

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 115**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2004** **E 10173737 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013** **EP 2246362**

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

30 Prioridad:

31.01.2003 US 356264

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2014

73 Titular/es:

**BIOGEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US**

72 Inventor/es:

**SAH, DINAH, WEN-YEE;
PEPINSKY, R. BLAKE;
BORIACK-SJODIN, PAULA ANN;
MILLER, STEPHAN S.;
ROSSOMANDO, ANTHONY y
SILVIAN, LAURA**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 450 115 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 de proteínas, 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 natural 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 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la superfamilia de la neurotrofina y la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). Los ligandos relacionados con el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) son una familia de proteínas dentro de la superfamilia del TGF- β . Los ligandos relacionados con GDNF incluyen GDNF, persefina (PSP), neurturina (NTN) y neublastina (NBN; conocida como atermina o enovina). Los miembros de la familia de ligandos relacionados con GDNF se diferencian, entre otras cosas, por sus siete residuos de cisteína conservados. Estos residuos forman puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares y dan lugar a la estructura terciaria y secundaria del ligando polipeptídico dimerizado. Los miembros de la familia también comparten la capacidad de inducir la señalización a través de un complejo receptor multicomponente que consta de un co-receptor anclado a glucosilfosfatidil inositol (GPI) de la familia GFR α , un miembro de la subfamilia de ligandos relacionados con GDNF y el receptor de tirosina quinasa RET.

RET inactivado inicia una cascada de transducción de señales que es el responsable, al menos en parte, de los efectos aguas 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 ruta del receptor GFR α para afectar a los procesos celulares aguas abajo.

La neublastina se clasifica 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 los documentos EP 02/02691, WO 02/078730 y WO 02/060929) y debido a 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 subregiones únicas en su secuencia de aminoácidos en comparación con otros miembros de la familia de ligandos relacionados con GDNF.

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 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 estados patológicos. Por ejemplo, patologías de neuronas sensoriales y dopaminérgicas que son la base de 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 organismo, lo que puede afectar al paradigma de dosificación de neublastina necesaria en aplicaciones terapéuticas. Por tanto, existe la necesidad de polipéptidos de neublastina modificada con biodisponibilidad aumentada. Por consiguiente, un objeto de la presente invención es identificar formas mutadas de neublastina que muestren biodisponibilidad potenciada.

Sumario de la invención

También se describen dímeros de neublastina mutada conjugada con polímero. Cada dímero contiene un primer polipéptido que comprende un primer aminoácido aminoterminal y un segundo polipéptido que comprende un segundo aminoácido aminoterminal. Cada polipéptido contiene individualmente: (a) una secuencia de aminoácidos caracterizada por una identidad de secuencia del al menos 70 %, 80 %, 90 % o 95 % con los aminoácidos 8-113 de la SEC ID N°: 1; (b) un residuo 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 residuos de aminoácidos: 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 de aminoácido (con respecto a la SEC ID N°: 1), que proporciona un sitio interno de conjugación con polímero al que se conjuga un polímero.

En el presente 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 o 100-110, de la SEC ID N°: 6 con 1-6 sustituciones de aminoácidos, proporcionando cada sustitución un sitio de conjugación con polímero en el que se conjuga un polímero. Los ejemplos de polipéptidos descritos en el presente 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 aminoácidos aminoterminales en el dímero puede estar conjugado con un polímero. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el reemplazo de un residuo de arginina por un residuo de lisina (Raa#K; donde aa# es el número de aminoácido basado en la SEC ID N°: 1), y el reemplazo de un residuo de asparagina con un residuo de lisina (NaaA#K) o un residuo de aspartato (Naa#D). Son ejemplos específicos de dicha sustitución R14K, R39K, R68K, N95D y N95K (numeración basada en la SEC ID N°: 1). La sustitución puede ser N95K.

El dímero de la presente invención comprende un primer polipéptido de neublastina y un segundo polipéptido de neublastina, en el que la secuencia de aminoácidos del primer y segundo polipéptido de neublastina es NBN104 (SEC ID N°: 16), en el que el primer polipéptido de neublastina y el segundo polipéptido de neublastina están cada uno de ellos glucosilados en el aminoácido de la posición 86 de la SEC ID N°: 16 correspondiente a la posición 95 de la secuencia de neublastina como se define en la SEC ID N°: 2, y en el que (a) el primer polipéptido de neublastina está conjugado en su extremo N con una porción de polietilenglicol, o (b) el primer polipéptido de neublastina y el segundo polipéptido de neublastina están cada uno de ellos conjugados en el extremo N con una porción de polietilenglicol.

Preferentemente, el peso molecular combinado total de la porción de polietilenglicol en un dímero es de 20.000-40.000 Da. Preferentemente, el peso molecular promedio de cada porción de polietilenglicol es de 2.000-100.000 Da; más preferentemente, 5.000-50.000 Da; y más preferentemente, aproximadamente 10.000 a 20.000 Da. La porción de polietilenglicol puede ser lineal o ramificada. En algunas realizaciones, al menos un polipéptido está glucosilado.

Como se describe en el presente documento, el dímero conjugado con polímero puede contener un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que: (a) cada polipéptido comprende individualmente los aminoácidos 100 a 110 de la 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 o 4 porciones de PEG, en el que el peso molecular de cada porción de PEG es de aproximadamente 10.000 Da, y cada porción 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 el presente documento también se describe una composición farmacéutica que comprende un dímero, como se describe en el presente documento. La composición puede contener uno o más dímeros diferentes, como se describe en el presente documento.

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

En el presente documento también 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 el presente documento. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de 0,1 µg/kg a 1000 µg/kg, de 1 µg/kg a 100 µg/kg o de 1 µg/kg a 30 µg/kg. La administración del dímero puede realizarse por diversas vías, por ejemplo, intramuscular, subcutánea o intravenosa. En algunos usos descritos en el presente documento, el dímero se administra tres veces por semana. En el presente 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 de aminoácido de neublastina se referirá a la numeración ilustrada en la SEC ID N°: 1.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un especialista en la técnica a la que pertenece esta invención. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Como se usa en el presente documento, "polipéptido de neublastina de tipo salvaje" significa una secuencia polipeptídica de neublastina de origen natural. Un polipéptido de neublastina de tipo salvaje 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 o 4). Se proporciona una secuencia consenso del polipéptido de neublastina como SEC ID N°: 1.

Como se usa en el presente 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 salvaje, contiene al menos una sustitución, inserción o fusión de aminoácido, con respecto al polipéptido de neublastina de tipo salvaje, y presenta actividad de neublastina (por ejemplo, como se describe en la Solicitud Internacional N° PCT/US02/02319 (documento WO 02/060929).

Como se usa en el presente documento, "sitio interno de conjugación con polímero" significa un residuo de aminoácido no terminal en un polipéptido de neublastina mutada, proporcionado dicho residuo una cadena lateral adecuada para la conjugación de un polímero.

Como se usa en el presente documento, "polipéptido de neublastina modificada", significa un polipéptido que contiene al menos un polímero unido.

Como se usa en el presente 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.

Como se usa en el presente 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 dividido entre la cantidad de posiciones 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 comparten una homología de 50 % (3 de las 6 posiciones totales son coincidentes). Generalmente, se realiza una comparación cuando se alinean dos secuencias para dar una homología máxima. Dicho alineamiento puede proporcionarse utilizando, 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 residuos aminoacídicos idénticos y similares, donde residuos similares son sustituciones conservativas para, o "mutaciones puntuales permitidas" de, residuos aminoacídicos correspondientes en una secuencia de referencia alineada. A este respecto, una "sustitución conservativa" de un residuo en una secuencia de referencia es una sustitución por un residuo que es física o funcionalmente similar al residuo de referencia correspondiente, por ejemplo, que tiene un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas o 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 de una secuencia de tipo salvaje 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 residuos coincidentes o sustituciones conservativas compartidas por las dos secuencias dividido entre 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

Los polipéptidos de neublastina mutada descritos en el presente documento conservan actividad neurotrófica y tienen biodisponibilidad potenciada en comparación con el polipéptido de neublastina de tipo salvaje. Por ejemplo, las neublastinas mutadas descritas en el presente documento activan el producto génico RET en ensayos en los que la neublastina de tipo salvaje activa RET. En el presente documento se describen polipéptidos de neublastina mutada que conservarán 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.

- (i) siete residuos de cisteína conservados en las posiciones 16, 43, 47, 80, 81, 109 y 111 cuando se enumeran de acuerdo con la SEC ID N°: 1-4:

(ii) los siguientes residuos de aminoácidos:

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, cada uno cuando se numera de acuerdo con la SEC ID N°: 1-4;

(iii) una repetición LGLG, un motivo FRFC, un motivo QPCCRP y un motivo SATACGC.

En el presente documento se describe un polipéptido de neublastina mutada truncado, en el que el extremo amino del polipéptido de neublastina truncado carece de uno o más aminoácidos aminoterminales de un polipéptido de neublastina maduro pero está mutado para que posea una unión interna con polímero. Cuando el polipéptido de neublastina mutada truncado se dimeriza, puede activar un polipéptido RET. El polipéptido de neublastina mutada puede inducir la dimerización del polipéptido RET. Dicha inducción puede requerir polipéptidos adicionales o cofactores, como sería evidente para un especialista en la técnica.

La secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de neublastina humana y de ratón se describe en la publicación PCT WO00/01815. Se presentan ejemplos de polipéptidos de neublastina de tipo salvaje de acuerdo con la invención en la Tabla 1A. Una secuencia consenso de neublastina (consenso con respecto a ser humano, ratón y rata), se expone en la Tabla 1B.

Tabla 1A. Polipéptidos NBN113 maduros de tipo salvaje		
1	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSD EL VRF AGTRSSRARTTDARGCRLRSQ LVPVSALGLGHSS DEL IRF AGTRSSRARATDARGCRLRSQ LVPVSALGLGHSS DEL IRF ag---srar---argcrlrsq lvpv-alglgh-sdel-rf	ser humano ratón rata Consenso
41	RFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC RFCSGSCRRARSQHDL SLASLLGAGALR SPPGSRPISQPC RFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRSPPGSRPISQPC rfcsgscrrars-hdls slasllgagalr -ppgsrp-sqpc	ser humano ratón rata consenso
81	CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLS ATACGCLG CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLS ATACGCLG CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLS ATACGCLG crptryeavsfmdvnstwr tvd -lsatacgc lg	ser humano (SEC ID N°: 2) ratón (SEC ID N°: 3) rata (SEC ID N°: 4) consenso (SEC ID N°: 1)
	*	* = Asn95

En el presente documento también se describen polipéptidos en los que al menos uno de los residuos de arginina (Arg o R) o asparagina (Asn o N) mostrados en **negrita** en la Tabla 1A está sustituido con un residuo aminoacídico diferente. El polipéptido de neublastina mutada puede tener un residuo de lisina (Lys o K) sustituido por asparagina en la posición de aminoácido 95, indicado por un asterisco en la Tabla 1A, y se conoce como NBN-N95K. En general, la sustitución N95K produce una solubilidad mejorada. Esto facilita la formulación a elevadas concentraciones.

Tabla 1B. Secuencia consenso de NBN113

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

Los residuos sustituidos en el polipéptido neublastina mutada pueden seleccionarse 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 seleccionarse 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 seleccionarse en base a la estructura cristalina de la neublastina, cuya cristalización y determinación estructural se describe a continuación. Además, los sitios pueden seleccionarse 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. En la Tabla 2 se expone una lista de aminoácidos de neublastina accesibles al disolvente o expuestos en la superficie identificados a través de esta metodología.

La Tabla 2 proporciona una lista de residuos y números en neublastina humana que se espera que estén expuestos en superficie. La primera columna se refiere a residuos 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 residuo 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 residuos apropiados en neublastina. La segunda y tercera columnas, respectivamente, se refieren a los residuos expuestos en superficie determinados examinando la estructura del dímero de neublastina humana formado por las cadenas A y B. El esquema de numeración de 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 Pro +-+	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 +++

Tabla 2					
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 residuos no están presente en las estructuras del GDNF o de la neublastina. Esto se debe al diseño de la construcción, a las regiones flexibles o a los insertos en la neublastina con relación al GDNF (residuos 68-71).

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

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

15 Los polipéptidos de neublastina descritos en el presente documento pueden conservar los siete residuos de 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;

- 20 (i) el polipéptido de 140 AA denominado en el presente documento NBN140, que posee la secuencia de aminoácidos denominada SEC ID N°: 6;
- (ii) el polipéptido de 116 AA denominado en el presente documento NBN116, que posee la secuencia de aminoácidos denominada SEC ID N°: 7; y
- 25 (iii) el polipéptido de 113 AA denominado en el presente documento NBN113, que posee la secuencia de aminoácidos denominada SEC ID N°: 2.

La Tabla 3 ilustra la relación entre las secuencias prepro polipeptídicas de neublastina descritas en el presente 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 residuos de cisteína conservados se indican con símbolos ("*", "#", "+" y "|") para indicar los puentes disulfuro intramoleculares (* con *, # con #, y + con +) e intermoleculares ("|") formados en el ligando de neublastina dimerizada madura. El acento circunflejo ("^") indica el residuo de asparagina en la posición del aminoácido 95 que está sustituido con una lisina en NBN106-N95K.

35

Tabla 3. Secuencias de polipéptidos de NBN

	10	20	30	40	50	
PrePro						
NBN140	-----MELGTCG STL SHCPWPRROPAL NPT AALAL -----					33
NBN116	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----					
NBN113	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----					
	60	70	80	90	100	
PrePro						
NBN140	SSVAEASLGSAPRSPAPREGPPPV L SPAGHLPGGR IARWC SGRARRPP					83
NBN116	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----					3
NBN113	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----					
	110	120	130	140	150	
PrePro						
NBN140	OPSRPAPPPPPAPPSALPRGGRAARAGSPGGRARANGAR SCRLRSOL PVR					133
NBN116	OPSRPAPPPPPAPPSALPRGGRAARAGSPGGRARAAGARGC RLRSOL PVR					53
NBN113	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----					29
NBN113	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----					26
	160	170	180	190	200	
PrePro						
NBN140	ALGLGHRSD ELVR FRFC SGSCRRAR SPHDL SLASLLGAGALR PPPGSRPV					183
NBN116	ALGLGHRSD ELVR FRFC SGSCRRAR SPHDL SLASLLGAGALR PPPGSRPV					103
NBN113	ALGLGHRSD ELVR FRFC SGSCRRAR SPHDL SLASLLGAGALR PPPGSRPV					79
NBN113	ALGLGHRSD ELVR FRFC SGSCRRAR SPHDL SLASLLGAGALR PPPGSRPV					76
		#	+			
	210	220	230			
PrePro						
NBN140	SQPCCRPTR YEAVS FMDV NSTWR TIVDRLS ATACG CLG					220
NBN116	SQPCCRPTR YEAVS FMDV NSTWR TIVDRLS ATACG CLO					140
NBN113	SQPCCRPTR YEAVS FMDV NSTWR TIVDRLS ATACG CLG					116
NBN113	SQPCCRPTR YEAVS FMDV NSTWR TIVDRLS ATACG CLG					113
		*	+	#	+	

La secuencia de los polipéptidos de neublastina identificados anteriormente puede estar truncada en su secuencia de aminoácidos amino-terminal. Son ejemplos de estas, descritos en el presente documento, las que incluyen:

- (iv) la secuencia del polipéptido de 112AA denominada en el presente documento NBN112, que posee 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 Nos: 1, 3 o 4.
- (v) la secuencia del polipéptido de 111AA denominada en el presente documento NBN111, que posee 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 Nos: 1, 3 o 4.
- (vi) la secuencia del polipéptido de 110AA denominada en el presente documento NBN110, que posee 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 Nos: 1, 3 o 4.
- (vii) la secuencia del polipéptido de 109AA denominada en el presente documento NBN109, que posee 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 Nos: 1, 3 o 4.
- (viii) la secuencia del polipéptido de 108AA denominada en el presente documento NBN108, que posee 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 Nos: 1, 3 o 4.
- (ix) la secuencia del polipéptido de 107AA denominada en el presente documento NBN107, que posee 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 las SEC ID Nos: 1, 3 o 4.

- (x) la secuencia del polipéptido de 106AA denominada en el presente documento NBN106 o, como alternativa, N-7, que posee 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 Nos: 1, 3 o 4.
- (xi) la secuencia del polipéptido de 105AA denominada en el presente documento NBN105, que posee 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 las SEC ID Nos: 1, 3 o 4.
- (xii) la secuencia del polipéptido de 104AA denominada en el presente documento NBN104 o, como alternativa, N-9, que posee 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 las SEC ID Nos: 1, 3 o 4.
- (xiii) la secuencia del polipéptido de 103AA denominada en el presente documento NBN103, que posee 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 Nos: 1, 3 o 4.
- (xiv) la secuencia del polipéptido de 102AA denominada en el presente documento NBN102, que posee 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 la SEC ID N°: 1, 3 o 4.
- (xv) la secuencia del polipéptido de 101AA denominada en el presente documento NBN101, que posee 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 Nos: 1, 3 o 4.
- (xvi) la secuencia del polipéptido de 100AA denominada en el presente documento NBN100, que posee 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 Nos: 1, 3 o 4.
- (xvii) la secuencia del polipéptido de 99AA denominada en el presente documento NBN99 o, como alternativa, N-14, que posee 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 Nos: 1, 3 o 4.

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

Tabla 4. Alineamiento de polipéptidos de neublastina truncados

	10	20	30	40	50	
NBN113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	50	
NBN112	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	49	
NBN111	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	48	
NBN110	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	47	
NBN109	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	46	
NBN108	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	45	
NBN107	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	44	
NBN106	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	43	
NBN105	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	42	
NBN104	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	41	
NBN103	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	40	
NBN102	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	39	
NBN101	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	38	
NBN100	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	37	
NBN99	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ	LPVVRALGLGHR	SDELVRFRFC	SGSCRRA	36	
	*			#	+	
	60	70	80	90	100	
NBN113	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	100		
NBN112	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	99		
NBN111	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	98		
NBN110	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	97		
NBN109	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	96		
NBN108	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	95		
NBN107	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	94		
NBN106	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	93		
NBN105	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	92		
NBN104	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	91		
NBN103	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	90		
NBN102	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	89		
NBN101	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	88		
NBN100	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	87		
NBN99	RSPHDLSTASLLGAGALRPP	PGSRPVSQPCCR	PTRYEAVSFMDVNSTWRT	86		
		*		^		
	110					
NBN113	VDRLSATAACGCLG	113	(SEC ID Nº: 2)			
NBN112	VDRLSATAACGCLG	112	(SEC ID Nº: 8)			
NBN111	VDRLSATAACGCLG	111	(SEC ID Nº: 9)			
NBN110	VDRLSATAACGCLG	110	(SEC ID Nº: 10)			
NBN109	VDRLSATAACGCLG	109	(SEC ID Nº: 11)			
NBN108	VDRLSATAACGCLG	108	(SEC ID Nº: 12)			
NBN107	VDRLSATAACGCLG	107	(SEC ID Nº: 13)			
NBN106	VDRLSATAACGCLG	106	(SEC ID Nº: 14)			
NBN105	VDRLSATAACGCLG	105	(SEC ID Nº: 15)			
NBN104	VDRLSATAACGCLG	104	(SEC ID Nº: 16)			
NBN103	VDRLSATAACGCLG	103	(SEC ID Nº: 17)			
NBN102	VDRLSATAACGCLG	102	(SEC ID Nº: 18)			
NBN101	VDRLSATAACGCLG	101	(SEC ID Nº: 19)			
NBN100	VDRLSATAACGCLG	100	(SEC ID Nº: 20)			
NBN99	VDRLSATAACGCLG	99	(SEC ID Nº: 21)			
	#	+				

Un polipéptido de neublastina mutada puede tener una identidad de, por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % con los aminoácidos 8-113 de la SEC ID Nº: 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, de ser humano o de 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 Nos: 2, 3 o 4 en estas posiciones.

Un polipéptido de neublastina mutada que difiere en la secuencia de los descritos en las SEC ID Nos: 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. Preferentemente, las sustituciones, inserciones o delecciones no deben anular la eficacia 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, ácido o básico mencionados anteriormente por otro miembro del mismo grupo pueden considerarse una sustitución conservativa.

Los especialistas en la técnica pueden identificar fácilmente otras sustituciones. Por ejemplo, para el aminoácido alanina, puede extraerse una sustitución entre uno cualquiera de D-alanina, glicina, beta-alanina, cisteína y D-cisteína. Para lisina, un reemplazo 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 residuo polar, por ejemplo, serina o treonina, se sustituye por (o con) un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucina, isoleucina, fenilalanina o alanina; (ii) un residuo de cisteína sustituye por (o con) cualquier otro residuo; (iii) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisina, arginina o histidina, se sustituye por (o con) un residuo que tiene una cadena lateral electronegativa, por ejemplo, ácido glutámico o ácido aspártico; o (iv) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o con) 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. Por consiguiente, algunas sustituciones no conservativas pueden tener poco o ningún efecto sobre las propiedades biológicas.

En muchos casos, un polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero tiene una semivida en suero más larga con relación a la semivida del polipéptido de tipo salvaje o polipéptido mutado en ausencia del polímero. En algunas realizaciones el polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero tiene una fuerza significativamente aumentada in vivo con relación a la fuerza del polipéptido o polipéptido glucosilado en ausencia del polímero.

El polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero puede proporcionarse como un dímero que incluye al menos un polipéptido de neublastina conjugado con polímero. En algunas realizaciones, el dímero es un homodímero de polipéptidos de neublastina mutada conjugados con polímero. En otras realizaciones, el dímero es un heterodímero que incluye un polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero y un polipéptido de neublastina de tipo salvaje. En otras realizaciones el dímero puede ser un heterodímero que incluye un polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero, y un polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero de tipo salvaje donde la conjugación de polímeros es en el extremo amino, y donde los polipéptidos pueden estar o no truncados. Otros dímeros incluyen heterodímeros u homodímeros de formas de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero que pueden estar o no truncados.

En el presente documento se describen secuencias polipeptídicas mutadas maduras y truncadas que comprenden los residuos de aminoácidos más carboxi-terminales del polipéptido prepro-NBN, tal como se proporciona en la SEC ID N°: 5, y que se denomina en el presente documento NBN^N, donde N° representa el número de residuos 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 de neublastina adicionales de la invención incluyen NBN112, NBN111, NBN110, NBN109, NBN108, NBN107, NBN106, NBN105, NBN104, NBN103, NBN102, NBN101, NBN100 y NBN99 (SEC ID Nos: 8-21).

En el presente documento también se describe un polipéptido de neublastina conjugado con polímero que es un homodímero de NBN106-N95K conjugado con tres residuos de PEG de 10 kDa ("3x10 kDa PEG NBN106-N95K") o cuatro porciones de PEG de 10 kDa ("4x10 kDa PEG NBN106-N95K"). También se describe una población mixta de homodímeros NBN106-N95K conjugados con tres porciones de PEG de 10 kDa o con cuatro porciones de PEG de 10 kDa, mencionada en el presente 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 aminotermiales están unidos

covalentemente a porciones de PEG y el tercer y/o cuarta porción de PEG está unido covalentemente a uno o ambos residuos 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.

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

Cuando el polipéptido de neublastina conjugado con polímero está dimerizado, puede potenciar la supervivencia de las neuronas, por ejemplo, potenciar la supervivencia de una neurona sensorial.

Cuando el polipéptido de neublastina conjugado con polímero está dimerizado, puede reducir o invertir cambios patológicos de una neurona, tal como una neurona sensorial.

Cuando el polipéptido de neublastina conjugado con polímero está dimerizado, puede potenciar la supervivencia de una neurona, por ejemplo, una neurona autónoma 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 a 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 la posición 14, 39, 68 y 95 puede ser lisina. Los aminoácidos 8-94 y 96-113 del polímero de neublastina conjugado con polímero pueden tener una identidad de al menos 90 % con los aminoácidos 8-94 y 96-113 de la SEC ID N°: 1. Las secuencias de aminoácidos pueden tener una identidad de al menos 95 % con 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 de 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 la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4. En las realizaciones anteriores, el residuo preferido en la posición de aminoácido 95 es una lisina o una cisteína.

La invención incluye 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) proporciona en la SEC ID N°: 36, o una proteína de fusión de neublastina donde la porción de fusión es un polipéptido de inmunoglobulina (Ig), un polipéptido de albúmina de suero o un polipéptido derivado de replicasa. Las proteínas de fusión de neublastina pueden tener propiedades farmacocinéticas y de biodisponibilidad potenciadas *in vivo*.

En el presente documento también se describe 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 suministra preferentemente en un vector, por ejemplo, un vector de expresión. Una molécula de ácido nucleico de neublastina mutada, o un vector que incluye la misma, puede suministrarse 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").

En el presente documento también se describe 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 una porción de origen natural. De acuerdo con la invención, la porción de origen natural es una porción glucosilo. La neublastina glucosilada puede expresarse, por ejemplo, en una célula CHO. En el presente documento también se describe un polipéptido de neublastina expresado en una célula. En el presente documento se describen ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras y métodos de producción de polipéptidos para las proteínas de fusión (tales como las proteínas de fusión neublastina-albúmina de suero) descritas en el presente documento.

Un polipéptido de neublastina que se expresa en la célula puede recuperarse y conjugarse con un polímero. El polímero puede ser una porción de polialquilenglicol. De acuerdo con la invención, el polímero es una porción de PEG.

En el presente documento se describe la 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 con una identidad de al menos 70 % con 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 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 polímero 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 el presente 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 acoplada a una porción de PEG, donde el polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada está acoplado a la porción de PEG por un enlace inestable. En algunas realizaciones el enlace inestable puede escindirse por hidrólisis bioquímica, proteólisis o escisión de sulfhidrilo. En algunas realizaciones el enlace inestable puede escindirse en condiciones *in vivo*.

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

Los polipéptidos de neublastina mutada conjugados con polímero descritos en el presente documento incluyen una o más sustituciones de aminoácidos 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 a 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 salvaje y mutada

Los polipéptidos de neublastina pueden aislarse utilizando 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 utilizando técnicas convencionales de purificación de proteínas. Como alternativa, los polipéptidos de neublastina mutada pueden sintetizarse químicamente utilizando técnicas convencionales de síntesis de péptidos. La síntesis de secuencias de aminoácidos cortas 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 se cultiva preferentemente 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 el presente documento, "recuperar" 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 utilizando cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica. Uno de dichos métodos es mutagénesis dirigida a sitio, en el que se cambia un nucleótido específico (o, si se desea, una pequeña cantidad de nucleótidos específicos) para cambiar un solo aminoácido (o, si se desea, una pequeña cantidad de residuos de aminoácidos predeterminados) en el polipéptido de neublastina codificado. Los especialistas en la técnica reconocen que la mutagénesis dirigida a sitio es una técnica rutinaria y ampliamente usada. De hecho, en el mercado se dispone muchos kits de mutagénesis dirigida a sitio. Uno de dichos kits es el "Transformer Site Directed Mutagenesis Kit" comercializado 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 de proteínas e inmunología, que están 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 y 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 y S.J. Higgins, eds.), 1984; Transcription and Translation (B.D. Haines y S.J. Higgins, eds.), 1984; Culture of Animal Cells (R.L. Freshney, ed). AlanR. 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 y M.P. Calos,

eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory, Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer y Walker, eds.), Academic Press, Londres, 1987; Handbook of Experiment Immunology, volúmenes I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.), 1986; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

5 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. Las porciones químicas preferidas 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 medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Preferentemente, el polímero será farmacéuticamente aceptable para la preparación de un producto o composición terapéutica.

Si se desea, puede emplearse una sola molécula polimérica para la conjugación con un polipéptido de neublastina, aunque también puede unirse más de una molécula polimérica. Las composiciones de neublastina conjugada de la presente invención 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, porción u otra especie conjugada, según sea apropiado para la aplicación de utilización final. A modo de ejemplo, en algunas aplicaciones puede ser útil unir covalentemente al polímero con una porción funcional que confiera resistencia a la degradación por UV, o antioxidación, u otras propiedades o características al polímero. Como ejemplo adicional, en algunas aplicaciones puede ser ventajoso 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, ligamientos u otras estructuras constituyentes que no imposibiliten la eficacia de la composición de neublastina conjugada para su propósito pretendido.

Un especialista en la técnica podrá seleccionar el polímero deseado teniendo en cuenta cuestiones tales como si el conjugado polímero/proteína va a utilizarse terapéuticamente, y si así fuera, teniendo en cuenta la dosificación deseada, el tiempo en circulación, la resistencia a la proteólisis, y otros aspectos. La eficacia de la derivatización puede averiguarse administrando el derivado, en la forma deseada (por ejemplo, por bomba osmótica o, más preferentemente, por inyección o infusión, o formularse adicionalmente por las vías de administración oral, pulmonar u otras vías de administración), y determinando su eficacia.

Como polímeros adecuados solubles en agua se incluyen, pero sin limitación, PEG, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido 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 tener cualquier peso 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 facilita la manipulación y la 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". Dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, duración de la liberación sostenida deseada; efectos, si los hubiese, sobre la actividad biológica; facilidad de manipulación; grado o ausencia de antigenicidad y otros efectos conocidos de PEG sobre una proteína terapéutica) pueden utilizarse otros pesos (tamaños) moleculares. En diversas realizaciones, el peso molecular es de aproximadamente 2 kDa, aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, aproximadamente 40 kDa o aproximadamente 100 kDa. En determinadas realizaciones preferidas, el peso molecular promedio de cada cadena de PEG puede ser de aproximadamente 20 kDa. En determinadas realizaciones el peso molecular promedio puede ser de aproximadamente 10 kDa.

La cantidad de moléculas de polímero así unidas puede variar, y un especialista en la técnica podrá averiguar el efecto sobre la función. Si puede monoderivatizar, o se puede proporcionar una di-, tri-, tetra- derivatización o alguna combinación de derivatización, con los mismos o con diferentes porciones químicas (por ejemplo, polímeros, tales como diferentes pesos de PEG). La proporción de moléculas de polímero con respecto a moléculas de proteína (o el 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 grado de derivatización deseado (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 otras porciones químicas) deben unirse a la proteína teniendo en cuenta los efectos sobre dominios funcionales o antígenicos de la proteína. Existen diversos 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. Hematol. 20: 1028-1035, 1992 (que informa de la PEGilación de GM-CSF utilizando cloruro de tresilo).

Por ejemplo, el PEG puede unirse covalentemente (PEGilación) a través de residuos de aminoácidos mediante un grupo reactivo, tal como, un grupo amino o carboxilo libre. Los residuos de aminoácidos que tienen un grupo amino libre incluyen residuos de lisina y el residuo aminoácido amino-terminal. Aquellos que tienen un grupo carboxilo libre incluyen residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuo aminoácido C-terminal. También pueden utilizarse grupos sulfhidrilo como grupos reactivos para unir una o más moléculas de PEG. Con fines terapéuticos, la unión puede ser en un grupo amino, por ejemplo, en el extremo N o grupo de lisina. Puede desearse específicamente una proteína modificada químicamente en el extremo amino.

Utilizando PEG como una ilustración de las presentes composiciones, puede seleccionarse una diversidad de moléculas de PEG (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de PEG con respecto a moléculas de proteína (o péptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de PEGilación a realizar y el método para obtener la proteína PEGilada seleccionada en el extremo amino. El método para obtener la preparación PEGilada en el extremo amino (es decir, separando esta porción de otras porciones 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 química selectiva en el extremo amino puede realizarse por alquilación reductora que aprovecha la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al extremo amino) disponibles para su derivatización en una proteína particular. En 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 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 residuos de lisina y el del grupo amino alfa (α) del residuo amino-terminal de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua con una proteína: la conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el extremo amino de la proteína y no se produce modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de lisina.

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

En el presente documento se describen polipéptidos de neublastina mutada que pueden expresarse en procariotas o eucariotas 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 residuo Asn95 interno. El dímero de neublastina mutada puede estar conjugado con polímero en cada extremo amino y conjugado con polímero en uno o ambos residuos 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 y los documentos EP 0 154 316 y EP 0 401 384; y las otras publicaciones citadas en el presente documento que se refieren a la PEGilación. La 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. Para realizar la PEGilación puede utilizarse cualquier molécula de PEG reactiva conocida o posteriormente descubierta. Un éster de PEG activado preferido es PEG esterificado con N-hidroxisuccinimida (NHS). Como se usa en el presente 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. Preferentemente, el enlace de conexión será una amida. Preferentemente también, el producto resultante estaría sustancialmente solo (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 utilizadas. Si se desea, las especies PEGiladas más purificadas pueden separarse de la mezcla, particularmente especies que no han reaccionado, 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 hacer reaccionar 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 solo 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 preferentemente 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 el presente documento como un enlace "alquilo".

La derivatización mediante alquilación reductora para producir un producto mono-PEGilado aprovecha 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 residuos de lisina y el del grupo α -amino del residuo 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 se produce modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de la lisina.

Las moléculas de polímero utilizadas en las estrategias 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 solo grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, preferentemente, 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 N° 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Para las reacciones de acilación, el o los polímeros seleccionados deben tener un solo grupo éster reactivo. Para la presente alquilación reductora, el o los polímeros seleccionados deben tener un solo grupo aldehído reactivo. Generalmente, el polímero soluble en agua no se seleccionará entre residuos de glucosilo de origen natural ya que habitualmente estos 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 para su uso en el presente documento es PEG. Como se usa en el presente documento, 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 adecuada. Los métodos para preparar una neublastina PEGilada generalmente comprenden 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 determinan 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 que permita realizar 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 de la porción polimérica 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 cual el 50 % de los grupos amino se protona y el 50 % no). El pH también afecta a la proporción de polímero con respecto a proteína a usar. En general, si el pH es inferior, se deseará un exceso mayor de polímero con respecto a proteína (es decir, cuanto menos 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, preferentemente 3-6.

Otra consideración importante es el peso molecular del polímero. En general, cuanto mayor es el peso molecular del polímero, menos moléculas de polímero pueden unirse a la proteína. Así mismo, 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 el presente 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, particularmente preferible de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 20 kDa. El peso molecular total preferido es de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 40 kDa.

De acuerdo con la invención, el polipéptido de neublastina está unido al polímero mediante un grupo reactivo N-terminal en el polipéptido. En el presente documento también se describe un polipéptido de neublastina que puede unirse, como alternativa, o adicionalmente, mediante el grupo amino de la cadena lateral de un residuo de lisina interno, por ejemplo, un residuo 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 grupo, o los grupos reactivos se denomina en el presente documento "polímero activado". El grupo reactivo reacciona selectivamente con grupos reactivos en la proteína, por ejemplo, amino libre. La unión puede producirse en el polímero activado en cualquier grupo amino de Neublastina disponible tal como los grupos alfa amino o los grupos épsilon amino de un residuo o residuos de lisina introducidos en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Neublastina. También pueden utilizarse, como sitios de unión, grupos carboxílicos libres, grupos carbonilo activados adecuadamente, porciones hidroxilo, guanidilo, imidazol, carbohidrato y grupos mercapto de la Neublastina (si están disponibles).

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 que al mismo tiempo optimiza, si es posible, la semivida de la proteína. Preferentemente, se conserva al menos aproximadamente el 50 % y más preferentemente casi el 100 % de la actividad biológica de la proteína.

El polímero puede acoplarse al polipéptido de Neublastina utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la porción 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 succinidimil succinato de PEG (SS-PEG) y succinidimil propionato de PEG (SPA-PEG). Las porciones de polialquilenglicol adecuadas 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 la porción succinimidilo. Estos incluyen, por ejemplo, isotiocianatos, nitrofenilcarbonatos, epóxidos y carbonatos de benzotriazol. Las condiciones se seleccionan preferentemente para maximizar la selectividad y grado de reacción.

Si se desea, los polipéptidos de Neublastina conjugados con polímero pueden contener una etiqueta, por ejemplo, una etiqueta que puede liberarse posteriormente por proteólisis. Por tanto, el residuo de lisina puede modificarse selectivamente haciendo reaccionar primero una etiqueta de 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 liberará la etiqueta His. El polipéptido entonces contendrá un grupo SH libre que puede modificarse selectivamente con un PEG que contiene un grupo principal reactivo tiol, tal como un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato o un SH libre o protegido.

El reactivo de Traut puede reemplazarse con cualquier enlazador que establezca un sitio específico para la unión a PEG. A modo de ejemplo, el reactivo de Traut podría reemplazarse con SPDP, SMPT, SATA o SATP (todos disponibles en Pierce). Asimismo, la proteína podría reaccionar con un enlazador 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 el producto resultante podría reaccionar con un PEG que contenga un SH libre. La única limitación al tamaño del enlazador que se emplea es que no pueda bloquear la eliminación posterior de la etiqueta amino-terminal.

La porción de polialquilenglicol puede acoplarse a un grupo de cisteína del polipéptido de Neublastina mutada. El acoplamiento puede realizarse utilizando, por ejemplo, un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato y un grupo tiol.

En realizaciones preferidas, el polipéptido de Neublastina conjugado con polímero en la composición tiene una semivida en suero más larga en relación a la semivida del polipéptido de Neublastina en ausencia del polímero. Como alternativa, o adicionalmente, el dímero polipeptídico de Neublastina conjugado con polímero en la composición se une a $GFR\alpha$, 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, por ejemplo, en el documento WO00/01815. Preferentemente, la neurona es una neurona sensorial, una neurona autónoma o una neurona dopaminérgica.

En realizaciones preferidas, la composición se proporciona como un complejo de polipéptido de Neublastina conjugado estable, soluble en agua, que comprende un polipéptido de Neublastina o polipéptido de Neublastina mutada acoplado a una porción de PEG. Si se desea, el polipéptido de Neublastina o polipéptido de Neublastina mutada puede acoplarse a la porción 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 disolvente, tiempos de reacción, 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 sola 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 de la invención 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, porción u otra especie conjugada, según sea apropiado para la aplicación de uso final. A modo de ejemplo, en algunas aplicaciones puede ser útil unir covalentemente al polímero una porción funcional que confiera resistencia a degradación por UV, o anti-oxidación, u otras propiedades o características al polímero. Como ejemplo adicional, en algunas aplicaciones puede ser ventajoso 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, enlaces, u otras estructuras constituyentes que no impidan la eficacia de la composición de muteína neublastina conjugada para su propósito pretendido.

A continuación en el presente 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, preferentemente aproximadamente a 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 hace 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 utilizarse formas lineales y ramificadas de PEG así como otras formas alquilo. La longitud del PEG puede modificarse. Las formas más habituales varían en tamaño de 2 K-100 kDa. Aunque los ejemplos de la presente invención informan de que la PEGilación dirigida en el extremo amino no afecta a las propiedades farmacodinámicas, el hecho de que el material conserve la función fisiológica indica que la modificación en el sitio o sitios descritos en el presente documento no es nociva. Por consiguiente, en la generación de formas mutantes de neublastina que pudieran proporcionar sitios de unión adicionales a través de la inserción de residuos de lisina, estas formas probablemente se PEGilarían tanto en la lisina como en el extremo amino.

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

El polipéptido de neublastina conjugado con polímero en la composición puede tener una semivida en suero más larga con relación a la semivida del polipéptido de tipo salvaje 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.

La invención proporciona polipéptidos multiméricos y complejos diméricos que incluyen un polipéptido de neublastina conjugado con polímero. Los polipéptidos multiméricos se proporcionan preferentemente como polipéptidos multiméricos purificados. En el presente documento también se describe un complejo multimérico que puede proporcionarse como un complejo heteromérico u homomérico. Por tanto, el complejo multimérico puede ser un complejo polipeptídico conjugado con polímero heterodimérico que incluye un polipéptido de neublastina mutada y un complejo polipeptídico conjugado con polímero heterodimérico o una neublastina no mutada que incluye dos o más polipéptidos de neublastina mutadas.

En algunas realizaciones, el polipéptido de neublastina conjugado con polímero puede unirse a GFR α 3. Preferentemente, 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 los medios de sobrenadantes de la línea celular CHO puede describirse utilizando una fórmula modificada de un ensayo de complejo ternario descrito por Sanicola et al (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 1997, 94: 6238). En este ensayo, puede evaluarse la capacidad de moléculas de tipo GDNF con respecto a su capacidad de mediar la unión entre el dominio extracelular de RET y los diversos coreceptores, GFR α 1, GFR α 2 y GFR α 3. Las formas solubles de RET y los correceptores se generan como proteínas de fusión. Se ha descrito una proteína de fusión en 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 W09744356; 27 de noviembre de 1997) y el dominio Fc de IgG1 humana (rGFR(α 1-Ig) (Sanicola et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1997, 94: 6238).

- 5 El polímero de la invención es una porción de PEG. En algunas realizaciones, una porción de PEG tiene 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 5.000 Da a aproximadamente 20.000 Da. En algunas realizaciones, al menos una porción polimérica 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.

- 15 El grupo funcional de la porción de polialquilenglicol puede ser, por ejemplo, carboximetil-NHS, norleucina-NHS, SC-PEG, tresilato, aldehído, epóxido, carboniliimidazol, o carbonato de PNP. El acoplamiento puede producirse mediante un éster activo de *N*-hidroxilsuccinimida (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). En el presente documento también se describe una porción de polialquilenglicol que se acopla a un grupo de cisteína del polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada. Por ejemplo, el acoplamiento puede producirse mediante un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato, y un grupo tiol. El polipéptido de neublastina o el polipéptido de neublastina mutada puede comprender uno, dos, tres o cuatro porciones de PEG.

- 20 De acuerdo con la invención, el polímero se acopla 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 de polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada. El polímero puede acoplarse a un aminoácido del polipéptido de neublastina o polipéptido de neublastina mutada expuesto a disolvente.

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

Proteínas de fusión de neublastina conjugadas con polímero

- 35 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 el presente documento también incluyen diversas formas estructurales de la proteína primaria que conservan actividad biológica.

- 40 Pueden construirse fusiones de neublastina conjugada con polímero-albúmina de suero utilizando métodos conocidos en la técnica. Cualquiera de los diversos reticulantes que contengan un grupo amino reactivo correspondiente y un grupo tiol reactivo pueden utilizarse para unir la neublastina a la albúmina de suero. 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 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 SPDP, SMPT, SATA o SATP todos ellos 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 de suero.

- 50 Un especialista en la técnica puede generar conjugados con albúmina de suero que no están dirigidos al extremo amino de la neublastina o a una porción tiol de la albúmina de suero. Si se desea, pueden generarse fusiones de neublastina-albúmina de suero utilizando técnicas de ingeniería genética, donde la neublastina se fusiona al gen de la albúmina de suero en su extremo amino o extremo carboxi, o en ambos extremos.

- 55 Cualquier conjugado de neublastina que produzca un producto con una semivida prolongada, por ejemplo, *in vivo* o específicamente, en animales (incluyendo seres humanos) puede generarse utilizando una estrategia similar. Otro ejemplo de un conjugado de neublastina que produce un producto con una semivida prolongada *in vivo* es una proteína de fusión de neublastina donde el compañero de fusión es una Ig.

- 60 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 polipeptídica señal (o líder) en la región amino-terminal de la proteína que dirige de forma co-traduccional o post-traduccional la transferencia de la proteína desde su sitio de síntesis hasta su sitio de función dentro o fuera de la membrana o pared celular (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 de histidina/neublastina). La secuencia de aminoácidos de la Neublastina también puede unirse al péptido Asp-Tyr-Lys-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 residuo inmediatamente después del par Asp-Lys.

10 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 postraduccionally. 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 preferentemente en los residuos N indicados en las listas de secuencias.

En el presente documento se describe un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos presentada como SEC ID N°: 6, que lleva un residuo de asparagina glucosilada en la posición 122; o la secuencia de aminoácidos presentada como SEC ID N°: 14, que lleva un residuo de asparagina glucosilada en la posición 95, o la posición análoga en cualquier polipéptido de Neublastina mutada cuando se alinean, por ejemplo, mediante el programa informático ClustalW.

El polipéptido descrito en el presente documento puede tener la secuencia de aminoácidos presentada como SEC ID N°: 23, mencionada en el presente documento como NBN113-N95K, que contiene un residuo de lisina sustituido por el residuo de asparagina en la posición 95 de la SEC ID N°: 2; o la secuencia de aminoácidos presentada como SEC ID N°: 24, mencionada en el presente documento como NBN106-N95K; o la posición análoga en cualquier polipéptido de Neublastina mutada cuando se alinean, por ejemplo, mediante el programa informático ClustalW.

En el presente 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 de albúmina de suero.

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

Un polipéptido descrito en el presente 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 una identidad de al menos aproximadamente 85 %, o al menos aproximadamente 90 %, o al menos aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 % con la secuencia presentada como SEC ID N°: 2.

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

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

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

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

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

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

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

Un polipéptido descrito en el presente documento puede tener la 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 una identidad de al menos aproximadamente 85 %, o al menos aproximadamente 90 %, o al menos aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 % con una cualquiera de las secuencias presentadas como SEC ID Nos: 1-21 y 36.

El polipéptido mutado descrito en el presente documento puede llevar la huella de la subfamilia del DNF es decir, los residuos de aminoácidos de cisteína conservados indicados en las Tablas 3 y 4.

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

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

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

En el presente documento se describen nuevos polipéptidos codificados por una secuencia polinucleotídica capaz de hibridarse en condiciones de elevada rigurosidad con la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 36, su cadena complementaria, o una subsecuencia de la misma. El polipéptido mutado descrito en el presente documento puede estar codificado por una secuencia polinucleotídica que tiene una identidad de al menos un 70 % con la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de 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 de la invención. El dímero del polipéptido de neublastina puede aislarse de una molécula de mamífero, preferentemente 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 el presente documento, son útiles para moderar el metabolismo, crecimiento, diferenciación o 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 con más detalle a continuación.

Composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de neublastina-polímero

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un dímero del polipéptido de neublastina modificado de la presente invención.

Los conjugados polímero-neublastina de la invención pueden administrarse como tal 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 conjugado con polímero se utiliza junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico.

El vehículo 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 el presente documento, y en una cantidad apropiada para conseguir la dosis o concentración *in vivo* de biodisponibilidad deseada.

Las formulaciones incluyen aquellas que son 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, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, bronquial, linfática, vaginal e intrauterina. 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 solución 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 portador, para formar una dispersión gaseosa del polvo que inspira el paciente desde un circuito de respiración que comprende un dispositivo nebulizador adecuado.

Las formulaciones que comprenden las proteínas descritas en el presente 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 fuera necesario dando forma al producto en formas de dosificación de la formulación deseada.

Las formulaciones descritas en el presente documento adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades individuales tales como cápsulas, obleas, comprimidos o pastillas para chupar, comprendiendo cada una de ellas una cantidad predeterminada del ingrediente activo en forma de un polvo o gránulos; o una suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso, tal como un jarabe, un elixir, una emulsión o un brebaje.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del conjugado activo, que es preferentemente 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 a 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 ajustarse a un pH y a un estado isotónico compatible 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 oculares, se preparan mediante un método similar a la pulverización nasal, excepto que el pH y los factores isotónicos se ajustan preferentemente para adecuarse a los del ojo.

Las formulaciones tópicas comprenden los conjugados de la invención disueltos o suspendidos en uno o más medios, tales como aceite mineral, petróleo, polihidroxialcoholes u otras bases utilizadas 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

anteriores también se aplican a las proteínas de fusión de neublastina descritas en el presente documento (por ejemplo, proteínas de fusión de neublastina-albúmina de suero humana).

En el presente documento se describen proteínas de fusión adecuadas para la estabilización *in vitro* de un conjugado de neublastina conjugado 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 la vida útil, la estabilidad a temperatura ambiente y similares. Se entiende que las consideraciones anteriores también se aplican a las proteínas de fusión de neublastina-albúmina de suero (incluyendo las proteínas de fusión de neublastina humana-albúmina de suero humana).

Usos médicos

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

Las composiciones descritas en el presente documento pueden utilizarse directamente, por ejemplo, mediante composiciones farmacéuticas inyectadas, implantadas o ingeridas para tratar un proceso patológico sensible a polipéptidos de neublastina. Las composiciones pueden utilizarse para aliviar un trastorno o enfermedad del organismo 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, malignidad o agentes tóxicos, y procesos genéticos o idiopáticos.

El daño puede haberse producido, en particular, en neuronas sensoriales o en células ganglionares retinianas, incluyendo neuronas de los ganglios de la raíz dorsal o en cualquiera de los siguientes tejidos: ganglios geniculado, petroso y nodoso; el complejo vestíbulo-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 el presente documento, la enfermedad o trastorno es una enfermedad neurodegenerativa que implica neuronas lesionadas o traumáticas, tales como lesiones traumáticas de nervios periféricos, médula y/o médula espinal, daño neuronal isquémico cerebral, neuropatía y especialmente neuropatía periférica, traumatismo o lesión de nervios periféricos, ictus isquémico, lesión cerebral aguda, lesión aguda de 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, síndrome 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 mecanoreceptoras, 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 ("ELA") y atrofia muscular espinal. Las moléculas de neublastina de la presente invención pueden utilizarse para potenciar la recuperación de los nervios después de lesión traumática. Como alternativa, o adicionalmente, puede utilizarse un canal de guía de nervios con una matriz que contenga polipéptidos de neublastina conjugados con polímero, o fusiones o conjugados de polipéptidos de neublastina mutada en los usos descritos en el presente 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 el presente documento (y las composiciones farmacéuticas que las comprenden) pueden utilizarse en el tratamiento de neuropatías periféricas. Entre las neuropatías periféricas incluidas para el tratamiento con las moléculas descritas en el presente documento se encuentran las neuropatías inducidas por traumatismo, por ejemplo, las producidas por lesión física o patológica, daño físico al cerebro, daño físico a la médula espinal, ictus asociado con daño cerebral y trastornos neurológicos relacionados con neurodegeneración. En el presente documento también se describen aquellas neuropatías secundarias a infección, exposición a toxinas, y exposición a fármacos. También se describen adicionalmente en el presente documento aquellas neuropatías secundarias a enfermedad sistémica o metabólica. Por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento también pueden utilizarse para tratar neuropatías inducidas por quimioterapia (tales como las producidas por la administración de agentes terapéuticos, por ejemplo taxol o cisplatino); neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por déficit de vitaminas; neuropatías idiopáticas; neuropatías diabéticas y neuralgias post-herpéticas. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.496.804 y 5.916.555.

Afecciones adicionales que pueden tratarse de acuerdo con los usos descritos en el presente documento son mononeuropatías, mononeuropatías múltiples y polineuropatías, incluyendo neuropatías axonales y desmielinizantes.

- 5 Las composiciones descritas en el presente documento (y las composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) pueden utilizarse en el tratamiento de diversos trastornos oculares, incluyendo pérdida fotorreceptora en la retina en pacientes afectados por degeneración macular, retinitis pigmentosa, glaucoma y enfermedades similares.

Usos y composiciones farmacéuticas

- 10 En el presente 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 el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un dímero de polipéptido de neublastina conjugado con polímero
15 suspendido, disuelto o disperso en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

1. Uso en el tratamiento de dolor neuropático

- 20 En el presente 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 el presente 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 salvaje, truncados o mutados,
25 incluyendo, por ejemplo, una cualquiera de las SEC ID Nos: 1, 2, 6-21 y 36 o una forma mutada de los mismos, solo, o administrando también al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto que induce analgesia seleccionado entre el grupo compuesto por opiáceos, antiarrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antidepresivos, corticoesteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). El compuesto que induce analgesia puede ser un anticonvulsivo. El compuesto que induce analgesia puede ser gabapentina (ácido 1-aminometil)ciclohexano acético o pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metilpropil) butanoico.

- 30 Los polipéptidos de neublastina y los ácidos nucleicos descritos en el presente documento (y las composiciones farmacéuticas que comprenden dímeros de polipéptido de neublastina conjugado con polímeros descritos en el presente documento) se usan en el tratamiento del dolor asociado con neuropatías periféricas. Entre las neuropatías periféricas que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención se encuentran las neuropatías inducidas por traumatismo, por ejemplo, las producidas por lesión física o patología, daño físico al cerebro, daño físico a la médula
35 espinal, ictus asociado con daño cerebral y trastornos neurológicos relacionados con neurodegeneración.

- En el presente documento también se describen usos en el tratamiento de neuropatías inducidas por quimioterapia (tales como las producidas por la administración de agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, taxol o cisplatino);
40 neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por patógenos (por ejemplo, inducidas por virus), neuropatías inducidas por déficit de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.496.804 y 5.916.555. Los nucleótidos y polipéptidos de neublastina descritos en el presente documento pueden utilizarse para el tratamiento de mononeuropatías, mononeuropatías múltiples y polineuropatías, incluyendo neuropatías axonales y
45 desmineralizantes.

- El dolor neuropático puede estar asociado con diversas 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
50 con hexacarbono, amiodarona, cloranfenicol, disulfiram, isoniazida, oro, litio, metronidazol, misonidazol, nitrofurantoina), (d) neuropatías inducidas por fármacos, incluyendo dolor neuropático inducido por fármacos terapéuticos (tal como el causado por agentes anticancerosos, particularmente, agentes anticancerosos seleccionados del grupo constituido por taxol, taxotere, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina; y tal como el causado por agentes antivirales, particularmente agentes antivirales seleccionados del grupo constituido por
55 ddI, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol e isoniazid), (e) neuropatías inducidas por déficit de vitaminas (incluyendo, aunque sin limitación, déficit de vitamina B12, déficit de vitamina B6 y déficit 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, pero sin limitación, insuficiencia renal e hipotiroidismo), (m) neuropatías infecciosas y víricas (incluyendo, aunque sin limitación, dolor neuropático asociado con lepra, enfermedad de Lyme, dolor neuropático asociado con infección por virus, particularmente un virus seleccionado del grupo que consiste en herpes virus (por ejemplo herpes zoster que puede conducir a neuralgia posherpética), un virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y un papilomavirus), (n) neuropatías autoinmunes (incluyendo, aunque sin
60 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 postraumática, 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” se refiere típicamente a la afección en un sujeto en el que se provoca dolor por estimulación de la piel (por ejemplo, al tacto) que normalmente es inocuo. En el presente 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 en solitario.

En el presente 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 mutada conjugado con polímero que contiene polipéptidos de neublastina truncados, de tipo salvaje o mutados, incluyendo, por ejemplo, al menos uno de las SEC ID Nos: 1, 2, 6-21 y 36 o una forma mutada de los mismos, en solitario, o administrando al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido de neublastina con una cantidad eficaz de un compuesto que induce analgesia seleccionado del grupo compuesto por opioides, antiarrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antidepresivos, corticoesteroides y AINES. 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).

El dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero puede administrarse asociado con un agente terapéutico incluyendo, aunque sin limitación, un agente anticanceroso o un agente antiviral. Los agentes anticancerosos incluyen, aunque sin limitación, taxol, taxotere, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina. Los agentes antivirales incluyen, aunque sin limitación, ddl, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol e isoniazid).

3. Uso en el tratamiento para la reducción de la pérdida de sensibilidad al dolor

En el presente documento se describe un uso para reducir la pérdida de sensibilidad al dolor en un sujeto afectado con una neuropatía. La neuropatía puede ser una 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 conjugada 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 el presente 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 conjugada 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 del grupo compuesto por un herpes virus (más particularmente por un virus herpes zoster, que puede conducir a neuralgia posherpética), un virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y un papilomavirus). Puede administrarse un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugada 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 del cuerpo afectada, que es una complicación común de una afección por herpes zoster (culebrillas). La neuralgia posherpética 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 el presente documento se describe el uso de un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugada 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 conjugada con polímero para evitar la aparición de dolor neuropático. Puede administrarse un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugada con polímero para reducir la gravedad del dolor neuropático que ya ha aparecido.

6. Uso en trastornos del sistema nervioso

En el presente documento también 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, a 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 residuo 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 mutada conjugada con polímero descrito en el presente 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 mutada conjugada 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 (ELA). Dichos dímeros de polipéptido de neublastina pueden utilizarse 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, médula o médula espinal, así como neuropatías inducidas por traumatismo, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por déficit 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 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 o 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. Administración

El dímero de polipéptido en los usos anteriores puede administrarse mediante cualquier sistema de administración adecuado y puede incluir administración intravenosa, intramuscular, intrapulmonar, subcutánea e intraperitoneal. El polipéptido de neublastina en los usos anteriores también puede administrarse mediante administración 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, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, bronquial, linfática, vaginal e intrauterina. 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 e 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 inmunitario, el peso corporal del mamífero. Típicamente, los niveles de proteínas en tejido se controlan utilizando ensayos de exploración apropiados como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado.

La frecuencia de dosificación para un dímero de polipéptido de neublastina mutada conjugado con polímero de la presente invención está dentro de la experiencia y criterio 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 variar 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

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 en la secuencia de neublastina no aparecen lisinas, las químicas de PEGilación amina específicas producirían la PEGilación de un polipéptido de neublastina de tipo salvaje en su extremo amino. Por tanto, para cada dímero de neublastina, deben unirse dos porciones de PEG. Por consiguiente, las formas de PEG se dirigían primero directamente al extremo amino a través de químicas amina específicas. Sorprendentemente, la PEGilación de neublastina de tipo salvaje expresada en *E. coli*, incluso con dos PEG de 20 kDa unidos, tenía poco beneficio sobre la semivida, lo que indica que un mecanismo basado en la vía de eliminación estaba invalidando la potenciación en la semivida 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 residuos aminoacídicos internos. Se diseñó una serie de cuatro mutantes que reemplazan residuos de origen natural en las posiciones 14, 39, 68 y 95, cuando se numeran 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 utilizando la estructura cristalina de GDNF (Nat. Struct. Biol. 4: 435-8,1997) como una región marco conservada para identificar residuos 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 salvaje en *E. coli*, se construyeron syngenes con menor contenido en GC y codones de *E. coli* preferidos. El syngen 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 con una etiqueta de histidina (es decir, 10 histidinas) y se separa de la etiqueta de histidina por un sitio de escisión de enteroquinasa (SEC ID N°: 35 y 36). La metionina de inicio precede la etiqueta de histidina.

Tabla 5. Secuencia de nucleótidos y de polipéptidos de neublastina de tipo salvaje marcada con His
NBN marcada con His

20	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
25	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
30	136	CCG	GTG	CGT	GCA	CTC	GGA	CTG	GGA	CAC	CGT	TCC	GAC	GAA	CTA	GTA	180
	46	P	V	R	A	L	G	L	G	H	R	S	D	E	L	V	60
35	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
40	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
45	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
50	406	TGA	TAA	TAG													(SEC ID N°: 35)
	136	*	*	*													(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 salvaje. 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. Se seleccionó un mutante en el que el residuo de asparagina en la posición 95 estaba reemplazado con una lisina (el "mutante N95K") para los estudios descritos en el presente documento.

Se construyeron cuatro neublastinas de rata mutadas diferentes que comprendían una o más alteraciones en la secuencia de tipo salvaje del polipéptido de neublastina de rata. Estas neublastinas mutadas contenían sustituciones de un solo aminoácido: R14K; R68K; R39K; o N95K. La tabla 1A identifica estas mutaciones puntuales ejemplares en negrita. En la nomenclatura " $X_1N_1X_2$ ", X_1 se refiere a un aminoácido de un polipéptido de neublastina de tipo salvaje, N_1 se refiere a la posición numérica de los aminoácidos X_1 en la secuencia, numerados de acuerdo con la SEC ID N°: 1, y X_2 se refiere a un aminoácido que sustituye al aminoácido de tipo salvaje en la posición numérica indicada N_1 .

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

TABLA 6. Secuencias de NBN de rata de tipo salvaje

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

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

La mutagénesis de pCMB020 utilizando los oligonucleótidos KD3-210 y KD3-211 produjo la formación del plásmido pCMB027:

KD3-210 5'-GTATCTTTTCATGGACGTTATGTTCTACATGGAGAACC-3' (SEC ID N°: 27)

KD3-211 5'-GGTTCTCCATGTAGAACATACGTCCATGAAAGATAC-3' (SEC ID N°: 28)

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

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 a sitio en pCMB020 utilizando los oligonucleótidos KD3-254 y KD3-255:

KD3-254 5'-GCTCGTGCAACGGATGCAAAAGGCTGTCGTCTGCG-3' (SEC ID N°: 29)

KD3-255 5'-CGCAGACGACAGCCTTTTGCATCCGTTGCACGAGC-3' (SEC ID N°: 30)

La construcción resultante se denominó pCMB029.

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

KD3-258 5'-GGAGCCGGAGCACTAAAATCTCCCCGGGATCTAGACC-3' (SEC ID N°: 31)

KD3-259 5'-GGTCTAGATCCCGGGGAGATTTTAGTGCTCCGGCTCC-3' (SEC ID N°: 32)

La construcción resultante se denominó pCMB030.

Se formó una neublastina mutada R39K por reemplazo de la arginina en el aminoácido 39 con lisina en la secuencia codificante de neublastina de pCMB020. Se realizó mutagénesis dirigida a sitio de pCMB020 utilizando 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 prensa APV Gaulin 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 etiqueta de His con enteroquinasa (véase el Ejemplo 5). Después, el producto 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 produjo 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 ensayo ELISA KIRA 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 rporciones de PEG por molécula a neublastina utilizando como reactivo propionato de metoxilpoli(etilenglicol)succinimidilo (SPA-PEG) con una masa molecular de 10.000 Da. 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 desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI/IMS), mapeo peptídico, evaluación de la actividad en el ensayo ELISA KIRA, 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 prevista. 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 UE/mg. La actividad específica de la neublastina PEGilada en el ensayo ELISA KIRA es de 10 nM. El producto PEGilado se formuló a 1,1 mg/ml en PBS, pH 6,5. El material, que es de fuerza similar a la neublastina de tipo salvaje (NBN113), puede administrarse en forma de un líquido congelado, que se conserva 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.

Preparación de neublastina NBN106-N95K Mutada 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 conservado 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 conservó 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 SO₃⁻(M) (EM Industries). La columna se procesó a temperatura ambiente. Todos los tampones se prepararon sin pirógeno. Se añadió cloruro sódico a la mezcla de reacción a una concentración final de 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 a una columna de 2,5 cm de diámetro y la neublastina PEGilada se eluyó de la columna con seis etapas de 10 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 dividió en alícuotas y se conservó 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 producto intermedio a granel. La concentración de proteína del producto PEGilado se estimó a partir del espectro utilizando un coeficiente de extinción $\Sigma_{280}^{0,1\%}=0,50$. La

concentración de proteína de la neublastina PEGilada a granel es de 1,1 mg/ml. No había turbidez en la muestra como es evidente por la ausencia de absorbancia a 320 nm.

Caracterización de neublastina NBN106-N95K mutada 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. En paralelo se procesaron marcadores de peso molecular (GIBCO-BRL).

El análisis de SDS-PAGE de la neublastina NBN106-N95K mutada 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 contenía 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 PEGs unidos se verificó por análisis de espectrometría de masas 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 NBN106-N95K mutada PEGilada por cromatografía de exclusión por tamaño

La neublastina NBN106-N95K mutada PEGilada se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño sobre una columna analítica Superose 6 HR10/30 FPLC utilizando 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 absorbancia a 280 nm. La neublastina mutada PEGilada eluyó como un solo pico con un peso molecular aparente de aproximadamente 200 kDa coherente con el gran volumen hidrodinámico del PEG. No se observaron evidencias de agregados. En la preparación no se detectó neublastina libre, que eluye con una masa molecular aparente de aproximadamente 30 kDa.

Análisis de neublastina NBN106-N95K mutada PEGilada por HPLC de fase inversa

La neublastina NBN106-N95K mutada PEGilada se sometió a HPLC de fase inversa en una columna Vydac C₄ (5 µm, 1 x 250 mm). La columna se desarrolló utilizando un gradiente de tampón B de 60 mm del 40 al 60 % (Tampón A: TFA al 0,1 %, Tampón B: acetonitrilo al 75 %/TFA al 0,085 %). El efluente de columna se controló por absorbancia a 214 nm y se recogieron fracciones para análisis posterior. 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 C₄. 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. En el producto no hubo evidencias de NBN106-N95K no PEGilada (eluye a 5-15 mm).

Análisis de neublastina NBN106-N95K mutada PEGilada por espectrometría de masas

La neublastina NBN106-N95K mutada PEGilada se desalinizó en una Zip Tip C₄ 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) utilizando 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 NBN106-N95K mutada 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 modificaciones de 2, 3 y 4 PEG por molécula.

Análisis de neublastina NBN106-N95K mutada PEGilada por mapeo peptídico

La especificidad de la reacción de PEGilación se evaluó por mapeo peptídico. La neublastina PEGilada se separó en los componentes di, tri y tetra PEGilados, que después se redujeron, se alquilaron 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 sometieron a digestión con proteinasa Asp-N y los productos de escisión resultante se fraccionaron por HPLC de fase inversa en una columna Vydac C₁₈ (5 µm, 1 x 250 mm) utilizando un gradiente de tampón B de 60 mm del 0 al 60 % (Tampón A: TFA al 0,1 %, Tampón B: acetonitrilo al 75 %/TFA al 0,085 %). El efluente de columna se controló por 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 sometió a digestión 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 utilizarse como una herramienta sencilla para explorar los sitios de modificación con respecto a la presencia o ausencia de un pico. La identidad de los diversos picos se resume en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7

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

(M): masa monoisotópica

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

Como la neublastina existe de forma natural como un homodímero, el producto de neublastina NBN106-N95K mutada de rata contiene cuatro sitios posibles 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 tanto indican que la porción de PEG se une específicamente a este péptido y no a cualquiera de los otros péptidos explorados. El segundo sitio de unión posible, el extremo amino está en un péptido que solo tiene una longitud de tres aminoácidos y no se detecta en el mapa peptídico. Se deduce que las uniones de PEG adicionales están en este sitio. Coherente con esta idea, un pequeño porcentaje de la neublastina N95K mutada de rata no está truncada y contiene la secuencia Ala-1 madura. Este péptido eluye a 30 μ m 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 fuerza de la neublastina NBN106-N95K mutada PEGilada internamente en un ELISA por activación del receptor quinasa (KIRA, *Kinase Receptor Activation*) (ejemplo ilustrativo)

La fuerza de la neublastina de rata mutada PEGilada se midió utilizando activación/fosforilación, dependiente de neublastina, de c-Ret como un indicador de la actividad de neublastina en un ELISA que era específico para determinar la presencia de RET fosforilado. Se sembraron células NB41A3-mRL3, una línea celular de neuroblastoma murino adherente que expresa Ret y GFR α 3, a 2×10^5 células por pocillo en placas de 24 pocillos en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado con suero bovino fetal al 10 %, y se cultivaron durante 18 h a 37 °C y CO₂ al 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 sometieron a lisis 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 mecidiendo suavemente las placas. Los lisados se agitaron adicionalmente pipeteando repetidamente y se transfirieron 0,25 ml de muestra a una placa ELISA de 96 pocillos que se había revestido con 5 μ g/ml de mA b 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 tampón 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 de suero bovina al 3 %).

Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron 6 veces con TBST. El Ret fosforilado se detectó incubando los pocillos a temperatura ambiente durante 2 h con 2 μ g/ml de anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en tampón de bloqueo, lavando 6 veces con TBST y midiendo la actividad de la 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 del fondo como una función de la concentración de neublastina presente en la mezcla de activación. La fuerza de la neublastina mutada PEGilada (3,(4) X 10 kDa PEG NBN106-N95K) en el ensayo ELISA KIRA era indistinguible de la del material NBN113 de tipo salvaje (Tabla 8). No hubo efecto de dos ciclos de congelación-descongelación sobre la fuerza 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 completamente activo, mientras que el producto de cuatro PEG tenía fuerza reducida (Tabla 8). Estos datos demuestran que 3,(4) X 10 kDa PEG NBN106-N95K y 3 X 10 kDa PEG NBN106-N95K activan Ret a un grado similar y con la misma dependencia de dosis que la neublastina no mutada (de tipo salvaje), NBN113. Sin embargo, aunque 4 X 10 kDa PEG NBN106-N95K activa Ret a un grado similar que la neublastina NBN113 no mutada (de tipo salvaje), 4 X 10 kDa PEG NBN106-N95K es aproximadamente 10 veces menos fuerte que la NBN113 no mutada (tipo salvaje) en la activación de Ret. En la Tabla 8 se proporcionan valores de CE50 estimados.

Ejemplo 4: Estudios farmacocinéticos de la neublastina NBN 106-N95K de rata mutada PEGilada internamente en ratas y ratones

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

Los datos revelaron que la PEGilación de la neublastina NBN106-N95K mutada con 3,3, PEG de 10000 Da provocó un efecto significativo sobre la semivida 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. Por otro lado para la neublastina N95K mutada no PEGilada después de una 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 de 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 la neublastina PEGilada alcanzaron un máximo de 200 ng/ml después de 24 h y permanecieron a este nivel mientras duró el estudio de tres días. Por otro lado, no se observó neublastina detectable en ningún momento después de la administración de neublastina mutada no PEGilada.

El análisis de las muestras de N95K PEGiladas se complicó por la presencia de aductos que comprendían 2, 3 y 4 PEG por molécula, que cada uno de ellos presentará un perfil PK diferente. En los primeros estudios PK, se utilizaron ratones para facilitar la exploración a través de una diversidad de cantidades 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.. Los niveles en ratones alcanzaron 1600 ng/ml después de 7 h y permanecieron a 400 ng/ml después de 24 h. por otro lado, 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 de los aminoácidos amino-terminales de neublastina no glucosilada no era suficiente para aumentar la exposición en suero sustancialmente; y 2) la PEGilación del aminoácido o 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, la NBN104 glucosilada (CHO) no dio exposición detectable después de administración s.c.; sin embargo, la 1X20 kDa PEG NBN104 (CHO) glucosilada dio elevada exposición en suero después de administración s.c.. Asimismo, la 2X20 kDa PEG NBN113 dio una exposición en suero de baja a moderada después de administración s.c.; sin embargo, la 2X20 kDa PEG NBN104 glucosilada (CHO) dio elevada exposición en suero después de administración s.c. Estos resultados indican que la conjugación con polímero del aminoácido o 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) produce una exposición en suero sustancialmente aumentada después de administración sistémica.

Tanto la neublastina de rata de tipo salvaje como la neublastina N95K mutada 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 salvaje se formuló para ir directamente a ensayo en animales mientras que la N95K se preparó para la PEGilación con PEG-SPA 10 kDa. Para conseguir el objetivo de replegamiento y purificación, se desarrolló un método de replegamiento utilizando cromatografía de exclusión por 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 de Ni-NTA y de sílice CM para aumentar la pureza final de la proteína. Las proteínas se sometieron a caracterización extensiva incluyendo análisis por SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño, ESMS, evaluación de la actividad por ensayo ELISA KIRA, y determinación del contenido de endotoxinas. LA SDS-PAGE y la SEC de los productos proteicos finales indicaron una pureza de más del 95 %. El nivel de endotoxinas de cada producto era < de 0,2 UE/mg. La actividad específica de ambas proteínas en el ensayo ELISA KIRA es de aproximadamente 10 nM. La neublastina de tipo salvaje se formuló a 1,0 mg/ml y la N95K se formuló a 2,6 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 6,5. La neublastina de tipo salvaje se dividió en alícuotas en tubos de 15 ml y se conservó congelada a -70 °C mientras que la N95K se sometió a PEGilación antes de dividirla en alícuotas y congelarla.

Ejemplo 5: Replegamiento y purificación de una neublastina de tipo salvaje y de 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 madura de 113 aminoácidos. Las bacterias que expresaban neublastina de tipo salvaje (sedimento de 1,8 kg) o N95K (sedimento de 2,5 kg) se sometieron a lisis en 2 litros de PBS utilizando una prensa APV Gaulin. 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 Tritón X-100 (2 %, v/v) seguido de dos lavados adicionales con tampón sin detergente. Ambos sedimentos se solubilizaron utilizando 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 utilizando un homogeneizador polytron seguido de agitación durante una noche a temperatura ambiente. Las proteínas solubilizadas se aclararon por centrifugación antes de la cromatografía desnaturalizante a través de Superdex 200 (columna de 5,5 litros equilibrada con glicina 0,05 M/H₃PO₄ pH 3,0 con clorhidrato de guanidina 2 M) a 20 ml por minuto.

La neublastina desnaturalizada se identificó por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían neublastina de tipo salvaje o N95K se combinaron y se concentraron a aproximadamente 250 ml utilizando 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 de dimensionamiento renaturalizante a través de Superdex 200 equilibrada con Tris-HCl 0,1 M pH 7,8, clorhidrato de guanidina 0,5 M, glutatión reducido 8,8 mM y glutatión oxidado 0,22 mM. La columna se desarrolló utilizando clorhidrato de guanidina 0,5 M a 20 ml por minuto. Se identificaron las fracciones que contenían neublastina de tipo salvaje o neublastina N95K renaturalizada por SDS-PAGE, se combinaron y se conservaron a 4 °C hasta que se necesitaron para la eliminación de la etiqueta de His.

Método alternativo para replegar la neublastina de tipo salvaje y la neublastina N95K mutada por dilución

Para replegar la neublastina por dilución, la proteína solubilizada se diluyó rápidamente en tampón de replegamiento (clorhidrato de guanidina 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. Después, la neublastina replegada se concentró 25 veces, 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 volúmenes de volumen de columna con tampón de lavado (imidazol 40 mM, clorhidrato de guanidina 0,5 M). Después, la neublastina se eluyó de la resina con imidazol 0,2 M y clorhidrato de guanidina 0,5 M.

Concentración de la neublastina replegada en columna por cromatografía con Ni-NTA

La neublastina renaturalizada en columna se conservó 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 polietersulfona (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 utilizando el mismo tampón. La neublastina se eluyó de la resina utilizando aproximadamente 300 ml de tampón de elución que contenía clorhidrato de guanidina 0,5 M e imidazol 0,4 M. Después de la elución, la neublastina se dializó durante una noche (utilizando 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 del clorhidrato de guanidina e imidazol a 0,05 M y 0,04 M, respectivamente.

Escisión de la etiqueta de His por lisil endopeptidasa o enteroquinasa.

Al día siguiente, cualquier precipitado que se formara durante la diálisis se eliminó por filtración. Las siguientes etapas de purificación se aplican a los productos de neublastina replegada tanto en columna como por dilución. La muestra proteica se realizó en NaCl 0,1 M por adición de NaCl a partir de una reserva 5 M para una concentración salina final, incluyendo la porción de clorhidrato de guanidina, de aproximadamente 150 mM. Esta concentración se confirmó utilizando un medidor de conductividad. Adicionalmente, se añadió HEPES 1 M pH 7,8 para una concentración final de 25 mM. Para escindir la etiqueta de His, se añadió lisil endopeptidasa a la neublastina de tipo salvaje y se añadió enteroquinasa a la neublastina mutada N95K, ambas a una proporción de aproximadamente 1:300 de proteasa con respecto 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 etiqueta de His por cromatografía con Ni-NTA.

La neuroblastina tratada con proteasa se aplicó a una columna de Ni-NTA de 100 ml equilibrada con clorhidrato de guanidina 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 etiqueta de His.

Cromatografía en sílice CM.

Después de la cromatografía con Ni-NTA, la proteína se sometió inmediatamente a purificación adicional a través de resina de sílice CM. Una columna de sílice CM de 20 ml equilibrada con tampón de carga (fosfato 5 mM pH 6,5, NaCl 150 mM) se cargó con neublastina a 20 ml por minuto. La columna se lavó con 20 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 la neublastina N95K y 150 mM para la neublastina de tipo salvaje. Ambas muestras se filtraron a través de una unidad de filtro PES de 0,2 μ , se analizaron por SDS-PAGE y se conservaron a 4 °C hasta que se necesitaron para caracterizaciones adicionales y/o PEGilación.

Las preparaciones proteicas de neublastina de tipo salvaje y N95K mutada se sometieron a análisis de espectro UV para evaluar su absorbancia a 280. Utilizando una microcubeta de cuarzo y estableciendo el blanco frente a tampón solo, se exploraron de forma continua 100 μ l de neublastina de tipo salvaje o N95K mutada de 230 a 330 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman. En base a este análisis, se determinó que la neublastina de tipo salvaje estaba a una concentración de 1,1 mg/ml y la neublastina N95K mutada a 2,6 mg/ml ($A_{280 \text{ nm}} - \Sigma^{0,1\%} = 0,5$ usada para cada proteína). Se identificó menos 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 de exclusión por 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 salvaje como N95K mutada migraron con un solo pico con un peso molecular esperado (23-24 kDa), y no contenían ninguna contaminación proteica significativa.

Las proteínas de neublastina tanto de tipo salvaje como N95K mutada se redujeron en clorhidrato de guanidina 2,5 M, Tris 60 mM pH 8,0 y DTT 16 mM. Las muestras reducidas se desalinizaron sobre una columna corta C_4 y se analizaron en línea por ESMS utilizando un instrumento tetrapolar triple. Los datos sin procesar de ESMS se desconvolucionaron mediante 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 masas desconvolucionado para el tipo salvaje mostró que la especie predominante tiene un peso molecular de 12046 Da, lo que coincide con el peso molecular previsto de 12046,7 Da para la forma de la proteína de 113 aminoácidos. También se observó un componente minoritario (12063 Da) lo que sugiere la presencia de un producto de oxidación. Se identificaron tres picos en la muestra proteica de neublastina mutada N95K. El componente mayoritario demostró una masa molecular aparente de 11345 Da de acuerdo con la masa prevista para la forma de la proteína de 106 aminoácidos. 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 N95K mutada puede atribuirse 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 de neublastina N95K mutada sobre el lado carboxi-terminal de Arg7 para producir la forma de 106 aminoácidos predominante. Por otro lado, la lisil endopeptidasa utilizada para escindir la neublastina de tipo salvaje es una actividad proteasa sencilla que actúa sobre el lado carboxi-terminal del residuo de lisina contenido dentro de la etiqueta de His para producir la forma madura de 113 aminoácidos de neublastina. Tanto la forma de neublastina de 106 como la de 113 aminoácidos son igualmente activas en todos los ensayos realizados y se comportan de manera similar en los ensayos de estabilidad con clorhidrato de guanidina.

La actividad neublastina se determinó con respecto a su capacidad para estimular la fosforilación de c-Ret en células NB41A3-mRL3 utilizando el ensayo ELISA KIRA descrito en el Ejemplo 3. El ret fosforilado se detectó incubando (2 horas) el receptor capturado con anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado con HRP (4G10; 0,2 μ g por pocillo). Después de la incubación, los pocillos se lavaron seis veces con TBST, y la actividad de la HRP se detectó 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 los datos se representaron como una función de la concentración de neublastina presente en la mezcla de activación. Los datos demuestran que los polipéptidos de neublastina purificados producían la aparición de RET fosforilado, lo que indica que la neublastina purificada era activa en este ensayo.

Ejemplo 6: Preparación de un conjugado de albúmina de suero-neublastina (ejemplo ilustrativo)

La neublastina de rata de tipo salvaje a una concentración de 1 mg/ml en PBS se trató con sulfo-SMCC (Pierce) 1 mM y se desalinizó para eliminar el exceso de reticulante. Como la proteína de neublastina de tipo salvaje contiene únicamente una sola 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 µg del conjugado de neublastina-SMCC con 120 µg de albúmina de suero bovino y se analizó el grado de reticulación por SDS-PAGE. La BSA contiene un solo grupo SH libre y por consiguiente se espera que la reacción con el conjugado de neublastina-SMCC produzca 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 una sola porción de BSA y dos moléculas de BSA ya que cada molécula de neublastina contiene dos extremos amino que pueden experimentar reacción, y por consiguiente están de acuerdo con esta idea. Junto con la formación de estas bandas, hubo una disminución en la intensidad de las bandas de neublastina-SMCC y BSA. En función de 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 intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño sobre una columna Superdex 200 (Pharmacia) esencialmente como se describe para los estudios de PEGilación comentados anteriormente. Las fracciones de columna del procesamiento de filtración en gel se realizaron por SDS-PAGE y aquellas que contenían el producto monosustituido se analizaron para determinar el contenido proteico por absorbancia a 280 nm. Como la masa de la BSA es aproximadamente el doble de la masa de la neublastina, la concentración aparente se dividió entre un factor de 3 para dar el equivalente de neublastina. Esta fracción se sometió a análisis para determinar la función en el ensayo ELISA KIRA. Los valores de CI50 para la neublastina tanto de tipo salvaje como conjugada con BSA fueron de 3-6 nM, lo que indica que la conjugación con BSA no había comprometido la función.

Aunque estos estudios preliminares se generaron con BSA, las proteínas de albúmina de suero correspondientes de rata y de ser humano también contienen un SH libre. Por consiguiente, puede aplicarse un enfoque similar para generar un conjugado de albúmina de suero de rata-neublastina de rata para realizar estudios PK y de eficacia en ratas y de albúmina de suero humana-neublastina humana para realizar ensayos clínicos. Asimismo, puede sustituirse el SMCC con cualquiera de diversos reticulantes que contienen un grupo amino reactivo en un lado y un grupo tiol reactivo en el otro lado. Son ejemplos de reticulantes amina reactivos que insertan una maleimida tiol reactiva AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, 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 únicamente ejemplares y se prevén muchas estrategias alternativas para unir el extremo amino de la neublastina con la albúmina de suero. Un especialista en la técnica también podría generar conjugados con albúmina de suero que no están dirigidos al extremo amino de la neublastina o a la porción tiol en la albúmina de suero. También se espera que las fusiones neublastina-albúmina de suero creadas utilizando ingeniería genética, donde la neublastina se fusiona con el gen de la albúmina de suero en su extremo amino, extremo carboxi o en ambos extremos, sean funcionales.

Este método puede ampliarse a través de adaptaciones rutinarias a cualquier conjugado de neublastina- albúmina de suero que produciría un producto con una semivida prolongada en animales y por consiguiente en seres humanos.

Ejemplo 7: Cristalización y determinación estructural de la neublastina humana (ejemplo ilustrativo)

Utilizando un procedimiento convencional se expresó neublastina marcada con selenometionina para inhibir la biosíntesis de metionina (Van Duyne, et al., 1991, *Science* 252, 839-842). Tanto la neublastina de tipo salvaje como la neublastina con selenometionina incorporada se concentraron a 17 mg/ml en arginina 0,8 M. La reserva 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.) páginas 56-62, Daresbury Laboratory, Warrington) reveló que los cristales pertenecían a un grupo espacial C2 con 1 dímero covalente por unidad asimétrica y las dimensiones de celda aproximadamente $a=115$ 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 sumergieron en PtCl_4 1 mM durante 4 horas, en IrCl_3 10 mM durante 72 horas y en IrCl_6 10 mM durante 18 horas y los datos se recogieron y se procesaron mediante el paquete integrado HKL (Otwinowski et al., citado anteriormente). Los dos sitios de selenometionina se localizaron por inspección de mapas de Paterson de diferencias isomorfas y anómalas. Los sitios restantes se localizaron utilizando SOLVE (4). Las fases se mejoraron por RESOLVE (Terwilliger et al., 1999, *Acta Crystallogr. D.* 55, 849- 861) a una cifra de valor 0,56 y los mapas resultantes eran de suficiente calidad para rastrear el modelo de neublastina. Ciclos alternos de construcción de modelos con O2D (5 G J Kleywegt & T A Jones, "O2D - the manual", manual de software, Uppsala, 1994) y el

refinamiento con CNX utilizando una diana mlhl y refinados frente a los datos de selenometionina produjeron un modelo completo de la proteína de 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 factor R es del 24,7 % a 2,0 Å con buena estereoquímica.

Ejemplo 8: Sitios de unión a sulfato y modelado de sulfato de heparina (ejemplo ilustrativo)

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 el sulfato de heparina. Hay tres sitios de arginina que parecen tener interacciones clave con estos sulfatos. El residuo de arginina R48 une simultáneamente 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 lateral forma un enlace de hidrógeno bifurcado con los sulfatos Nº 6 y Nº 3. Un segundo residuo de arginina (R49) forma un enlace de hidrógeno con el sulfato Nº 2 y un tercer residuo de arginina (R51) forma un enlace de hidrógeno largo con el sulfato Nº 6.

Estos sulfatos pueden representar bolsillos de unión para el sulfato de heparina, que si mutan a residuos cargados no positivamente podrían reducir la unión del sulfato de heparina y posiblemente disminuir y/o retrasar la eliminación de la molécula de 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 la neublastina. Los sulfatos unidos a n y n+2 sacáridos en el sulfato de heparina de la estructura cristalina de FGF-1 formando complejo con sulfato de heparina están separados por aproximadamente 8,5Å (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 por 8,8 Å y los sulfatos Nº 3 y Nº 2 están separados por 8,1 Å. Esta correspondencia con 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 el glutamato o aspartato, o en cualquier otro aminoácido no positivo, podría reducir la afinidad de unión por el sulfato de heparina sin reducir la actividad de unión al receptor de la neublastina, dando así lugar a un producto biológicamente activo con una semivida 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 ácidos glutámicos. Los productos de neublastina mutada se expresarán en *E. coli*, se purificarán, se replegarán y se someterán a ensayo para determinar su función. Finalmente, los productos se someterán a ensayo para determinar su capacidad de unirse a heparina, así como su farmacocinética y farmacodinámica en animales.

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

Ejemplo 9: Dosificación de la neublastina NBN106-N95K mutada pegilada en la inversión de hiperalgesia táctil y térmica en un modelo animal de ligamiento de nervios de dolor neuropático.

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

En el presente documento, se describen estudios para abordar el efecto de inversión de la neublastina N95K pegilada sobre la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica en el modelo de ligamiento del nervio espinal ("LNE") L5/L6 de Chung. Ratas macho Sprague-Dawley (230 - 380 g) se dividieron en dos grupos. A todas las ratas se les realizó 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) X 10 kDa PEG NBN106-N95K) por inyección subcutánea a 10 µg/kg. La 3,(4) X 10 kDa PEG NBN106-N95K, comprendía la proteína neublastina procedente de *E. coli* y en la posición 95 contenía una sustitución de aminoácido Asn-a-Lys, que después se truncó (truncamiento amino-terminal de 7 aminoácidos; NBN106), y finalmente se pegiló con un promedio de 3,3 porciones de PEG por dímero de NBN, utilizando como reactivo propionato de metoxilpoli(etilenglicol)-succinimidilo (SPA-PEG) con una masa molecular de 10.000 Da. El vehículo estaba compuesto por fosfato 5 mM y cloruro sódico 150 mM a pH 6,5. Las inyecciones subcutáneas se administraron los días 3, 5, 7, 10, 12 y 14 después de la intervención (post-LNE). Se utilizaron los ensayos conductuales de Von Frey (Chaplan et al. (1994), *J. Neurosci. Meth.* 53: 55-63) y de Hargreave (Hargreaves et al. (1988), *Pain.* 32: 77-88) para controlar las respuestas táctil y térmica, respectivamente. Estas respuestas al dolor se controlaron antes del ligamiento del nervio espinal para establecer respuestas iniciales, el día 2 post-LNE para verificar la presencia de hiperalgesia táctil y térmica, y después los días 3, 5, 7, 10, 12, 14 y 15 post-LNE. Para evaluar el significado estadístico del tratamiento farmacológico con relación al tratamiento con vehículo, se realizó un análisis de varianza de 1 vía (ANOVA de una vía) seguido de un ensayo de Student Neuman Keuls (SNK) *post-hoc*.

Como se esperaba, ambos tipos de comportamiento de dolor neuropático (alodinia táctil e hiperalgesia térmica) se desarrollaron completamente el día 2 post-LNE. La administración subcutánea de 10 µg/kg de 3(,4) X 10 kDa PEGN95K-NBN106 condujo a una inversión sustancial y estadísticamente significativa de ambos tipos de dolor neuropático en ratas con ligamiento del nervio espinal. En ratas con ligamiento del nervio espinal, el efecto de 10 µg/kg de 3(,4) X 10 kDa PEG N95K-NBN106 sobre la sensibilidad térmica y la alodinia táctil primero llegó a ser estadísticamente significativo 4 días después del inicio de la administración de la neublastina N95K pegilada. El efecto de 10 µg/kg de 3(,4) X 10 kDa PEG NBN106-N95K sobre la sensibilidad térmica y la alodinia táctil alcanzó un nivel estable aproximadamente 4 días después del inicio de la administración de la neublastina N95K pegilada. Los efectos de 3(,4) X 10 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 los días 5 y 7. En otro experimento (datos no mostrados), la administración subcutánea de 3 µg/kg de 3(,4) X 10 kDa PEG NBN106-N95K 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 LNE, aunque la aparición del efecto fue algo más lenta.

Estos resultados demostraron que 3(,4) X 10 kDa PEG NBN106-N95K tenía una fuerza aumentada de al menos 100 a 333 veces sobre la neublastina no glucosilada no mutada en los comportamientos de dolor de alodinia táctil e hiperalgesia térmica en el modelo LNE. Las propiedades farmacocinéticas potenciadas de 3(,4) X 10 kDa PEG N95K NBN106 en comparación con la neublastina no glucosilada no mutada indicaron que la eficacia de la neublastina, administrada de forma sistémica, se correlacionaba con los niveles en suero de la neublastina. Estos resultados demostraron que los conjugados de neublastina mutada con polímero podían utilizarse para tratar el dolor neuropático en pacientes con dosis enormemente reducidas, y frecuencia de dosificación posiblemente reducida, debido a su biodisponibilidad potenciada en comparación con la neublastina no conjugada.

Tabla 8. Caracterización biológica de la NBN PEGilada

Forma de NBN	Aminoácidos PEGilados	Aminoácidos glucosilados	Exposición en ratones después de administración s.c.	KIRA: ~CE50	KIRA: ~Eficacia máx frente a TS
NBN			nd	0,4-1,2 nM	100 %
NBN104 (CHO)		95,95	nd	0,7 nM	90 %
2 X 5 kDa	1,1		nd	0,2 nM	105 %
PEG-NBN					
4 X 5 kDa PEG	1,1,95,95		nd	1 nM	80 %
NBN106-N95K					
2 X 10 kDa	1,1		nd	0,2 nM	72 %
PEG-NBN					
1 X 20 kDa	1		nd	0,2 nM	83 %
Ramificada					
PEG-NBN					
1 X 20 kDa	1	95,95	++	0,3 nM	110 %
PEG-NBN104 (CHO)					
3 X 10 kDa	1,1,95		++	0,7 nM	115 %
PEG-TS/					
N95K-NBN106					
3 X 10 kDa PEG	1,1,95		++	0,8 nM	100 %
NBN106-N95K					
3 (,4) X 10 kDa	1,1,95 (,95)		++	1,6 nM	90 %
PEG NBN106-N95K					
4 X 10 kDa PEG	1,1,95,95		++	11 nM	>80 %
NBN106-N95K					
2 X 20 kDa	1,1		+	0,6 nM	80 %
PEG-NBN					
2 X 20 kDa	1,95		++	inactivo	Inactivo
Ramificada PEG					
NBN106-N95K					
2 X 20 kDa	1,1	95,95	++	1 nM	105 %
PEG-NBN104 (CHO)					

Nota: nd significa no detectable, + indica exposición baja-moderada, ++ indica exposición alta

Nota: todas son NBN113, salvo que se indique otra cosa
Nota: todas proceden de E. coli, salvo que se indique CHO

SEC ID Nº:	Secuencia:
1	Consenso del polipéptido de neublastina madura - 113 aa
2	NBN113 madura humana
3	NBN113 madura de ratón
4	NBN113 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	NBN101truncada
20	NBN100 truncada
21	NBN99 truncada
22	Polipéptido DYKDDDDK - 8 aa
23	NBN113-N95K
24	NBN106-N95K
25	ORF de tipo salvaje de rata - 675 nt
26	Polipéptido preproNBN de tipo salvaje de rata - 224 aa
27	Cebador KD2-310
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

5 Otras realizaciones

Aunque en el presente documento se han descrito con detalle realizaciones particulares, esto se ha realizado a modo de ejemplo solo con fines de ilustrativos y no pretende que sean limitantes con respecto al alcance de las siguientes reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biogen Idec MA Inc.

5 <120> CONJUGADOS POLIMÉRICOS DE NEUBLASTINA MUTADA

<130> BIO11561PCTEP / A111 US CIP

<140> EP 04 707 363.0

10 <141> 02-02-2004

<150> PCT/US2004/002763

<151> 02-02-2004

15 <150> US 10/356.264

<151> 31-01-2003

<160> 36

20 <170> FastSEQ para windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<223> secuencia consenso de neublastina madura

<220>

30 <221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Gly o Thr

<220>

35 <221> VARIANTE

<222> 4

<223> Xaa = Pro o Arg

<220>

40 <221> VARIANTE

<222> 5

<223> Xaa = Gly o Ser

<220>

45 <221> VARIANTE

<222> 10, 11

<223> Xaa = Ala o Thr

<220>

50 <221> VARIANTE

<222> 12

<223> Xaa = Gly o Asp

<220>

55 <221> VARIANTE

<222> 26, 33

<223> Xaa = Arg o Ser

<220>

60 <221> VARIANTE

<222> 38, 76

<223> Xaa = Val o Ile

<220>

65 <221> VARIANTE

<222> 53

<223> Xaa = Pro o Gln

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> 69

<223> Xaa = Pro o ser

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> 103

<223> Xaa = Arg o His

<400> 1

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

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)...(113)

25 <223> NBN113 madura

<400> 2

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

<210> 3

<211> 113

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> VARIANTE
 <222> (1)...(113)
 <223> NBN113 madura

5 <400> 3

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

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(113)
 <223> NBN113 madura

15

<400> 4

20

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

<210> 5
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 5

30

Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
 1 5 10 15

Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
 20 25 30
 Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Pro Arg Ser Pro
 35 40 45
 Ala Pro Arg Glu Gly Pro Pro Pro Val Leu Ala Ser Pro Ala Gly His
 50 55 60
 Leu Pro Gly Gly Arg Thr Ala Arg Trp Cys Ser Gly Arg Ala Arg Arg
 65 70 75 80
 Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro
 85 90 95
 Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly
 100 105 110
 Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln
 115 120 125
 Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu
 130 135 140
 Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro
 145 150 155 160
 His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro
 165 170 175
 Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
 180 185 190
 Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val
 195 200 205
 Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 210 215 220

<210> 6
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(140)
 <223> neublastina madura (NBN140)

<400> 6

Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly
 20 25 30
 Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln
 35 40 45
 Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu
 50 55 60
 Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro
 65 70 75 80
 His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro
 85 90 95
 Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
 100 105 110
 Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val
 115 120 125
 Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 130 135 140

<210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>

<221> VARIANTE

<222> (1)...(116)

<223> neublastina mutada (NBN116)

5 <400> 7

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

<210> 8

10 <211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> (1)...(112)

<223> neublastina truncada (NBN112)

<400> 8

20

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

<210> 9

25 <211> 111

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

30 <221> VARIANTE

<222> (1)...(111)

<223> neublastina truncada (NBN111)

<400> 9

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

5 <210> 10
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(110)
 <223> neublastina truncada (NBN110)

15 <400> 10

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

20 <210> 11
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(109)
 <223> neublastina truncada (NBN109)

<400> 11

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

<210> 12

<211> 108

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (1)...(108)

<223> neublastina truncada (NBN108)

<400> 12

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

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)...(107)

25 <223> neublastina truncada (NBN107)

<400> 13

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

<210> 14
 <211> 106
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (1)...(106)
 <223> neublastina truncada (NBN106)

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 105
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(105)
 25 <223> neublastina truncada (NBN105)

<400> 15

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

<210> 16
 <211> 104
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (1)...(104)
 <223> neublastina truncada (NBN104)

<400> 16

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

<210> 17
 <211> 103
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> (1)...(103)
 <223> neublastina truncada (NBN103)

<400> 17

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

<210> 18
<211> 102
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> VARIANTE
10 <222> (1)...(102)
<223> neublastina truncada (NBN102)

<400> 18

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

<210> 19
<211> 101
20 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> VARIANTE
25 <222> (1)...(101)
<223> neublastina truncada (NBN101)

<400> 19

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

<210> 20
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(100)
 <223> neublastina truncada (NBN100)

<400> 20

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

<210> 21
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(99)
 <223> neublastina truncada (NBN99)

<400> 21

Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser
 20 25 30
 Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln

50 55 60
 Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val
 65 70 75 80
 Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly
 85 90 95
 Cys Leu Gly

<210> 22
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> purificación de péptido marcador

<400> 22

10 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 23
 <211> 113
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> VARIANTE
 20 <222> (1)...(113)
 <223> neublastina mutada (NBN113-N95K)

<400> 23

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

<210> 24
 <211> 106
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(106)
 35 <223> neublastina mutada (NBN106-N95K)

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 25

10 atggaactgg gacttggaga gcctactgca ttgtccact gcctccggcc taggtggcaa 60
 ccagccttgt ggccaaccct agctgctcta gccctgctga gcagcgtcac agaagcttcc 120
 ctggacccaa tgtcccgag ccccgctct cgcgatgttc cctcgccggt cctggcgccc 180
 ccaacagact acctacctgg gggacacacc gcacatctgt gcagcgaaag agccctgcga 240
 ccaccgccc agtctctca gcccgcaccc ccaccaccgg gtcccgcgct ccagtctct 300
 cccgctgcgc tccgcggggc acgcgcggcg cgtgcaggaa cccggagcag ccgcgcacgg 360
 gctacagatg cgcgcggctg ccgcctgccc tcacagctgg tgccgggtgag cgctctcggc 420
 ctggggccaca gctccgacga gctgatacgt ttccgcttct gcagcggttc gtgccgcga 480
 gcacgctccc cgcacgatct cagcctggcc agcctgctgg gcgcggggc cctgcggtct 540
 cctcccgggt cccggccgat cagccagccc tgttgccggc ccactcgcta tgaggcagtc 600
 tccttcatgg acgtgaacag cacctggaga accgtggacc atctctccgc caccgcctgc 660
 ggctgtctgg gctga 675

<210> 26
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 26

Met Glu Leu Gly Leu Gly Glu Pro Thr Ala Leu Ser His Cys Leu Arg
 1 5 10 15
 Pro Arg Trp Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
 20 25 30
 Leu Ser Ser Val Thr Glu Ala Ser Leu Asp Pro Met Ser Arg Ser Pro
 35 40 45
 Ala Ser Arg Asp Val Pro Ser Pro Val Leu Ala Pro Pro Thr Asp Tyr
 50 55 60
 Leu Pro Gly Gly His Thr Ala His Leu Cys Ser Glu Arg Ala Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Pro Pro Gln Ser Pro Gln Pro Ala Pro Pro Pro Gly Pro Ala
 85 90 95
 Leu Gln Ser Pro Pro Ala Ala Leu Arg Gly Ala Arg Ala Ala Arg Ala
 100 105 110
 Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Ala Thr Asp Ala Arg Gly Cys Arg
 115 120 125
 Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Ser Ala Leu Gly Leu Gly His Ser
 130 135 140
 Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg
 145 150 155 160
 Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly
 165 170 175
 Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser Gln Pro Cys Cys
 180 185 190
 Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr
 195 200 205
 Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 210 215 220

<210> 27

<211> 37

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> cebador

10 <400> 27

gtatctttca tggacgttat gttctacatg gagaacc

37

<210> 28

<211> 36

15 <212>ADN

<213> Secuencia artificial

<223> cebador

20 <400> 28

ggttctccat gtagaacata cgtccatgaa agatac

36

<210> 29

<211> 35

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> cebador

30 <400> 29

gctcgtgcaa cggatgcaaa aggctgtcgt ctgcg

35

<210> 30

<211> 35

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> cebador
 <400> 30
 cgcagacgac agccttttgc atccgttgca cgagc 35
 5
 <210> 31
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <223> cebador
 <400> 31
 ggagccggag cactaaaatc tccccggga tctagacc 38
 15
 <210> 32
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <223> cebador
 <400> 32
 ggtctagatc ccgggggaga ttttagtgct ccggtcc 38
 25
 <210> 33
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <223> cebador
 <400> 33
 gacgaattaa ttaagtttcg ttttgttca gg 32
 35
 <210> 34
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <223> cebador
 <400> 34
 cctgaacaaa aacgaaactt aattaattcg tc 32
 45
 <210> 35
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(414)
 <223> Neublastina marcada con His
 55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(405)
 60 <400> 35

atg ggc cat cat cat cat cat cat cat cat cat cat cac tcg agc ggc cat	48
Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His	
1 5 10 15	
atc gac gac gac gac aag gct gga gga ccg gga tct cgt gct cgt gca	96
Ile Asp Asp Asp Asp Lys Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala	
20 25 30	
gca gga gca cgt ggc tgt cgt ctg cgt tct caa cta gtg ccg gtg cgt	144
Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg	
35 40 45	
gca ctc gga ctg gga cac cgt tcc gac gaa cta gta cgt ttt cgt ttt	192
Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe	
50 55 60	
tgt tca gga tct tgt cgt cgt gca cgt tct ccg cat gat cta tct cta	240
Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu	
65 70 75 80	
gca tct cta cta gga gcc gga gca cta aga ccg ccg ccg gga tct aga	288
Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg	
85 90 95	
cct gta tct caa cct tgt tgt aga cct act aga tac gaa gca gta tct	336
Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser	
100 105 110	
ttc atg gac gta aac tct aca tgg aga acc gta gat aga cta tct gca	384
Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala	
115 120 125	
acc gca tgt ggc tgt cta gga tgataatag	414
Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly	
130 135	

- 5 <210> 36
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(135)
 <223> Neublastina marcada con His
- <400> 36

Met	Gly	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	His
1				5					10					15	
Ile	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Arg	Ala	Arg	Ala
			20					25					30		
Ala	Gly	Ala	Arg	Gly	Cys	Arg	Leu	Arg	Ser	Gln	Leu	Val	Pro	Val	Arg
		35					40					45			
Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	His	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu	Val	Arg	Phe	Arg	Phe
	50					55					60				
Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Arg	Arg	Ala	Arg	Ser	Pro	His	Asp	Leu	Ser	Leu
65					70					75				80	
Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Leu	Arg	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg
				85					90					95	
Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Cys	Cys	Arg	Pro	Thr	Arg	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser
			100					105					110		
Phe	Met	Asp	Val	Asn	Ser	Thr	Trp	Arg	Thr	Val	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala
		115					120					125			
Thr	Ala	Cys	Gly	Cys	Leu	Gly									
	130					135									

Reivindicaciones

- 5 1. Un dímero que comprende un primer polipéptido de neublastina y un segundo polipéptido de neublastina, en el que la secuencia de aminoácidos del primer y segundo polipéptido de neublastina es NBN104 (SEC ID N°: 16), en el que cada uno del primer polipéptido de neublastina y segundo polipéptido de neublastina están glucosilados en el aminoácido de la posición 86 de la SEC ID N°: 16 correspondiente a la posición 95 de la secuencia de neublastina como se define por la SEC ID N°: 2, y en el que (a) el primer polipéptido de neublastina está conjugado en su extremo N a una porción de polietilenglicol, o (b) cada uno del primer polipéptido de neublastina y segundo polipéptido de neublastina están conjugados en el extremo N-terminal con una porción de polietilenglicol.
- 10 2. El dímero de la reivindicación 1, en el que la porción de polietilenglicol tiene un peso molecular de 20 kilodalton.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 0202691 A [0005]
- WO 02078730 A [0005]
- WO 02060929 A [0005] [0020]
- US 0202319 W [0020]
- WO 0001815 A [0027] [0094] [0105]
- US 4683195 A, Mullis [0062]
- EP 0401384 A [0070] [0075]
- EP 0154316 A [0075]
- US 5252714 A [0080]
- WO 9744356 A [0105]
- US 5434131 A [0120]
- US 5834029 A [0157]
- US 5496804 A [0158] [0164]
- US 5916555 A [0158] [0164]
- EP 04707363 A [0253]
- US 2004002763 W [0253]
- US 10356264 B [0253]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- BALOH et al. *Neuron*, 1998, vol. 21, 1291-1302 [0006] [0031]
- NEEDLEMAN et al. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443-453 [0024]
- EIGENBROT et al. *Nat. Struct. Biol.*, 1997, vol. 4, 435-38 [0030]
- BALOH et al. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 3412-20 [0030]
- STEWART et al. *Solid Phase Peptide Synthesis*. 1984 [0059]
- *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0062]
- DNA Cloning. 1985, vol. I, II [0062]
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0062]
- *Nucleic Acid Hybridization*. 1984 [0062]
- *Transcription and Translation*. 1984 [0062]
- *Culture of Animal Cells*. Alan R. Liss, Inc, 1987 [0062]
- *Immobilized Cells and Enzymes*. IRL Press, 1986 [0062]
- *A Practical Guide to Molecular Cloning*. 1984 [0062]
- *Methods in Enzymology*. Academic Press, vol. 154, 155 [0062]
- *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987 [0062]
- *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*. Academic Press, 1987 [0062]
- *Handbook of Experiment Immunology*. 1986, vol. I-IV [0062]
- *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986 [0062]
- MALIK et al. *Exp. Hematol.*, 1992, vol. 20, 1028-1035 [0070]
- *Focus on Growth Factors*, 1992, vol. 3 (2), 4-10 [0075]
- *Bioconjugate Chem.*, 1994, vol. 5, 133-140 [0076]
- SANICOLA et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 6238 [0105]
- HOPP et al. *Biotechnology*, 1988, vol. 6, 1204 [0114]
- *Nat. Struct. Biol.*, 1997, vol. 4, 435-8 [0188]
- *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 3412-20 [0188]
- VAN DUYNE et al. *Science*, 1991, vol. 252, 839-842 [0242]
- JANCARIK, J. ; KIM, S.H. *J. Appl. Crystallogr.*, 1991, vol. 24, 409-411 [0242]
- OTWINOWSKI et al. *Proceeding of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing*. Daresbury Laboratory, 1993, 56-62 [0243]
- TERWILLIGER et al. *Acta Crystallogr. D.*, 1999, vol. 55, 849-861 [0244]
- PELLEGRINI et al. *Nature*, 2000, vol. 407, 1029-1034 [0246]
- CHAPLAN et al. *J. Neurosci. Meth.*, 1994, vol. 53, 55-63 [0249]
- HARGREAVES et al. *Pain*, 1988, vol. 32, 77-88 [0249]