



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 215**

51 Int. Cl.:
C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04707363 .0**

96 Fecha de presentación : **02.02.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1594436**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

54 Título: **Conjugados poliméricos de neublastina mutada.**

30 Prioridad: **31.01.2003 US 356264**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2011

73 Titular/es: **BIOGEN IDEC MA Inc.**
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US

72 Inventor/es: **Silvian, Laura;**
Rossomando, Anthony;
Pepinsky, R., Blake;
Miller, Stephan, S.;
Boriack-Sjodin, Paula, Ann y
Sah, Dinah, Wen-Yee

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 351 215 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

Conjugados poliméricos de neublastina mutada.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a química proteica, biología molecular, neurobiología, neurología, y tratamiento del dolor.

10 **Antecedentes de la invención**

Los factores neurotróficos son proteínas de origen natural que regulan la supervivencia neuronal durante el desarrollo y regulan la plasticidad e integridad estructural del sistema nervioso adulto. Los factores neurotróficos pueden aislarse de tejido neural y de tejido no neural. Durante los últimos veinte años, se han descubierto muchos factores neurotróficos. Estos factores neurotróficos pueden clasificarse en superfamilias, familias, subfamilias y especies individuales en base a su estructura y función.

Las superfamilias de factores neurotróficos incluyen la superfamilia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la superfamilia de neurotrofina, y la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). Los ligandos relacionados con el factor neurotrópico derivado de la línea celular glial (GDNF) son una familia de proteínas dentro de la superfamilia TGF- β . Los ligandos relacionados con GDNF incluyen GDNF, persefina (PSP), neurturina (NTN) y neublastina (NBN; conocida como artemina o enovina). Los miembros de la familia de ligandos relacionados con GDNF se distinguen por, entre otras cosas, sus siete restos de cisteína conservados. Estos restos forman puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares y dan lugar a la estructura terciaria y cuaternaria del ligando polipeptídico dimerizado. Los miembros de la familia también comparten la capacidad de inducir la señalización a través de un complejo receptor de múltiples componentes que consta de un co-receptor anclado a glucosilfosfatidilinositol (GPI) de la familia GFR α , un miembro de la subfamilia de ligandos relacionados con GDNF, y el receptor tirosina quinasa RET.

RET activado inicia una cascada de transducción de señales que es responsable, al menos en parte, de los efectos corriente abajo de los ligandos relacionados con GDNF. Por consiguiente, la activación de RET puede representar un aspecto deseable de una terapia que actúe a través de una vía del receptor GFR α para afectar a los procesos celulares corriente abajo.

La neublastina está clasificada dentro de la familia GDNF porque comparte regiones de homología con otros ligandos GDNF incluyendo el motivo de siete cisteínas (por ejemplo, como se describe en el documento EP02/02691, las publicaciones PCT US02/02319 y US02/06388), y a causa de su capacidad de unirse a, y activar, el receptor RET como parte de un complejo GFR α . Específicamente, la neublastina es muy selectiva para la unión al complejo receptor GFR α 3-RET. A este respecto, la neublastina contiene sub-regiones únicas en su secuencia de aminoácidos en comparación con otros miembros de la familia de ligandos relacionados con GDNF.

Los datos actuales sugieren que la neublastina puede tener un papel protector y regenerador en los sistemas nervioso periférico y central y, como resultado, puede ser útil como agente terapéutico para trastornos neurodegenerativos. Por ejemplo, los datos sugieren que la neublastina puede tener efectos promotores de la supervivencia sobre neuronas sensoriales cultivadas a partir de ganglios de la raíz dorsal y de los ganglios trigeminales, y sobre neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra cultivadas (Baloh *et al.*, Neuron 21: 1291-1302 (1998)). Por lo tanto parece que la neublastina puede promover la supervivencia de poblaciones neuronales incluyendo neuronas sensoriales y dopaminérgicas. Esto es importante porque la degeneración y disfunción de las neuronas está asociada con patologías. Por ejemplo, patologías de neuronas sensoriales y dopaminérgicas subyacen a neuropatía periférica y enfermedad de Parkinson, respectivamente.

Por lo tanto, la administración de neublastina puede ser útil, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades asociadas con degeneración y disfunción neuronal. Sin embargo, la neublastina se elimina rápidamente del cuerpo, lo que puede afectar al paradigma de dosificación de neublastina necesaria en aplicaciones terapéuticas. Por tanto, existe la necesidad de polipéptidos de neublastina mutada con biodisponibilidad potenciada. Por consiguiente, un objeto de la presente invención es identificar formas mutadas de neublastina que muestren biodisponibilidad potenciada.

60 **Sumario de la invención**

La invención proporciona un polipéptido de neublastina que es al menos un 80% idéntico a los aminoácidos 8-113 de la SEC ID N° 1 y que contiene una sustitución de una o más de la arginina en la posición 48, la arginina en la posición 49, o la arginina en la posición 51 con un resto de ácido glutámico. La invención también proporciona el polipéptido, en el que el resto de arginina en la posición 48 está sustituido con ácido glutámico. Como alternativa, se proporciona el polipéptido en el que el resto de arginina en la posición 49 está sustituido con ácido glutámico. También se proporciona el polipéptido, en el que el resto de arginina en la posición 51 está sustituido con ácido glutámico.

ES 2 351 215 T3

También se describen dímeros de neublastina mutada conjugada con polímero. Cada dímero contiene un primer polipéptido que comprende un primer aminoácido amino-terminal y un segundo polipéptido que comprende un segundo aminoácido amino-terminal. Cada polipéptido contiene individualmente: (a) una secuencia de aminoácidos caracterizada por una identidad de secuencia de al menos el 70%, 80%, 90%, o 95% con los aminoácidos 8-113 de la SEC ID N° 1; (b) un resto de cisteína en cada una de las posiciones 16, 43, 47, 80, 81, 109, y 111 (numeración de acuerdo con la SEC ID N° 1); (c) los siguientes restos aminoacídicos: C en la posición 16, L en la posición 18, V en la posición 25, L en la posición 28, G en la posición 29, L en la posición 30, G en la posición 31, E en la posición 36, F en la posición 40, R en la posición 41, F en la posición 42, C en la posición 43, G en la posición 45, C en la posición 47, C en la posición 80, C en la posición 81, R en la posición 82, P en la posición 83, F en la posición 91, D en la posición 93, S en la posición 105, A en la posición 106, C en la posición 109 y C en la posición 111; y (d) una repetición LGLG, un motivo FRFC, un motivo QPCCRP, y un motivo SATACGC. El dímero incluye al menos una sustitución aminoacídica (con respecto a la SEC ID N° 1), que proporciona un sitio interno de conjugación con polímero en el que se conjuga un polímero.

En este documento también se describe un dímero de neublastina mutada conjugada con polímero que contiene un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que cada polipéptido contiene los aminoácidos 90-140, por ejemplo, 95-120 ó 100-110, de la SEC ID N° 6 con 1-6 sustituciones aminoacídicas, proporcionando cada sustitución un sitio de conjugación con polímero en el que se conjuga un polímero. Los ejemplos de polipéptidos descritos en este documento incluyen NBN113 (SEC ID N° 2), NBN140 (SEC ID N° 6), NBN116 (SEC ID N° 7), NBN112 (SEC ID N° 8), NBN111 (SEC ID N° 9), NBN110 (SEC ID N° 10), NBN109 (SEC ID N° 11), NBN108 (SEC ID N° 12), NBN107 (SEC ID N° 13), NBN106 (SEC ID N° 14), NBN105 (SEC ID N° 15), NBN104 (SEC ID N° 16), NBN103 (SEC ID N° 17), NBN102 (SEC ID N° 18), NBN101 (SEC ID N° 19), NBN100 (SEC ID N° 20) y NBN99 (SEC ID N° 21).

Al menos uno de los dos aminoácidos amino-terminales en el dímero puede estar conjugado con un polímero. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el remplazo de un resto de arginina con un resto de lisina (Rn°aaK; donde n°aa es el número de aminoácido en base a la SEC ID N° 1), y el remplazo de un resto de asparagina con un resto de lisina (Nn°aaK) o un resto de aspartato (Nn°aaD). Ejemplos específicos de dicha sustitución son R14K, R39K, R68K, N95D, y N95K (numeración basada en la SEC ID N° 1). La sustitución puede ser N95K.

Como se describe en este documento, el peso molecular combinado total de los polímeros en un dímero puede ser de 20.000-40.000 Da. El peso molecular promedio de cada polímero puede ser de 2.000-100.000 Da; o de 5.000-50.000 Da o aproximadamente de 10.000 a 20.000 Da. El polímero puede ser lineal o ramificado. El polímero puede ser un resto de polialquilenglicol, por ejemplo, un resto de polietilenglicol (PEG). Al menos un polipéptido puede estar glucosilado.

Como se describe en este documento, el dímero conjugado con polímero contiene un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que: (a) cada polipéptido comprende individualmente los aminoácidos 100 a 110 de las SEC ID N° 1, (b) cada polipéptido comprende una sustitución de asparagina a lisina en el número de aminoácido 95 en la SEC ID N° 1, (c) y el dímero comprende 3 ó 4 restos de PEG, en el que el peso molecular de cada resto de PEG es de aproximadamente 10.000 Da, y cada resto de PEG está conjugado en un extremo amino o en la lisina 95. El dímero conjugado con polímero puede ser un homodímero que contiene un par de monómeros denominados 3(,4)x 10 kDa PEG NBN106-N95K.

En este documento también se describe una composición farmacéutica que comprende un dímero, como se describe en este documento. La composición puede contener dos o más dímeros diferentes, como se describe en este documento.

En este documento también se describe un ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión de Aunque codifica un polipéptido para su incorporación en un dímero, como se describe en este documento. En este documento también se describe una célula hospedadora transformada con el ácido nucleico.

En este documento se describe un uso para tratar el dolor neuropático en un mamífero. El uso incluye administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del dímero, como se describe en este documento. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de 0,1 $\mu\text{g/kg}$ a 1000 $\mu\text{g/kg}$, de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 $\mu\text{g/kg}$, o de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 30 $\mu\text{g/kg}$. La administración del dímero puede ser por diversas vías, por ejemplo, intramuscular, subcutánea o intravenosa. En algunos usos descritos en este documento, el dímero se administra tres veces por semana. En este documento también se describe un uso para activar el receptor RET en un mamífero con una cantidad eficaz del dímero.

Las características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

Salvo que se indique otra cosa, cualquier referencia a un número de posición aminoacídica de neublastina se referirá a la numeración ilustrada en la SEC ID N° 1.

ES 2 351 215 T3

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un especialista en la técnica a la que pertenece esta invención.

5 Como se usa en este documento, “polipéptido de neublastina de tipo silvestre” significa una secuencia polipeptídica de neublastina de origen natural. Un polipéptido de neublastina de tipo silvestre también puede definirse adicionalmente por la fuente de la neublastina, por ejemplo, neublastina humana, de ratón, o de rata (véase, por ejemplo, la SEC ID N° 2, 3 ó 4). Se proporciona una secuencia consenso del polipéptido de neublastina como SEC ID N° 1.

10 Como se usa en este documento, “polipéptido de neublastina mutada”, significa un polipéptido que contiene al menos un nivel mínimo especificado de identidad de secuencia con respecto a un polipéptido de neublastina de tipo silvestre, contiene al menos una sustitución, inserción o fusión de aminoácido, con respecto al polipéptido de neublastina de tipo silvestre, y presenta actividad neublastina (por ejemplo, como se describe en la solicitud internacional N° PCT/US02/02319 (documento WO 02/060929)).

15 Como se usa en este documento, “sitio interno de conjugación con polímero” significa un resto aminoacídico no terminal en un polipéptido de neublastina mutada, proporcionado dichos resto una cadena lateral para la conjugación de un polímero.

20 Como se usa en este documento, “polipéptido de neublastina modificado”, significa un polipéptido que contiene al menos un polímero unido.

Como se usa en este documento, “fusión” significa un enlace covalente, co-lineal de dos o más polipéptidos a través de sus estructuras peptídicas respectivas a través de expresión génica de una molécula polinucleotídica que codifica esas proteínas en la misma fase de lectura.

25 Como se usa en este documento, “identidad” se refiere a la similitud de secuencia entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad monomérica aminoacídica (por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, o una posición en cada uno de los dos polipéptidos está ocupada por una lisina), entonces las moléculas respectivas son homólogas en esa posición. El “porcentaje de identidad” entre dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones coincidentes compartidas por las dos secuencias dividida por la cantidad de posición comparadas x 100. Por ejemplo, si coinciden 6 de 10 posiciones en dos secuencias, entonces las dos secuencias tienen una identidad del 60%. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparte una homología del 50% (3 de las 6 posiciones totales son coincidentes). Generalmente, se hace una comparación cuando se alinean dos secuencias para dar una homología máxima. Dicho alineamiento puede proporcionarse usando, por ejemplo, el método de Needleman *et al.*, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970), aplicado convenientemente por programas informáticos tales como el programa Align (DNASTar, Inc.). Secuencias “similares” son aquellas que, cuando se alinean, comparten restos aminoacídicos idénticos y similares, donde restos similares son sustituciones conservativas para, o “butacones puntuales permitidas” de restos aminoacídicos correspondientes en una secuencia de referencia alineada. A este respecto, una “sustitución conservativa” de un resto en una secuencia de referencia es una sustitución por un resto que es física o funcionalmente similar al resto de referencia correspondiente, por ejemplo, que tiene un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Por tanto, una secuencia “mutada con sustitución conservativa” es una que difiere de una secuencia de referencia o una secuencia de tipo silvestre porque están presentes una o más sustituciones conservativas o mutaciones puntuales permitidas. El “porcentaje positivo” entre dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones que contienen restos coincidentes o sustituciones conservativas compartidas por las dos secuencias dividida por la cantidad de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si coinciden 6 de 10 posiciones en dos secuencias y 2 de 10 posiciones contienen sustituciones conservativas, entonces las dos secuencias tienen una homología positiva del 80%.

Polipéptidos de neublastina mutada

55 Los polipéptidos de neublastina mutada descritos en este documento retienen actividad neurotrófica y tienen bio-disponibilidad potenciada en comparación con el polipéptido de neublastina de tipo silvestre. Por ejemplo, las neublastinas mutadas descritas en este documento activan el producto génico RET en ensayos en los que la neublastina de tipo silvestre activa RET. Se describen polipéptidos de neublastina mutada que retendrán al menos una de las siguientes características pero comprenderán adicionalmente al menos una modificación, de modo que se cree un sitio interno de conjugación con polímero:

60 (i) siete restos de cisteína conservados en las posiciones 16, 43, 47, 80, 81, 109, y 111 cuando se numeran de acuerdo con las SEC ID N° 1-4;

(ii) los siguientes restos aminoacídicos:

C en la posición 16, L en la posición 18, V en la posición 25, L en la posición 28, G en la posición 29, L en la posición 30, G en la posición 31, E en la posición 36, F en la posición 40, R en la posición 41, F en la posición 42, C

5

10

15

20

25

30

45

rata (SEC ID N1 4)

consenso (SEC ID N° 1)

50

60

65

Tabla 1B. Secuencia consenso de NBM13

Secuencia consenso: (SEC ID N° 1)

Ala Gly Xaa1 Xaa2 Xaa3 Ser Arg Ala Arg Xaa4 Xaa5 Xaa6 Ala Arg Gly Cys
 Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Xaa7 Ala Leu Gly Leu Gly His Xaa8 Ser
 Asp Glu Leu Xaa9 Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg
 Ser Xaa10 His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg
 Xaa11 Pro Pro Gly Ser Arg Pro Xaa12 Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
 Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp
 Xaa13 Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly

donde:

Xaa ₁ es Gly o Thr	Xaa ₆ es Gly o Asp	Xaa ₁₁ es Pro o Ser
Xaa ₂ es Pro o Arg	Xaa ₇ es Arg o Ser	Xaa ₁₂ es Val o Ile
Xaa ₃ es Gly o Ser	Xaa ₈ es Arg o Ser	Xaa ₁₃ es Arg o His
Xaa ₄ es Ala o Thr	Xaa ₉ es Val o Ile	
Xaa ₅ es Ala o Thr	Xaa ₁₀ es Pro o Gln	

En este documento también se describe un polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero que comprende una secuencia de aminoácidos es decir, por ejemplo, al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-113 de la SEC ID N° 1 (también mostrada en la Tabla 1). En el mismo, puede remplazarse una o más de las argininas en la posición 14, posición 39, posición 68, o las asparagina en la posición 95 por un aminoácido diferente de arginina o asparagina. En el mismo, el aminoácido de tipo silvestre puede sustituirse con lisina o cisteína.

Los restos sustituidos en el polipéptido de neublastina mutada pueden elegirse para facilitar el acoplamiento de un polímero, por ejemplo, un polímero de polialquilenglicol, en el aminoácido sustituido. Los sitios ventajosos de modificación son aquellos en regiones accesibles al disolvente en el polipéptido de neublastina. Dichos sitios pueden elegirse en base a una inspección de la estructura cristalina del factor neurotrófico relacionado, tal como GDNF, cuya estructura cristalina se describe en Eigenbrot *et al.*, Nat. Struct. Biol. 4:435-38, 1997. Los sitios también pueden elegirse en base a la estructura cristalina de la neublastina, cuya cristalización y determinación de la estructura se describe a continuación. Además, los sitios pueden elegirse en base a la información estructural-funcional proporcionada para proteínas quiméricas persefina/neublastina. Estas quimeras se describen en Baloh *et al.*, J. Biol. Chem. 275:3412-20, 2000. Se expone una lista de aminoácidos de neublastina accesibles al disolvente o expuestos en superficie identificados a través de esta metodología en la Tabla 2.

La Tabla 2 proporciona una lista de restos y números en neublastina humana que se espera que estén expuestos en superficie. La primera columna se refiere a restos expuestos en superficie determinados examinando la estructura del dímero GDNF de rata formado por las cadenas A y B (PDB código 1AGQ) y determinando si un resto estaba en la superficie de la estructura. Esta estructura después se comparó con una alineación de secuencia de GDNF y neublastina en Baloh *et al.*, Neuron 21:1291-1302, 1998 para determinar los restos apropiados en neublastina. La segunda y tercera columnas, respectivamente, se refieren a los restos expuestos en superficie determinados examinando la estructura del dímero de neublastina humana formado por las cadenas A y B. El esquema de numeración en la Tabla 2 es el mostrado en la Tabla 1.

Tabla 2

1	Ala n n n	21	Gln + + +	41	Arg + + +	61	Leu ---	81	Cys ---	101	Val - + +
2	Gly n n n	22	Leu + + +	42	Phe + - -	62	Leu + + +	82	Arg ---	102	Asp + + +
3	Gly n n n	23	Val ---	43	Cys ---	63	Gly + + +	83	Pro ---	103	Arg + + +
4	Pro n n n	24	piro + + +	44	Ser + - -	64	Ala + + +	84	Thr + + +	104	Leu ---
5	Gly n n n	25	Val ---	45	Gly + - -	65	Gly + + +	85	Arg + + +	105	Ser ---
6	Ser n n n	26	Arg + + +	46	Ser + + +	66	Ala + + +	86	Tyr + + +	106	Ala ---
7	Arg n n n	27	Ala + - -	47	Cys ---	67	Leu ---	87	Glu + + +	107	Thr + + +
8	Ala n n n	28	Leu ---	48	Arg + + +	68	Arg n + +	88	Ala + + +	108	Ala + + +
9	Arg n n n	29	Gly + + +	49	Arg + + +	69	Pro n + +	89	Val + - -	109	Cys ---
10	Ala n n n	30	Leu + + +	50	Ala - + +	70	Pro n - -	90	Ser + + +	110	Gly + - -
11	Ala n n n	31	Gly + + +	51	Arg + + +	71	Pro n + +	91	Phe ---	111	Cys ---
12	Gly + n n	32	His + + +	52	Ser + + +	72	Gly + + +	92	Met + + +	112	Leu + + +
13	Ala - n n	33	Arg + + +	53	Pro + + +	73	Ser + + +	93	Asp + - -	113	Gly n - -
14	Arg + + n	34	Ser ---	54	His ---	74	Arg n + +	94	Val + + +		
15	Gly + - +	35	Asp + + +	55	Asp ---	75	Pro n - -	95	Asn + + +		
16	Cys ---	36	Glu + + +	56	Leu + + +	76	Val - + +	96	Ser + + +		
17	Arg + + +	37	Leu + + +	57	Ser ---	77	Ser ---	97	Thr + + +		
18	Leu + + +	38	Val ---	58	Leu ---	78	Gln + + +	98	Trp + + +		
19	Arg + - -	39	Arg + + +	59	Ala + - -	79	Pro ---	99	Arg + + +		
20	Ser + + +	40	Phe ---	60	Ser + + +	80	Cys ---	100	Thr + + +		

n indica que los restos no están presentes en las estructuras de GDNF o neublastina. Esto es a causa del diseño de la construcción, las regiones flexibles, o insertos en neublastina con relación a GDNF (restos 68-71).

- indica que los restos están sepultados y no sobre la superficie o son restos de cisteína implicados en enlaces disulfuro. Como esta proteína es un lazo de cisteína, una inmensa mayoría de los restos está sobre la superficie.

+ indica que este resto está expuesto en superficie en la estructura de GDNF o en la estructura de neublastina, aunque el bucle que contiene los restos 66-75 es visible solamente en uno de los monómeros GDNF (supuestamente flexible). Este bucle también contiene un inserto de 4 restos en neublastina con relación a GDNF.

Los polipéptidos de neublastina descritos en este documento pueden retener los siete restos Cys conservados que son característicos de la subfamilia GDNF y de la superfamilia TGF-beta.

La secuencia del prepolipéptido NBN de longitud completa humano (SEC ID N° 5) se muestra en la Tabla 3. Se identificaron tres formas maduras de polipéptidos de neublastina. Estas formas incluyen:

(i) el polipéptido de 140 AA denominado en este documento como NBN140, que tiene la secuencia de aminoácidos denominada SEC ID N° 6;

(ii) el polipéptido de 116 AA denominado en este documento como NBN116, que tiene la secuencia de aminoácidos denominada SEC ID N° 7; y

(iii) el polipéptido de 113 AA denominado en este documento como NBN113, que tiene la secuencia de aminoácidos denominada SEC ID N° 2.

ES 2 351 215 T3

La Tabla 3 ilustra la relación entre las secuencias descritas del prepolipéptido de neublantina descrito en este documento. La línea 1 proporciona el polipéptido de la SEC ID N° 5, la línea 2 proporciona el polipéptido de la SEC ID N° 6, la línea 3 proporciona el polipéptido de la SEC ID N° 7 y la línea 4 proporciona el polipéptido de la SEC ID N° 2. Los siete restos de cisteína conservados se denominan por símbolos (“*”, “#”, “+” y “[]”) para indicar los puentes 5 disulfuro intramoleculares (* con *, # con #, y + con +) e intermoleculares (“[]”) formados en el ligando de neublantina dimerizada madura. La marca de intercalación (“^”) indica el resto de asparagina en la posición del aminoácido 95 que está sustituido con una lisina en NBN106-N95K.

Tabla 3. Secuencias del polipéptido NBN

10 15 20 25 30 35 40 45	 PrePro-----MELGLGGLSTLSHCWPERRQPALWPTLAALL 3 ----- NBN140----- NBN116----- NBN113----- PreProSSVAEASLGSA PRSPAPREGPPV LASPAGHLPGERTARWC SGRARRPPP 83 NBN140-----PPP 3 NBN116----- NBN113----- PreProQPSRPAD PPPAPP SALPRGGRAARAGSG PSRRARAAGARGCRLRSOLVPVR 133 NBN140QPSRPAD PPPAPP SALPRGGRAARAGSG PSRRARAAGARGCRLRSOLVPVR 53 NBN116-----PARACSGPSRARAAGARGCRLRSOLVPVR 29 NBN113-----SSGPSRARAAGARGCRLRSOLVPVR 26 * PreProALGLGHRSD ELVRFRC SGSCRRARS PHDSL ASLL GAGAL RPP PGSRPV 183 NBN140ALGLGHRSD ELVRFRC SGSCRRARS PHDSL ASLL GAGAL RPP PGSRPV 103 NBN116ALGLGHRSD ELVRFRC SGSCRRARS PHDSL ASLL GAGAL RPP PGSRPV 79 NBN113ALGLGHRSD ELVRFRC SGSCRRARS PHDSL ASLL GAGAL RPP PGSRPV 76 # + PreProSQPCCRPTR YEAVS FMDVN STWR TVDR LSAT ACCLG 220 (SEC ID Nº 5) NBN140SQPCCRPTR YEAVS FMDVN STWR TVDR LSAT ACCLG 140 (SEC ID Nº 6) NBN116SQPCCRPTR YEAVS FMDVN STWR TVDR LSAT ACCLG 116 (SEC ID Nº 7) NBN113SQPCCRPTR YEAVS FMDVN STWR TVDR LSAT ACCLG 113 (SEC ID Nº 2) * ^ # +
--	---

50 La secuencia de los polipéptidos de neublastina identificados anteriormente puede estar truncada en su secuencia de aminoácidos amino-terminal. Los ejemplos de éstas, que se describen en este documento, incluyen:

(iv) la secuencia del polipéptido de 112 AA denominado en este documento como NET1112, que tiene los 112 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 29-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 8) o los aminoácidos 2-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

(v) la secuencia del polipéptido de 111 AA denominado en este documento como NBN111, que tiene los 111 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 30-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 9) o los aminoácidos 3-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

(vi) la secuencia del polipéptido de 110 AA denominado en este documento como NBN110, que tiene los 110 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 31-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 10) o los aminoácidos 4-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

65 (vii) la secuencia del polipéptido de 109 AA denominado en este documento como NBN109, que tiene los 109 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 32-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 11) o los aminoácidos 5-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

ES 2 351 215 T3

(viii) la secuencia del polipéptido de 108 AA denominado en este documento como NBN108, que tiene los 108 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 33-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 12) o los aminoácidos 6-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

5 (ix) la secuencia del polipéptido de 107 AA denominado en este documento como NBN107, que tiene los 107 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 34-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 13) o los aminoácidos 7-113 de la SEC ID N° 1, 3 ó 4.

10 (x) la secuencia del polipéptido de 106 AA denominado en este documento, como alternativa, como NBN106 o N-7, que tiene los 106 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 35-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 14) o los aminoácidos 8-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

15 (xi) la secuencia del polipéptido de 105 AA denominado en este documento como NBN105, que tiene los 105 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 36-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 15) o los aminoácidos 9-113 de la SEC ID N° 1, 3 ó 4.

20 (xii) la secuencia del polipéptido de 104 AA denominado en este documento, como alternativa, como NBN104 o N-9, que tiene los 104 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 37-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 16) o los aminoácidos 10-113 de la SEC ID N° 1, 3 ó 4.

(xiii) la secuencia del polipéptido de 103 AA denominado en este documento como NBN103, que tiene los 103 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 38-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 17) o los aminoácidos 11-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

25 (xiv) la secuencia del polipéptido de 102 AA denominado en este documento como NBN102, que tiene los 102 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 39-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 18) o los aminoácidos 12-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

30 (xv) la secuencia del polipéptido de 101 AA denominado en este documento como NBN101, que tiene los 101 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 40-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 19) o los aminoácidos 13-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

35 (xvi) la secuencia del polipéptido de 100 AA denominado en este documento como NBN100, que tiene los 100 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 41-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 20) o los aminoácidos 14-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

40 (xvii) la secuencia del polipéptido de 99 AA denominado en este documento, como alternativa, como NBN99 o N-14, que tiene los 99 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, por ejemplo, los aminoácidos 42-140 de la SEC ID N° 6 (SEC ID N° 21) o los aminoácidos 15-113 de las SEC ID N° 1, 3 ó 4.

Las secuencias polipeptídicas de estos polipéptidos de neublastina truncados se muestran en la Tabla 4 para NBN113 a NBN99. La formación del puente disulfuro es como se describe para la Tabla 3.

Tabla 4. Alineación de polipéptidos de neublastina truncados

	10	20	30	40	50	
NBN113	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 50
NBN112	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 49
NBN111	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 48
NBN110	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 47
NBN109	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 46
NBN108	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 45
NBN107	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 44
NBN106	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 43
NBN105	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 42
NBN104	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 41
NBN103	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 40
NBN102	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 39
NBN101	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 38
NBN100	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 37
NBN99	AGG	GSRAA	AGARGCRLRSQ	LVFVRALGLGHR	SDELVRF	FCGSGSCRRA 36
	*			#	+	

ES 2 351 215 T3

		60	70	80	90	100	
	NBN113	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 100
5	NBN112	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 99
	NBN111	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 98
	NBN110	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 97
	NBN109	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 96
	NBN108	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 95
	NBN107	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 94
10	NBN106	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 93
	NBN105	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 92
	NBN104	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 91
	NBN103	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 90
	NBN102	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 89
	NBN101	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 88
15	NBN100	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 87
	NBN99	RSPHDL	SLASLL	GAGALR	PPPGSR	PVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT 86
					*		
20			110				
	NBN113	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 2) 113
	NBN112	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 8) 112
	NBN111	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 9) 111
	NBN110	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 10) 110
	NBN109	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 11) 109
25	NBN108	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 12) 108
	NBN107	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 13) 107
	NBN106	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 14) 106
	NBN105	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 15) 105
	NBN104	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 16) 104
30	NBN103	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 17) 103
	NBN102	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 18) 102
	NBN101	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 19) 101
	NBN100	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 20) 100
35	NBN99	VDRLS	ATACGCLG				(SEC ID N° 21) 99
			# +				

Un polipéptido de neublastina mutada de acuerdo con la invención es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a los aminoácidos 8-113 de la SEC ID N° 1. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina mutada incluye la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de neublastina de rata, ser humano o ratón de origen natural en los aminoácidos 1-94 y 96-113 del polipéptido de neublastina mutada, por ejemplo, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N° 2, 3 ó 4 en estas posiciones.

Un polipéptido de neublastina mutada que difiere en la secuencia de los descritos en las SEC ID N° 1-4 puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. Como alternativa, o adicionalmente, el polipéptido de neublastina mutada puede diferir en una o más sustituciones de aminoácidos no conservativas, o en delecciones o inserciones. Las sustituciones, inserciones o delecciones no deben eliminar la actividad biológica de la proteína aislada.

Una sustitución conservativa es la sustitución de un aminoácido por otro con características similares. Las sustituciones conservativas incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, alanina y glicina; leucina, valina, e isoleucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina, cisteína, y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Los aminoácidos hidrófobos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier sustitución de un miembro de los grupos polar, básico o ácido mencionados anteriormente por otro miembro del mismo grupo puede considerarse una sustitución conservativa.

Los especialistas en la técnica pueden identificar fácilmente otras sustituciones. Por ejemplo, para el aminoácido alanina, puede adoptarse una sustitución entre uno cualquiera de D-alanina, glicina, beta-alanina, cisteína y D-cisteína. Para lisina, un replazo puede ser uno cualquiera de D-lisina, arginina, D-arginina, homo-arginina, metionina, D-metionina, ornitina, o D-ornitina. Generalmente, las sustituciones en regiones funcionalmente importantes que puede esperarse que induzcan cambios en las propiedades de polipéptidos aislados son aquellas en las que: (i) un resto polar, por ejemplo, serina o treonina, sustituye o se sustituye por un resto hidrófobo, por ejemplo, leucina, isoleucina, fenilalanina, o alanina; (ii) un resto de cisteína sustituye o se sustituye por cualquier otro resto; (iii) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisina, arginina o histidina, sustituye o se sustituye por un resto que tiene una cadena lateral electronegativa, por ejemplo, ácido glutámico o ácido aspártico; o (iv) un resto que

tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, sustituye o se sustituye por uno que no tiene dicha cadena lateral, por ejemplo, glicina. La probabilidad de que una de las sustituciones no conservativas anteriores pueda alterar las propiedades funcionales de la proteína también está correlacionada con la posición de la sustitución con respecto a regiones funcionalmente importantes de la proteína. Algunas sustituciones no conservativas pueden tener, por consiguiente, poco o ningún efecto sobre las propiedades biológicas.

En muchos casos, un polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero tiene una vida media en suero más larga con relación a la vida media del polipéptido de tipo silvestre o el polipéptido mutado en ausencia del polímero. El polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero puede tener una potencia significativamente aumentada *in vivo* con relación a la potencia del polipéptido o polipéptido glucosilado en ausencia del polímero.

El polipéptido de neublastina conjugado con polímero puede proporcionarse en forma de un dímero que incluye al menos un polipéptido de neublastina conjugado con polímero. El dímero puede ser un homodímero de polipéptidos de neublastina mutada conjugados con polímero. El dímero puede ser un homodímero de polipéptidos de neublastina mutada truncados conjugados con polímero. El dímero puede ser un heterodímero que incluye un polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero y un polipéptido de neublastina de tipo silvestre. El dímero puede ser un heterodímero que incluye un polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero, y un polipéptido de neublastina conjugado con polímero de tipo silvestre donde la conjugación del polímeros es en el extremo amino, y donde los polipéptidos pueden estar o no truncados. Otros dímeros pueden incluir heterodímeros u homodímeros de formas de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero que pueden o no estar truncadas.

En la invención se proporcionan secuencias polipeptídicas mutadas maduras y truncadas que comprende los restos aminoacídicos más carboxi-terminales del polipéptido preproNBN, tal como se proporciona en la SEC ID N° 5, y que se denominan en este documento como NBNn°, donde n° representa el número de restos carboxi-terminales que quedan en el polipéptido de neublastina referenciado. Los polipéptidos de neublastina conjugados con polímero presentes en los dímeros de neublastina bioactivos pueden ser productos de una reacción de escisión con proteasa o una reacción de escisión química, o pueden expresarse a partir de una construcción de ADN recombinante, o pueden sintetizarse. Los ejemplos de polipéptidos de neublastina incluyen, por ejemplo, NBN140, NBN116, y NBN113. Polipéptidos adicionales de neublastina de la invención incluyen NBN112, NBN111, NBN110, NBN109, NBN108, NBN107, NBN106, NBN105, NBN104, NBN103, NBN102, NBN101, NBN100 y NBN99 (SEC ID N° 8-21).

También se describe un polipéptido de neublastina conjugado con polímero que es un homodímero de NBN106-N95K conjugado a tres restos de PEG de 10 kDa ("3x10 kDa PEG NBN106-N95K") o a cuatro restos de PEG de 10 kDa ("4x10 kDa PEG NBN106-N95K"). También se describe una población mixta de homodímeros NBN106-N95K conjugados a tres restos de PEG de 10 kDa o a cuatro restos de PEG de 10 kDa, mencionado en este documento como "3(4)x10 kDa PEG NBN106-N95K". También se prefiere un homodímero 3(4)x10 kDa PEG NBN106-N95K, en el que los dos aminoácidos amino-terminales están unidos covalentemente a restos de PEG y el tercer y/o cuarto resto de PEG está unido covalentemente a uno o ambos restos N95K sustituidos.

El polipéptido de neublastina conjugado con polímero puede estar basado en la secuencia consenso de la SEC ID N° 1, y puede incluir los aminoácidos 1-7 de la SEC ID N° 1 además de los aminoácidos 8-113.

El polipéptido de neublastina conjugado con polímero, cuando está dimerizado, puede unirse a GFR α 3. El polipéptido de neublastina conjugado con polímero, cuando está dimerizado, puede estimular la fosforilación de tirosina de un polipéptido RET, por sí mismo o cuando está unido a GFR α 3.

El polipéptido de neublastina conjugado con polímero, cuando está dimerizado, puede potenciar la supervivencia de las neuronas, por ejemplo, potenciar la supervivencia de neuronas sensoriales.

El polipéptido de neublastina conjugado con polímero, cuando está dimerizado, puede reducir o revertir los cambios patológicos de una neurona, tal como una neurona sensorial.

El polipéptido de neublastina conjugado con polímero, cuando está dimerizado, puede potenciar la supervivencia de una neurona, por ejemplo, una neurona autonómica, o una neurona dopaminérgica.

Como se describe, el polipéptido de neublastina conjugado con polímero puede incluir una, dos, tres, cuatro o más de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo compuesto por un aminoácido diferente de arginina en la posición 14 en la secuencia de aminoácidos del polipéptido conjugado con polímero, un aminoácido diferente de arginina en la posición 39 en la secuencia de aminoácidos del polipéptido conjugado con polímero, un aminoácido diferente de arginina en la posición 68 del polipéptido conjugado con polímero, y un aminoácido diferente de asparagina en la posición 95 del polipéptido conjugado con polímero. El aminoácido en uno o más de los aminoácidos en las posiciones 14, 39, 68, y 95 puede ser lisina. Los aminoácidos 8-94 y 96-113 del polipéptido de neublastina conjugado con polímero pueden ser al menos un 90% idénticos a los aminoácidos 8-94 y 96-113 de la SEC ID N° 1. Las secuencias de aminoácidos pueden ser al menos un 95% idénticas a la misma. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina conjugado con polímero puede incluir la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de neublastina humano, de ratón o de rata de origen natural en los aminoácidos 8-94 y 96-113 del polipéptido de neublastina conjugado con polímero. Por ejemplo, los aminoácidos 8-94 y 96-113 del polipéptido de neublastina conjugado con polímero pueden incluir la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 8-94 y 96-113 de

ES 2 351 215 T3

la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4. Para los anteriores polipéptidos, el resto en la posición aminoacídica 95 puede ser una lisina o una cisteína.

En este documento se describe una construcción que es un heterodímero o un homodímero que contiene proteínas de fusión de neublastina conjugadas con polímero, por ejemplo, la neublastina marcada con polihistidina (His) proporcionada en SEC ID N° 36, o una proteína de fusión de neublastina donde el resto de fusión es un polipéptido de inmunoglobulina (Ig), un polipéptido de albúmina sérica o un polipéptido derivado de replicasa. Las proteínas de fusión de neublastina pueden tener propiedades farmacocinéticas y de biodisponibilidad potenciadas *in vivo*.

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina maduro o truncado, con una secuencia polipeptídica mutada. La molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina proporcionado se proporciona preferiblemente en un vector, por ejemplo, un vector de expresión. Una molécula de ácido nucleico de neublastina mutada, o a vector que incluya la misma, puede proporcionarse en una célula. La célula puede ser, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de insecto, o una célula bacteriana. Una célula de mamífero preferida es una célula de ovario de hámster chino ("célula CHO").

También se describe en este documento un método para fabricar un polipéptido de neublastina conjugado con polímero, cultivando una célula que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina en condiciones que permiten la expresión de un polipéptido de neublastina. La neublastina puede conjugarse a un resto de origen natural. El resto de origen natural puede ser un resto glucosilo. La neublastina glucosilada puede expresarse, por ejemplo, en una célula CHO. El polipéptido de neublastina puede expresarse en una célula. En este documento se describen ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras, y métodos de producción de polipéptido similares para las proteínas de fusión (tales como las proteínas de fusión neublastina-albúmina sérica) descritas en este documento.

Un polipéptido de neublastina que se expresa en una célula puede recuperarse y conjugarse con un polímero. El polímero puede ser un resto de polialquilenglicol. El polímero puede ser un resto de PEG.

En este documento se describe una composición que incluye un polipéptido de neublastina mutada acoplado a un polímero de origen no natural. El polipéptido de neublastina mutada en la composición puede incluir una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-113 de la SEC ID N° 1, con la condición de que el polipéptido de neublastina conjugado con polímero incluya una o más de las sustituciones aminoacídicas seleccionadas entre el grupo compuesto por un aminoácido diferente de arginina en la posición 14 en la secuencia de aminoácidos del polipéptido conjugado con polímero, un aminoácido diferente de arginina en la posición 39 en la secuencia de aminoácidos del polipéptido conjugado con polímero, un aminoácido diferente de arginina en la posición 68 del polipéptido conjugado con polímero, y un aminoácido diferente de asparagina en la posición 95 del polipéptido conjugado con polímero, donde las posiciones de los aminoácidos están numeradas de acuerdo con la secuencia del polipéptido de la SEC ID N° 1.

En este documento también se describe un polipéptido de neublastina conjugado, estable, soluble en agua o un complejo de polipéptido de neublastina mutada que comprende un polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada acoplado a un resto de PEG, donde el polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada está acoplado al resto de PEG por un enlace inestable. El enlace inestable puede escindirse por hidrólisis bioquímica, proteólisis, o escisión de sulfhidrilo. El enlace inestable puede escindirse en condiciones *in vivo*.

En este documento también se describe un método para fabricar un polipéptido de neublastina modificado que tiene vida media en suero prolongada con relación a una neublastina de tipo silvestre. El método incluye proporcionar un polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada, y acoplar el polipéptido o polipéptido de neublastina mutada a un resto polimérico de origen no natural, formando de este modo una composición de polipéptido de neublastina y polímero acoplados.

Los polipéptidos de neublastina mutada conjugados con polímero descritos en este documento incluyen una o más sustituciones aminoacídicas en las que, por ejemplo, existe un aminoácido diferente de arginina en la posición 14 en la secuencia de aminoácidos del polipéptido conjugado con polímero, existe un aminoácido diferente de arginina en la posición 39 en la secuencia de aminoácidos del polipéptido conjugado con polímero, existe un aminoácido diferente de arginina en la posición 68 en el polipéptido conjugado con polímero, o existe un aminoácido diferente de asparagina en la posición 95 en el polipéptido conjugado con polímero, cuando las posiciones de los aminoácidos están numeradas de acuerdo con la secuencia del polipéptido de la SEC ID N° 1.

Síntesis y Aislamiento de Polipéptidos de Neublastina de Tipo Silvestre y Mutada

Los polipéptidos de neublastina pueden aislarse usando métodos conocidos en la técnica. Los polipéptidos de neublastina de origen natural pueden aislarse de fuentes celulares o tisulares por un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. Como alternativa, los polipéptidos de neublastina mutada pueden sintetizarse químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales. La síntesis de cortas secuencias de aminoácidos está bien establecida en la técnica peptídica. Véase, por ejemplo, Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis (2ª ed., 1984).

En algunas realizaciones, los polipéptidos de neublastina mutada se producen por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina mutada puede insertarse en un vector, por ejemplo, un vector de expresión, y el ácido nucleico puede introducirse en una célula. Las células adecuadas incluyen, por ejemplo, células de mamífero (tal como células humanas o células CHO), células fúngicas, células de levadura, células de insecto, y células bacterianas. Cuando se expresa en una célula recombinante, la célula preferiblemente se cultiva en condiciones que permiten la expresión de un polipéptido de neublastina mutada. El polipéptido de neublastina mutada puede recuperarse de una suspensión celular si se desea. Como se usa en este documento, “recuperarse” significa que el polipéptido mutado se retira de aquellos componentes de una célula o medio de cultivo en el que está presente antes del proceso de recuperación. El proceso de recuperación puede incluir una o más etapas de replegamiento o purificación.

Los polipéptidos de neublastina mutada pueden construirse usando cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Uno de dichos métodos es mutagénesis dirigida al sitio, en el que se cambia un nucleótido específico (o, si se desea una pequeña cantidad de nucleótidos específicos) para cambiar un único aminoácido (o, si se desea, una pequeña cantidad de restos aminoácidos predeterminados) en el polipéptido de neublastina codificado. Lo especialistas en la técnica reconocen que la mutagénesis dirigida al sitio es una técnica rutinaria y ampliamente usada. De hecho, están disponibles en el mercado muchos kits de mutagénesis dirigida al sitio. Uno de dichos kit es el “Transformer Site Directed Mutagenesis Kit” vendido por Clontech Laboratories (Palo Alto, Calif.).

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, química proteica, e inmunología, que está dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se describen en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición. (Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D.N. Glover, ed), 1985; *Oligonucleotide Synthesis*, (M.J. Gait, ed.), 1984; patente de Estados Unidos N° 4.683.195 (Mullis *et al.*); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Haines and S.J. Higgins, eds.), 1984; *Transcription and Translation* (B.D. Hames and S.J. Higgins, eds.), 1984; *Culture of Animal Cells* (R.I. Freshney, ed). Alan R. Liss, Inc., 1987; *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, 1986; *A Practical Guide to Molecular Cloning* (13.Perbal), 1984; *Methods in Enzymology*, Volúmenes 154 y 155 (Wu *et al.*, eds), Academic Press, Nueva York; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.H. Miller and M.P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds.), Academic Press, Londres, 1987; *Handbook of Experiment Immunology*, Volúmenes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.), 1986; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

Conjugación con Polímero de Polipéptidos de Neublastina

Los especialistas en la técnica pueden preparar polipéptidos de neublastina modificados químicamente en base a la presente descripción. Los restos químicos preferidos para la conjugación con un polipéptido de neublastina son polímeros solubles en agua. Un polímero soluble en agua es ventajoso porque la proteína a la que se une no precipita en un entono acuoso, tal como un entorno fisiológico. El polímero puede ser farmacéuticamente aceptable para la preparación de un producto o composición terapéutica.

Si se desea, puede emplearse una única molécula de polímero para la conjugación con un polipéptido de neublastina, aunque puede unirse también más de una molécula de polímero. Las composiciones de neublastina conjugada descritas en este documento pueden encontrar utilidad en aplicaciones tanto *in vivo* como no *in vivo*. Además, se reconocerá que el polímero de conjugación puede utilizar cualquier otro grupo, resto, u otra especie conjugada, según sea apropiado para la aplicación de uso final. A modo de ejemplo, puede ser útil en algunas aplicaciones unir covalentemente al polímero un resto funcional que confiera resistencia a la degradación por UV, o antioxidación, u otras propiedades o características al polímero. Como ejemplo adicional, puede ser ventajoso en algunas aplicaciones funcionalizar el polímero para volverlo reactivo o con carácter reticulable, para potenciar diversas propiedades o características del material conjugado global. Por consiguiente, el polímero puede contener cualquier funcionalidad, grupos de repetición, uniones, u otras estructuras constituyentes que no imposibiliten la eficacia de la composición de neublastina conjugada para su propósito pretendido.

Un especialista en la técnica será capaz de seleccionar el polímero deseado en base a dichas consideraciones como si el conjugado polímero/proteína se usará terapéuticamente, y si es así, la dosificación deseada, el tiempo en circulación, la resistencia a proteólisis, y otras consideraciones. La eficacia de la derivatización puede averiguarse administrando el derivado, en la forma deseada (por ejemplo, por bomba osmótica o, más preferiblemente, por inyección o infusión, o formularse adicionalmente para las vías de suministro oral, pulmonar u otras vías de suministro), y determinando su eficacia.

Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen, aunque sin limitación, PEG, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (u homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona) PEG, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos.

El polímero puede ser de cualquier pero molecular adecuado, y puede ser ramificado o no ramificado.

Para PEG, el peso molecular promedio adecuado es entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa. Esto proporciona facilidad de manipulación y fabricación. Los especialistas en la técnica apreciarán que en preparaciones de PEG, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular indicado. Por tanto, el peso molecular se especifica típicamente como “peso molecular promedio”. Pueden usarse otros pesos moleculares (ta-
 5 maños), dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada; los efectos, si los hay, sobre la actividad biológica; la facilidad de manipulación; el grado o ausencia de antigenicidad y otros efectos conocidos de PEG sobre una proteína terapéutica). En diversas realizaciones, el peso molecular es de aproximadamente 2 kDa, aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproxima-
 10 damente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, aproximadamente 40 kDa o aproximadamente 100 kDa. El peso molecular promedio de cada cadena de PEG puede ser de aproximadamente 20 kDa. El peso mole-
 cular promedio puede ser de aproximadamente 10 kDa.

La cantidad de moléculas de polímero así unidas puede variar, y un especialista en la técnica será capaz de averiguar el efecto sobre la función. Se puede monoderivatizar, o se puede proporcionar una di-, tri-, tetra-derivatización o alguna
 15 combinación de derivatización, con los mismos o diferentes restos químicos (por ejemplo, polímeros, tales como diferentes pesos de PEG). La proporción de moléculas de polímero a moléculas de proteína (o polipéptido) variará, así como lo harán sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la proporción óptima (en términos de eficacia de reacción en que no hay exceso de proteína o polímero sin reaccionar) se determinará por factores tales como el
 20 grado deseado de derivatización (por ejemplo, mono, di-, tri-, etc.), el peso molecular del polímero seleccionado, si el polímero está ramificado o no ramificado, y las condiciones de reacción.

Las moléculas de PEG (u otros restos químicos) deben unirse a la proteína con la consideración de los efectos sobre dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Existen varios métodos de unión disponibles para los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 401384 (acoplamiento de PEG a G-CSF); Malik *et al.*, Exp.
 25 Hematol. 20: 1028-1035, 1992 (que informa de la PEGilación de GM-CSF usando cloruro de tresilo).

Por ejemplo, el PEG puede unirse covalentemente (PEGilación) a través de restos aminoacídicos mediante un grupo reactivo, tal como, un grupo amino o carboxilo libre. Los restos aminoacídicos que tienen un grupo amino
 30 libre incluyen restos de lisina y el resto aminoacídico amino-terminal. Aquellos que tienen un grupo carboxilo libre incluyen restos de ácido aspártico, restos de ácido glutámico, y el resto aminoacídico C-terminal. También pueden usarse grupos sulfhidrido como grupo reactivo para unir una o más moléculas de PEG. Para propósitos terapéuticos, la unión puede ser en un grupo amino, por ejemplo, en el extremo N o grupo de lisina. Se puede desear específicamente una proteína modificada químicamente en el extremo amino.

Usando el PEG como una ilustración de las presentes composiciones, se puede seleccionar entre una diversidad de moléculas de PEG (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de PEG a moléculas de proteína
 35 (o péptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de PEGilación a realizar, y el método para obtener la proteína PEGilada de forma amino-terminal seleccionada. El método para obtener la preparación PEGilada en el extremo amino (es decir, separado este resto de otros restos monoPEGilados si fuera necesario) puede ser por purificación del material PEGilado en el extremo amino de una población de moléculas de proteína PEGilada. La modificación
 40 química amino-terminal selectiva puede conseguirse por alquilación reductora que explota la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente a amino-terminal) disponibles para su derivatización en una proteína particular. En las condiciones de reacción apropiadas, se consigue una derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo amino con un grupo carbonilo que contiene polímero. Por ejemplo, se puede
 45 PEGilar selectivamente el extremo amino de la proteína realizando la reacción a un pH que permite sacar provecho de las diferencias de pKa entre el grupo amino épsilon (ϵ) de los restos de lisina y el del grupo amino alfa (α) del resto amino-terminal de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua a una proteína: la conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el extremo amino de la proteína y no sucede modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de
 50 lisina.

Usando la alquilación reductora, el polímero soluble en agua puede ser del tipo descrito anteriormente, y debe tener un único aldehído reactivo para acoplarse a la proteína. Puede usarse propionaldehído de PEG, que contiene un
 55 único aldehído reactivo.

En este documento se describen polipéptidos de neublastina mutada que pueden expresarse en procariotas o eu-
 60 cariotas o fabricarse sintéticamente. La neublastina puede estar glucosilada. El dímero de neublastina puede estar conjugado con polímero en cada extremo amino y glucosilado en cada resto Asn95 interno. El dímero de neublastina mutada puede estar conjugado con polímero en cada extremo amino y conjugado con polímero en uno o ambos restos Lys95 internos.

La PEGilación puede realizarse por cualquier reacción de PEGilación adecuada. Se conocen diversas químicas de PEGilación en la técnica. Véase, por ejemplo, Focus on Growth Factors, 3 (2): 4-10, 1992; documento EP 0 154 316; documento EP 0 401 384; y las otras publicaciones citadas en este documento que se refieren a la PEGilación. La
 65 PEGilación puede realizarse mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo).

La PEGilación por acilación generalmente implica hacer reaccionar un derivado éster activo de PEG. Puede usarse cualquier molécula de PEG reactiva conocido o posteriormente descubierta para realizar la PEGilación. El éster de PEG activado puede ser un PEG esterificado a N-hidroxisuccinimida (NHS). Como se usa en este documento, "acilación" incluye, sin limitación, los siguientes tipos de enlaces entre la proteína terapéutica y un polímero soluble en agua tal como PEG: amida, carbamato, uretano, y similares. Véase, *Bioconjugate Chem.* 5:133-140,1994. Las condiciones de reacción pueden seleccionarse entre cualquiera de las conocidas en la técnica de PEGilación o las desarrolladas posteriormente, pero deben evitar condiciones tales como temperatura, disolvente, y pH que inactivaría la proteína o polipéptido de neublastina a modificar.

La PEGilación por acilación generalmente producirá un producto de proteína de neublastina poli-PEGilado. Preferiblemente, el enlace de conexión será una amida. El producto resultante puede estar sustancialmente sólo (por ejemplo, >95%) mono, di- o tri-PEGilado. Sin embargo, pueden formarse algunas especies con mayores grados de PEGilación en cantidades que dependen de las condiciones de reacción específicas usadas. Si se desea, pueden separarse especies PEGiladas más purificadas de la mezcla, particularmente especies sin reaccionar, por técnicas de purificación convencionales, incluyendo, entre otras, diálisis, desalado, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por filtración en gel y electroforesis.

La PEGilación por alquilación generalmente implica un derivado aldehído terminal de PEG con neublastina en presencia de un agente reductor. La PEGilación por alquilación también puede producir productos de proteína de neublastina poli-PEGilados. Además, se pueden manipular las condiciones de reacción para favorecer la PEGilación sustancialmente sólo en el grupo α -amino del extremo amino de neublastina (es decir, una proteína mono-PEGilada). En cualquier caso de mono-PEGilación o poli-PEGilación, los grupos de PEG se unen preferiblemente a la proteína mediante un grupo $-\text{CH}_2-\text{NH}-$. Con referencia particular al grupo $-\text{CH}_2-$, este tipo de enlace se menciona en este documento como un enlace "alquilo".

La derivatización mediante alquilación reductora para producir un producto mono-PEGilado explota la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al extremo amino) disponibles para la derivatización. La reacción se realiza a un pH que permite sacar provecho de las diferencias de pKa entre los grupos ϵ -amino de los restos de lisina y el del grupo α -amino del resto amino-terminal de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo tal como un aldehído, a una proteína: la conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el extremo amino de la proteína y no sucede modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de lisina.

Las moléculas de polímero usadas en los enfoques tanto de acilación como de alquilación pueden seleccionarse entre polímeros solubles en agua como se ha descrito anteriormente. El polímero seleccionado debe modificarse para que tenga un único grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, preferiblemente, de modo que pueda controlarse el grado de polimerización proporcionada en los presentes métodos. Un aldehído de PEG reactivo ejemplar es propionaldehído de PEG, que es estable en agua, o derivados mono C1-C10 alcoxi o ariloxi del mismo (véase, la Patente de Estados Unidos 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Para las reacciones de acilación, el o los polímeros seleccionados deben tener un único grupo éster reactivo. Para la presente alquilación reductora, el o los polímeros seleccionados deben tener un único grupo aldehído reactivo. Generalmente, el polímero soluble en agua no se seleccionará entre restos de glucosilo de origen natural ya que estos habitualmente se crean más convenientemente por sistemas de expresión recombinante de mamífero. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado.

Un polímero soluble en agua ejemplar es PEG. El polietilenglicol abarca cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas incluyendo, aunque sin limitación, por ejemplo, mono-(C1-C10) alcoxi- o ariloxi-PEG.

En general, la derivatización química puede realizarse en cualquier condición adecuada usada para hacer reaccionar una sustancia biológicamente activa con una molécula de polímero activada. Los métodos para preparar una neublastina PEGilada generalmente comprenderán las etapas de (a) hacer reaccionar una proteína o polipéptido de neublastina con PEG (tal como un derivado éster o aldehído reactivo de PEG) en condiciones por las cuales la molécula llega a estar unida a uno o más grupos de PEG, y (b) obtener el o los productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán caso por caso en base a parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la proporción PEG:proteína, mayor será el porcentaje de producto poli-PEGilado.

La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de mono-polímero/neublastina generalmente comprenderá las etapas de: (a) hacer reaccionar una proteína o polipéptido de neublastina con una molécula de PEG reactiva en condiciones de alquilación reductora, a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva del grupo α -amino en el extremo amino de neublastina; y (b) obtener el o los productos de reacción.

Para una población sustancialmente homogénea de mono-polímero/neublastina, las condiciones de reacción de alquilación reductora son aquellas que permiten la unión selectiva del resto polimérico soluble en agua con el extremo amino de neublastina. Dichas condiciones de reacción generalmente proporcionan diferencias de pKa entre los grupos amino de lisina y el grupo α -amino en el extremo amino (siendo el pKa el pH al que el 50% de los grupos amino se protona y el 50% no). El pH también afecta a la proporción de polímero a proteína a usar. En general, si el pH

ES 2 351 215 T3

es inferior, se deseará un exceso mayor de polímero a proteína (es decir, cuanto menor reactivo es el grupo α -amino amino-terminal, más polímero se necesita para conseguir las condiciones óptimas). Si el pH es mayor, la proporción polímero:proteína no tiene que ser tan grande (es decir, están disponibles más grupos reactivos, de modo que se necesitan menos moléculas de polímero). Para los propósitos de la presente invención, el pH generalmente estará dentro del intervalo de 3-9, preferiblemente 3-6.

Otra consideración importante es el peso molecular del polímero. En general, cuando mayor es el peso molecular del polímero, menos moléculas de polímero pueden unirse a la proteína. Asimismo, debe tenerse en cuenta la ramificación del polímero cuando se optimizan estos parámetros. Generalmente, cuanto mayor es el peso molecular (o cuantas más ramificaciones haya) mayor será la proporción polímero:proteína. En general, para las reacciones de PEGilación incluidas en este documento, el peso molecular promedio preferido es de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa. El peso molecular promedio preferido es de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, de particularmente preferible de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 20 kDa. El peso molecular total preferido es de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 40 kDa.

El polipéptido de neublastina puede unirse al polímero mediante un grupo reactivo terminal en el polipéptido. Como alternativa, o adicionalmente, el polipéptido de neublastina puede unirse mediante un grupo amino de cadena lateral de un resto de lisina interno, por ejemplo, un resto de lisina introducido en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de neublastina de origen natural. Por tanto, las conjugaciones también pueden ramificarse a partir de los grupos reactivos no terminales. El polímero con el o los grupos reactivos se denomina en este documento como "polímero activado". El grupo reactivo reacciona selectivamente con grupos reactivos en la proteína, por ejemplo, amino libre.

La unión puede suceder en el polímero activado en cualquier grupo amino de neublastina disponible tal como los grupos alfa amino o los grupos épsilon amino de un resto o restos de lisina introducidos en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de neublastina. También pueden usarse grupos carboxílicos libres, grupos carbonilo activados adecuadamente, restos hidroxilo, guanidilo, imidazol, carbohidrato oxidado y grupos mercapto de la neublastina (si están disponibles) como sitios de unión.

Generalmente se emplean de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 moles de polímero activado por mol de proteína, dependiendo de la concentración de proteína. La cantidad final es un equilibrio entre la que maximiza el grado de la reacción mientras minimiza las modificaciones no específicas del producto y, al mismo tiempo, define las químicas que mantendrán la actividad óptima, mientras al mismo tiempo optimiza, si es posible, la vida media de la proteína. Puede retenerse al menos aproximadamente el 50% o casi el 100% de la actividad biológica de la proteína.

El polímero puede acoplarse al polipéptido de neublastina usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el resto de polialquilenglicol puede acoplarse a un grupo de lisina del polipéptido de neublastina mutada. La unión al grupo de lisina puede realizarse con un éster activo de N-hidroxilsuccinimida (NHS) tal como succinimidil succinato de PEG (SS-PEG) y succinimidil propionato de PEG (SPA-PEG). Los restos de polialquilenglicol adecuados incluyen, por ejemplo, carboximetil-NHS, norleucina-NHS, SC-PEG, tresilato, aldehído, epóxido, carbonilimidazol, y carbonato de PNP.

Enlazadores de PEG amina reactivos adicionales pueden sustituir el resto succinimidilo. Estos incluyen, por ejemplo, isotiocianatos, nitrofenilcarbonatos, epóxidos, y carbonatos de benzotriazol. Las condiciones se eligen preferiblemente para maximizar la selectividad y grado de reacción.

Si se desea, los polipéptidos de neublastina conjugados con polímero pueden contener una marca, por ejemplo, una marca que puede liberarse posteriormente por proteólisis. Por tanto, el resto de lisina puede modificarse selectivamente haciendo reaccionar primero una marca His modificada con un enlazador de bajo peso molecular tal como el reactivo de Traut (Pierce) que reaccionará tanto con la lisina como con el extremo amino, y después liberando la marca his. El polipéptido entonces contendrá un grupo SH libre que puede modificarse selectivamente con un PEG que contiene un grupo frontal reactivo tiol tal como un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato, o un SH libre o protegido.

El reactivo de Traut puede remplazarse con cualquier enlazador que establezca un sitio específico para la unión de PEG. A modo de ejemplo, el reactivo de Traut podría remplazarse con SPDP, SMPT, SATA, o SATP (todos disponibles en Pierce). Asimismo, podría hacerse reaccionar la proteína con un enlazado de amina reactiva que inserte una maleimida (por ejemplo SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS, o GMBS), un grupo haloacetato (SBAP, SIA, SIAB), o un grupo vinilsulfona y hacerse reaccionar el producto resultante con un PEG que contenga un SH libre. La única limitación al tamaño del enlazador que se emplea es que no pueda bloquear la posterior eliminación de la marca amino-terminal.

El resto de polialquilenglicol puede acoplarse a un grupo de cisteína del polipéptido de neublastina mutada. El acoplamiento puede realizarse usando, por ejemplo, un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato, y un grupo tiol.

El polipéptido de neublastina conjugado con polímero en la composición puede tener una vida media en suero más larga en relación a la vida media del polipéptido de neublastina en ausencia del polímero. Como alternativa, o adicio-

nalmente, el dímero polipeptídico de neublastina conjugado con polímero en la composición se une a GFR α 3, activa RET, normaliza los cambios patológicos de una neurona, potencia la supervivencia de una neurona, o mejora el dolor neuropático, o realiza una combinación de estas funciones fisiológicas. Los ensayos para determinar si un polipéptido potencia la supervivencia de una neurona, o normaliza los cambios patológicos de una neurona, se describen en, por ejemplo, el documento WO00/01815. La neurona puede ser una neurona sensorial, una neurona autonómica, o una neurona dopaminérgica.

La composición puede ser un complejo de polipéptido de neublastina conjugado estable, soluble en agua que comprende un polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada acoplado a un resto de PEG. Si se desea, el polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada puede acoplarse al resto de PEG por un enlace inestable. El enlace inestable puede escindirse en, por ejemplo, hidrólisis bioquímica, proteólisis, o escisión de sulfhidrilo. Por ejemplo, el enlace puede escindirse en condiciones *in vivo* (fisiológicas).

Otros parámetros de reacción, tales como el disolvente, los tiempos de reacción, las temperaturas, etc., y el medio de purificación de los productos, pueden determinarse caso por caso en base a la información publicada con relación a la derivatización de proteínas con polímeros solubles en agua.

Si se desea, puede emplearse una única molécula de polímero para la conjugación por polipéptido de neublastina. Como alternativa, puede unirse más de una molécula de polímero. Las composiciones de neublastina conjugada descritas en este documento pueden encontrar utilidad en aplicaciones tanto *in vivo* como no *in vivo*. Además, se reconocerá que el polímero de conjugación puede utilizar cualquier otro grupo, resto, u otra especie conjugada, según sea apropiado para la aplicación de uso final. A modo de ejemplo, puede ser útil en algunas aplicaciones unir covalentemente al polímero un resto funcional que confiera resistencia a degradación por UV, o antioxidación, u otras propiedades o características al polímero. Como ejemplo adicional, puede ser ventajoso en algunas aplicaciones funcionalizar el polímero para volverlo reactivo o de carácter reticulable, para potenciar diversas propiedades o características del material conjugado global. Por consiguiente, el polímero puede contener cualquier funcionalidad, grupo de repetición, enlace, u otra estructura constituyente que no impida la oficina de la composición de muteína neublastina conjugada para su propósito pretendido.

A continuación en este documento se describen polímeros ilustrativos que pueden emplearse de forma útil para conseguir estas características deseables en esquemas de reacción ejemplares. En aplicaciones de péptido unido covalentemente, el polímero puede funcionalizarse y después acoplarse a uno o más aminoácidos libres del o de los polipéptidos para formar enlaces inestables.

Las reacciones pueden tener lugar por cualquier método adecuado usado para hacer reaccionar de forma biológica materiales activos con polímeros inertes, preferiblemente a aproximadamente pH 5-8, por ejemplo, pH 5, 6, 7, u 8, si los grupos reactivos están en el grupo alfa amino en el extremo amino. Generalmente, el proceso implica preparar un polímero activado y después de ello hacer reaccionar la proteína con el polímero activado para producir la proteína soluble adecuada para la formulación. La reacción de modificación anterior puede realizarse por varios métodos, que pueden implicar una o más etapas.

Pueden usarse formar lineales y ramificadas de PEG así como otras formas alquilo. La longitud del PEG puede variarse. Las formas más habituales varían en tamaño de 2 K-100 kDa. Aunque los presentes ejemplos informan de que la PEGilación dirigida en el extremo amino no afecta a las propiedades farmacodinámicas, el hecho de que el material retuviera la función fisiológica indica que la modificación en el sitio o sitios descritos en este documento no es nociva. Por consiguiente, en la generación de formas mutantes de neublastina que pudieran proporcionar sitios adicionales de unión a través de la inserción de restos de lisina, estas formas probablemente se PEGilarían tanto en la lisina como en el extremo amino.

Puede acoplarse uno o más sitios en un polipéptido de neublastina a un polímero. Por ejemplo, puede unirse uno, dos, tres, cuatro, o cinco restos de PEG al polipéptido. Un resto de PEG puede unirse al extremo amino y/o los aminoácidos 14, 39, 68, y 95 de un polipéptido de neublastina numerados como se muestra en la Tabla 1 y la SEC ID N° 1.

El polipéptido de neublastina conjugado con polímero en la composición puede tener una vida media en suero más larga con relación a la vida media del polipéptido de tipo silvestre o mutado de neublastina en ausencia del polímero. Como alternativa, o adicionalmente, el polipéptido de neublastina conjugado con polímero en la composición se une a GFR α 3, activa RET, normaliza los cambios patológicos de una neurona, potencia la supervivencia de una neurona, o mejora el dolor neuropático, o realiza una combinación de estas funciones fisiológicas.

El polipéptido de neublastina mutada o conjugado polimérico en el complejo puede tener una actividad biológica seleccionada entre el grupo compuesto por: unión a GFR α 3, activación de RET, normalización de los cambios patológicos de una neurona, potenciación de la supervivencia de neuronas, o mejora del dolor neuropático.

En este documento también se describen polipéptidos multiméricos que incluyen un polipéptido de neublastina conjugado con polímero. Los polipéptidos multiméricos pueden ser polipéptidos multiméricos purificados. Los ejemplos de complejos multiméricos incluyen, por ejemplo, complejos diméricos. El complejo multimérico puede proporcionarse en forma de un complejo heteromérico u homomérico. Por tanto, el complejo multimérico puede ser

un complejo de polipéptido conjugado con polímero heterodimérico que incluye un polipéptido de neublastina mutada y una neublastina no mutada o un complejo de polipéptido conjugado con polímero heterodimérico que incluye dos o más polipéptidos de neublastina mutada.

5 El polipéptido de neublastina conjugado con polímero puede unirse a GFR α 3. La unión del polipéptido de neublastina conjugado con polímero puede estimular la fosforilación de un polipéptido RET. Para determinar si un polipéptido se une a GFR α 3, pueden realizarse ensayos como se describe en el documento WO00/01815. Por ejemplo, la presencia de neublastina en el medio de sobrenadantes de la línea celular CHO puede describirse usando una forma modificada de un ensayo de complejo ternario descrito por Sanicola *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 6238). En este
10 ensayo, puede evaluarse la capacidad de moléculas tipo GDNF para su capacidad de mediar la unión entre el dominio extracelular de RET y los diversos co-receptores, GFR α 1, GFR α 2, y GFR α 3. Las formas solubles de RET y los co-receptores se generan como proteínas de fusión. Se ha descrito una proteína de fusión entre el dominio extracelular de RET de rata y la fosfatasa alcalina placentaria (RET-AP) y una proteína de fusión entre el dominio extracelular de GFR α -1 de rata (descrito en la solicitud publicada WO9744356; 27 de noviembre de 1997) y el dominio Fc de IgG1
15 humana (rGFR(α 1-Ig) (Sanicola *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997,94: 6238).

El polímero descrito en este documento puede ser un resto de polialquilenglicol, y más preferiblemente un resto de PEG. Un resto polimérico puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 25.000 Da; de aproximadamente 1000 Da a aproximadamente 20.000 Da; o de aproximadamente 5000 Da a
20 aproximadamente 20.000 Da. Al menos un resto polimérico puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 5000 Da; un peso molecular promedio de aproximadamente 10.000 Da; o un peso molecular promedio de aproximadamente 20.000 Da.

El grupo funcional en el resto de polialquilenglicol puede ser, por ejemplo, carboximetil-NHS, norleucina-NHS, SC-PEG, tresilato, aldehído, epóxido, carbonilimidazol, o carbonato de PNP. El acoplamiento puede suceder mediante un éster activo de N-hidroxisuccinimida (NHS). El éster activo puede ser, por ejemplo, succinimidil succinato de PEG (SS-PEG), succinimidil butirato de PEG (SPB-PEG), o succinimidil propionato de PEG (SPA-PEG). El resto de polialquilenglicol puede acoplarse a un grupo de cisteína del polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada. Por ejemplo, el acoplamiento puede suceder mediante un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo
30 haloacetato, y un grupo tiol. El polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada puede comprender uno, dos, tres, o cuatro restos de PEG.

El polímero puede acoplarse al polipéptido en un sitio en la neublastina que sea un extremo N. El polímero puede acoplarse al polipéptido en un sitio en un aminoácido no terminal del polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada. El polímero puede acoplarse a un aminoácido expuesto a disolvente del polipéptido de neublastina
35 o polipéptido de neublastina mutada.

El polímero puede acoplarse al polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada en un resto seleccionado entre el grupo compuesto por el aminoácido amino-terminal del polipéptido conjugado con polímero, la posición 14 en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada, la posición 39 en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada, la posición 68 en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada, y la posición 95 en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina o polipéptido mutado.

45 *Proteínas de fusión de neublastina conjugadas con polímero*

Si se desea, el polipéptido de neublastina conjugado con polímero puede ser una proteína de fusión. Los derivados polipeptídicos de fusión de proteínas descritas en este documento también incluyen diversas formas estructurales de la proteína primaria que retienen actividad biológica.

50 Pueden construirse fusiones de neublastina conjugada con polímero-albúmina sérica usando métodos conocidos en la técnica. Puede usarse cualquiera de varios reticulantes que contienen un grupo amino reactivo correspondiente y puede usarse un grupo tiol reactivo para unir la neublastina a la albúmina sérica. Los ejemplos de enlazadores adecuados incluyen reticulantes amina reactivos que insertan una maleimida tiol reactiva. Estos incluyen, por ejemplo, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS, o GMBS. Otros enlazadores adecuados insertan un
55 grupo haloacetato tiol reactivo. Estos incluyen, por ejemplo, SBAP, SIA, SIAB y los que proporcionan un tiol protegido o no protegido para la reacción con grupos sulfhidrilo para producir un enlace reducible son SPD, SMPT, SATA, o SATP, todos los cuales están disponibles en el mercado (por ejemplo, Pierce Chemicals). Un especialista en la técnica puede idear de forma similar estrategias alternativas que unirán el extremo amino de neublastina con albúmina sérica.
60

Un especialista en la técnica puede generar conjugados con albúmina sérica que no están dirigidos al extremo amino de la neublastina o en el resto tiol de la albúmina sérica. Si se desea, las fusiones de neublastina-albúmina sérica pueden generarse usando técnicas de ingeniería genética, donde la neublastina se fusiona al gen de la albúmina sérica en su extremo amino o extremo carboxi, o en ambos extremos.
65

Cualquier conjugado de neublastina que produzca un producto con una vida media prolongada, por ejemplo, *in vivo* o, específicamente, en animales (incluyendo seres humanos) puede generarse usando una estrategia similar. Otro

ejemplo de un conjugado de neublastina que produce un producto con una vida media prolongada *in vivo* es una proteína de fusión de neublastina donde el compañero de fusión es una Ig.

Otros derivados de neublastinas conjugadas con polímero incluyen conjugados covalentes o agregados de neublastina mutada o sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, tal como por síntesis en cultivo recombinante como extremos amino o extremos carboxi adicionales. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser una secuencia señal (o líder) del polipéptido en la región amino-terminal de la proteína que dirige de forma co-traducciona o post-traducciona la transferencia de la proteína desde su sitio de síntesis hasta su sitio de función dentro o fuera de la membrana celular o pared (por ejemplo, el líder del factor alfa de levaduras). Las proteínas receptoras de neublastina pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de la neublastina (por ejemplo, fusiones histidina/neublastina). La secuencia de aminoácidos de la neublastina también puede unirse al péptido Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEC ID N° 22) (Hopp *et al.*, Biotechnology 6:1204 (1988)). La última secuencia es altamente antigénica y proporciona un epítipo unido de forma reversible por un anticuerpo monoclonal específico, lo que posibilita un rápido ensayo y fácil purificación de la proteína recombinante expresada.

Esta secuencia también se escinde específicamente por la enteroquinasa de mucosa bovina en el resto inmediatamente después del par Asp-Lys.

Polipéptidos Bioactivos

Los polipéptidos de la invención pueden proporcionarse en cualquier forma bioactiva, incluyendo la forma de pre-pro-proteínas, pro-proteínas, proteínas maduras, proteínas glucosiladas, proteínas no glucosiladas, proteínas fosforiladas, proteínas no fosforiladas, formas truncadas, o cualquier otra proteína modificada de forma post-traducciona. Un polipéptido de neublastina bioactivo incluye un polipéptido que, por ejemplo, cuando se dimeriza, solo o en presencia de un cofactor (tal como GFR α 3, o RET), se une a RET, induce la dimerización de RET, y la autofosforilación de RET.

Los polipéptidos de la invención pueden ser, en particular, un polipéptido N-glucosilado, estando dicho polipéptido glucosilado preferiblemente en los restos N indicados en las listas de secuencias.

Un polipéptido descrito en este documento tiene la secuencia de aminoácidos presentada como la SEC ID N° 6, que alberga un resto de asparagina glucosilada en la posición 122; o la secuencia de aminoácidos presentada como la SEC ID N° 14, que alberga un resto de asparagina glucosilada en la posición 95, o la posición análoga en cualquier polipéptido de neublastina mutada cuando se alinean por, por ejemplo, el software informático ClustalW.

El polipéptido descrito en este documento puede tener la secuencia de aminoácidos presentada como la SEC ID N° 23, mencionada en este documento como NBN113-N95K, que contiene un resto de lisina sustituyendo el resto de asparagina en la posición 95 de la SEC ID N° 2; o la secuencia de aminoácidos presentada como la SEC ID N° 24, mencionada en este documento como NBN106-N95K; o la posición análoga en cualquier polipéptido de neublastina mutada cuando se alinean por, por ejemplo, el software informático ClustalW.

En este documento también se describen proteínas de fusión de neublastina mutada, tal como fusiones con Ig, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.434.131, o fusiones con albúmina sérica.

Un polipéptido descrito en este documento puede tener la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEC ID N° 1 con la excepción de una sustitución, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con la secuencia presentada como la SEC ID N° 1.

Un polipéptido descrito en este documento puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 con la excepción de una sustitución, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con la secuencia presentada como la SEC ID N° 2.

Un polipéptido descrito en este documento puede tener una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 con la excepción de una sustitución, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85%, o aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con la secuencia presentada como la SEC ID N° 3.

Un polipéptido descrito en este documento puede tener una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 con la excepción de una sustitución, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con la secuencia presentada como la SEC ID N° 4.

Un polipéptido descrito en este documento puede tener una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5 con la excepción de una sustitución, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con la secuencia presentada como la SEC ID N° 5.

ES 2 351 215 T3

Un polipéptido descrito en este documento puede tener una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6 con la excepción de una sustitución, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con la secuencia presentada como la SEC ID N° 6.

Un polipéptido descrito en este documento puede tener una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7 con la excepción de una sustitución, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con la secuencia presentada como la SEC ID N° 7.

Un polipéptido descrito en este documento puede tener una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID N° 8-21 con la excepción de una sustitución, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con la secuencia presentada como una cualquiera de las SEC ID N° 8-21.

Un polipéptido descrito en este documento puede tener una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 36 con la excepción de una sustitución, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con la secuencia presentada como la SEC ID N° 36.

Un polipéptido descrito en este documento puede tener una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID N° 1-21 y 36 con la excepción de una sustitución, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con una cualquiera de las secuencias presentadas como las SEC ID N° 1-21 y 36.

El polipéptido mutado descrito en este documento puede albergar la huella distintiva de la familia de, es decir, Los restos aminoacídicos de cisteína conservados designados en las Tablas 3 y 4.

En este documento se describe un polipéptido mutado codificado por una secuencia polinucleotídica capaz de hibridar en condiciones de elevada rigurosidad con la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 1, su cadena complementaria, o una sub-secuencia de la misma. El polipéptido mutado descrito en este documento puede estar codificado por una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 1.

En este documento se describen nuevos polipéptidos codificados por una secuencia polinucleotídica capaz de hibridar en condiciones de elevada rigurosidad con la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 2, su cadena complementaria, o una sub-secuencia de la misma. El polipéptido mutado descrito en este documento puede estar codificado por una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 2.

En este documento se describen polipéptidos mutados codificados por una secuencia polinucleotídica capaz de hibridar en condiciones de elevada rigurosidad con la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de una cualquiera de las SEC ID N° 8-21, su cadena complementaria, o una sub-secuencia de la misma. El polipéptido mutado descrito en este documento puede estar codificado por una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de una cualquiera de las SEC ID N° 8-21.

En este documento se describen nuevos polipéptidos codificados por una secuencia polinucleotídica capaz de hibridar en condiciones de elevada rigurosidad con la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 36, su cadena complementaria, o una sub-secuencia de la misma. El polipéptido mutado descrito en este documento puede estar codificado por una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 36.

Origen Biológico

Un dímero del polipéptido de neublastina no conjugado puede aislarse y después conjugarse con uno o más polímeros para obtener un dímero de polipéptido de neublastina conjugado con polímero descrito en este documento. El dímero de polipéptido de neublastina puede aislarse de una célula de mamífero, preferiblemente de una célula humana o de una célula de origen murino o de una célula de origen de ovario de hámster chino.

Actividad Neurotrófica

Los polipéptidos de neublastina modificados, incluyendo polipéptidos de neublastina truncados, descritos en este documento, son útiles para moderar el metabolismo, el crecimiento, la diferenciación, o la supervivencia de un nervio o célula neuronal. En particular, los polipéptidos de neublastina modificados se usan para tratar o aliviar un trastorno o enfermedad de un animal vivo, por ejemplo, un ser humano, siendo sensible dicho trastorno o enfermedad a la actividad de un agente neurotrófico. Dichos tratamientos y métodos se describen en más detalle a continuación.

Composiciones farmacéuticas que comprende conjugados de neublastina-polímero

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un dímero de polipéptido de neublastina modificado descrito en este documento.

Los conjugados polímero-neublastina descritos en este documento pueden administrarse *per se* así como en forma de ésteres, sales, y otros derivados fisiológicamente funcionales de los mismos farmacéuticamente aceptables. En dichas formulaciones farmacéuticas y de medicamento, el conjugado de neublastina conjugada con polímero puede utilizarse junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente cualquier otros ingrediente terapéutico.

El o los vehículos deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no excesivamente nocivos para el destinatario de los mismos. La neublastina conjugada con polímero se proporciona en una cantidad eficaz para conseguir un efecto farmacológico deseado o efecto médicamente beneficioso, como se describe en este documento, y en una cantidad apropiada para conseguir la dosis o concentración *in vivo* de biodisponibilidad deseada.

Las formulaciones incluyen las adecuadas para administración parenteral así como no parenteral, y las modalidades específicas de administración incluyen administración oral, rectal, bucal, tópica, nasal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, intratecal, intra-articular, intra-arterial, sub-aracnoidea, bronquial, linfática, vaginal, e intra-uterina. Las formulaciones pueden ser adecuadas para administración por aerosol y parenteral, de forma tanto local como sistémica.

Cuando la neublastina conjugada con polímero se utiliza en una formulación que comprende una solución líquida, la formulación puede administrarse ventajosamente por vía oral, bronquial, o parenteral. Cuando la neublastina conjugada con polímero se emplea en una formulación de suspensión líquida o en forma de un polvo en una formulación de vehículo biocompatible, la formulación puede administrarse ventajosamente por vía oral, rectal, o bronquial. Como alternativa, puede administrarse por vía nasal o bronquial, mediante nebulización del polvo en un gas de vehículo, para formar una dispersión gaseosa del polvo que se inspira por el paciente desde un circuito de respiración que comprende un dispositivo nebulizador adecuado.

Las formulaciones que comprenden las proteínas descritas en este documento pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Dichos métodos generalmente incluyen la etapa de poner en asociación el o los ingredientes activos con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios.

Típicamente, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de forma uniforme e íntima el o los ingredientes activos con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto en formas de dosificación de la formulación deseada.

Las formulaciones descritas en este documento además para administración oral pueden presentarse como unidades concretas tales como cápsulas, obleas, comprimidos, o grageas, comprendiendo, cada una, una cantidad predefinida del ingrediente activo en forma de un polvo o gránulos; o una suspensión en un lico acuoso o un líquido no acuoso, tal como un jarabe, un elixir, una emulsión, o un trago.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del conjugado activo, que es preferiblemente isotónica con la sangre del destinatario (por ejemplo, solución salina fisiológica). Dichas formulaciones pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes u otros sistemas microparticulados que están diseñados para dirigir al compuesto a componentes sanguíneos o uno o más órganos. Las formulaciones pueden presentarse en forma de dosis unitaria o de múltiples dosis.

Las formulaciones de pulverización nasal comprenden soluciones acuosas purificadas del conjugado activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Dichas formulaciones pueden ajustar a un pH y un estado isotónico compatibles con las membranas de la mucosa nasal.

Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse en forma de un supositorio con un vehículo adecuado tal como manteca de cacao, grasas hidrogenadas, o ácido carboxílico graso hidrogenado. Las formulaciones oftálmicas tales como gotas para los ojos se preparan por un método similar a la pulverización nasal, excepto en que el pH y los factores isotónicos se ajustan preferiblemente para coincidir con los del ojo.

Las formulaciones tópicas comprenden los conjugados descritos en este documento disueltos o suspendidos en uno o más medios, tales como aceite mineral, petróleo, polihidroxi alcoholes, u otras bases usadas para formulaciones farmacéuticas tópicas.

Además de los ingredientes mencionados anteriormente, las formulaciones pueden incluir adicionalmente uno o más ingredientes accesorios seleccionados entre diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, disgregantes, agentes tensioactivos, espesantes, lubricantes, conservantes (incluyendo antioxidantes), y similares. Las consideraciones ante-

riores también se aplican a las proteínas de fusión de neublastina descritas en este documento (por ejemplo, proteínas de fusión de neublastina-albúmina sérica humana).

En este documento se describen proteínas de fusión adecuadas para la estabilización *in vitro* de un conjugado de neublastina conjugada con polímero en solución. Las proteínas de fusión pueden emplearse, por ejemplo, para aumentar la resistencia a la degradación enzimática del polipéptido de neublastina conjugado con polímero y proporcionar un medio para mejorar el periodo de validez, la estabilidad a temperatura ambiente, y similares. Se entiende que las consideraciones anteriores también se aplican a las proteínas de fusión de neublastina-albúmina sérica (incluyendo las proteínas de fusión de neublastina humana-albúmina sérica humana).

Usos médicos

Las composiciones descritas en este documento pueden usarse para tratar o aliviar un trastorno o enfermedad en un mamífero, por ejemplo, un primate incluyendo un humano, siendo sensible dicho trastorno o enfermedad a la actividad de agentes neurotróficos.

Las composiciones descritas en este documento pueden usarse directamente mediante, por ejemplo, composiciones farmacéuticas inyectadas, implantadas o ingeridas para tratar un proceso patológico sensible a polipéptidos de neublastina. Las composiciones pueden usarse para aliviar un trastorno o enfermedad del cuerpo de un animal vivo, incluyendo un ser humano, siendo sensible dicho trastorno o enfermedad a la actividad de agentes neurotróficos. El trastorno o enfermedad puede ser, en particular, un daño del sistema nervioso causado por traumatismo, cirugía, isquemia, infección, enfermedades metabólicas, deficiencia nutricional, una malignidad o agentes tóxicos, y procesos genéticos o idiopáticos.

El daño puede haber sucedido, en particular, a neuronas sensoriales o células ganglionares retinianas, incluyendo neuronas de los ganglios de la raíz dorsal o en cualquiera de los siguientes tejidos: el geniculado, los ganglios petroso y nodoso; el complejo vestibulo-acústico de los ocho nervios craneales; el polo ventrolateral del lóbulo maxilomandibular del ganglio trigémino; y el núcleo trigémino mesencefálico.

Para los usos descritos en este documento, la enfermedad o trastorno es una enfermedad neurodegenerativa que implica neuronas lesionadas y traumáticas, tales como lesiones traumáticas de nervios periféricos, la médula, y/o la médula espinal, daño neuronal isquémico cerebral, neuropatía y especialmente neuropatía periférica, traumatismo o lesión de nervios periféricos, apoplejía isquémica, lesión cerebral aguda, lesión aguda de la médula espinal, tumores del sistema nervioso, esclerosis múltiple, exposición a neurotoxinas, enfermedades metabólicas tales como diabetes o disfunciones renales y daño causado por agentes infecciosos, trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, síndromes de Parkinson-Plus, parálisis supranuclear progresiva (síndrome de Steele-Richardson-Olszewski), atrofia olivopontocerebelosa (OPCA), síndrome de Shy-Drager (atrofia de múltiples sistemas), complejo de demencia parkinsoniana de Guam, esclerosis lateral amiotrófica, o cualquier otra enfermedad congénita o neurodegenerativa, y alteración de la memoria ligada a demencia.

Pueden tratarse neuronas del sistema sensorial y/o autónomo. En particular, pueden tratarse neuronas nociceptivas y mecano-receptoras, más particularmente neuronas de fibras A-delta, fibras C y fibras A-beta. Además, pueden tratarse neuronas del sistema simpático y parasimpático del sistema autónomo.

Pueden tratarse enfermedades de las neuronas motoras tales como la esclerosis lateral amiotrófica ("ALS") y atrofia muscular espinal. Las moléculas de neublastina de esta invención pueden usarse para potenciar la recuperación de los nervios después de lesión traumática. Como alternativa, o adicionalmente, puede usarse un canal de guía de nervios con una matriz que contiene polipéptidos de neublastina conjugados con polímero, o fusiones o conjugados de polipéptidos de neublastina mutada en los usos descritos en este documento. Dichos canales de guía de nervios se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 5.834,029,

Las composiciones descritas en este documento (y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) pueden usarse en el tratamiento de neuropatías periféricas. Entre las neuropatías periféricas incluidos para el tratamiento con las moléculas descritas en este documento están neuropatías inducidas por traumatismo, por ejemplo, las causadas por lesión física o patología, daño físico al cerebro, daño físico a la médula espinal, apoplejía asociada con daño cerebral, y trastornos neurológicos relacionados con neurodegeneración. En este documento también se describen aquellas neuropatías secundarias a infección, exposición a toxinas, y exposición a fármacos. También se describen adicionalmente en este documento aquellas neuropatías secundarias a enfermedad sistémica o metabólica. Por ejemplo, las composiciones descritas en este documento también pueden usarse para tratar neuropatías inducidas por quimioterapia (tales como las causadas por el suministro de agentes terapéuticos, por ejemplo, taxol o cisplatino); neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; neuropatías diabéticas; y neuralgias post-herpéticas. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.496.804 y 5.916.555.

Afecciones adicionales que pueden tratarse de acuerdo con los usos descritos en este documento son mono-neuropatías, mono-neuropatías combinadas, y poli-neuropatías, incluyendo neuropatías axonales y desmielinizantes.

Las composiciones descritas en este documento (y las composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) pueden usarse en el tratamiento de diversos trastornos en el ojo, incluyendo pérdida foto-receptora en la retina en pacientes afectados por degeneración macular, retinitis pigmentosa, glaucoma, y enfermedades similares.

Usos y Composiciones farmacéuticas

En este documento se describen usos para tratar el dolor neuropático, para tratar la alodinia táctil, y para reducir la pérdida de sensibilidad al dolor asociada con neuropatía. Se usan dímeros de polipéptido de neublastina conjugado con polímero, incluyendo dímeros que comprenden polipéptidos de neublastina de longitud completa bioactivos o polipéptidos de neublastina truncados bioactivos. Además, en este documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un dímero de polipéptido de neublastina conjugado con polímero suspendido, disuelto, o dispersado en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

1. Uso en el Tratamiento de Dolor Neuropático

En este documento se describe un uso para tratar el dolor neuropático en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un dímero de polipéptido de neublastina conjugado con polímero. En este documento también se describe un uso para tratar el dolor neuropático en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un dímero de polipéptido de neublastina conjugado con polímero que comprende, por ejemplo, polipéptidos de neublastina de tipo silvestre, truncados o mutados, incluyendo, por ejemplo, uno cualquiera de las SEC ID N° 1, 2, 6-21 y 36 o una forma mutada de los mismo, solo, o administrando también al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto que induce analgesia seleccionado entre el grupo compuesto por opioides, antiarrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antidepresivos, corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID). El compuesto que induce analgesia puede ser un anticonvulsivo. El compuesto que induce analgesia puede ser gabapentina (ácido (1-aminometil)ciclohexanoacético) o pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metilpropil)butanoico).

Los polipéptidos de neublastina y los ácidos nucleicos descritos en este documento (y las composiciones farmacéuticas que comprenden dímeros de polipéptido de neublastina conjugado con polímero descritos en este documento) se usan en el tratamiento del dolor asociado con neuropatías periféricas. Entre las neuropatías periféricas que pueden tratarse de acuerdo con esta invención están las neuropatías inducidas por traumatismo, por ejemplo, las causadas por lesión física o patología, daño físico al cerebro, daño físico a la médula espinal, apoplejía asociada con daño cerebral, y trastornos neurológicos relacionados con neurodegeneración.

En este documento también se describen usos en el tratamiento de neuropatías inducidas por quimioterapia (tales como las causadas por el suministro de agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, taxol o cisplatino); neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por patógenos (por ejemplo, inducidas por virus), neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.496.804 y 5.916.555. Los nucleótidos y polipéptidos de neublastina descritos en este documento pueden usarse para el tratamiento de mono-neuropatías, mono-neuropatías combinadas, y poli-neuropatías, incluyendo neuropatías axonales y desmielinizantes.

El dolor neuropático puede estar asociado con varias neuropatías periféricas, incluyendo: (a) neuropatías inducidas por traumatismo, (b) neuropatías inducidas por quimioterapia, (c) neuropatías inducidas por toxinas (incluyendo, aunque sin limitación, neuropatías inducidas por alcoholismo, intoxicación con vitamina B6, intoxicación con hexacarbono, amiodarona, cloranfenicol, disulfiram, isoniazida, oro, litio, metronidazol, misonidazol, nitrofurantoína), (d) neuropatías inducidas por fármacos, incluyendo dolor neuropático inducido por fármacos terapéuticos (tal como el causado por agentes anti-cáncer, particularmente agentes anti-cáncer seleccionados entre el grupo compuesto por taxol, taxotere, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina; y tal como el causado por agentes anti-virales, particularmente agentes anti-virales seleccionados entre el grupo compuesto por ddI, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol, e isoniazid), (e) neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas (incluyendo, aunque sin limitación deficiencia de vitamina B12, deficiencia de vitamina B6, y deficiencia de vitamina E), (f) neuropatías idiopáticas, (g) neuropatías diabéticas, (h) daño nervioso inducido por patógenos, (i) daño nervioso inducido por inflamación, (j) neurodegeneración, (k) neuropatía hereditaria (incluyendo, aunque sin limitación ataxia de Friedreich, polineuropatía amiloide familiar, enfermedad de Tangier, enfermedad de Fabry), (l) trastornos metabólicos (incluyendo, aunque sin limitación, insuficiencia renal e hipotiroidismo), (m) neuropatías infecciosas y víricas (incluyendo, aunque sin limitación, dolor neuropático asociado con la lepra, enfermedad de Lyme, dolor neuropático asociado con infección por un virus, particularmente un virus seleccionado entre el grupo compuesto por un herpes virus (por ejemplo, herpes zoster que puede conducir a neuralgia post-herpética), un virus de inmunodeficiencia humana (VIH), y un papiloma virus), (n) neuropatías auto-inmunes (incluyendo, aunque sin limitación, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, gammopatía monoclonal de importancia indeterminada y polineuropatía), (o) neuralgia del trigémino y síndromes de atrapamiento (incluyendo, aunque sin limitación, el túnel carpiano), y (p) otros síndromes de dolor neuropático incluyendo neuralgia post-traumática, dolor de la extremidad fantasma, dolor por esclerosis múltiple, síndromes de dolor regional complejo (incluyendo, aunque sin limitación, distrofia simpática refleja, causalgia), dolor asociado con neoplasia, neuropatía vasculítica/angiopática, y ciática. El dolor neuropático puede manifestarse como alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo o dolor fantasma.

2. Uso en el Tratamiento de Alodinia Táctil

La expresión “alodinia táctil” típicamente se refiere a la afección en un sujeto en el que se provoca dolor por estimulación de la piel (por ejemplo, tacto) que normalmente es inocuo. En este documento se describe un uso para tratar la alodinia táctil en un sujeto.

La alodinia táctil puede tratarse administrando al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero solo.

En este documento se describe un uso para tratar la alodinia táctil en un sujeto, administrando al sujeto una cantidad eficaz de un dímero de polipéptido de neublastina conjugado con polímero que contiene polipéptidos de neublastina truncados, de tipo silvestre o mutados, incluyendo, por ejemplo, al menos uno de las SEC ID N° 1, 2, 6-21 y 36 o una forma mutada de los mismos, solo, o administrando al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido de neublastina con una cantidad eficaz de un compuesto que induce analgesia seleccionado entre el grupo que compuesto por opioides, anti-arrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antidepresivos, corticosteroides y NSAID. El compuesto que induce analgesia puede ser un anticonvulsivo. El compuesto que induce analgesia puede ser gabapentina (ácido (1-aminometil)ciclohexanoacético) o pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metilpropil)butanoico).

Un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero puede administrarse asociado con un agente terapéutico incluyendo, aunque sin limitación, un agente anti-cáncer o un agente anti-viral. Los agentes anti-cáncer incluyen, aunque sin limitación, taxol, taxotere, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina. Los agentes anti-virales incluyen, aunque sin limitación, ddI, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol, e isoniazid.

3. Uso en el Tratamiento para la Reducción de la Pérdida de Sensibilidad al Dolor

En este documento se describe un uso para reducir la pérdida de sensibilidad al dolor en un sujeto afectado con una neuropatía. La neuropatía puede ser neuropatía diabética. La pérdida de sensibilidad al dolor puede ser una pérdida en la sensibilidad al dolor térmico. Se contemplan usos tanto profilácticos como terapéuticos.

Para su uso en tratamiento profiláctico, se administra un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero a un sujeto en riesgo de desarrollar pérdida de sensibilidad al dolor; se esperaría que dichos sujetos fueran sujetos con una neuropatía en fase temprana. El uso de neublastina para el tratamiento en dichas circunstancias serviría para tratar a pacientes en riesgo de forma preventiva.

Para su uso en tratamiento terapéutico, se administra un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero a un sujeto que ha experimentado pérdida de sensibilidad al dolor como resultado de una afección con una neuropatía, se esperaría que dichos sujetos fueran sujetos con una neuropatía en fase tardía. El uso de un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero para el tratamiento en dichas circunstancias serviría para rescatar la sensibilidad apropiada al dolor en el sujeto.

4. Uso en el Tratamiento de Infecciones Víricas y Neuropatías Asociadas a Virus

En este documento se describe el tratamiento profiláctico de neuropatías infecciosas y víricas. El tratamiento profiláctico está indicado después de la determinación de infección vírica y antes de la aparición de dolor neuropático. Se administra un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero para evitar la aparición de dolor neuropático incluyendo, aunque sin limitación, dolor neuropático asociado con lepra, enfermedad de Lyme, dolor neuropático asociado con infección por un virus, particularmente un virus seleccionado entre el grupo compuesto por un herpes virus (y más particularmente por un virus herpes zoster, que puede conducir a neuralgia post-herpética), un virus de inmunodeficiencia humana (VIH), y un papiloma virus). Puede administrarse un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero para reducir la gravedad del dolor neuropático, si aparece.

Los síntomas de infección vírica aguda a menudo incluyen la aparición de erupción. Otros síntomas incluyen, por ejemplo, el desarrollo de dolor persistente en el área afectada del cuerpo, que es una complicación común de una infección por herpes zoster (culebrillas). La neuralgia post-herpética puede durar un mes o más, y puede aparecer varios meses después de que cualquier síntoma tipo erupción haya desaparecido.

5. Uso en el Tratamiento de Neuropatía Diabética Dolorosa

En este documento se describe el uso de un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero para su uso en el tratamiento profiláctico de neuropatía diabética dolorosa. El tratamiento profiláctico de las neuropatías diabéticas comenzaría después de la determinación del diagnóstico inicial de diabetes o síntomas asociados con diabetes y antes de la aparición de dolor neuropático. El tratamiento profiláctico de neuropatía diabética dolorosa también puede comenzar después de la determinación de que un sujeto está en riesgo de desarrollar diabetes o síntomas asociados con diabetes. Durante el tratamiento, se administra un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero para evitar la aparición de dolor neuropático. Puede administrarse un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero para reducir la gravedad del dolor neuropático que ya ha aparecido.

6. *Uso en Trastornos del Sistema Nervioso*

En este documento se describe un uso para tratar o prevenir un trastorno del sistema nervioso en un sujeto (tal como un ser humano), administrando a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de neublastina conjugado con polímero, una composición que contiene un polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada acoplado a un polímero, o un complejo que incluye un polipéptido de neublastina conjugado estable, soluble en agua o un complejo de polipéptido de neublastina mutada que comprende un polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada acoplado a un resto de polialquileño tal como, por ejemplo, PEG.

El trastorno del sistema nervioso puede ser un trastorno del sistema nervioso periférico, tal como una neuropatía periférica o un síndrome de dolor neuropático. Los seres humanos son los sujetos preferidos para el tratamiento.

Un dímero de polipéptido de neublastina conjugado con polímero descrito en este documento es útil para tratar un defecto en una neurona, incluyendo, sin limitación, neuronas lesionadas y neuronas traumatizadas. Los nervios periféricos que experimentan traumatismo incluyen, aunque sin limitación, nervios de la médula o de la médula espinal. Los dímeros de polipéptido de neublastina conjugado con polímero de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, daño neuronal isquémico cerebral; neuropatía, por ejemplo, neuropatía periférica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS). Dichos dímeros de polipéptido de neublastina pueden usarse en el tratamiento de memoria alterada, por ejemplo, alteración de la memoria asociada con demencia.

Ejemplos adicionales de afecciones o enfermedades son trastornos del sistema nervioso periférico, la médula, o la médula espinal, así como neuropatías inducidas por traumatismo, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas, dolor neuropático asociado con daño nervioso inducido por toxinas, daño nervioso inducido por patógenos, daño nervioso inducido por inflamación, o neurodegeneración. Un dímero de polipéptido de neublastina es adicionalmente útil para tratar el dolor neuropático, para tratar la alodinia táctil y para reducir la pérdida de sensibilidad al dolor asociada con neuropatía.

7. *Dosificación*

Los usos anteriores contemplan administrar al sujeto una formulación que comprende un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero que puede estar o no truncado a una dosificación de 0,01 $\mu\text{g/kg}$ a 1000 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal del sujeto, por dosis. La dosificación puede ser de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal del sujeto, por dosis o de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 30 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal del sujeto, por dosis, por ejemplo, de 3 $\mu\text{g/kg}$ a 10 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal del sujeto, por dosis. Las cantidades terapéuticamente eficaces de la formulación pueden administrarse a un sujeto que lo necesite en un régimen de dosificación que puede averiguar un especialista en la técnica, sin experimentación excesiva. La formulación puede administrarse de forma sistémica.

8. *Suministro*

El dímero de polipéptido en los usos anteriores puede administrarse mediante cualquier sistema de suministro adecuado, y puede incluir suministro intravenoso, suministro intramuscular, suministro intrapulmonar, suministro subcutáneo, y suministro intraperitoneal. El polipéptido de neublastina en los usos anteriores también puede administrarse mediante suministro intratecal.

La administración de un dímero de polipéptido de neublastina conjugado con polímero puede ser, por ejemplo, sistémica o local. Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración parenteral así como no parenteral, y las modalidades de administración específicas incluyen administración oral, rectal, bucal, tópica, nasal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, intratecal, intra-articular, intra-arterial, sub-aracnoidea, bronquial, linfática, vaginal, e intra-uterina. Se incluyen formulaciones adecuadas para la administración por aerosol y parenteral, tanto de forma local como sistémica. Las formulaciones son adecuadas para administración subcutánea, intramuscular, o intravenosa.

9. *Regímenes*

La frecuencia de dosificación para el dímero de polipéptido de la invención puede proporcionarse administrando al sujeto una formulación tres veces a la semana durante dos semanas. Para optimizar la eficacia terapéutica, primero se administra un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero a diferentes regímenes de dosificación. La dosis unitaria y el régimen dependen de factores que incluyen, por ejemplo, la especie de mamífero inmunizada, su estado inmune, el peso corporal del mamífero. Típicamente, los niveles de proteínas en tejido se controlan usando ensayos de exploración apropiados como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado.

La frecuencia de dosificación para un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero de esta invención pertenece a la experiencia habitual y juicio clínico de los médicos. Típicamente, el régimen de administración se establece por ensayos clínicos que pueden establecer parámetros de administración óptimos. Sin embargo, el facultativo puede variar dichos regímenes de administración de acuerdo con la edad, salud, peso, sexo y estado médico del sujeto. La frecuencia de dosificación también puede variar entre tratamientos agudos y crónicos para neuropatía. Además, la frecuencia de dosificación puede variarse dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Biodisponibilidad de Neublastina PEGilada amino-terminal (ejemplo ilustrativo)

Se observó que neublastinas recombinantes derivadas de células CHO y *E. coli* se eliminaban rápidamente de la circulación si se administraban por vía intravenosa en ratas. Las proteínas estaban por debajo del umbral de detección en el suero después de administración subcutánea. Para aumentar la biodisponibilidad de neublastina, se construyeron formas PEGiladas de neublastina mutada.

Como no existen lisinas en la secuencia de neublastina, las químicas de PEGilación amina-específica producirían la PEGilación de un polipéptido de neublastina de tipo silvestre en su extremo amino. Por tanto, para cada dímero de neublastina, deben unirse dos restos de PEG. Por consiguiente, las formas de PEG se dirigieron primero directamente al extremo amino a través de químicas amina-específicas. Sorprendentemente, la PEGilación de neublastina de tipo silvestre expresada en *E. coli*, incluso con dos PEG de 20 kDa unidos, tenía poco beneficio sobre la vida media, lo que indica que un mecanismo basado en la vía de eliminación estaba pasando por encima de la potenciación en la vida media que se esperaba conseguir por PEGilación.

Ejemplo 2

Construcción de una Neublastina Mutada PEGilada (N95K) (ejemplo ilustrativo)

A continuación se examinó la biodisponibilidad de formas de neublastina mutada PEGiladas en restos aminoácidos internos. Se diseñó una serie de cuatro mutantes que remplazan los restos de origen natural en las posiciones 14, 39, 68, y 95, cuando están numerados como se muestra en la SEC ID N° 1, para insertar lisinas en sitios seleccionados en la secuencia. Estas lisinas proporcionarían sitios alternativos para la unión de PEG. Estos sitios se seleccionaron usando la estructura cristalina de GDNF (Nat. Struct. Biol. 4: 435-8, 1997) como un entramado para identificar restos de superficie. Se usó el estudio de mutagénesis de la quimera persefina/neublastina (J. Biol. Chem. 275: 3412-20, 2000) para identificar regiones funcionalmente importantes de la estructura que deben evitarse.

Para expresar el gen de neublastina de tipo silvestre en *E. coli*, se construyeron con SynGene genes con menor contenido en GC y codones de *E. coli* preferidos. El gen construido con SynGene se clonó en dos vectores, pET19b y pMJB164, un derivado de pET19b. En pET19b, la secuencia que codifica el dominio maduro de neublastina (NBN113) se fusiona directamente con una metionina de inicio. En pMJB164, el dominio maduro de neublastina se fusiona a una marca de histidina (es decir, 10 histidinas) y se separa de la marca de histidina por un sitio de escisión de enteroquinasa (SEC ID N° 35 y 36). La metionina de inicio precede la marca de histidina.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 351 215 T3

TABLA 5

Secuencia de Nucleótidos y Polipeptídica de Neublastina de Tipo Silvestre marcada con His

NBN marcada con His

1	ATG GGC CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAC TCG AGC GGC	45
1	M G H H H H H H H H H H S S G	15
46	CAT ATC GAC GAC GAC GAC AAG GCT GGA GGA CCG GGA TCT CGT GCT	90
16	H I D D D D K A G G P G S R A	30
91	CGT GCA GCA GGA GCA CGT GGC TGT CGT CTG CGT TCT CAA CTA GTG	135
31	R A A G A R G C R L R S Q L V	45
136	CCG GTG CGT GCA CTC GGA CTG GGA CAC CGT TCC GAC GAA CTA GTA	180
46	P V R A I G L G H R S D E L V	60
181	CGT TTT CGT TTT TGT TCA GGA TCT TGT CGT CGT GCA CGT TCT CCG	225
61	R F R F C S G S C R R A R S P	75
226	CAT GAT CTA TCT CTA GCA TCT CTA CTA GGA GCC GGA GCA CTA AGA	270
76	H D L S L A S L L G A G A L R	90
271	CCG CCG CCG GGA TCT AGA CCT GTA TCT CAA CCT TGT TGT AGA CCT	315
91	P P P G S R P V S Q P C C R P	105
316	ACT AGA TAC GAA GCA GTA TCT TTC ATG GAC GTA AAC TCT ACA TGG	360
106	T R Y E A V S F M D V N S T W	120
361	AGA ACC GTA GAT AGA CTA TCT GCA ACC GCA TGT GGC TGT CTA GGA	405
121	R T V D R L S A T A C G C L G	135
406	TGA TAA TAG	414
136	* * *	(SEC ID N° 35) (SEC ID N° 36)

Dos de las mutaciones (R39 y R68) se dirigieron a una región que, en base a la distribución de cargas positivas sobre la superficie, pueden representar un sitio de unión a heparina. Este sitio probablemente contribuye a la rápida eliminación de la proteína. Un tercer sitio se dirigió a N95, el sitio de glucosilación natural en la neublastina de tipo silvestre. Este sitio se modifica de forma natural con una estructura de carbohidrato compleja. Por lo tanto, no se esperaba que la modificación con PEG en este sitio tuviera impacto sobre la función. El cuarto sitio (R14) se seleccionó en una región que no estaba cubierta por ninguna otra modificación. Un mutante en el que el resto de asparagina en la posición 95 estaba remplazado con un lisina (el “mutante N95K”) se eligió para los estudios descritos en este documento.

Se construyeron cuatro neublastinas de rata mutadas diferentes que comprendían una o más alteraciones en la secuencia de tipo silvestre del polipéptido de neublastina de rata. Estas neublastinas mutadas contenían sustituciones de un único aminoácido: R14K; R68K; R39K; o N95K. La Tabla 1A identifica estas mutaciones puntuales ejemplares en negrita. En la nomenclatura “X₁N₁X₂”, X₁ se refiere a un aminoácido de un polipéptido de neublastina de tipo silvestre, N₁ se refiere a la posición numérica de los aminoácidos X₁ en la secuencia, numerados de acuerdo con la SEC ID N° 1, y X₂ se refiere a un aminoácido que sustituye al aminoácido de tipo silvestre en la posición numérica indicada N₁.

Para construir la mutación de neublastina N95K de rata, se realizó mutagénesis dirigida al sitio en pCMB020, un plásmido que codifica neublastina de rata de tipo silvestre. La secuencia de ácido nucleico de neublastina de rata de tipo silvestre y la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificada por la misma se presentan a continuación:

ES 2 351 215 T3

TABLA 6

Secuencias de NBN de Rata de Tipo Silvestre

5 1 ATGGAAGTGG GACTTGGAGA GCCTACTGCA TTGTCCCACT GCCTCCGGCC
51 TAGGTGGCAA CCAGCCTTGT GGCCAACCCT AGCTGCTCTA GCCCTGCTGA
101 GCAGCGTCAC AGAAGCTTCC CTGGACCCAA TGTCCCGCAG CCCC GCCTCT
10 151 CGCGATGTTT CCTCGCCGGT CCTGGCGCCC CCAACAGACT ACCTACCTGG
201 GGGACACACC GCACATCTGT GCAGCGAAAG AGCCCTGCGA CCACCGCCGC
251 AGTCTCCTCA GCCCGCACCC CCACCACCGG GTCCCGCGCT CCAGTCTCCT
15 301 CCCGCTGCGC TCCGCGGGGC ACGCGCGGCG CGTGCAGGAA CCCGGAGCAG
351 CCGCGCACGG GCTACAGATG CGCGCGGCTG CCGCCTGCGC TCACAGCTGG
401 TGCCGGTGAG CGCTCTCGGC CTGGGCCACA GCTCCGACGA GCTGATACGT
20 451 TTCCGCTTCT GCAGCGGTTT GTGCCGCCGA GCACGCTCCC CGCACGATCT
501 CAGCCTGGCC AGCCTGCTGG GCGCCGGGGC CCTGCGGTCT CCTCCCGGGT
551 CCCGGCCGAT CAGCCAGCCC TGTGTCGGC CCACTCGCTA TGAGGCAGTC
25 601 TCCTTCATGG ACGTGAACAG CACCTGGAGA ACCGTGGACC ATCTCTCCGC
651 CACCGCCTGC GGCTGTCTGG GCTGA (SEC ID N° 25)

30 1 MELGLGEPTA LSHCLRPRWQ PALWPTLAAL ALLSSVTEAS LDPMSRSPAS
51 RDVPSPVLAP PTDYLPGGHT AHLCSERLR PPPQSPQAP PPPGPALQSP
101 PAALRGARAA RAGTRSSRAR ATDARGCRLR SQLVPVSALG LGHSSDELIR
151 FRFCSGSCRR ARSPHDLA SLLGAGALRS PPGSRPISQP CCRPTRYEAV
35 201 SFMDVNSTWR TVDHLSATAC GCLG* (SEC ID N° 26)

40 La mutagénesis de pCM020 usando los oligonucleótidos KD3-210 y KD3-211 provocó la formación del plásmido pCMB027:

KD3-210

45 5'-GTATCTTTTCATGGACGTTATGTTCTACATGGAGAACC-3' (SEC ID N° 27)

KD3-211

5'-GGTTCTCCATGTAGAACATACGTCCATGAAAGATAC-3' (SEC ID N° 28)

50

En pCMB027, el codón que codifica la asparagina en la posición 95 se reemplazó con un codón que codifica lisina.

55 Se formó una neublastina mutada R14K por reemplazo de un codón que codifica arginina en la posición 14 con un codón que codifica lisina en la secuencia codificante de neublastina de pCMB020. Se realizó mutagénesis dirigida al sitio en pCMB020 usando los oligonucleótidos KD3-254 y KD3-255:

KD3-254

60 5'-GCTCGTGCAACGGATGCAAAAGGCTGTCGTCTGCG-3' (SEC ID N° 29)

KD3-255

65 5'-CGCAGACGACAGCCTTTTGCATCCGTTGCACGAGC-3' (SEC ID N° 30)

La construcción resultante se llamó pCMB029.

ES 2 351 215 T3

Se formó una neublastina mutada R68K por remplazo de un codón que codifica arginina en la posición 68 con un codón que codifica lisina en la secuencia codificante de neublastina de pCMB020. Se realizó mutagénesis dirigida al sitio en pCMB020 usando los oligonucleótidos KD3-258 y KD3-259:

KD3-258

5' -GGAGCCGGAGCACTAAAATCTCCCCGGGATCTAGACC-3' (SEC ID N° 31)

KD3-259

5' -GGTCTAGATCCCGGGGGAGATTTTAGTGCTCCGGCTCC-3' (SEC ID N° 32)

La construcción resultante se llamó pCMB030.

Se formó una neublastina mutada R39K por remplazo de la arginina en el aminoácido 39 con una lisina en la secuencia codificante de neublastina de pCMB020. Se realizó mutagénesis dirigida al sitio de pCMB020 usando los oligonucleótidos KD3-256 y KD3-257:

KD3-256

5' -GACGAATTAATTAAGTTTCGTTTTTGTTCAGG-3' (SEC ID N° 33)

KD3-257

5' -CCTGAACAAAAACGAACTTAATTAATTCGTC-3' (SEC ID N° 34)

Expresión y Caracterización de Neublastina Mutada en E. coli

Para la expresión y purificación, se expresó un plásmido que codificaba el polipéptido de neublastina N95K de rata en *E. coli* como una proteína de fusión marcada con His con un sitio de escisión con enteroquinasa inmediatamente adyacente al inicio de la secuencia de neublastina de 113 aminoácidos madura. Las células de *E. coli* se cultivaron en un fermentador de 500 l y se proporcionó una pasta celular congelada. Las células de *E. coli* se lisaron en una APV Gaulin Press y se recuperó la neublastina N95K de rata de la fracción sedimentada lavada insoluble.

La neublastina mutada N95K se extrajo del sedimento con clorhidrato de guanidina, se replegó, y se eliminó la marca His con enteroquinasa (véase el Ejemplo 5). El producto después se sometió a cromatografía sobre Ni NTA agarosa (Qiagen) y sobre resina de intercambio catiónico Bakerbond WP CBX.

El tratamiento con enteroquinasa del producto marcado con His provocó una escisión aberrante de la proteína en la arginina 7 en la secuencia madura. El producto de des 1-7 neublastina (NBN106-N95K) resultante era completamente activo en el KIRA ELISA y estructuralmente indistinguible de la forma madura en su susceptibilidad a desnaturalización inducida por guanidina y por lo tanto se usó para el trabajo posterior.

La neublastina mutada de rata NBN106-N95K se PEGiló a un promedio de 3,3 restos de PEG por molécula a neublastina usando propionato de metoxipoli(etilenglicol)-succinimidilo (SPA-PEG) con una masa molecular de 10.000 Da como reactivo. El producto PEGilado resultante se sometió a caracterización extensiva incluyendo análisis por SDS-PAGE, cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), HPLC de fase inversa, espectrometría de masas por deserción/ionización por láser asistida por matriz (MALD/IMS), mapeado de péptidos, evaluación de la actividad en el KIRA ELISA, y determinación del contenido de endotoxinas. La pureza del producto de neublastina N95K antes de la PEGilación medida por SDS-PAGE y SEC era mayor del 95%. El producto de neublastina N95K migraba en condiciones no reductoras como un dímero, coherente con su estructura predicha. Después de la PEGilación, el producto resultante constaba de una serie de aductos modificados que comprendían 2 PEG por molécula, que era el 5% del producto, 3 PEG por molécula, que era el 60% del producto, 4 PEG por molécula, que era el 30% del producto, y varias formas minoritarias de masa mayor. En la muestra PEGilada no había evidencias de agregados. Los niveles residuales de neublastina no modificada en el producto estaban por debajo de los límites de cuantificación. El contenido de endotoxinas del material era rutinariamente menor de 1 EU/mg. La actividad específica de la neublastina PEGilada en el KIRA ELISA es 10 nM. El producto PEGilado se formuló a 1,1 mg/ml en PBS, pH 6,5. El material, que es de potencia similar a la neublastina de tipo silvestre (NBN113), puede suministrarse en forma de un líquido congelado, que se almacena a -70°C.

Los polipéptidos de neublastina mutada R14K, R39K, y R68K se expresaron en *E. coli* y pueden someterse a los mismos métodos para su purificación, PEGilación y evaluación de la función como se ha descrito anteriormente para la neublastina NBN106-N95K.

ES 2 351 215 T3

Preparación de Neublastina Mutada NBN106-N95K PEGilada

Se diluyeron 230 ml de la neublastina mutada N95K de rata replegada (2,6 mg/ml) que se habían producido en *E. coli* y almacenado a 4°C en fosfato sódico 5 mM pH 6,5, NaCl 100 mM, con 77 ml de agua, 14,4 ml de HEPES 1 M pH 7,5, y 2,8 g (10 mg/ml final) de PEG SPA 10.000 Da (Shearwater Polymers, Inc.). La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas en la oscuridad, después se trató con imidazol 5 mM (final), se filtró, y se almacenó durante una noche a 4°C. El producto se generó en dos lotes, uno que contenía 130 ml del volumen de N95K y otro que contenía 100 ml del volumen. La neublastina PEGilada se purificó de la mezcla de reacción en Fractogel EMD SO_3^- (M) (EM Industries). La columna se procesó a temperatura ambiente. Todos los tampones se prepararon libres de pirógenos. Se añadió cloruro sódico a la mezcla de reacción a una concentración final 87 mM y la muestra se cargó en una columna Fractogel de 45 ml (diámetro interno de 5 cm).

La columna se lavó con un volumen de columna de fosfato sódico 5 mM pH 6,5, NaCl 80 mM, después con tres alícuotas de un volumen de columna de fosfato sódico 5 mM que contenía NaCl 50 mM. La resina se transfirió en una columna de 2,5 cm de diámetro y la neublastina PEGilada se eluyó de la columna con seis etapas de diez ml que contenían fosfato sódico 5 mM pH 6,5, NaCl 400 mM, tres etapas que contenían 500 ml de NaCl, y seis etapas que contenían NaCl 600 mM. Las fracciones de elución se analizaron para el contenido de proteínas por absorbancia a 280 nm y después para el grado de modificación por SDS-PAGE. Las fracciones seleccionadas se combinaron, se filtraron a través de un filtro de 0,2 μm , y se diluyeron con agua hasta 1,1 mg de neublastina de rata PEGilada/ml. Después de evaluar los niveles de endotoxina en los lotes individuales, se combinaron y se volvieron a filtrar a través de una membrana de 0,2 μm . El material final se hizo en alícuotas y se almacenó a -70°C.

Espectro UV de Neublastina Mutada NBN106-N95K PEGilada Purificada

El espectro UV (240-340 nm) de NBN N95K PEGilada se obtuvo sobre la muestra neta. La muestra se analizó por triplicado. La muestra PEGilada mostró una absorbancia máxima a 275-277 nm y una absorbancia mínima a 247-249. Este resultado es coherente con lo que se observa sobre el intermedio a granel. La concentración de proteína del producto PEGilado se estimó a partir del espectro usando un coeficiente de extinción de $\Sigma_{280}=0,50$. La concentración de proteína de la neublastina PEGilada a granel es de 1,1 mg/ml. No había turbidez presente en la muestra como es evidente por la ausencia de absorbancia a 320 nm.

Caracterización de Neublastina Mutada NBN106-N95K PEGilada por SDS-PAGE

Alícuotas de neublastina PEGilada que contenían 3, 1,5, 0,75, y 0,3 μg del producto se sometieron a SDS-PAGE en un gel del 4-20% de gradiente (Owl). El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250. Se procesaron en paralelo marcadores de peso molecular (GIBCO-BRL).

El análisis de SDS-PAGE de la neublastina mutada NBN106-N95K PEGilada en condiciones no reductoras reveló una serie de bandas correspondientes a modificaciones con 2, 3, 4, y más de 4 PEG por molécula. La banda principal con masa aparente de 98 kDa contiene 3 PEG por molécula. En el producto PEGilado purificado, no se detectó neublastina no PEGilada. La presencia de una mezcla de productos con 2, 3 y 4 PEG unidos se verificó por análogos de espectrometría de masas por MALDI. La proporción de producto que contenía 2, 3, y 4 PEG se determinó por densitometría y se determinó que era del 7, 62, y 30 por ciento del total, respectivamente.

Caracterización de Neublastina Mutada NBN106-N95K PEGilada por Cromatografía por Exclusión de Tamaño

La neublastina mutada NBN106-N95K PEGilada se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño sobre una columna analítica Superose 6 HR10/30 FPLC usando MES 5 mM pH 6,5, NaCl 300 mM como fase móvil. Esta columna se procesó a 20 ml/h. Las fracciones de elución se controlaron para la absorbancia 280 nm. La neublastina mutada PEGilada eluyó como un único pico con un peso molecular aparente de aproximadamente 200 kDa coherente con el gran volumen hidrodinámico del PEG. No se observaron evidencias de agregados. No se detectó neublastina libre, que eluye con una masa molecular aparente de aproximadamente 30 kDa, en la preparación.

Análisis de Neublastina Mutada NBN106-N95K PEGilada por HPLC de Fase Inversa

La neublastina mutada NBN106-N95K PEGilada se sometió a HPLC de fase inversa en una columna Vydac C_4 (5 μm , 1 x 250 mm). La columna se desarrolló usando un gradiente de 60 mm del 40 al 60% de tampón B (tampón A: TFA al 0,1%, tampón B: acetonitrilo al 75%/TFA al 0,085%). El efluente de columna se controló para la absorbancia a 214 nm y se recogieron las fracciones para el posterior análisis. La NBN106-N95K PEGilada se fraccionó en sus diversos componentes di (60,5 mm), tri (63,3 mm), y tetra (67,8 mm) PEGilados por HPLC de fase inversa en una columna C_4 . Las intensidades relativas de los picos sugieren que las proporciones de los componentes son del 5,4, 60,5, y 30,1%, respectivamente. Las identidades de pico se verificaron por MALDI-MS. No hubo evidencias de NBN106-N95K no PEGilada (eluye a 5-15 mm) en el producto.

ES 2 351 215 T3

Análisis de Neublastina Mutada NBN106-N95K PEGilada por Espectrometría de Masas

La neublastina mutada NBN106-N95K PEGilada se desaló en C₄ Zip Tip y se analizó por espectrometría de masas en un espectrómetro de masas Voyager-DE™ STR (PerSeptive Biosystems) por desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) usando ácido sinapínico como matriz. Se mezclaron 0,5 µl de la proteína purificada con 0,5 µl de la matriz sobre la placa diana. La espectrometría de masas de la neublastina mutada NBN106-N95K PEGilada reveló formas cargadas de forma sencilla o doble de tres aductos. Las masas observadas de 43803 Da, 54046 Da, y 64438 Da son coherentes con las modificaciones de 2, 3, y 4 PEG por molécula.

Análisis de Neublastina Mutada NBN106-N95K PEGilada por Mapeado de Péptidos

La especificidad de la reacción de PEGilación se evaluó por mapeado de péptidos. La neublastina PEGilada se separó en los componentes di, tri, y tetra PEGilados, que después se redujeron, se alquilieron, y se separaron adicionalmente en sus componentes de cadena sencilla por HPLC en una columna C₄. Estos componentes y la NBN106-N95K no PEGilada reducida y alquilada como control se digirieron con proteinasa Asp-N y los productos de escisión resultantes se fraccionaron por HPLC de fase inversa en una columna Vydac C₁₈ (5 µm, 1 x 250 mm) usando un gradiente de 60 mm del 0 al 60% de tampón B (tampón A: TFA al 0,1%, tampón B: acetonitrilo al 75%/TFA al 0,085%). El efluente de columna se controló para la absorbancia a 214 nm.

La secuencia de neublastina de rata contiene cinco ácidos aspárticos internos y por lo tanto se esperaba que produjera un perfil de escisión simple cuando se digirió con endoproteinasa Asp-N. Todos los picos de la digestión con Asp-N de N95K de rata se han identificado por espectrometría de masas y/o secuenciación amino-terminal de Edman y por tanto el mapa peptídico puede usarse como una herramienta simple para sondear sitio de modificación por la presencia o ausencia de un pico. La identidad de los diversos picos se resume a continuación en la Tabla 7.

TABLA 7

Pico por tiempo de retención (mm)	Promedio de masa observada	Promedio de masa teórica	Asignación de restos (SEC ID N° 2)	Secuencia de aminoácidos
38,8	1261,1 (M)	1262,4	102-113	DHLSATACGLG
40,7	1090,9	1092,2	93-101	DVKSTWRTV
44,6	2508,4	2508,9	35-54	DELIRFRFCSGSCRRARSPH
46,0	2437,0	2437,8	12-34	DARGCRLRSQLPVVSALGLGHSS
51,4	3456,7	3456,0	55-86	DLSLAS...CRPTRY
51,9	4134,4		55-92(óxid.)	DLSLAS...CRPTRYEAVSFM
53,2	4136,3 *	4120,8	55-92	DLSLAS...CRPTRYEAVSFM

(M): masa monoisotópica

*: debido a la oxidación del péptido que contiene metionina en MALDI.

Como la neublastina existe de forma natural como un homodímero, el producto de neublastina mutada NBN106-N95K de rata contiene cuatro sitios potenciales para la PEGilación, las dos aminas amino-terminales de cada una de las cadenas y los dos sitios N95K que se diseñaron en la construcción. En el mapa peptídico de la cadena di-PEGilada, solamente el pico que contiene el péptido con la mutación N95K se alteró por la modificación de PEG. Ninguno de los otros picos estuvo afectado por la modificación de PEG. Los datos de mapeado por lo tanto indican que el resto de PEG se une específicamente a este péptido y no a cualquiera de los otros péptidos que se exploraron. El segundo sitio potencial de unión, el extremo amino, está en un péptido que es solamente de tres aminoácidos de longitud y no se detecta en el mapa peptídico. Se deduce que las uniones de PEG adicionales están en este sitio. Coherente con esta noción, un pequeño porcentaje de la neublastina mutada N95K de rata no está truncado y contiene la secuencia Ala-1 madura. Este péptido eluye a 30 µm y es visible en el mapa peptídico de la digestión no PEGilada, pero está ausente de las digestiones de neublastina mutada NBN106-N95K PEGilada.

Ejemplo 3

Evaluación de la Potencia de Neublastina Mutada NBN106-N95K PEGilada de forma Interna en un ELISA por Activación de Receptor Quinasa (KIRA) (ejemplo ilustrativo)

La potencia de la neublastina de rata mutada PEGilada se midió usando activación/fosforilación dependiente de neublastina de c-Ret como informador para la actividad neublastina en un ELISA que era específico para la presencia

ES 2 351 215 T3

de RET fosforilado. Se sembraron células NB41A3-mRL3, una línea celular de neuroblastoma murino adherente que expresa Ret y GFR α 3, a 2 x 10⁵ células por pocillo en placas de 24 pocillos en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero bovino fetal al 10%, y se cultivaron durante 18 h a 37°C y CO₂ al 5%.

- 5 Las células se lavaron con PBS, y se trataron con diluciones en serie de neublastina en 0,25 ml de DMEM durante 10 min. a 37°C y CO₂ al 5%. Cada muestra se analizó por duplicado. Las células se lavaron con 1 ml de PBS, y se lisaron durante 1 h a 4°C con 0,30 ml de Tris HCl 10 mM, pH 8,0, Nonidet P40 al 0,5%, desoxicolato sódico al 0,2%, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM con balanceo suave de las placas. Los lisados se agitaron adicionalmente por pipeteo repetido y se transfirieron 0,25 ml de muestra a una placa ELISA de 96 pocillos
- 10 que se había recubierto con 5 μ g/ml de mAb anti-Ret (AA.GE7,3) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6 a 4°C durante 18 h, y se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con buffer de bloqueo (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1% (TBST) que contenía suero de ratón normal al 1% y albúmina sérica bovina al 3%).

- Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron 6 veces con TBST. Se detectó Ret
- 15 fosforilado incubado los pocillos a temperatura ambiente durante 2 h con 2 μ g/ml de anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) en tampón de bloqueo, lavando 6 veces con TBST, y midiendo la actividad HRP a 450 nm con un reactivo de detección colorimétrica. Se midieron los valores de absorbancia de los pocillos tratados con lisado o con tampón de lisis y se representó la señal corregida con el fondo como una función de la concentración de neublastina presente en la mezcla de activación. La potencia de la neublastina mutada
- 20 PEGilada (3,(4)X10 kDa PEG NBN106-N95K) en el KIRA ELISA era indistinguible de la del material NBN113 de tipo silvestre (FIG. 1 y Tabla 8). No hubo efecto de dos ciclos de congelación-descongelación sobre la potencia y después de este tratamiento no hubo aumento significativo en la turbidez de la muestra, lo que indica que las muestras pueden descongelarse de forma segura para el estudio. En estudios independientes que acceden a la actividad del producto con tres y cuatro PEG de 10 kDa por molécula por separado, se determinó que el aducto con tres PEG era
- 25 completamente activo, mientras que el producto de cuatro PEG tenía potencia reducida (FIG. 2 y Tabla 8). Estos datos demuestran que 3,(4)X10 kDa PEG NBN106-N95K (FIG. 1) y 3X 0 kDa PEG NBN106-N95K (FIG. 2) activan Ret a un grado similar y con la misma dependencia de dosis que la neublastina no mutada (de tipo silvestre), NBN113. Sin embargo, aunque 4X10 kDa PEG NBN106-N95K (FIG. 2) activa Ret a un grado similar que NBN113 no mutada (de tipo silvestre), 4X10 kDa PEG NBN106-N95K es aproximadamente 10 veces menos potente que NBN113 no mutada
- 30 (tipo silvestre) en la activación de Ret. Se proporcionan EC50 estimadas en la Tabla 8.

Ejemplo 4

- 35 *Estudios Farmacocinéticos de Neublastina Mutada NBN106-N95 de Rata PEGilada de forma Interna en Ratas y Ratones (ejemplo ilustrativo)*

Se examinaron las propiedades farmacocinéticas de diversos productos de neublastina mutada PEGilados y no PEGilados en modelos de rata y de ratón (véase la Tabla 8 para un resumen de los resultados).

- 40 Los datos revelaron que la PEGilación de neublastina mutada NBN106-N95K de rata con 3,3, PEG de 10000 Da provocó un efecto significativo sobre la vida media y la biodisponibilidad de la neublastina. Después de una administración IV de 1 mg/kg en ratas Sprague Dawley, se detectaron niveles de pico de neublastina mutada PEGilada de 3000 ng/ml después de 7 minutos, y se detectaron niveles de 700 ng/ml después de 24 h, 200 ng/ml después de 48 h, y 100 ng/ml después de 72 h. En contraste para la neublastina mutada N95K no PEGilada después de una
- 45 administración IV de 1 mg/kg, se detectaron niveles de 1500 ng/ml después de 7 minutos, pero después los niveles bajaron rápidamente hasta 70 ng/ml después 3 h y no fueron detectables después de 7 h. Los efectos de la PEGilación fueron incluso más pronunciados en animales tratados con neublastina PEGilada por administración subcutánea.

- Después de una administración s.c. de 1 mg/kg, los niveles en circulación de neublastina PEGilada alcanzaron un
- 50 máximo de 200 ng/ml después de 24 h y permanecieron a este nivel mientras duró el estudio de tres días. En contraste, no se observó neublastina detectable en ningún momento puntual después de la administración de neublastina mutada no PEGilada.

- El análisis de las muestras de N95K PEGilada se complicó por la presencia de aductos que comprendían 2, 3 y
- 55 4 PEG por molécula, que cada una de ellas presentará un perfil PK diferente. En los primeros estudios PK, se usaron ratones para facilitar la exploración a través de una diversidad de candidatos y vías de administración. Los estudios en ratones revelaron diferencias drásticas en la biodisponibilidad de los candidatos. Sin embargo, cuando se evaluó el aducto de 3,3 PEG de 10 kDa en ratas, se descubrió que estaba menos biodisponible en ratas de lo que estaba en ratones. Esta diferencia en la biodisponibilidad era particularmente pronunciada después de administración i.p.
- 60 Los niveles en ratones alcanzaron los 1600 ng/ml después de 7 h y permanecieron a 400 ng/ml después de 24 h. En contraste, los niveles en rata fueron constantes a 100 ng/ml durante 4-48 h.

- Surgieron dos resultados sorprendentes e inesperados de los estudios PK resumidos en la Tabla 8: 1) la PEGilación en los aminoácidos amino-terminales de neublastina no glucosilada no era suficiente para aumentar la exposición en suero sustancialmente; y 2) la PEGilación del o de los aminoácidos amino-terminales de neublastina junto con la modificación (por ejemplo, PEGilación o glucosilación) del aminoácido 95 era suficiente para aumentar la exposición en suero sustancialmente. Por ejemplo, NBN104 glucosilada (CHO) no dio exposición detectable después de administración s.c.; sin embargo, 1X20 kDa PEG NBN104 glucosilada (CHO) dio elevada exposición en suero después
- 65

ES 2 351 215 T3

de administración s.c. Asimismo, 2X20 kDa PEG NBN113 dio una exposición en suero de baja a moderada después de administración s.c.; sin embargo, 2X20 kDa PEG NBN104 glucosilada (CHO) dio elevada exposición en suero después de administración s.c. Estos resultados indicaron que la conjugación con polímero del o de los aminoácidos amino-terminales de neublastina junto con la conjugación con polímero de un aminoácido interno (por ejemplo, en la posición 95) o la glucosilación en un aminoácido interno (por ejemplo, en la posición 95) provoca una exposición en suero sustancialmente aumentada después de administración sistémica.

Tanto la neublastina de rata de tipo silvestre como la neublastina mutada N95K se replegaron y se purificaron hasta >95% para los ensayos de eficacia en el modelo de neuropatía de rata diabética STZ. La neublastina de tipo silvestre se formuló para ir directamente al ensayo en animales mientras que N95K se preparó para la PEGilación con PEG-SPA de 10 kDa. Para conseguir el objetivo de replegamiento y purificación, se desarrolló un método de replegamiento que utiliza cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) que permitía la renaturalización de neublastina a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli* en grandes cantidades y a elevadas concentraciones. Además de SEC, se emplearon etapas de cromatografía en columna tanto en Ni-NTA como sílice CM para aumentar la pureza final de la proteína. Las proteínas se sometieron a caracterización extensiva incluyendo análisis por SDS-PAGE, cromatografía por exclusión de tamaño, ESMS, evaluación de la actividad por KIRA ELISA, y determinación del contenido de endotoxinas. La SDS-PAGE y SEC de los productos proteicos finales indicaron una pureza de más del 95%. El nivel de endotoxinas de cada producto era de <0,2 EU/mg. La actividad específica de ambas proteínas en el KIRA ELISA es de aproximadamente 10 nM. La neublastina de tipo silvestre se formuló a 1,0 mg/ml y N95K se formuló a 2,6 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 6,5. La neublastina de tipo silvestre se hizo alícuotas en tubos de 15 ml y se almacenó congelada a -70°C mientras que N95K se sometió a PEGilación antes de la formación de alícuotas y la congelación.

Ejemplo 5

Replegamiento y Purificación de Neublastina de Tipo Silvestre y la Neublastina N95K Mutada (ejemplo ilustrativo)

Ambas formas de neublastina se expresaron en *E. coli* como proteínas de fusión marcadas con histidina (His) con un sitio de escisión con enteroquinasa inmediatamente adyacente al inicio de la secuencia de 113 aminoácidos madura. Las bacterias que expresaban neublastina de tipo silvestre (sedimento de 1,8 kg) o N95K (sedimento de 2,5 kg) se sometieron a lisis en 2 litros de PBS usando una APV Gaulin Press. Después de la centrifugación (10.000 rpm) para sedimentar los cuerpos de inclusión, se desecharon los sobrenadantes de cada preparación. Los sedimentos de los cuerpos de inclusión se lavaron dos veces con tampón de lavado (Tris-HCl 0,02 M pH 8,5, EDTA 0,5 mM) después se lavaron dos veces con el mismo tampón que contenía Triton X-100 (2%, v/v) seguido de dos lavados adicionales con tampón sin detergente. Ambos sedimentos se solubilizaron usando clorhidrato de guanidina 6 M, Tris 0,1 M pH 8,5, DTT 0,1 M, y EDTA 1 mM. Para ayudar en el proceso de solubilización, cada sedimento se sometió a homogeneización usando un homogeneizador politron seguido de agitación durante una noche a temperatura ambiente. Las proteínas solubilizadas se aclararon por centrifugación antes de la cromatografía desnaturante a través de Superdex 200 (columna de 5,5 litros equilibrada con glicina 0,05 M/H₃PO₄ pH 3,0 con Guanidina-HCl 2 M) a 20 ml por minuto.

La neublastina desnaturada se identificó por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían neublastina de tipo silvestre o N95K se combinaron y se concentraron a aproximadamente 250 ml usando un concentrador celular de agitación de 2,5 litros Amicon. Después de la filtración para eliminar cualquier precipitado, la proteína concentrada se sometió a cromatografía a medida renaturalizante a través de Superdex 200 equilibrada con Tris-HCl 0,1 M pH 7,8, guanidina-HCl 0,5 M, glutatión reducido 8,8 mM y glutatión oxidado 0,22 mM. La columna se desarrolló usando guanidina-HCl 0,5 M a 20 ml por minuto. Se identificaron las fracciones que contenían neublastina de tipo silvestre o neublastina N95K renaturalizada por SDS-PAGE, se combinaron, y se almacenaron a 4°C hasta que se necesitaron para la eliminación de la marca His.

Método Alternativo para Replegar Neublastina de Tipo Silvestre y Neublastina N95K Mutada por Dilución

Para replegar la neublastina por dilución, la proteína solubilizada se diluyó rápidamente en tampón de replegamiento (guanidina-HCl 0,5 M, L-arginina 0,35 M, fosfato potásico 50 mM (pH 7,8), glutatión reducido 0,2 mM, glutatión oxidado 1 mM, y Tween-80 al 0,1%) a una concentración final de 0,1 mg/ml y se incubó a temperatura ambiente durante 48 horas sin agitación. La neublastina replegada después se concentró a factor 25, se llevó a imidazol 40 mM, y se aplicó a una columna de cromatografía que contenía agarosa Ni-NTA para concentrar adicionalmente el producto y eliminar las proteínas de la célula hospedadora. La columna se lavó con 10 veces el volumen de columna con tampón de lavado (imidazol 40 mM, guanidina-HCl 0,5 M). La neublastina después se eluyó de la resina con imidazol 0,2 M y guanidina-HCl 0,5 M.

Concentración de la Neublastina Replegada en Columna por Cromatografía en Ni-NTA

La neublastina renaturalizada en columna se almacenó a 4°C durante al menos 24 horas antes de proceder con la purificación para promover la formación de puentes disulfuro entre los monómeros de neublastina. Durante este tiempo, se formó un precipitado y se eliminó por filtración a través de una unidad de filtro de 0,2 µ de poliéter sulfona (PES). Para disminuir la unión no específica, la solución proteica se llevó a imidazol 20 mM antes de cargarla en una columna de Ni-NTA (Qiagen) de 100 ml equilibrada con tampón de columna (guanidina 0,5 M e imidazol 20 mM) a 50 ml por minuto. Después de la aplicación de la proteína, la columna se lavó hasta la línea basal usando el mismo tampón. La neublastina se eluyó de la resina usando aproximadamente 300 ml de tampón de elución que contenía

ES 2 351 215 T3

guanidina-HCl 0,5 M e imidazol 0,4 M. Después de la elución, la neublastina se dializó durante una noche (usando tubos de diálisis de 10 kDa) a temperatura ambiente frente a diez volúmenes de HCl 5 mM. La diálisis promueve la hidrólisis de las sustancias contaminantes y disminuye las concentraciones de guanidina-HCl e imidazol hasta 0,05 M y 0,04 M, respectivamente.

Escisión de la Marca His por Lisil Endopeptidasa o Enteroquinasa

El siguiente día, se eliminó por filtración cualquier precipitado que se formara durante la diálisis. Las siguientes etapas de purificación se aplican tanto a los productos de neublastina replegada tanto en columna como por dilución. La muestra proteica se hizo en NaCl 0,1 M por la adición de NaCl a partir de una solución madre 5 M para una concentración salina final incluyendo el resto de guanidina-HCl de aproximadamente 150 mM. Esta concentración se confirmó usando un medidor de conductividad. Además, se añadió HEPES 1 M pH 7,8 para una concentración final de 25 mM. Para escindir la marca His, se añadió lisil endopeptidasa a la neublastina de tipo silvestre y se añadió enteroquinasa a la neublastina mutada N95K, ambas a una proporción de aproximadamente 1:300 de proteasa a neublastina. Para la neublastina mutada N95K se usó enteroquinasa en lugar de lisil endopeptidasa debido a un sitio de escisión con proteasa adicional en la proteína mutada en Lys95. Las muestras se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas y las digestiones se controlaron por SDS-PAGE.

Eliminación de la Marca His por Cromatografía en Ni-NTA

La neublastina tratada con proteasa se aplicó a una columna de Ni-NTA de 100 ml equilibrada con guanidina-HCl 0,5 M e imidazol 20 mM a 50 ml por minuto. La columna se lavó hasta la línea basal con el mismo tampón. Cualquier proteína retirada por lavado de la columna se combinó con la proteína de flujo continuo que contenía la neublastina sin la marca His.

Cromatografía en Sílice CM

Después de la cromatografía en Ni-NTA, la proteína se sometió inmediatamente a purificación adicional a través de resina de sílice CM. Se cargó una columna de sílice CM de 20 ml equilibrada con tampón de carga (fosfato 5 mM pH 6,5, NaCl 150 mM) con neublastina a 20 ml por minuto. La columna se lavó con veinte volúmenes de columna de tampón de lavado (fosfato 5 mM pH 6,5, NaCl 400 mM) y la etapa proteica se eluyó con tampón de elución que contenía fosfato 5 mM pH 6,5 pero NaCl con 1 M. La proteína eluida se dializó durante una noche frente a fosfato solo para llevar la concentración salina por debajo de 100 mM para neublastina N95K y 150 mM para neublastina de tipo silvestre. Ambas se filtraron muestras a través de una unidad de filtro PES de 0,2 μ , se analizaron por SDS-PAGE, y se almacenaron a 4°C hasta que se necesitaron para caracterizaciones adicionales y/o PEGilación.

Las preparaciones proteicas de neublastina de tipo silvestre y mutada N95K se sometieron a análisis de espectro UV para evaluar su absorbancia a 280. Usando una microcubeta de cuarzo y estableciendo el blanco frente a tampón solo, se exploraron de forma continua 100 μ l de neublastina de tipo silvestre o mutada N95K de 230 a 330 nm usando un espectrofotómetro Beckman. En base a este análisis, se determinó que la neublastina de tipo silvestre estaba a una concentración de 1,1 mg/ml y la neublastina mutada N95K a 2,6 mg/ml ($A_{280\text{ nm}}-E^{0,1\%}=0,5$ usada para cada proteína). Se identificó menor del 1% del material precipitado en base a la absorbancia a 330 nm.

Para evaluar la pureza de ambas preparaciones proteicas, cada muestra (0,5 mg) se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño a través de una columna 16/30 Superdex 75. La columna se equilibró con fosfato 5 mM pH 6,5 que contenía NaCl 400 mM y se desarrolló con un caudal de 1,5 ml por minuto. En base a la absorbancia a 280 nm, las preparaciones de neublastina tanto de tipo silvestre como mutada N95K migraron como un único pico con un peso molecular esperado (23-24 kDa), y no contenían ninguna contaminación proteica significativa.

Las proteínas neublastina tanto de tipo silvestre como mutada N95K se redujeron en guanidina-HCl 2,5 M, Tris 60 mM pH 8,0 y DTT 16 mM. Las muestras reducidas se desalaron sobre una corta columna C_4 y se analizaron en línea por ESMS usando un instrumento de cuatro polos triple. Los datos sin procesar de ESMS se desarrollaron por el programa MaxEnt para generar espectros de masas. Este procedimiento permite que se colapsen múltiples señales cargadas en un pico que corresponde directamente a la masa molecular en kilodalton (kDa). El espectro de masa desarrollado para el tipo silvestre mostró que la especie predominante es de 12046 Da, que está de acuerdo con el peso molecular predicho de 12046,7 Da para la forma de 113 aminoácidos de la proteína. También se observó un componente minoritario (12063 Da) que sugiere la presencia de un producto de oxidación. Se identificaron tres picos en la muestra proteica de neublastina mutada N95K. El componente mayoritario mostró una masa molecular aparente de 11345 Da de acuerdo con la masa predicha para la forma de 106 aminoácidos de la proteína. Los otros dos picos tenían masas de 11362 y 12061 Da, lo que sugiere oxidación de N95K y la presencia de la forma de 113 aminoácidos, respectivamente.

La presencia de las formas de 106 y 113 aminoácidos en la preparación proteica de neublastina mutada N95K se puede atribuir a la digestión con enteroquinasa. Esta proteasa de Biozyme es una preparación enzimática natural purificada a partir de la mucosa intestinal de ternero y se ha informado que contienen una ligera contaminación con tripsina (0,25 ng de tripsina por μ g de enteroquinasa). Por lo tanto, la tripsina puede estar actuando sobre la proteína neublastina mutada N95K sobre el lado carboxi-terminal de Arg7 para producir la forma de 106 aminoácidos predominante. Por otro lado, la lisil endopeptidasa usada para escindir la neublastina de tipo silvestre es una única

actividad proteasa que actúa sobre el lado carboxi-terminal del resto de lisina contenido dentro de la marca His para producir la forma madura de 113 aminoácidos de neublastina. Tanto la forma de 106 como la de 113 aminoácidos de neublastina son igual de activas en todos los ensayos realizados y se comportan de forma similar en los ensayos de estabilidad en guanidina-HCl.

5

La actividad neublastina se determinó por su capacidad de estimular la fosforilación de c-Ret en células NB41A3-mRL3 usando el KIRA ELISA descrito en el Ejemplo 3. Se detectó Ret fosforilado incubando (2 horas) el receptor capturado con anticuerpo contra fosfotirosina conjugado con HRP (4G10; 0,2 μ g por pocillo). Después de la incubación, los pocillos se lavaron seis veces con TBST, y se detectó la actividad HRP a 450 nm con un ensayo colorimétrico. Se midieron los valores de absorbancia de los pocillos tratados con lisado o con tampón de lisis solo, se corrigieron los fondos, y se representaron los datos como una función de la concentración de neublastina presente en la mezcla de activación. Los datos demuestran que los polipéptidos de neublastina purificados provocaban la aparición de RET fosforilado, lo que indica que la neublastina purificada era activa en este ensayo.

15 Ejemplo 6

Preparación de un Conjugado Albúmina Sérica-Neublastina (ejemplo ilustrativo)

La neublastina de rata de tipo silvestre a una concentración de 1 mg/ml en PBS se trató con sulfo-SMCC (Pierce) 20 1 mM y de desaló para retirar el exceso de reticulante. Como la proteína neublastina de tipo silvestre contiene solamente una única amina en su extremo amino y ningún grupo sulfhidrilo libre, se esperaba que la reacción con SMCC provocara una modificación específica de sitio de la neublastina con SMCC unido en su extremo amino.

A continuación, se incubaron 60 μ g del conjugado neublastina-SMCC con 120 μ g de albúmina sérica bovina y se 25 analizaron para el grado de reticulación por SDS-PAGE. La BSA contiene un único grupo SH libre y por consiguiente se espera que la reacción con el conjugado neublastina-SMCC provoque modificaciones en este sitio a través de la maleimida en el SMCC. En estas condiciones, se observaron dos bandas adicionales de mayor peso molecular, que son coherentes en masa con la modificación de la neublastina con un único resto de BSA y con dos moléculas de BSA ya que cada molécula de neublastina contiene dos extremos amino que pueden experimentar reacción, y por consiguiente 30 están de acuerdo con esta noción. De forma concurrente con la formación de estas bandas, hubo una disminución de la intensidad de las bandas de neublastina-SMCC y BSA. En base a la intensidad de la banda de neublastina restante, parecía que la reacción había llegado a completarse al 70-80%.

El producto monosustituido se purificó de la mezcla de reacción sometiendo el material a cromatografía de inter- 35 cambio catiónico y cromatografía por exclusión de tamaño sobre una columna Superdex 200 (Pharmacia) esencialmente como se describe para los estudios de PEGilación analizados anteriormente. Las fracciones de columna del procesamiento de filtración en gel se analizaron por SDS-PAGE y aquellas que contenían el producto monosustituido se analizaron para el contenido de proteínas por absorbancia a 280 nm. Como la masa de la BSA es aproximadamente dos veces la de la neublastina, la concentración aparente se dividió por un factor de 3 para dar el equivalente de neublastina. Esta fracción se sometió a análisis para la función en el KIRA ELISA. Los valores de IC₅₀ para la 40 neublastina tanto de tipo silvestre como conjugada con BSA fueron de 3-6 nM, lo que indica que la conjugación con la BSA no había comprometido la función.

Aunque estos estudios preliminares se generaron con BSA, las proteínas de albúmina sérica correspondientes de 45 ratas y seres humanos también contienen un SH libre. Por consiguiente, puede aplicarse un enfoque similar para generar un conjugado albúmina sérica de rata-neublastina de rata para realizar estudios PK y de eficacia y albúmina sérica humana-neublastina humana para realizar ensayos clínicos. Asimismo, puede sustituirse el SMCC con cualquiera de varios reticulantes que contienen un grupo amino reactivo en un lado y un grupo tiol reactivo en el otro lado. Ejemplos de reticulantes amina reactivos que insertan una maleimida tiol reactiva son AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, 50 SMPH, KMUS, o GMBS, que insertan un grupo haloacetato tiol reactivo son SBAP, SIA, SIAB y que proporcionan un tiol protegido o no protegido para la reacción con grupos sulfhidrilo para producir un enlace reducible son SPDP, SMPT, SATA, o SATP, todos los cuales están disponibles en Pierce. Dichos reticulantes son simplemente ejemplares y se anticipan muchas estrategias alternativas para unir el extremo amino de neublastina con albúmina sérica. Un especialista en la técnica también podría generar conjugados con albúmina sérica que no están dirigidos al extremo amino 55 de neublastina o en el resto tiol en la albúmina sérica. También se espera que sean funcionales fusiones de neublastina con albúmina sérica creadas usando ingeniería genética donde la neublastina se fusiona con el gen de albúmina sérica en su extremo amino, extremo carboxi, o en ambos extremos.

Este método puede extenderse a través de adaptaciones rutinarias a cualquier conjugado de neublastina con al- 60 búmina sérica que produciría un producto con una vida media prolongada en animales y por consiguiente en seres humanos.

Ejemplo 7

65 *Cristalización y Determinación de la Estructura de Neublastina Humana*

Se expresó neublastina marcada con selenometionina usando un procedimiento convencional para inhibir la biosíntesis de metionina (VanDuyne, *et al.*, 1991, *Science* 252, 839-842). Tanto la neublastina de tipo silvestre como

la neublastina con selenometionina incorporada se concentraron a 17 mg/ml en arginina 0,8 M. La solución madre proteica se concentró a 17 mg/ml en arginina 0,8 M. Se hicieron crecer cristales por el método de difusión de vapor de gota colgante (Jancarik, J. & Kim, S.H., 1991, *J. Appl Crystallogr.* 24, 409-411) en sulfato de magnesio 1,25 M, MES 0,1 M pH 6,5 a 20°C. Los cristales más reproducibles se obtuvieron por microsiembra. Los cristales se crioconservaron por la adición de etilenglicol al 5% cada 60 segundos hasta una concentración final de sulfato de magnesio 1,25 M, MES 0,1 M pH 6,5, y etilenglicol al 30% (v/v) y después se congelaron por transferencia rápida a nitrógeno líquido.

Los cristales de aproximadamente 100 micrómetros a cada lado difractaban hasta 1,6 Å en la línea del haz X4A en el National Synchrotron Light Source (Upton, NY). El procesamiento de los datos con el paquete de programas HKL (Otwinowski (1993) en: *Proceeding of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing* (Sawer *et al.*, Eds.) pág. 56-62, Daresbury Laboratory, Warrington) reveló que los cristales pertenecían al grupo espacial C2 con 1 dímero covalente por unidad asimétrica y las dimensiones de celda aproximadas $a=115$ Å, $b=33$ Å, $c=55$ Å y $\alpha=\gamma=90^\circ$, $\beta=99^\circ$.

La estructura cristalina se resolvió por reemplazos isomorfos múltiples. Los cristales de neublastina nativa se impregnaron en PtCl_4 1 mM durante 4 horas, IrCl_3 10 mM durante 72 horas, y IrCl_6 10 mM durante 18 horas y se recogieron los datos y se procesaron por el ajuste HKL (Otwinowski *et al.*, *supra*). Los dos sitios de selenometionina se localizaron por inspección de mapas de patterson de diferencias isomorfas y anómalas. Los sitios restantes se localizaron usando SOLVE (4). Las fases se mejoraron por RESOLVE (Terwilliger *et al.*, 1999, *Acta Crystallogr. D.* 55, 849-861) a una cifra de valor de 0,56 y los mapas resultantes eran de suficiente calidad para rastrear el modelo de neublastina. Ciclos alternos de construcción de modelos con O2D (S G J Kleywegt y T A Jones, "O2D - the manual", manual de software, Uppsala, 1994) y el refinamiento con CNX usando una diana mlhl y refinados frente a los datos de selenometionina produjeron un modelo completo de la proteína neublastina, excluyendo los primeros 13 aminoácidos amino-terminales, así como las 89 moléculas de agua y los 6 aniones sulfato. El R_{libre} final es del 28,5% y el R-factor es del 24,7% hasta 2,0 Å con buena estereoquímica.

Ejemplo 8

Sitios de Unión a Sulfato y Modelado de Sulfato de Heparina

Se localizó un grupo de tres sulfatos en los vértices de un triángulo equilátero aproximado en la región pre-hélice de la superficie de neublastina y podía representar un sitio de unión para sulfato de heparina. Hay tres restos de arginina que parece que tienen interacciones clave con estos sulfatos. El resto de arginina R48 une juntos los tres sulfatos (nº 2, nº 6, y nº 3). Su estructura amida interacciona con el sulfato nº 2, mientras que su grupo guanidinio de la cadena latera forma un enlace de hidrógeno bifurcado con los sulfatos nº 6 y nº 3. Un segundo resto de arginina (R49) forma un enlace de hidrógeno con el sulfato nº 2 y un tercer resto de arginina (R51) forma un largo enlace de hidrógeno con el sulfato nº 6.

Estos sulfatos pueden representar bolsillos de unión para sulfato de heparina, que si se mutan en resto cargados no positivamente podrían reducir la unión de sulfato de heparina y posiblemente disminuir y/o retardar la eliminación de la molécula neublastina después de su administración *in vivo*. Puede construirse un modelo de sulfato de heparina unido a neublastina superponiendo los sulfatos del glucosaminoglucano con los sulfatos existentes de la estructura cristalina de neublastina. Los sulfatos unidos al sacárido n y n+2 en el sulfato de heparina de la estructura cristalina de FGF-1 en complejo con sulfato de heparina están separados en aproximadamente 8,5 Å (Pellegrini *et al.*, (2000) *Nature* 407, 1029-1034). Esta medición coincide estrechamente con la distancia entre los sulfatos del grupo de 3 sulfatos en la estructura de neublastina; los sulfatos nº 3 y nº 6 están separados en 8,8 Å y los sulfatos nº 3 y nº 2 están separados en 8,1 Å. Esta correspondencia en la medición de la distancia podría indicar que este motivo R48/R49/R51 es parte de un sitio de unión a heparina. Esto sugiere que mutaciones de un único sitio de R48, R49 o R51 en ácido glutámico podría reducir la afinidad de unión por sulfato de heparina sin reducir la actividad de unión al receptor de la neublastina, produciendo de este modo un producto biológicamente activo que tiene una vida media prolongada en animales y por consiguiente en seres humanos. Para ensayar esta posibilidad, se está generando una serie de construcciones que contienen una o más argininas mutadas en ácido glutámico. Los productos de neublastina mutada se expresarán en *E. coli*, se purificarán y se replegarán, y se ensayarán para su función. Finalmente, los productos se ensayarán para su capacidad de unirse a heparina y para la farmacocinética y farmacodinámica en animales.

Uno o más de estos sitios podrían también proporcionar otros sitios para la PEGilación que puede conseguirse reemplazando R con K o C y aplicando los métodos descritos anteriormente.

Ejemplo 9

Dosificación de Neublastina Mutada NBN106-N95K Pegilada en la Reversión de Hiperalgnesia Táctil y Térmica en un Modelo Animal de Ligamiento de Nervios de Dolor Neuropático (ejemplo ilustrativo)

Se ha descubierto previamente que 1 mg/kg de neublastina de tipo silvestre, administrada s.c. 3 veces por semana, provoca una reversión y normalización casi completa de los comportamientos de dolor neuropático (alodinia táctil e hiperalgnesia térmica) inducido por ligamiento del nervio espinal en ratas, mientras que 0,03 mg/kg de tipo silvestre, administrada s.c. 3 veces por semana no tuvo efecto y 0,1 mg/kg y 0,6 mg/kg de neublastina tipo silvestre, administrada s.c. 3 veces por semana tuvo efectos intermedios en este modelo.

Aquí se describen estudios para abordar el efecto de reversión de la neublastina N95K pegilada sobre la alodinia táctil, y la hiperalgesia térmica en el modelo de ligamiento del nervio espinal L5/L6 de Chung ("SNL"). Ratas macho Sprague-Dawley (230 - 380 g) se dividieron en dos grupos. Todas las ratas recibieron el ligamiento del nervio espinal. A un grupo de ratas (n=6) se le administró vehículo por inyección subcutánea. A un segundo grupo de ratas (n=6 por grupo) se le administró neublastina N95K pegilada (3,(4)X10 kDa PEG NBN106-N95K) por inyección subcutánea a 10 µg/kg. La 3,(4)X10 kDa PEG NBN106-N95K, comprendía la proteína neublastina que se obtuvo de *E. coli* y contenía una sustitución de aminoácido Asn-a-Lys en la posición 95, que después se había truncado (truncamiento amino-terminal de 7 aminoácidos; NBN106), y finalmente se había pegilado con un promedio de 3,3 restos de PEG por dímero de NBN, usando propionato de metoxilpoli(etilenglicol)-succinimidilo (SPA-PEG) con una masa molecular de 10.000 Da como reactivo. El vehículo constaba de fosfato 5 mM y cloruro sódico 150 mM a pH 6,5. Las inyecciones subcutáneas se administraron en los días 3, 5, 7, 10, 12 y 14 después de la operación (post-SNL). Se usaron los ensayos de comportamiento de Von Frey (Chaplan *et al.* (1994), *J. Neurosci. Meth.* 53: 55-63) y de Hargreaves (Hargreaves *et al.* (1988), *Pain* 32: 77-88) para controlar las respuestas táctiles y térmicas, respectivamente. Estas respuestas de dolor se controlaron antes del ligamiento del nervio espinal para establecer las respuestas iniciales, en el día 2 post-SNL para verificar la presencia de hiperalgesia táctil y térmica, y después en los días 3, 5, 7, 10, 12, 14 y 15 post-SNL. Para evaluar la significancia estadística del tratamiento con fármaco con relación al tratamiento con vehículo, se realizó un análisis de una vía de la varianza (ANOVA de una vía) seguido de un ensayo de Student Neuman Keuls (SNK) post-hoc.

Los resultados se representan en las FIG. 3-4 como promedios ± errores típicos de la media. Ambos tipos de comportamiento de dolor neuropático (alodinia táctil mostrada en la FIG. 3, e hiperalgesia térmica mostrada en la FIG. 4) se desarrollaron completamente en el día 2 post-SNL, como se esperaba. La administración subcutánea de 10 µg/kg de 3,(4)X10 kDa PEG N95K-NBN106 (como se indica por las flechas descendentes en las FIG. 3 y 4) condujo a una reversión sustancial y estadísticamente significativa de ambos tipos de dolor neuropático (táctil en la FIG. 3 y térmico en la FIG. 4) en ratas con ligamiento del nervio espinal. En ratas con ligamiento del nervio espinal, el efecto de 10 µg/kg de 3,(4)X10 kDa PEG NBN106-N95K sobre la sensibilidad térmica y la alodinia táctil primero llegó a ser estadísticamente significativo 4 días después del inicio de la administración de neublastina N95K pegilada. El efecto de 10 µg/kg de 3,(4)X10 kDa PEG NBN106-N95K sobre la sensibilidad térmica y la alodinia táctil alcanzó un nivel constante aproximadamente 4 días después del inicio de la administración de neublastina N95K pegilada. Los efectos de 3,(4)X10 kDa PEG NBN106-N95K no disminuyeron durante el intervalo de 2 a 3 días entre las administraciones. De hecho, hubo una normalización sustancial de los comportamientos de dolor entre las administraciones de la neublastina N95K pegilada en los días 5 y 7. En otro experimento (datos no mostrados), la administración subcutánea de 3 µg/kg de 3,(4)X10 kDa PEG NBN106-N95K en los días 3, 5, 7, 10, 12 y 14 condujo a una normalización significativa de los comportamientos de dolor (hiperalgesia táctil y térmica) en el modelo SNL, aunque la aparición del efecto fue algo más lenta.

Estos resultados demostraron que 3,(4)X10 kDa PEG NBN106-N95K tiene una potencia aumentada de al menos 100 a 333 veces sobre la neublastina no glucosilada no mutada sobre los comportamientos de dolor de la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica en el modelo SNL. Las propiedades farmacocinéticas potenciadas de 3,(4)X10 kDa PEG N95K NBN106 en comparación con la neublastina no glucosilada no mutada indicaron que la eficacia de neublastina administrada de forma sistémica se correlaciona con los niveles séricos de neublastina. Estos resultados demostraron que los conjugados con polímeros de neublastina mutada pueden usarse para tratar el dolor neuropático en pacientes con dosis enormemente reducidas, y frecuencia de dosificación potencialmente reducida, debido a su biodisponibilidad potenciada en comparación con neublastina no conjugada.

TABLA 8

Caracterización Biológica de NBN PEGilada

Forma de NBN	Aminoácidos PEGilados	Aminoácidos glucosilados	Exposición en ratones después de administración	KIRA: ~EC50	KIRA: eficacia ~Máx vs WT
			S.C.		
NBN			nd	0,4-1,2 nM	100%
NBN104		95,95	nd	0,7 nM	90%
(CHO)					
2 X 5 kDa	1,1		nd	0,2 nM	105%
PEG-NBN					
4 X 5 kDa	1,1,95,95		nd	1 nM	80%
PEG					
NBN106-N95K					

ES 2 351 215 T3

	2X10 kDa 1,1		nd	0,2 nM	72%
	PEG-NBN				
5	1X20 kDa 1		nd	0,2 nM	83%
	ramificado				
	PEG-NBN				
10	1X20 kDa 1	95,95	++	0,3 nM	110%
	PEG-NBN104				
	(CHO)				
15	3X10 kDa 1,1,95		++	0,7 nM	115%
	PEG-				
	WT/N95K-				
	NBN106				
20	3X10 kDa 1,1,95		++	0,8 nM	100%
	PEG				
	NBN106-				
25	N95K				
	3(,4)X10 kDa 1,1,95 (,95)		++	1,6 nM	90%
	PEG				
	NBN106-				
30	N95K				
	4X10 kDa 1,1,95,95		++	11 nM	>80%
	PEG				
35	NBN106-				
	N95K				
	2X20 kDa 1,1		+	0,6 nM	80%
	PEG-NBN				
40	2X20 kDa 1,95		++	inactivo	inactivo
	ramificado				
	PEG				
45	NBN106-				
	N95K				
	2X20 kDa 1,1	95,95	++	1 nM	105%
50	PEG-NBN104				
	(CHO)				

Nota: nd se refiere a no detectable, + indica exposición baja-moderada, ++ indica alta exposición

Nota: todas son NBN113, salvo que se indique otra cosa

Note: todas se obtuvieron de E. coli, salvo si se indica CHO

ES 2 351 215 T3

SEC ID Nº	Secuencia:
1	Polipéptido de neublastina madura consenso - 113 aa
2	NBN113 madura humana
3	NBN113 madura de ratón
4	NBN113 madura de rata
5	PreproNBN - 220 aa
6	NBN140 madura
7	NBN116 madura
8	NBN112 truncada
9	NBN111 truncada
10	NBN110 truncada
11	NBN109 truncada
12	NBN108 truncada
13	NBN107 truncada
14	NBN106 truncada
15	NBN105 truncada
16	NBN104 truncada
17	NBN103 truncada
18	NBN102 truncada
19	NBN101 truncada
20	NBN100 truncada
21	NBN99 truncada
22	Polipéptido DYKDDDDK - 8 aa
23	NBN113-N95K
24	NBN106-N95K
25	ORF de tipo silvestre de rata - 675 nt
26	polipéptido preproNBN de tipo silvestre de rata - 224 aa
27	Cebador KD2-310 Primer
28	Cebador KD2-311
29	Cebador KD3-254
30	Cebador KD2-255
31	Cebador KD3-258
32	Cebador KD3-259
33	Cebador KD3-256
34	Cebador KD3-257
35	ORF de NBN marcada con His - 414 nt
36	NBN marcada con His - 135 aa

Otras realizaciones

Aunque se han descrito realizaciones particulares en este documento en detalle, esto se ha hecho a modo de ejemplo para propósitos de ilustración solamente, y no se pretende que sean limitantes con respecto al alcance de las siguientes reivindicaciones adjuntas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de neublastina que es al menos un 80% idéntico a los aminoácidos 8-113 de la SEC ID N° 1 y
5 que contiene una sustitución de una o más de la arginina de la posición 48, la arginina de la posición 49, o la arginina
de la posición 51 con un resto de ácido glutámico.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el resto de arginina de la posición 48 está sustituido con ácido
glutámico.

10 3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el resto de arginina de la posición 49 está sustituido con ácido
glutámico.

15 4. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el resto de arginina de la posición 51 está sustituido con ácido
glutámico.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65