



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 349 043**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05789285 .3**

(96) Fecha de presentación : **18.08.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1786454**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

(54) Título: **Variantes de neublastina.**

(30) Prioridad: **19.08.2004 US 602825 P**
24.06.2005 US 694067 P

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.12.2010

(72) Inventor/es: **Silvian, Laura;**
Rossmanno, Anthony y
Pepinsky, R., Blake

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.12.2010

(74) Agente: **Zea Checa, Bernabé**

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**Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas**

- 5 **[0001]** Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional número 60/602.825, presentada el 19 de agosto de 2004 y la solicitud provisional número 60/694.067, presentada el 24 de junio de 2005.

Campo Técnico

- 10 **[0002]** La invención se refiere a química proteica, biología molecular, y neurobiología.

Antecedentes

- 15 **[0003]** La neublastina, también conocida como artemina y enovina, es una proteína secretada homodimérica de 24 kDa que promueve la supervivencia de neuronas del sistema nervioso periférico y central tal como neuronas dopaminérgicas (Baudet et al., 2000, *Development*, 127:4335; Rosenblad et al., 2000, *Mol. Cell Neurosci.*, 15(2):199; GenBank AF120274). El gen que codifica la neublastina se ha clonado y secuenciado (Roseblad et al., 2000, *Mol. Cell Neurosci.*, 15(2): 199; Baloh et al., *Neuron*, 21:1291).
- 20 **[0004]** La neublastina es un miembro de la familia de ligandos del factor neurotrópico derivado de la línea celular glial (GDNF). A nivel celular, los miembros de GDNF activan el receptor tirosina quinasa, RET. RET se asocia con un co-receptor, el receptor de la familia GDNF alfa (GFRalpha), una proteína de membrana unida a glucosilfosfatidil inositol (GPI) que proporciona especificada de ligando para RET. Se conocen cuatro GFRalpha (GFRalpha1-4), La neublastina se une a GFRalpha3 junto con RET formando un complejo de señalización ternario (Baudet et al. 2000, *Development*, 127:4335; Baloh et al., 1998, *Neuron*, 21:1291), que se localiza predominantemente sobre neuronas sensoriales nociceptivas (Orozco et al., 2001, *Eur. J. Neurosci.*, 13(11):2177). Estas neuronas detectan el dolor y las lesiones. Por tanto, la neublastina tiene aplicación clínica en el tratamiento general de neuropatía y más específicamente en el tratamiento de dolor neuropático.
- 25 **[0005]** La neublastina y los otros miembros de la familia GDNF son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF beta) y

por tanto, se caracterizan por la presencia de siete residuos de cisteína conservados con espaciado similar que forman la estructura de un lazo de cisteína (Saarma, 1999, *Microsc. Res. Tech.*, 45:292). Cada monómero contiene dos enlaces disulfuro que forman una estructura de bucle cerrado 5 que rodea el tercer disulfuro para formar una estructura de lazo apretado. La séptima cisteína contenida dentro de cada monómero forma un enlace disulfuro intermolecular, que une covalentemente los monómeros para formar el producto dimérico final (Rattenholl et al 2000, *J. Mol Biol.*, 305:523).

[0006] Los miembros de la familia TGF beta se sintetizan como pre-pro- 10 proteínas que finalmente se secretan como un homodímero maduro después de la escisión del péptido señal y el pro-dominio (véase, por ejemplo, Rattenholl, et al., 2000, *J. Mol Biol.*, 305:523; Fairlie et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276(20): 16911). Tanto el péptido señal como el pro-dominio median 15 la secreción apropiada de los miembros de la familia TGF beta (Rattenholl et al., 2000, *J. Mol Biol.*, 305:523; Rattenholl et al., 2001, *Eur. J. Biochem.*, 268:3296).

Resumen

20 [0007] La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la neblastina se une a sulfato de heparina y que residuos aminoacídicos particulares en el polipéptido de neblastina contribuyen a este acontecimiento de unión. Se descubrió que la sustitución de residuos aminoacídicos seleccionados disminuía la unión de heparina por polipéptidos 25 de neblastina variantes y aumentaba la bioactividad y biodisponibilidad de las variantes.

[0008] En un aspecto, la invención muestra un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 1, donde la secuencia de aminoácidos 30 contiene un aminoácido diferente de arginina en la posición correspondiente a la posición 48 y la posición 49 de la SEC ID Nº 1 (por ejemplo, la arginina se sustituye con un residuo aminoacídico no conservativo tal como ácido glutámico), donde el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFRalfa3 y RET, y donde el polipéptido muestra unión 35 disminuida a heparina en comparación con la proteína neblastina de tipo salvaje de la SEC ID Nº 1.

[0009] Por ejemplo, el residuo de arginina en la posición 48 y el residuo de

arginina en la posición 49 de la SEC ID Nº 1 pueden sustituirse con residuos aminoacídicos no conservativos (por ejemplo, ácido glutámico).

5 [0010] En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos es al menos un 90%, al menos un 95%, o al menos un 98% idéntica a los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 1.

[0011] También se describe un polipéptido que contiene los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 5. En algunas realizaciones, el polipéptido contiene los aminoácidos 10-113 de la SEC ID Nº 5. En algunas realizaciones, el polipéptido contiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 5.

10 [0012] La invención también muestra conjugados que contienen un polipéptido descrito en este documento conjugado con un polímero de origen no natural. Un polímero ejemplar es un polímero sintético soluble en agua tal como un polialquilenglicol (por ejemplo, polietilenglicol).

15 [0013] La invención también muestra una proteína de fusión que contiene un polipéptido descrito en este documento y una secuencia de aminoácidos heteróloga.

[0014] La invención también muestra un dímero que contiene dos de los polipéptidos, conjugados, o proteínas de fusión descritos en este documento.

20 [0015] La invención también muestra una composición farmacéutica que contiene un polipéptido, dímero, conjugado, o proteína de fusión descrito en este documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0016] También se describe un ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica un polipéptido descrito en este documento, un vector de expresión que contiene el ácido nucleico, y una célula que contiene el vector de expresión.

25 [0017] También se describe un método para preparar un polipéptido, incluyendo el método las siguientes etapas: (i) proporcionar una célula que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en este documento, y (ii) cultivar la célula en condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico.

[0018] La invención también muestra un polipéptido, dímero, conjugado, proteína de fusión, o composición farmacéutica descrita en este documento para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno del sistema nervioso en un mamífero.

30 [0019] La invención también muestra un polipéptido, dímero, conjugado, proteína de fusión, o composición farmacéutica descrita en este documento para su uso en el tratamiento del dolor neuropático en un mamífero.

- [0020] La invención también muestra un polipéptido, dímero, conjugado, proteína de fusión, o composición farmacéutica descrita en este documento para su uso en la activación del receptor RET en un mamífero administrándolo al mamífero.
- 5 [0021] Una ventaja de los polipéptidos de neublastina variantes seleccionados descritos en este documento es que tienen capacidad de unión a heparina disminuida en comparación con la neublastina de tipo salvaje. La unión disminuida a heparina provoca una eliminación disminuida del polipéptido variante *in vivo*.
- 10 [0022] Inesperadamente se descubrió que una variante del polipéptido de neublastina que tiene sustituciones en las posiciones de los aminoácidos 48 y 49 tenía capacidad de unión a heparina enormemente disminuida y potencia y biodisponibilidad enormemente aumentadas en comparación con mutantes de un único aminoácido y/o neublastina de tipo salvaje. Por ejemplo, se
- 15 descubrió que el mutante doble mostraba un aumento de aproximadamente 185 veces en la exposición sérica en comparación con la neublastina de tipo salvaje. Además, se descubrió que este mutante doble mostraba un aumento de más de cinco veces en la expresión *in vitro* en comparación con la neublastina de tipo salvaje, facilitando de este modo la producción a gran escala de la proteína.
- 20 [0023] Las ventajas y propiedades inesperadas de los polipéptidos de neublastina variantes permiten el tratamiento de sujetos usando dosis inferiores de proteína y/o permiten intervalos prolongados entre administraciones (en comparación con tratamientos con la proteína de tipo salvaje).
- 25 [0024] Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un especialista en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describe métodos y materiales ejemplares. En caso de conflicto, la presente solicitud, incluyendo las definiciones, será la dominante. Los materiales, métodos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.
- 30 [0025] Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

Breve Descripción de los Dibujos**[0026]**

- 5 La Fig. 1 es un alineamiento de pre-pro-polipéptidos de neublastina humana (SEC ID Nº 10), de ratón (SEC ID Nº 11), y de rata (SEC ID Nº 12) de tipo salvaje. Las líneas verticales izquierda y derecha indican, respectivamente, el inicio de las formas de 113 aminoácidos madura y de 104 aminoácidos. El motivo de unión a heparina RRXR está en un recuadro.
- 10 La Fig. 2A representa un perfil de elución catiónico de neublastina de tipo salvaje (Pico D) y tres mutantes de sustitución única Arg-a-Glu (Picos A, B, y C) (la línea inclinada representa la concentración de cloruro sódico teórica para cualquier volumen dado eluido de la columna). Los datos son la representación de los valores de OD280 de la muestra eluida.
- 15 La Fig. 2B representa un perfil de elución en heparina Sepharose de neublastina de tipo salvaje (Pico H) y tres mutantes de sustitución única Arg-a-Glu (Picos E, F, y G) (la línea inclinada representa la concentración de cloruro sódico teórica para cualquier volumen dado eluido de la columna). Los datos son la representación de los valores de OD280 de la muestra eluida.
- 20 La Fig. 3A-3B son fotografías que representan la SDS/PAGE de neublastina de tipo salvaje después de cromatografía aniónica en presencia (2A) o ausencia (2B) de heparina.
- 25 La Fig. 4 es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de unión a células CHO de neublastina. Después de SDS/PAGE y densitometría, se representaron los valores OD de las bandas de neublastina de tipo salvaje y el mutante Arg48E frente a la concentración de heparina en cada muestra.
- 30 La Fig. 5 es un gráfico que representa los resultados de un ELISA de unión a heparina usando NBN113 humana de tipo salvaje, NBN104 humana de tipo salvaje, Arg48E, Arg49E, Arg51E, y Arg48,49E.
- 35 La Fig. 6 es un gráfico que representa los resultados del análisis KIRA de NBN113 de rata de tipo salvaje, Arg51E, Arg48E, Arg49E, y NBN113 de rata.
- La Fig. 7A es un gráfico que representa los resultados del análisis KIRA

de neublastina humana de tipo salvaje y la neublastina humana mutante Arg48,49E (forma de 113 aminoácidos).

La Fig. 7B es un gráfico que representa los resultados del análisis KIRA de neublastina humana de tipo salvaje, neublastina humana mutante Arg48,49E (forma de 104 aminoácidos), neublastina humana Arg48,51E (forma de 113 aminoácidos), y neublastina humana Arg49,51E (forma de 113 aminoácidos).
5

La Fig. 8 es un gráfico que representa los resultados del análisis del complejo ternario de neublastina humana de tipo salvaje, las formas de neublastina Arg48E, Arg49E, Arg51E, Arg48,49E, y Arg48,49,51E.
10

Fig. 9 es un gráfico que representa los resultados del análisis del complejo ternario de neublastina de tipo salvaje, las formas de neublastina Arg48E, Arg49E, Arg51E, Arg48,49E, y Arg48,49,51E.

La Fig. 10 es un gráfico que representa los resultados del análisis farmacocinético de neublastina de tipo salvaje y Arg48,49E después de una única inyección subcutánea de 7 mg/kg en embolada (las concentraciones plasmáticas de neublastina se determinaron usando el ELISA de detección de neublastina).
15

La Fig. 11 es un gráfico que representa los resultados del análisis farmacocinético de neublastina de tipo salvaje y Arg48,49E después de una única inyección intravenosa de 1 mg/kg en embolada (las concentraciones plasmáticas de neublastina se determinaron usando el ELISA de detección de neublastina).
20

La Fig. 12 es un gráfico que representa los resultados del análisis farmacocinético de neublastina Arg48,49E PEGilada 2X10K después de una única inyección subcutánea de 7 mg/kg en embolada (los datos representados están extrapolados hasta 1 mg/kg) y neublastina Arg48,49E PEGilada 2X10K administrada por vía intravenosa a 1 mg/kg (las concentraciones plasmáticas de neublastina se determinaron usando el ELISA de detección de neublastina).
25

La Fig. 13 es un gráfico que representa los niveles de expresión relativos de neublastina en células CHO transfectadas con plásmidos que codifican neublastina de tipo salvaje o Arg48,49E.

La Fig. 14 es un gráfico que representa los niveles de expresión relativa de neublastina en las líneas de células CHO transfectadas con el doble mutante Arg48,49E principal y una línea de células CHO transfectada con la neublastina de tipo salvaje principal.
30
35

Descripción Detallada

[0027] La presente invención proporciona polipéptidos variantes de neublastina que tienen sustituciones en los residuos aminoacídicos 5 correspondientes a las posiciones 48 y 49 de la SEC ID Nº 1. Como se describe en los Ejemplos adjuntos, se ha descubierto que los residuos específicos en el polipéptido de neublastina de tipo salvaje son importantes para la unión de heparina. Como se cree que la unión de heparina contribuye a la eliminación de neublastina *in vivo*, se espera que sustituciones en uno o 10 más de estos residuos específicos disminuyan la unión de heparina y por lo tanto aumentan la exposición sérica del polipéptido variante.

Polipéptidos Variantes de Neublastina

15 [0028] La neublastina humana de tipo salvaje madura es de 113 aminoácidos de longitud y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

AGGPGSRARAAGARGCRLRSQQLPVRALGLGHRSDELVRFRFCGSCRRA
RSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT
VDRLSATACGCLG (SEC ID Nº 1).

20 [0029] En este documento se describen polipéptidos que tienen sustituciones en uno o más residuos aminoacídicos seleccionados del polipéptido de neublastina. Se espera que mutaciones en uno o más de estos residuos produzcan un polipéptido variante de neublastina que tenga capacidad de unión a heparina reducida o ausente en comparación con neublastina de tipo 25 salvaje. Un polipéptido variante de neublastina contiene una sustitución aminoacídica, con relación a la SEC ID Nº 1, en (i) un residuo de arginina en las posiciones 48 y 49. Salvo que se indique otra cosa, cualquier referencia en este documento a un residuo aminoacídico de neublastina por el número de la posición se refiere a la numeración de los residuos con relación a la 30 SEC ID Nº 1.

[0030] Un residuo aminoacídico de neublastina designado para sustitución (por ejemplo, un residuo de arginina en la posición 48, 49, y/o 51) puede sustituirse con un residuo aminoacídico no conservativo (por ejemplo, ácido glutámico) o un residuo aminoacídico conservativo. Como se detalla en los 35 Ejemplos adjuntos, la sustitución de la Arg 48, Arg 49, y/o Arg 51 con un aminoácido no conservativo puede producir un polipéptido variante de neublastina que tenga actividad de unión a heparina reducida pero que

retenga (o incluso potencie) la actividad biológica neublastina. Los aminoácidos ejemplares que pueden sustituir un residuo aminoacídico identificado en este documento (por ejemplo, un residuo de arginina en la posición 48, 49, y/o 51) incluyen ácido glutámico, ácido aspártico, y alanina.

- 5 **[0031]** Una variante del polipéptido neublastina biológicamente activo, cuando se dimeriza, se une a un complejo ternario que contiene GFRalfa3 y RET.

Puede usarse cualquier método para detectar la unión a este complejo para evaluar la actividad biológica de un polipéptido variante de neublastina. Se describen ensayos ejemplares para detectar la capacidad de unión en el

- 10 complejo ternario de un polipéptido variante de neublastina en el documento WO00/01815 y en el Ejemplo 7.

[0032] Un polipéptido variante de neublastina también puede evaluarse para su capacidad de desencadenar la cascada de señalización de neublastina.

Por ejemplo, el ensayo de activación del receptor quinasa (KIRA) descrito en el Ejemplo 6 puede usarse para evaluar la capacidad de un polipéptido variante de neublastina de inducir la autofosforilación de RET (véase también, Sadick et al., 1996, *Anal. Biochem.*, 235(2):207).

- 15 **[0033]** Además de las sustituciones de aminoácidos específicas identificadas en este documento, un polipéptido variante de neublastina también puede contener una o más adiciones, sustituciones, y/o delecciones en otras posiciones aminoacídicas, como se detalla en las siguientes secciones.

[0034] Un polipéptido variante de neublastina puede, además de tener las sustituciones de aminoácidos descritas en este documento, variar también en longitud. Aunque el polipéptido de neublastina humana maduro (SEC ID Nº 1) consta de los 113 aminoácidos carboxi-terminales de la pre-pro-neublastina, no se requiere el total de los 113 aminoácidos para conseguir la actividad biológica neublastina útil. Es permisible un truncamiento amino-terminal. Por tanto, un polipéptido variante de neublastina puede contener una o más de las sustituciones de aminoácidos descritas en este documento en el contexto de los 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, o 113 aminoácidos carboxi-terminales de la SEC ID Nº 1 (es decir, su longitud puede ser de 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, o 113 aminoácidos).

[0035] Un polipéptido variante de neublastina puede, además de tener las

- 30 sustituciones de aminoácidos descritas en este documento (y opcionalmente tener un truncamiento descrito en este documento), variar también en secuencia. En particular, pueden introducirse ciertas sustituciones de

- aminoácidos en la secuencia de neublastina sin pérdida apreciable de una actividad biológica neublastina. En realizaciones ejemplares, un polipéptido (i) contiene las sustituciones de aminoácidos descritas en este documento, y (ii) es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a la SEC ID Nº 1 (o un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 1). Un polipéptido variante de neublastina que difiere en secuencia de la SEC ID Nº 1 (o que difiere en secuencia de los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 1) puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, una o más sustituciones de aminoácidos no conservativas, y/o una o más delecciones o inserciones.
- [0036] La Fig. 1 es un alineamiento de los pre-pro-polipéptidos de neublastina humana, de ratón, y de rata de tipo salvaje. Las líneas verticales en la Fig. 1 indican el inicio de la forma de 113 aminoácidos madura (línea vertical izquierda) y la forma de 104 aminoácidos (línea vertical derecha) de neublastina. El motivo de unión a heparina RRXR está en un recuadro. Este alineamiento de las formas bioactivas de origen natural de neublastina indica residuos ejemplares específicos (es decir, aquellos que no están conservados entre las formas humana, de ratón, y de rata) que pueden sustituirse sin eliminar la bioactividad.
- [0037] El porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el programa BLAST 2.0. La comparación de secuencias puede realizarse usando alineamiento sin huecos y usando los parámetros por defecto (matriz Blossom 62, coste de existencia de hueco de 11, coste por hueco de residuo de 1, y una proporción lambda de 0,85). El algoritmo matemático usado en programas BLAST se describe en Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- [0038] Una sustitución conservativa es la sustitución de un aminoácido por otro con características similares. Las sustituciones conservativas incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, alanina y glicina; leucina, valina, e isoleucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina, cisteína, y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Los aminoácidos hidrófobos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier

sustitución de un miembro de los grupos polar, básico o ácido mencionados anteriormente por otro miembro del mismo grupo puede considerarse una sustitución conservativa.

- [0039]** Las sustituciones no conservativas incluyen aquellas en que (i) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva (por ejemplo, Arg, His o Lys) sustituye a o se sustituye por, un residuo electronegativo (por ejemplo, Glu o Asp), (ii) un residuo hidrófilo (por ejemplo, Ser o Thr) sustituye a o se sustituye por, un residuo hidrófobo (por ejemplo, Ala, Leu, Ile, Phe o Val), (iii) una cisteína o prolina sustituye a o se sustituye por, cualquier otro residuo, o (iv) un residuo que tiene una cadena lateral hidrófoba o aromática voluminosa (por ejemplo, Val, Ile, Phe o Trp) sustituye a o se sustituye por, uno que tiene una cadena lateral más pequeña (por ejemplo, Ala, Ser) o sin cadena lateral (por ejemplo, Gly).
- [0040]** Se describen polipéptidos variantes de neublastina ejemplares en la Tabla 1. Los residuos aminoácidos de los polipéptidos variantes de neublastina que están mutados en comparación con la posición de tipo salvaje correspondiente están en negrita y subrayados. Además, el polipéptido de neublastina (de 113, 99, ó 104 aminoácidos de longitud) usado como antecedente para la sustitución está representado en la Tabla 1.
- 20

Tabla 1: Polipéptidos Variantes de Neublastina

Las SEC ID Nº 2, 3, 4, 8 y 9 son secuencias de referencia

SEC ID Nº	Posición Sustituida	Longitud del Polipéptido	Secuencia de Aminoácidos
2	Arg 48	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQQLVPVR ALGLGHR <u>S</u> DELVRFR <u>F</u> CS <u>G</u> <u>S<u>C</u>E</u> RARSP HDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC CRPTRYEAVSFMDVN <u>S</u> TWRTVDRLSAT ACGCLG
3	Arg 49	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQQLVPVR ALGLGHR <u>S</u> DELVRFR <u>F</u> CS <u>G</u> <u>S<u>C</u>E</u> RARSP HDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC CRPTRYEAVSFMDVN <u>S</u> TWRTVDRLSAT ACGCLG
4	Arg 51	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQQLVPVR ALGLGHR <u>S</u> DELVRFR <u>F</u> CS <u>G</u> <u>S<u>C</u>RRA</u> E <u>SP</u>

			HDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSAT ACGCLG
5	Arg 48 y Arg 49	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQLVPVR ALGLGHRSD E LVRFRC S GS C HDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSAT ACGCLG
6	Arg 48 y Arg 49	99	GCRLRSQLVPVRALGLGHRSD E LVRFRC S GS C FCS G S C E ARSPHDLSLASLLGAGALR PPPGRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDV NSTWRTVDRLSATACGCLG
7	Arg 48 y Arg 49	104	AAGARGCRLRSQLVPVRALGLGHRSD E LVRFRFC S G S C E ARSPHDLSLASLLG AGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVS FMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG
8	Arg 49 y Arg 51	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQLVPVR ALGLGHRSD E LVRFRC S GS C R E A E SP HDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSAT ACGCLG
9	Arg 48 y Arg 51	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQLVPVR ALGLGHRSD E LVRFRC S GS C R A E SP HDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSAT ACGCLG

[0041] Un polipéptido variante de neblastina puede acoplarse opcionalmente a un polímero (por ejemplo, un residuo de polialquilenglicol tal como un residuo de polietilenglicol). En algunas realizaciones, el polímero se acopla al 5 polipéptido en un sitio en el polipéptido de neblastina que está en el extremo N. En algunas realizaciones, el polipéptido variante de neblastina incluye al menos una sustitución de aminoácido con respecto a la SEC ID Nº 1 (o con respecto a los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 1), que proporciona un sitio de conjugación polimérico interno en el que puede conjugarse un 10 polímero. En algunas realizaciones, el polímero se acopla al polipéptido variante de neblastina en un residuo (numerado de acuerdo con la

secuencia de la SEC ID Nº 1) seleccionado entre el grupo compuesto por la posición 14, posición 39, posición 68, y posición 95. Se describen variantes de neublastina ejemplares que proporcionan sitios de conjugación poliméricos internos en WO 02/060929 y WO 04/069176.

- 5 **[0042]** Un polipéptido puede contener opcionalmente secuencias de aminoácidos heterólogas además de un polipéptido variante de neublastina. "Heterólogo," como se usa cuando se hace referencia a una secuencia de aminoácidos, se refiere a una secuencia que se origina a partir de una fuente foránea a la célula hospedadora particular o, si es de la misma célula
- 10 hospedadora, está modificada a partir de su forma original. Las secuencias heterólogas ejemplares incluyen una secuencia señal heteróloga (por ejemplo, la secuencia señal de albúmina de rata nativa, una secuencia señal de rata modificada, o una secuencia señal de la hormona del crecimiento humana) o una secuencia usada para la purificación de un polipéptido
- 15 variante de neublastina (por ejemplo, una marca de histidina).
- [0043]** Los polipéptidos de neublastina pueden aislarse usando métodos conocidos en la técnica. Los polipéptidos de neublastina de origen natural pueden aislarse a partir de células o fuentes tisulares usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. Como alternativa, pueden
- 20 sintetizarse químicamente polipéptidos de neublastina mutados usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales. La síntesis de cortas secuencias de aminoácidos está bien establecida en la técnica peptídica. Véase, por ejemplo, Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis (2^a ed., 1984).
- 25 **[0044]** En algunas realizaciones, se producen polipéptidos variantes de neublastina por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante de neublastina puede insertarse en un vector, por ejemplo, un vector de expresión, y el ácido nucleico puede introducirse en una célula. Las células adecuadas incluyen,
- 30 por ejemplo, células de mamífero (tales como células humanas o células CHO), células fúngicas, células de levadura, células de insecto, y células bacterianas. Cuando se expresa en una célula recombinante, la célula preferiblemente se cultiva en condiciones que permitan la expresión de un polipéptido variante de neublastina. El polipéptido variante de neublastina
- 35 puede recuperarse de una suspensión celular si se desea. Como se usa en este documento, "recuperarse" significa que el polipéptido mutado se retira de aquellos componentes de una célula o medio de cultivo en el que está

presente antes del proceso de recuperación. El proceso de recuperación puede incluir una o más etapas de replegamiento o purificación.

[0045] Los polipéptidos variantes de neublastina pueden construirse usando cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Uno de dichos

- 5 métodos es mutagénesis dirigida al sitio, en la que se cambia un nucleótido específico (o, si se desea, una pequeña cantidad de nucleótidos específicos) para cambiar un único aminoácido (o, si se desea, una pequeña cantidad de residuos aminoacídicos predeterminados) en el polipéptido variante de neublastina codificado. Están disponibles en el mercado muchos kits de
10 mutagénesis dirigida al sitio. Uno de dichos kits es el "Transformer Site Directed Mutagenesis Kit" vendido por Clontech Laboratories (Palo Alto, CA).

Composiciones Farmacéuticas

- 15 **[0046]** Un polipéptido variante de neublastina puede incorporarse en una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido y uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos, y/o diluyentes. Los diluyentes, vehículos y excipientes aceptables típicamente no afectan de forma adversa a la homeostasis del destinatario (por ejemplo, equilibrio de electrolitos). Los vehículos aceptables incluyen sales biocompatibles, inertes o bioabsorbibles, agentes tamponantes, oligo- o polisacáridos, polímeros, agentes que mejoran la viscosidad, conservantes y similares. Un vehículo ejemplar es solución salina fisiológica (NaCl 0,15 M, pH 7,0 a 7,4). Otro vehículo ejemplar es fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 25 100 mM. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre técnicas de formulación y administración de composiciones farmacéuticas en, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

- [0047]** La administración de una composición farmacéutica que contiene un polipéptido variante de neublastina puede ser sistémica o local. Las 30 composiciones farmacéuticas pueden formularse de modo que sean adecuadas para administración parenteral y/o no parenteral. Las modalidades de administración específicas incluyen administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, intratecal, oral, rectal, bucal, tópica, nasal, oftálmica, intra-articular, intra-arterial, sub-aracnoidea, bronquial, linfática, vaginal, e intra-uterina.

[0048] Las formulaciones adecuadas para administración parenteral

contienen convenientemente una preparación acuosa estéril del polipéptido variante de neublastina, que preferiblemente es isotónica con la sangre del destinatario (por ejemplo, solución salina fisiológica). Las formulaciones pueden presentarse en forma de dosis unitaria o multi-dosis.

- 5 **[0049]** Una formulación ejemplar contiene un polipéptido variante de neublastina descrito en este documento y los siguientes componentes tamponantes: succinato sódico (por ejemplo, 10 mM); NaCl (por ejemplo, 75 mM); y L-arginina (por ejemplo, 100 mM).
- 10 **[0050]** Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden presentarse en forma de unidades discretas tales como cápsulas, obleas, comprimidos, o grageas, conteniendo, cada una, una cantidad predeterminada del polipéptido variante de neublastina; o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso, tal como un jarabe, un elixir, una emulsión, o una poción.
- 15 **[0051]** Las cantidades terapéuticamente eficaces de una composición farmacéutica pueden administrarse a un sujeto que lo necesite en un régimen de dosificación que pueden averiguar los especialistas en la técnica. Por ejemplo, una composición puede administrarse al sujeto, por ejemplo, de forma sistémica a una dosificación de 0,01 µg/kg a 1000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis. En otro ejemplo, la dosificación es de 1 µg/kg a 100 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis. En otro ejemplo, la dosificación es de 1 µg/kg a 30 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis, por ejemplo, de 3 µg/kg a 10 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis.
- 20 **[0052]** Para optimizar la eficacia terapéutica, primero se administra un polipéptido variante de neublastina a diferentes regímenes de dosificación. La dosis unitaria y el régimen dependen de factores que incluyen, por ejemplo, la especie del mamífero, su estado inmune, el peso corporal del mamífero. Típicamente, los niveles de proteínas en tejidos se controlan usando ensayos de exploración apropiados como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado.
- 25 **[0053]** La frecuencia de la dosificación para un polipéptido variante de neublastina pertenece a la experiencia y al juicio clínico de los médicos. Típicamente, el régimen de administración se establece por ensayos clínicos que pueden establecer parámetros de administración óptimos. Sin embargo,
- 30 el facultativo puede variar dichos regímenes de administración de acuerdo con la edad, salud, peso, sexo y estado médico del sujeto. La frecuencia de dosificación también puede variar entre tratamientos agudos y crónicos para

neuropatía. Además, la frecuencia de dosificación puede variarse dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

Usos Médicos

5

[0054] Los polipéptidos variantes de neublastina son útiles para modular el metabolismo, crecimiento, diferenciación, o supervivencia de una célula nerviosa o neuronal. En particular, los polipéptidos variantes de neublastina pueden usarse 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.

10 **[0055]** Los polipéptidos variantes de neublastina descritos en este documento (y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) pueden usarse en métodos para tratar un trastorno caracterizado por el daño a neuronas sensoriales o células del ganglio retiniano, incluyendo neuronas de los ganglios de la raíz dorsal o de cualquiera de los siguientes tejidos: los ganglios geniculado, petroso y nodoso; el complejo vestibuloacústico del octavo nervio craneal; el polo ventrolateral del lóbulo maxilomandibular del ganglio trigeminal; y el núcleo trigeminal mesencefálico.

15 **[0056]** En algunas realizaciones, pueden tratarse las neuronas del sistema sensorial y/o autónomo. En particular, pueden tratarse neuronas nociceptivas y mecanorreceptoras, más particularmente neuronas de fibras A-delta, fibras C y fibras A-beta. Además, pueden tratarse neuronas simpáticas y parasimpáticas del sistema autónomo.

20 **[0057]** En algunas realizaciones, pueden tratarse enfermedades de las neuronas motoras tales como esclerosis lateral amiotrófica ("ELA") y atrofia muscular espinal. En otras realizaciones, los polipéptidos variantes de neublastina pueden usarse para potenciar la recuperación nerviosa después de una lesión traumática. Como alternativa, o adicionalmente, puede usarse un canal de guía nerviosa con una matriz que contiene polipéptidos de neublastina conjugados con polímero, o fusiones o conjugados de polipéptidos de neublastina mutados. Dichos canales de guía nerviosa se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 5.834.029.

25

[0058] En algunas realizaciones, los polipéptidos variantes de neublastina (y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) se usan en el tratamiento de diversos trastornos en el ojo, incluyendo la pérdida de fotoreceptores en la retina en pacientes afectados con degeneración macular,

retinitis pigmentosa, glaucoma, y enfermedades similares.

- [0059] En algunas realizaciones, los polipéptidos variantes de neublastina (y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) se usan para tratar el dolor neuropático, para tratar la alodinia táctil, para reducir la pérdida 5 de sensibilidad al dolor asociada con neuropatía, para tratar infecciones víricas y neuropatías asociadas a virus, para tratar neuropatía diabética dolorosa, y para tratar trastornos del sistema nervioso. Los usos se analizan en detalle en las siguientes subsecciones.

10 1. Tratamiento del Dolor Neuropático

- [0060] Los polipéptidos variantes de neublastina descritos en este documento (y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) pueden usarse para tratar el dolor neuropático en un sujeto, que comprende 15 administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido variante de neublastina solo, o también administrando al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto inductor de analgesia seleccionado entre el grupo compuesto por opioides, anti-arrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antidepresivos, corticosteroides y fármacos anti-inflamatorios 20 no esteroideos (NSAID). En una realización, el compuesto inductor de analgesia es un anticonvulsivo. En otra realización, el compuesto inductor de analgesia es gabapentina (ácido (1-aminometil)ciclohexanoacético) o pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metilpropil)butanoico).

- [0061] Los polipéptidos variantes de neublastina descritos en este documento 25 (y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) pueden usarse en el tratamiento del dolor asociado con neuropatías periféricas. Entre las neuropatías periféricas que pueden tratarse están las neuropatías asociadas a traumatismos, por ejemplo, las causadas por lesión o patología física, daño físico al cerebro, daño físico a la médula espinal, apoplejía 30 asociada con daño cerebral, y trastornos neurológicos relacionados con neurodegeneración.

- [0062] Los polipéptidos variantes de neublastina descritos en este documento (y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) pueden usarse en el tratamiento de varias neuropatías periféricas, incluyendo: (a) 35 neuropatías inducidas por traumatismo, (b) neuropatías inducidas por quimioterapia, (c) neuropatías inducidas por toxinas (incluyendo, aunque sin limitación, neuropatías inducidas por el alcoholismo, intoxicación con vitamina

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

35 2. Tratamiento de Alodinia Táctil

[0063] Los polipéptidos variantes de neublastina descritos en este documento

(y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) pueden usarse en el tratamiento de alodinia táctil en un sujeto. La expresión "alodinia táctil" típicamente se refiere a la afección de un sujeto en el que se provoca dolor por la estimulación de la piel (por ejemplo, tacto) que normalmente es

5 inocua.

[0064] En algunas realizaciones, la alodinia táctil se trata administrando al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido variante de neublastina. En una realización relacionada, la alodinia táctil puede tratarse administrando a un sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido variante de neublastina solo, o administrando al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido variante de neublastina con una cantidad eficaz de un compuesto inductor de analgesia seleccionado entre el grupo compuesto por en opioides, anti-arrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antidepresivos, corticosteroides y NSAID. En una realización, el compuesto inductor de analgesia es un anticonvulsivo. En otra realización preferida, el compuesto inductor de analgesia es gabapentina (ácido (1-aminometil)ciclohexanoacético) o pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metilpropil)butanoico).

[0065] En algunas realizaciones, se administra un polipéptido variante de neublastina en asociación con un agente terapéutico, incluyendo, aunque sin limitación, un agente anti-cáncer o un agente anti-viral. Los agentes anti-cáncer incluyen, aunque sin limitación, taxol, taxotere, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina. Los agentes anti-virales incluyen, aunque sin limitación, ddl, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol, e isoniazid.

25

3. Tratamiento para la Reducción de la Pérdida de Sensibilidad al Dolor

[0066] En otra realización, los polipéptidos variantes de neublastina descritos en este documento (y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) pueden usarse para reducir la pérdida de sensibilidad al dolor en un sujeto afectado con una neuropatía. En una realización, la neuropatía es neuropatía diabética. En algunas realizaciones, la pérdida de sensibilidad al dolor es una pérdida a la sensibilidad al dolor térmico. Estos métodos incluyen tratamiento tanto profiláctico como terapéutico.

[0067] En el tratamiento profiláctico, se administra un polipéptido variante de neublastina a un sujeto en riesgo de desarrollar una pérdida de sensibilidad al dolor (se esperaría que dicho sujeto fuera un sujeto con una neuropatía en

fase temprana). El tratamiento con un polipéptido variante de neublastina en dichas circunstancias serviría para tratar a pacientes en riesgo de forma preventiva.

- [0068] En tratamiento terapéutico, se administra un polipéptido variante de neublastina a un sujeto que ha experimentado pérdida de sensibilidad al dolor como resultado de una afección con neuropatía (se esperaría que dicho sujeto fuera un sujeto con una neuropatía en fase tardía). El tratamiento con un polipéptido variante de neublastina en dichas circunstancias serviría para recuperar la sensibilidad apropiada al dolor en el sujeto.

10

4. Tratamiento de Infecciones Víricas y Neuropatías Asociadas con Virus

- [0069] Se contempla el tratamiento profiláctico de neuropatías infecciosas y víricas. El tratamiento profiláctico está indicado después de la determinación de una infección vírica y antes de la aparición de dolor neuropático. Durante el tratamiento, se administra un polipéptido variante de neublastina para prevenir 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 el grupo compuesto por un herpesvirus (y más particularmente por un virus herpes zoster, que puede conducir a neuralgia post-herpética), un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y un papilomavirus. En una realización alternativa, se administra un polipéptido variante de neublastina para reducir la gravedad del dolor neuropático, si aparece.
- [0070] Los síntomas de infección vírica aguda a menudo incluyen la aparición de un sarpullido. Otros síntomas incluyen, por ejemplo, el desarrollo de dolor persistente en el área afectada del cuerpo, que es una complicación habitual de una infección por herpes (culebrillas). La neuralgia post-herpética puede durar un mes o más, y puede aparecer varios meses después de que hayan desaparecido todos los síntomas tipo sarpullido.

5. Tratamiento de Neuropatía Diabética Dolorosa

- [0071] Se contempla 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 los síntomas asociados con diabetes y antes de la aparición del dolor neuropático. El

tratamiento profiláctico de neuropatía diabética dolorosa también puede comenzar después de determinar que un sujeto está en riesgo de desarrollar diabetes o síntomas asociados con diabetes. Durante el tratamiento, se administra un polipéptido variante de neublastina para prevenir la aparición de

5 dolor neuropático. En una realización alternativa, se administra un polipéptido variante de neublastina para reducir la gravedad del dolor neuropático que ya ha aparecido.

6. Tratamiento de Trastornos del Sistema Nervioso

10

[0072] Los polipéptidos variantes de neublastina descritos en este documento (y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) pueden usarse en el tratamiento o prevención de un trastorno del sistema nervioso en un sujeto (tal como un ser humano), administrando a un sujeto que lo

15 necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido variante de neublastina, una composición que contiene un polipéptido variante de neublastina, o un complejo que incluye una polipéptido variante de neublastina estable, acuoso y soluble conjugado acoplado a un residuo polialquileno tal como, por ejemplo, PEG.

20

[0073] 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 sujetos preferidos para el tratamiento.

[0074] Un polipéptido variante de neublastina es útil para tratar un defecto en una neurona, incluyendo sin limitación, neuronas lesionadas y neuronas

25

traumatizadas. Los nervios periféricos que experimentan traumatismo incluyen, aunque sin limitación, nervios de la médula ósea o de la médula espinal. Los polipéptidos variantes de neublastina son útiles en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, daño neuronal isquémico cerebral; neuropatía, por ejemplo, neuropatía periférica,

30

enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Dichos polipéptidos variantes de neublastina pueden usarse en el tratamiento de memoria alterada, por ejemplo, alteración de la memoria asociada con demencia.

[0075] Lo siguiente son ejemplos de la práctica de la invención. No están

35

concebidos como limitantes del alcance de la invención de ningún modo.

EjemplosEjemplo 1: Diseño y Síntesis de Polipéptidos Variantes de Neublastina

- 5 **[0076]** Se cristalizó neublastina humana y su estructura reveló una triada de iones sulfato que interaccionaban con los cuatro siguientes residuos de neublastina en cercana proximidad entre sí: Arg 14, Arg 48, Arg 49, y Arg 51. En base a la presencia de esta triada y su espaciado relativo entre sí, se postuló que esta región de neublastina podría ser un dominio de unión a 10 sulfato de heparina potencial. Posteriormente, se introduce (*in silico*) una estructura de sulfato de heparina previamente resuelta a neublastina en el sitio de la tríada de sulfato. El sulfato de heparina se ajusta de forma precisa en esta posición, lo que sugiere que esta región dentro de la neublastina tiene potencial para la unión de sulfato de heparina.
- 15 **[0077]** Los datos de cristalización de neublastina también revelaron que los siguientes residuos aminoacídicos proporcionan interacciones suplementarias con la triad de iones sulfato o con uno o más de los otros tres iones sulfato que interaccionan con la neublastina: Ser 46, Ser 73, Gly 72, Arg 39, Gln 21, Ser 20, Arg 68, Arg 33, His 32, y Val 94. Además de los sitios de unión a 20 sulfato revelados por la estructura cristalina, la neublastina contiene una secuencia consenso del sitio de unión a sulfato de heparina (GPGSRAR) en los residuos 3-9 en su extremo N. Esta región estaba sin estructurar en la estructura cristalina pero puede llegar a ordenarse después de la unión de glucosaminoglucanos. Es probable que la región esté cerca en el espacio al 25 grupo de tres sulfatos observado en la estructura cristalina (Arg 14 contribuye al sitio de unión a heparina que está principalmente centrado en la región bisagra de la proteína).
- 30 **[0078]** Para investigar la relevancia biológica del dominio de unión a sulfato de heparina potencial, se hicieron tres sustituciones de residuos aminoacídicos únicos individuales dentro de la neublastina humana de 113 aminoácidos madura (SEC ID Nº 1). Los residuos de arginina de cada una de la posición 48 (variante llamada "Arg48E"; SEC ID Nº 2), la posición 49 (variante llamada "Arg49E"; SEC ID Nº 3), y la posición 51 (variante llamada "Arg51E"; SEC ID Nº 4) se remplazaron por glutamato (es decir, se 35 prepararon tres diferentes construcciones variantes de un único aminoácido) con la intención de cambiar la carga del residuo de una que atraería al sulfato a una que lo repeliera, y para estabilizar potencialmente los residuos de

arginina adyacentes. Las proteínas se replegaron y se purificaron de cuerpos de inclusión de *E. coli* (véase el documento WO 04/069176). Cada variante de neublastina se sometió a análisis para verificar la integridad estructural y confirmar la sustitución de residuo correcto. Los tres mutantes eran 5 estructuralmente comparables con la neublastina humana de tipo salvaje.

Ejemplo 2: Cromatografía Catiónica y en Heparina Sepharose

[0079] Los polipéptidos variantes de neublastina se sometieron a análisis 10 bioquímico adicional para determinar el efecto que cada mutación tenía sobre la unión a heparina. Se empleó cromatografía tanto en heparina Sepharose como catiónica cromatografía. Como la neublastina humana de tipo salvaje es una proteína básica con un *pI* aparente de 11,31. La neublastina se une de forma eficaz a resinas basadas en cationes. Una conversión única de arginina 15 a glutamato disminuye el *pI* aparente hasta 10,88. Sin embargo, no se esperaba que este *pI* inferior alterar drásticamente la unión a resina catiónica ni se esperaba que alterar el perfil de elución de los mutantes en comparación con el control de tipo salvaje.

[0080] Cada uno de los mutantes (junto con el control de neublastina de tipo 20 salvaje) se sometió a cromatografía catiónica. Las muestras se cargaron sobre la resina en tampón que contenía fosfato 5 mM pH 6,5 y cloruro sódico 150 mM seguido de elución con un gradiente salino lineal comenzando con cloruro sódico 150 mM y acabando con cloruro sódico 1 M. La neublastina de tipo salvaje eluía a ~800 mM de cloruro sódico (Fig. 2A; Pico D), mientras que 25 cada uno de los tres mutantes eluía dentro de un intervalo salino de aproximadamente 500 mM, reflejando de este modo su *pI* inferior. Arg49E y Arg51E (Fig. 2A; Picos B y C) eluían con una concentración salina ligeramente mayor que la requerida para eluir Arg48E (Fig. 2A; Pico A) (520 mM frente a 490 mM, respectivamente). Esta diferencia sugería que Arg48 es 30 más accesible a la superficie y contribuye más a la unión catiónica que las de las otras dos mutaciones.

[0081] Para determinar si las sustituciones Arg-a-Glu tenían un efecto sobre la unión a heparina, cada uno de los tres mutantes (junto con la neublastina humana de tipo salvaje) se sometió cromatografía en heparina Sepharose 35 (Fig. 2B). Las condiciones de unión y elución fueron similares a las usadas para la cromatografía catiónica. Sin embargo, el perfil de elución observado fue significativamente diferente del perfil de elución en la resina catiónica. La

neublastina de tipo salvaje eluía en cloruro sódico aproximadamente 720 mM (Fig. 2B; Pico H) mientras que Arg51E, Arg49E, y Arg48E eluían con cloruro sódico 570 mM (Fig. 2B; Pico G), 510 mM (Fig. 2B; Pico F), y 450 mM (Fig. 2B; Pico E), respectivamente. Parecía que Arg48E tenía un efecto

- 5 particularmente drástico sobre la unión a heparina. Tomados en conjunto, estos perfiles de cromatografía sugerían que cada mutación disminuía la afinidad aparente de la neublastina por heparina.

Ejemplo 3: Cromatografía Aniónica

10

[0082] A condiciones de pH convencionales de 6,5 y una concentración de cloruro sódico de 150 mM, la neublastina no se une a resinas aniónicas. En contraste, el sulfato de heparina sí se une a resinas aniónicas en estas mismas condiciones.

15

[0083] Cuando la neublastina se pre-mezclaba en una proporción molar 1:1 con sulfato de heparina de 16 kDa y se aplicaba a una matriz aniónica usando las condiciones anteriores, la neublastina se unía y se eluía con cloruro sódico 600 mM (Fig. 3B, carriles marcados "FT"), lo que sugiere que la neublastina se estaba uniendo a la matriz aniónica a través de su interacción 20 con sulfato de heparina. En ausencia de heparina, la neublastina no se unía a la resina aniónica (Fig. 3A, carriles marcados "FT") y la neublastina no eluía con cloruro sódico 600 mM (Fig. 3A, carriles marcados "Elución"). Estos datos proporcionan evidencias adicionales de la capacidad de la neublastina de unirse a heparina.

25

Ejemplo 4: Estudios de Unión a Células de Ovario de Hámster Chino

30

[0084] Se ha demostrado previamente que la neublastina se une de forma no específica a la superficie de células de ovario de hámster chino (CHO). Se estableció un ensayo de unión de neublastina a células CHO para determinar si esta interacción estaba mediada, al menos en parte, a través de la unión de la neublastina a moléculas de sulfato de heparina de la superficie celular.

35

[0085] La neublastina humana de tipo salvaje (40 µg) o el mutante Arg48E se pre-mezcló con células CHO (10^6 células) a una densidad celular que se une completamente a ambas formas de neublastina junto con cantidades crecientes de sulfato de heparina de 16 kDa y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Después de la incubación, las células se peletizaron por

centrifugación y la neublastina no unida restante en el sobrenadante se sometió a análisis de SDS/PAGE. Después de la cuantificación de cada banda de proteínas por densitometría, se representó el valor de densidad óptica resultante frente a la concentración de heparina en cada muestra (Fig. 4).

5 4.

[0086] A las dos concentraciones de heparina inferiores, las formas de neublastina tanto de tipo salvaje como mutante tenían cantidades iguales de proteínas identificadas en el sobrenadante. Sin embargo, según aumentaba la concentración de heparina hasta 0,5 µg/ml y más, se identificaba más 10 neublastina de tipo salvaje en el sobrenadante que del mutante Arg48E. Esta observación sugería que la heparina puede competir con la heparina unida a la superficie celular por la unión de neublastina de tipo salvaje (es decir, la unión de la heparina a neublastina de tipo salvaje provoca su eliminación de la superficie celular), mientras que la heparina no puede retirar por 15 competición el mutante Arg48E tan fácilmente. A la concentración más elevada de heparina (50 µg/ml), el mutante Arg48E empezaba a retirarse por elución de la superficie celular, lo que sugiere que una interacción iónica entre la heparina y el mutante Arg48E podría ser responsable de esta observación.

20 Ejemplo 5: Unión a Heparina de Neublastina de Tipo Salvaje y Polipéptidos de Variantes de Neublastina

[0087] Para investigar adicionalmente el papel de la triada de arginina identificada como un sitio de unión a heparina de la neublastina, se estableció 25 un ELISA de unión a heparina. En resumen, se recubrió una placa de 96 pocillos con anticuerpo monoclonal anti-neublastina, seguido de lavado y la adición de una de las formas de neublastina. Después se añadió heparina biotinilada a la placa. Después de una etapa de lavado adicional, se identificó el complejo neublastina/heparina usando un conjugado de estreptavidina-HRP con un sustrato quimioluminescente. Este ELISA de unión a heparina se usó para comparar las formas de neublastina humana de tipo salvaje de 30 113 aminoácidos (SEC ID Nº 1) y 104 aminoácidos (aminoácidos 10-113 de la SEC ID Nº 1) con polipéptidos variantes de neublastina que contienen una única sustitución de aminoácido (Arg48E, Arg49E, y Arg51E; SEC ID Nº 2-4) 35 así como una doble sustitución (Arg48,49E; SEC ID Nº 5).

[0088] Ambas formas de tipo salvaje de neublastina se unían a heparina con una EC50 de ~1 ng/ml de heparina (Fig. 5). Arg49E y Arg51E se unían de

forma menos eficaz, con una EC50 aparente de ~10 ng/ml, pero la unión máxima seguía siendo igual (Fig. 5). De las tres mutaciones puntuales sencillas, Arg48E tenía el efecto más drástico sobre la unión a heparina, con una EC50 aparente de ~100 ng/ml, pero aún conseguía el mismo valor de
5 unión máxima a heparina en comparación con las formas de neublastina no modificadas (Fig. 5). El mutante Arg48E por tanto era cien veces menos eficaz en la unión a heparina en comparación a las formas de neublastina sin modificar y diez veces menor eficaz en comparación con los otros mutantes de sustitución única. Cuando se sustituyeron tanto Arg 48 como Arg 49 con
10 glutamato, la unión a heparina prácticamente se eliminaba, provocando un descenso de siete veces en la unión máxima a heparina, pero la EC50 permanecía dentro del intervalo de los mutantes puntuales sencillos. Estos resultados sugieren que la Arg 48 desempeña una tarea importante en la
15 unión a heparina debido a su localización central en el sitio putativo de unión a heparina.

Ejemplo 6: Análisis de la Activación del Receptor Quinasa de Neublastina de Tipo Salvaje y Mutantes de Unión a Heparina

20 [0089] Para determinar si las mutaciones del sitio de unión a heparina tienen un efecto sobre la señalización del receptor de neublastina en un bioensayo basado en células, las formas mutantes de neublastina junto con la neublastina de tipo salvaje se sometieron a un análisis de activación del receptor quinasa (KIRA).

25 [0090] Cada uno de los mutantes de sustitución única Arg-a-Glu parecía idéntico al control sin modificar con respecto a la actividad KIRA, lo que sugiere que estos mutantes son estructuralmente similares al tipo salvaje y son capaces de activar el receptor de neublastina y la cascada de señalización (Fig. 6). Además, estos datos sugieren que la unión a heparina de la neublastina puede no ser necesaria para la activación del receptor.
30 [0091] Cuando el doble mutante Arg48,49E (SEC ID Nº 5; forma de 113 aminoácidos) se sometió a análisis KIRA, su EC50 aparente se desplazaba hacia la izquierda en aproximadamente un orden de magnitud con un aumento en su activación máxima del receptor en comparación con el control de neublastina humana de tipo salvaje (Fig. 7A). Asimismo, el doble mutante Arg48,49E (SEC ID Nº 7; forma de 104 aminoácidos) también mostraba una potencia aumentada en comparación con la neublastina de tipo salvaje (Fig.

7B). Cada uno de los dobles mutantes Arg48,51E y Arg49,51E (SEC ID Nº 9 y SEC ID Nº 8, respectivamente; formas de 113 aminoácidos) parecían similares al control de neublastina sin modificar con respecto a la actividad KIRA (Fig. 7B).

5

Ejemplo 7: Análisis de Complejo Ternario

[0092] La neublastina humana de tipo salvaje y cada uno de los mutantes de heparina se sometieron a análisis de complejo ternario usando dos protocolos ligeramente diferentes. El primer protocolo combinaba componentes del receptor de neublastina (GFRalfa3 y RET) junto con neublastina en una mezcla antes de la adición a la placa ELISA recubierta con anticuerpo de captura (Fig. 8). El segundo protocolo añadía estos componentes secuencialmente a una placa ELISA con GFRalfa3 añadido primero, seguido de neublastina, y después RET (Fig. 9).

[0093] Cuando los componentes se añadían juntos como una mezcla, se conseguía la unión máxima tanto con Arg48E como con Arg48,49E, lo que sugiere que estas formas de neublastina tienen la mayor afinidad por su receptor. La neublastina de tipo salvaje parecía unirse con una afinidad similar a la del mutante Arg49E, mientras que Arg51E y un mutante triple (Arg 48,49 y 51 todas sustituidas con glutamato) mostraron la unión más débil al receptor.

[0094] Cuando los componentes del receptor se añadían secuencialmente, Arg48E mostró la mejor unión al receptor. Sin embargo, en estas condiciones, el doble mutante se unía débilmente a su receptor con una afinidad que parecía similar al mutante Arg51E. Arg49E y la neublastina de tipo salvaje tenían una afinidad por el receptor que estaba en un punto intermedio entre la unión máxima y mínima observadas. El mutante triple no se unía en estas condiciones. Globalmente, estos datos sugieren que la Arg 48 desempeña una tarea central en la afectación de la afinidad de la neublastina por su receptor.

Ejemplo 8: Análisis de CD de UV Cercano y Lejano

[0095] Para investigar adicionalmente los efectos de las mutaciones dobles sobre la estructura secundaria y terciaria de la neublastina, el doble mutante Arg48,49E se sometió a análisis de CD de UV tanto cercano como lejano.

Aunque se detectaron diferencias sutiles en las estructuras secundaria y terciaria, la conformación del doble mutante era muy parecida a la de la neublastina de tipo salvaje.

5 Ejemplo 9: Análisis Farmacocinético del Doble Mutante Arg48,49E de Neublastina

[0096] La neublastina humana muestra mala farmacocinética (PK) cuando se administra a ratas por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC), con una biodisponibilidad global de menos del 1%. La eliminación basada en heparina puede ser una de las razones para esta baja biodisponibilidad. Para determinar si la eliminación basada en heparina participa en la rápida eliminación de la neublastina humana de la rata, el doble mutante Arg48,49E (junto con el control de tipo salvaje) se sometió a análisis PK.

10 [0097] Se administraron ambas formas por separado en ratas at 7 mg/kg SC. Se recogieron muestras séricas empezando a 1 hora, se completaron a las 96 horas, y se analizaron para la neublastina (Fig. 10). El área bajo la curva (AUC) observada para la neublastina de tipo salvaje era de ~109 mientras que el AUC observada para el doble mutante era de 20.145. Esto representaba un aumento de factor 185 en el AUC para el doble mutante (en comparación con la neublastina de tipo salvaje) y un aumento significativo en la exposición sérica.

15 [0098] Las neublastinas tanto de tipo salvaje como doble mutante también se sometieron a análisis PK después de administración IV (1 mg/kg). La concentración plasmática inicial del doble mutante era aproximadamente seis veces mayor (diamantes) que la del control de tipo salvaje (cuadrados) a los cinco minutos después de la inyección pero rápidamente se aproximaba a los niveles de tipo salvaje en una hora (Fig. 11). Estos datos sugieren que la doble mutación en la neublastina ayuda a aumentar la exposición sérica pero no afecta a la velocidad de eliminación global.

20 [0099] Esto tomado junto con la observación SC, parece que la unión a heparina es especialmente relevante después de administración SC, quizá provocando un efecto tipo depósito. Una vez que la neublastina entra en la circulación, la velocidad a la que se eliminan las moléculas doble mutante y de tipo salvaje es aproximadamente la misma.

25 [0100] Para abordar la velocidad a la que se elimina la neublastina de la circulación en la rata, las formas tanto de tipo salvaje como doble mutante de

neublastina se PEGilaron con PEG de 10 kDa usando química de acoplamiento basada en SPA. Como la neublastina es un homo-dímero sin residuos de lisina nativos, los residuos de 10 kDa marcaban específicamente el extremo amino de cada monómero. Se purificó la neublastina humana

- 5 doble mutante PEGilada 2X10K hasta homogeneidad, y se sometió a análisis estructural y biológico antes del ensayo PK.

[0101] Se inyectó el doble mutante Arg48,49E PEG 2X10K IV (1 mg/kg) o SC (7 mg/kg) en ratas y se recogió el suero en diversos momentos puntuales para el análisis. Después de administración IV, el doble mutante PEG 2X10K 10 consiguió la Cmáx teórica de 10 µg/ml (diamantes) con fases alfa y beta típicas (Fig. 12). La administración SC del doble mutante PEGilado mostró una Cmáx de 40 ng/ml a las 24 horas de la inyección (Fig. 12). Una vez que el fármaco alcanzaba la circulación, la velocidad aparente de eliminación era paralela a la de la dosis IV. La biodisponibilidad de esta construcción era de 15 aproximadamente el 10% en comparación con menos del 1% para la neublastina humana de tipo salvaje no PEGilada o PEGilada.

Ejemplo 10: Expresión de un Mutante de Neublastina de Unión a Heparina en Células de Ovario de Hámster Chino

20

[0102] Se expresaron construcciones plasmídicas que codificaban la neublastina de tipo salvaje y mutante en células CHO y se midió la cantidad de proteína soluble secretada por ELISA. Las construcciones plasmídicas usadas en estos experimentos codificaban una proteína de fusión que contenía el péptido señal de la hormona del crecimiento humana (SigPep) (con o sin un intrón incluido en el plásmido) fusionado con (i) los 104 aminoácidos carboxi-terminales de la neublastina humana de tipo salvaje, o (ii) el doble mutante Arg48,49E (forma de 104 aminoácidos).

25

[0103] Lo siguiente son las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión de neublastina usadas en estos experimentos. Las secuencias de la neublastina están en mayúscula. Las secuencias del péptido señal de la hormona del crecimiento humana están en minúscula. La unión de las secuencias del péptido señal y la neublastina está indicada con un carácter (^). Los aminoácidos en las posiciones 48 y 49 están subrayados.

30

[0104] SigPep-NBN (tipo salvaje): matgsrtsllafgllclswlqegsa^AAGARGCRLRS QLVPVRALGLGHRSD**ELVRFRC**SGSC**RR**RSPHDLSLASLLGAGALRPPP GSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG (SEC ID N°

13).

[0104] SigPep-NBN (Arg48,49E): matgsrtsllafgllclswlqegsa[^]AAGAR

GCRLRSQL

VPVRALGLGHRSDDELVRFRFCSGSCEEARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGS

5 RPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG (SEC ID Nº
14).

[0105] Se transfecaron células CHO con plásmidos que codificaban cada una de las formas anteriores de neublastina y se cultivaron en placas de 384 pocillos. Después de varias semanas, los pocillos que contenían células en crecimiento se transfirieron a placas de cultivo de 96 pocillos frescas. El medio condicionado se analizó por ELISA para medir el título de neublastina soluble. Se detectaron los datos de absorbancia cumulativa para cada plásmido ensayado (valor medio con una desviación típica en forma de barras de error).

10 15 **[0106]** La transfección de células CHO con plásmidos que codificaban el doble mutante Arg48,49E produjo una cantidad significativamente aumentada de líneas celulares que mostraban elevados niveles de expresión de proteína recombinante, en comparación con las células transfecadas con plásmidos que codificaban la neublastina de tipo salvaje (Fig. 13).

20 25 **[0107]** Las líneas celulares principales de cada transfección se expandieron adicionalmente. Se cultivaron cantidades fijas de células durante tres días y se determinaron el recuento celular total, la viabilidad, y el título. Los títulos de la neublastina expresada a partir de las líneas celulares dobles mutantes Arg48,49E principales eran casi cinco veces mayores que los de una línea celular de neublastina de tipo salvaje principal (Fig. 14).

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 1, en el 5 que la secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido diferente de arginina sustituido en las posiciones correspondientes a la posición 48 y la posición 49 de la SEC ID Nº 1, donde el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFRalfa3 y RET, y donde el polipéptido muestra unión a heparina disminuida en comparación con la proteína 10 neblastina de tipo salvaje de la SEC ID Nº 1.
2. Polipéptido de la reivindicación 1, en el que el residuo de arginina de la posición 48 y el residuo de arginina de la posición 49 de la SEC ID Nº 1 están sustituidas con residuos aminoacídicos no conservativos. 15
3. Polipéptido de la reivindicación 1, en el que el residuo de arginina de la posición 48 y el residuo de arginina de la posición 49 de la SEC ID Nº 1 están cada uno sustituidos con ácido glutámico.
4. Polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de aminoácidos es al menos un 90% idéntica a los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 1. 20
5. Polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de aminoácidos es al menos un 95% idéntica a los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 1. 25
6. Polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de aminoácidos es al menos un 98% idéntica a los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 1. 30
7. Polipéptido que comprende los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 5.
8. Polipéptido de la reivindicación 7, donde el polipéptido comprende los aminoácidos 10-113 de la SEC ID N °5. 35
9. Polipéptido de la reivindicación 7, donde el polipéptido comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 5.

10. Polipéptido de la reivindicación 7, donde el polipéptido consiste en los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº 5.

5

11. Polipéptido de la reivindicación 7, donde el polipéptido consiste en los aminoácidos 10-113 de la SEC ID Nº 5.

12. Polipéptido de la reivindicación 7, donde el polipéptido consiste en la

10 secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 5 ó 7.

13. Dímero que comprende dos polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15 14. Conjugado que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 conjugado con un polímero de origen no natural.

15. Conjugado de la reivindicación 14, en el que el polímero de origen no natural es un polialquilenglicol.

20

16. Conjugado de la reivindicación 15, en el que el polialquilenglicol es polietilenglicol.

17. Conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el

25 polímero de origen no natural está acoplado al polipéptido en el extremo amino.

18. Conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el polímero de origen no natural está acoplado al polipéptido en un sitio de

30 conjugación de polímero interno.

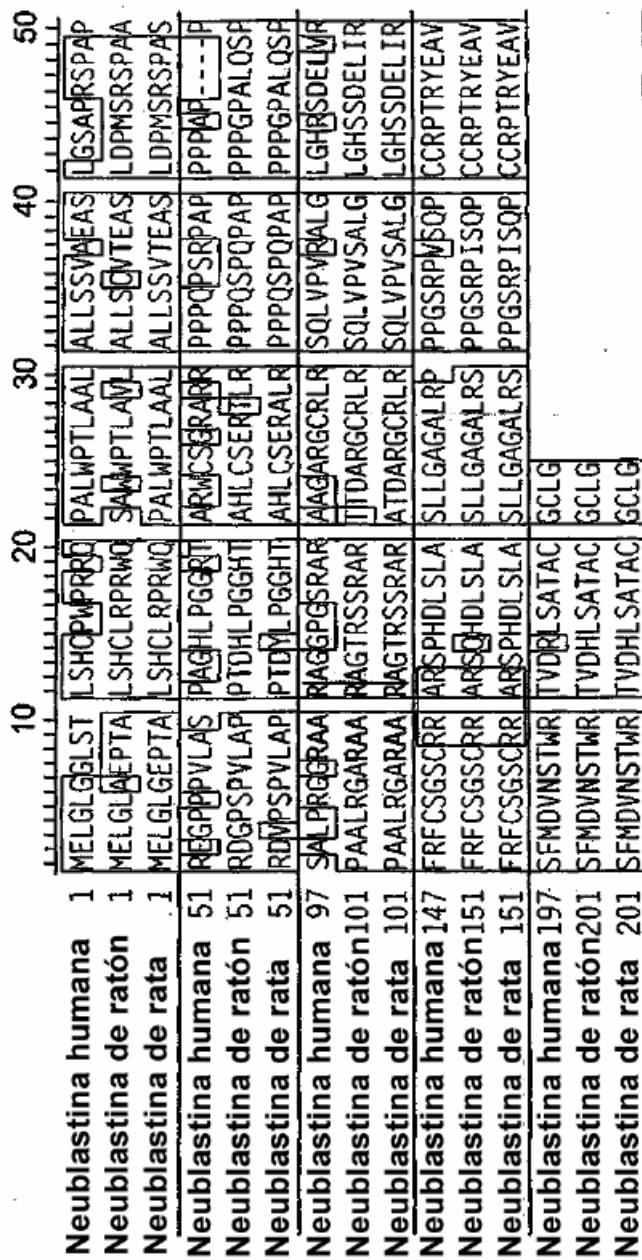
19. Proteína de fusión que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y una secuencia de aminoácidos heteróloga.

35 20. Composición farmacéutica que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el dímero de la reivindicación 13, el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, o la proteína de fusión de

la reivindicación 19 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

21. Polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el dímero de la reivindicación 13, el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14
5 a 18, la proteína de fusión de la reivindicación 19, o la composición farmacéutica de la reivindicación 20 para su uso como medicamento.
22. Ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
10
23. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 22.
24. Célula que comprende el vector de expresión de la reivindicación 23.
15
25. Procedimiento para preparar un polipéptido, el procedimiento comprendiendo:
proporcionar la célula de la reivindicación 24, y
cultivar la célula en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico.
20
26. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el dímero de la reivindicación 13, el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, o la proteína de fusión de la reivindicación 19 para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento o la prevención de una afección del sistema nervioso en un mamífero.
25
27. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el dímero de la reivindicación 13, el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, o la proteína de fusión de la reivindicación 19 para la preparación de una composición farmacéutica destinado al tratamiento del dolor neuropático en un mamífero.
30
28. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el dímero de la reivindicación 13, el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, o la proteína de fusión de la reivindicación 19 para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la activación del receptor RET en un mamífero.
35

29. Polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el dímero de la reivindicación 13, el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, la proteína de fusión de la reivindicación 19, o la composición
- 5 farmacéutica de la reivindicación 20 para su uso en el tratamiento o prevención de una afección del sistema nervioso en un mamífero.
30. Polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el dímero de la reivindicación 13, el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, la proteína de fusión de la reivindicación 19, o la composición
- 10 farmacéutica de la reivindicación 20, para su uso en el tratamiento del dolor neuropático en un mamífero.
31. Polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el dímero de la reivindicación 13, el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, la proteína de fusión de la reivindicación 19, o la composición
- 15 farmacéutica de la reivindicación 20 para su uso en la activación del receptor RET en un mamífero.
- 20 32. Uso, polipéptido, dímero, conjugado, proteína de fusión o composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31, donde el mamífero es un ser humano.



1
FIG

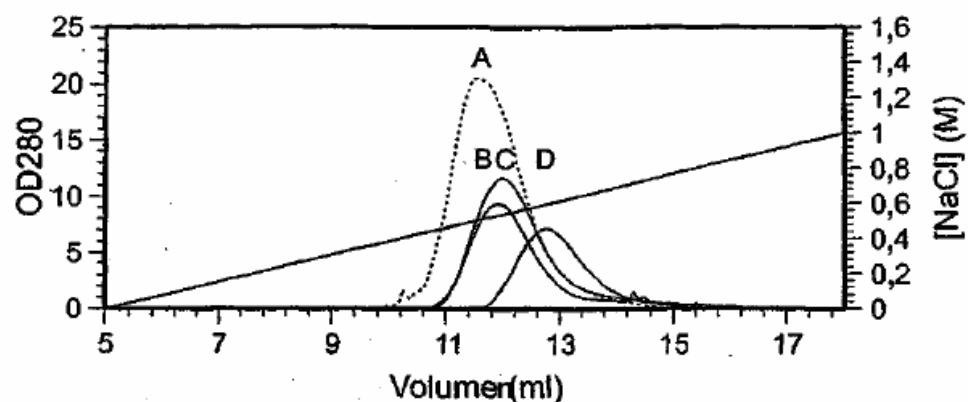


FIG. 2A

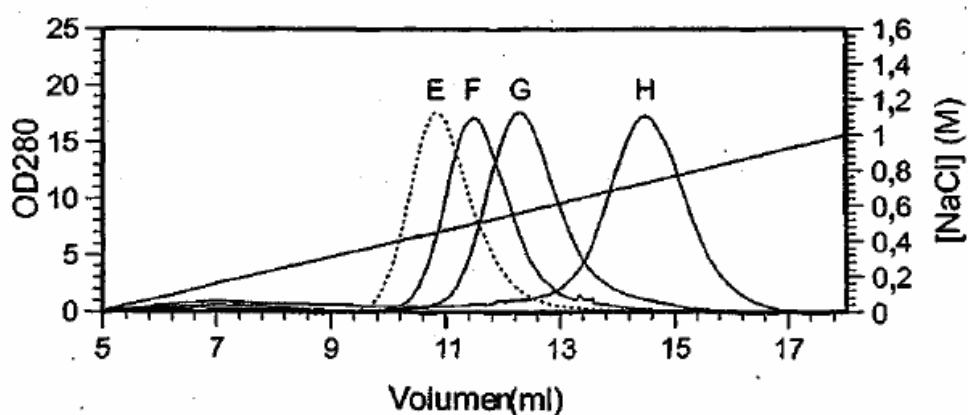


FIG. 2B

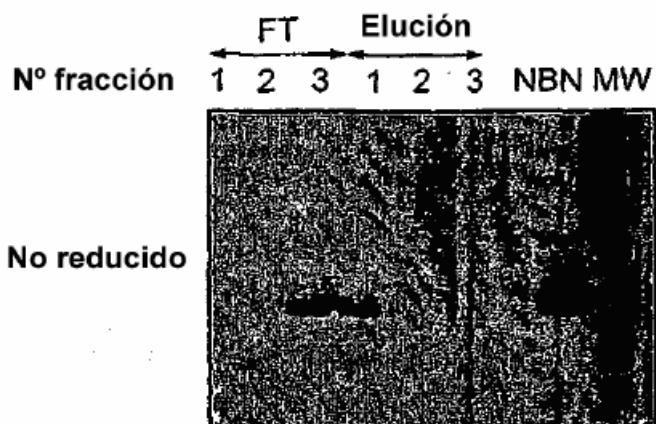


FIG. 3A

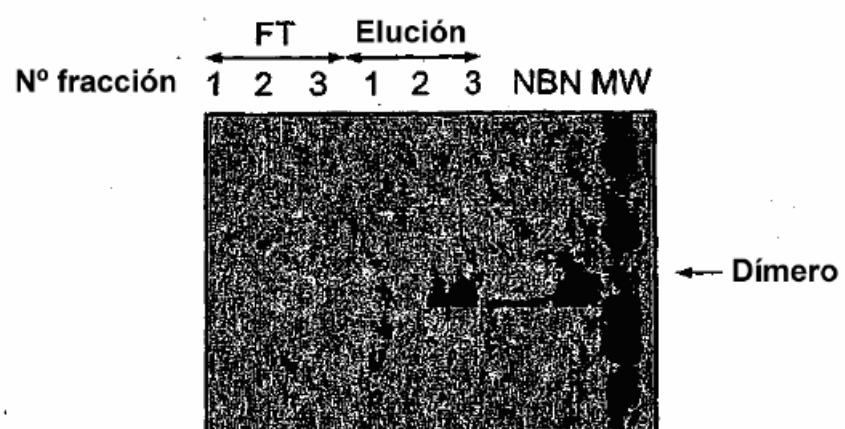


FIG. 3B

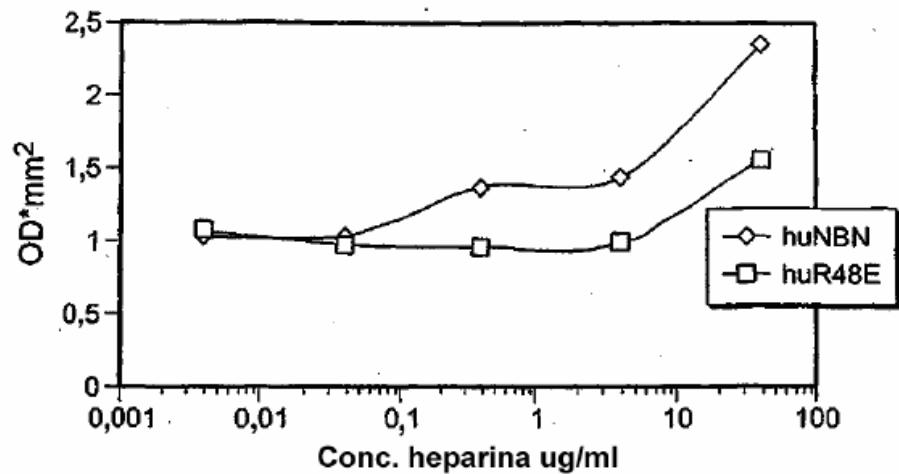


FIG. 4

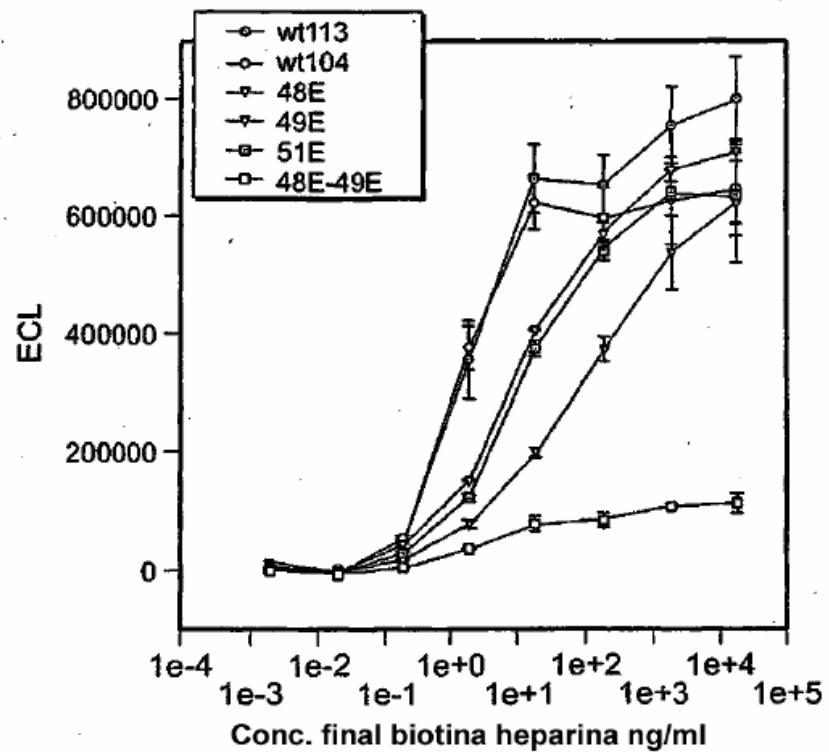


FIG. 5

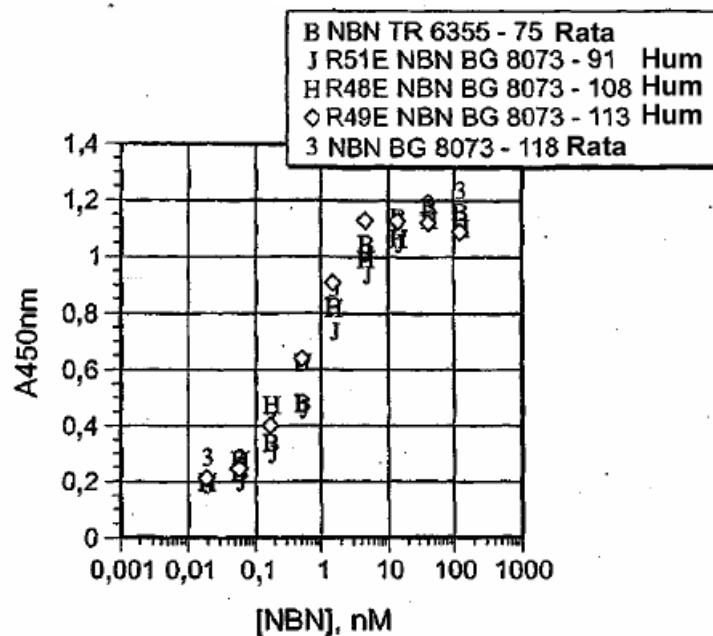


FIG. 6

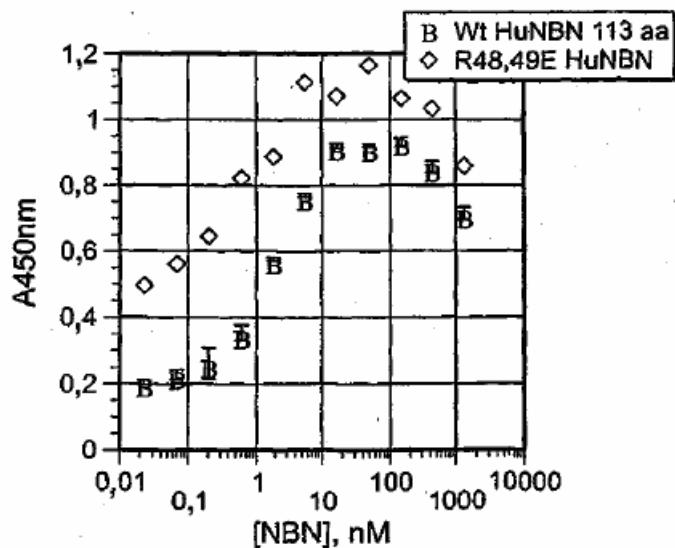


FIG. 7A

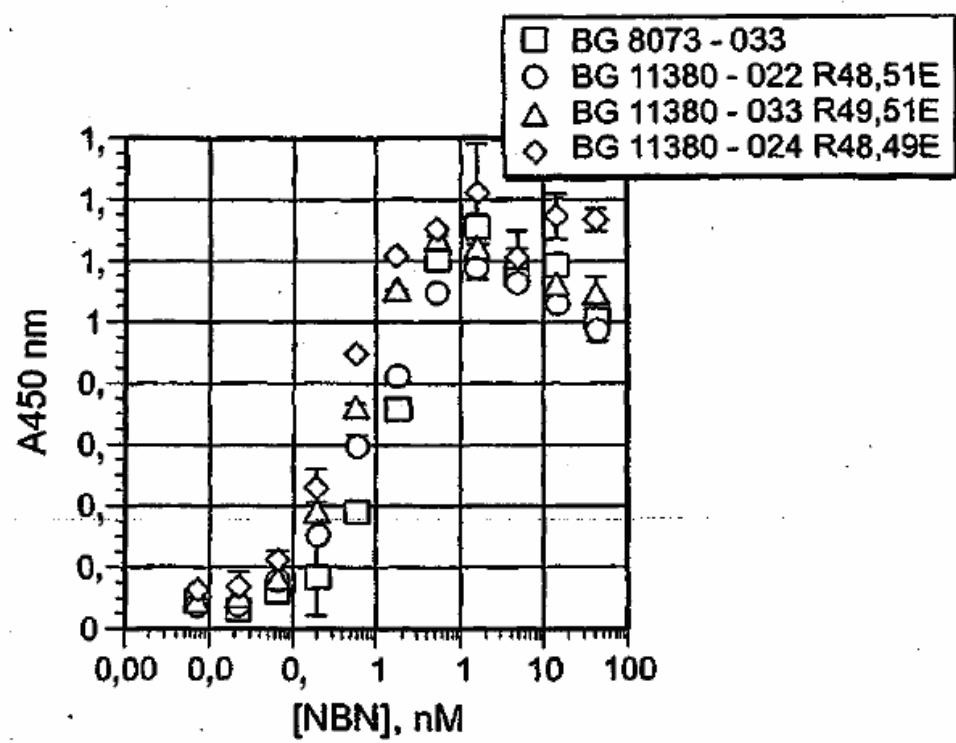


FIG. 7B

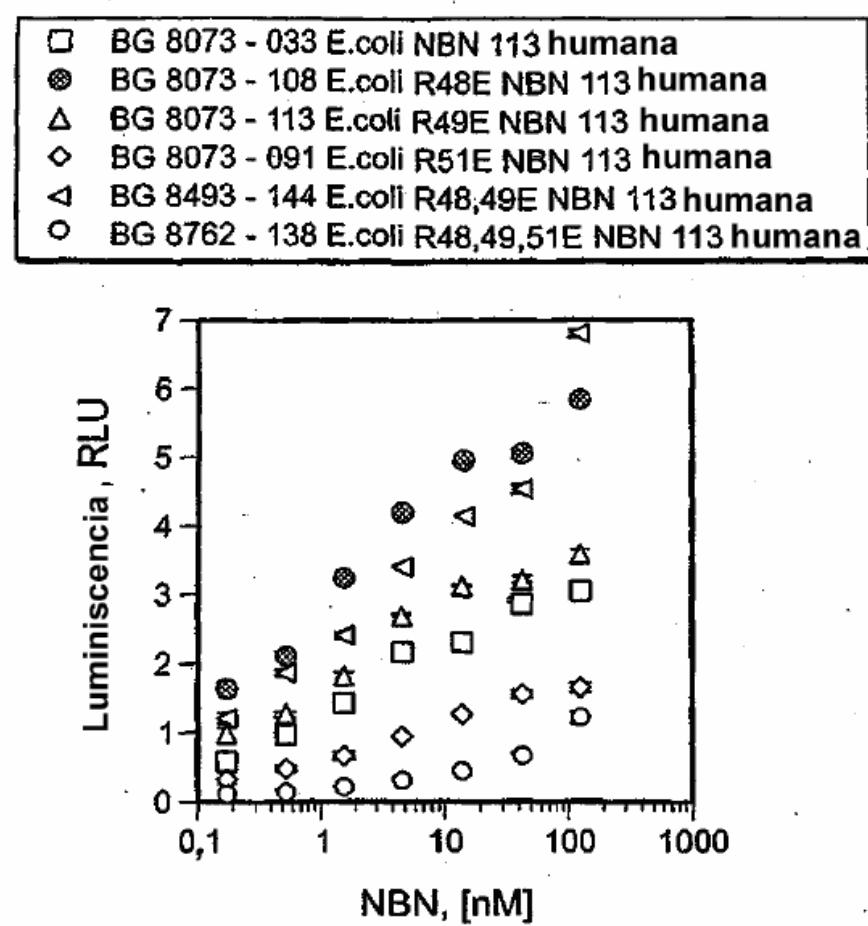


FIG. 8

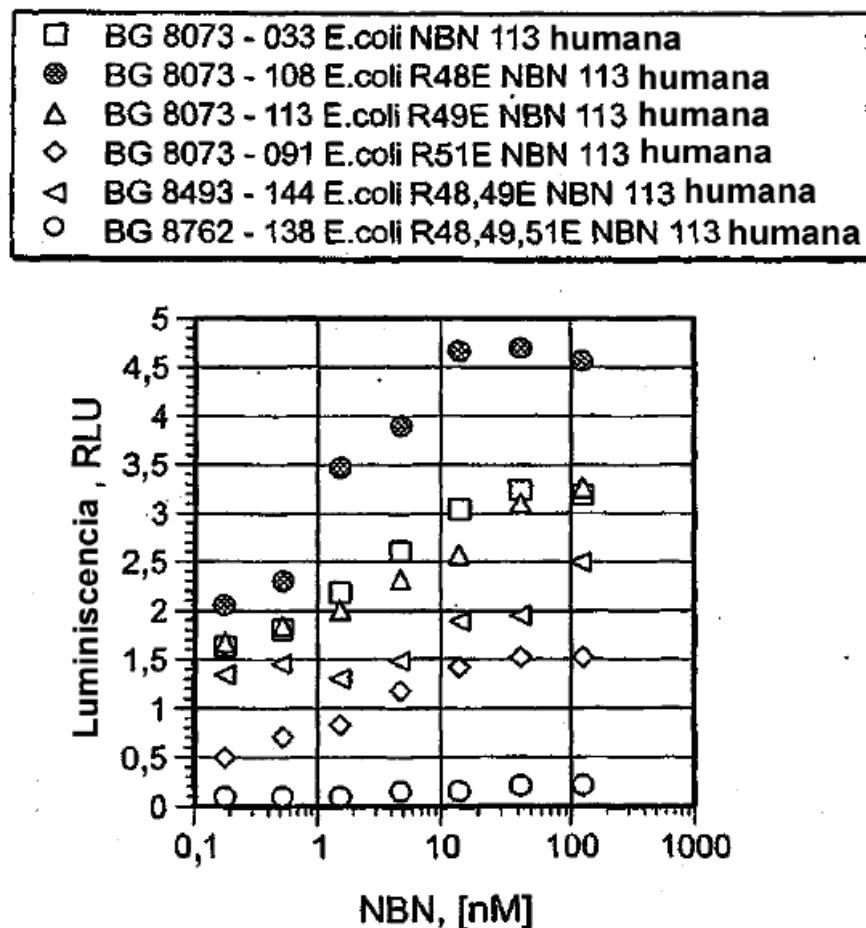


FIG. 9

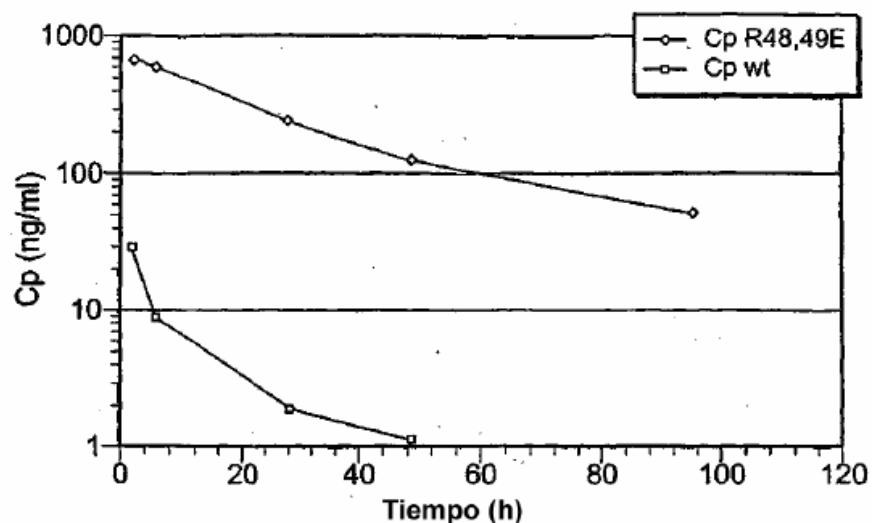


FIG. 10

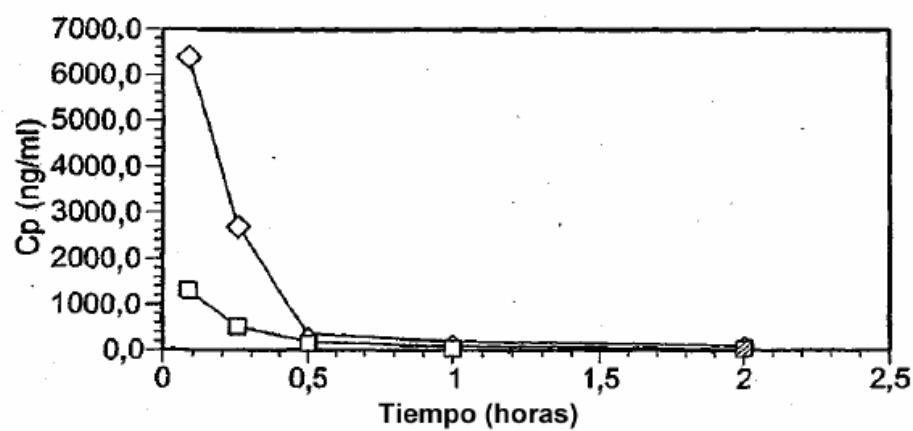


FIG. 11

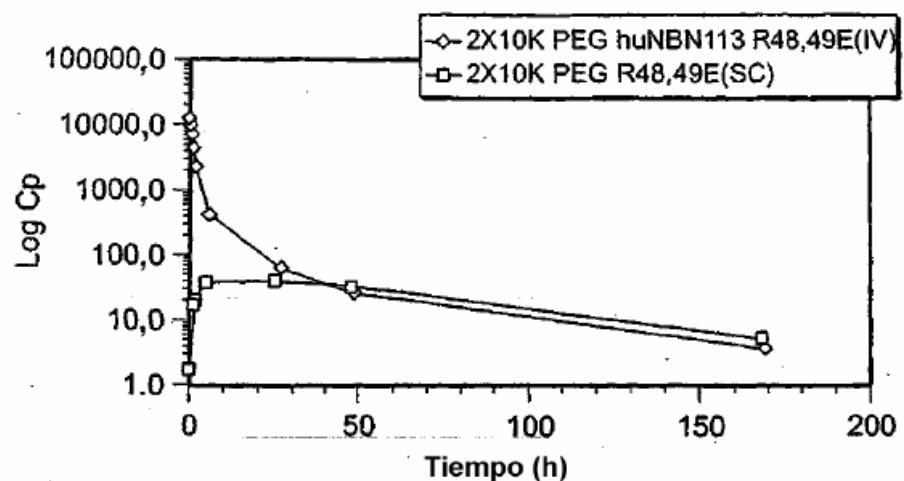


FIG. 12

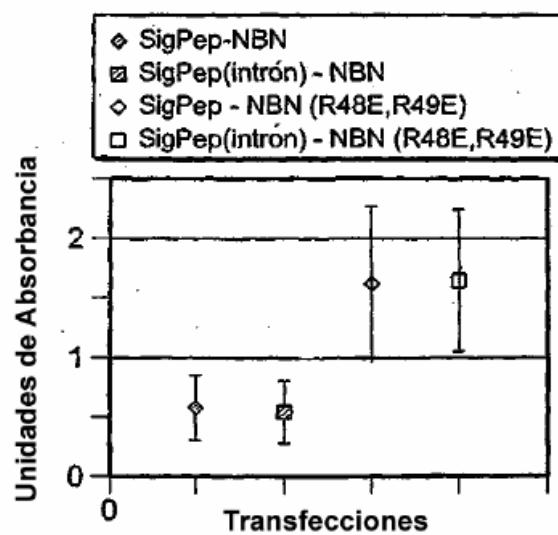


FIG. 13

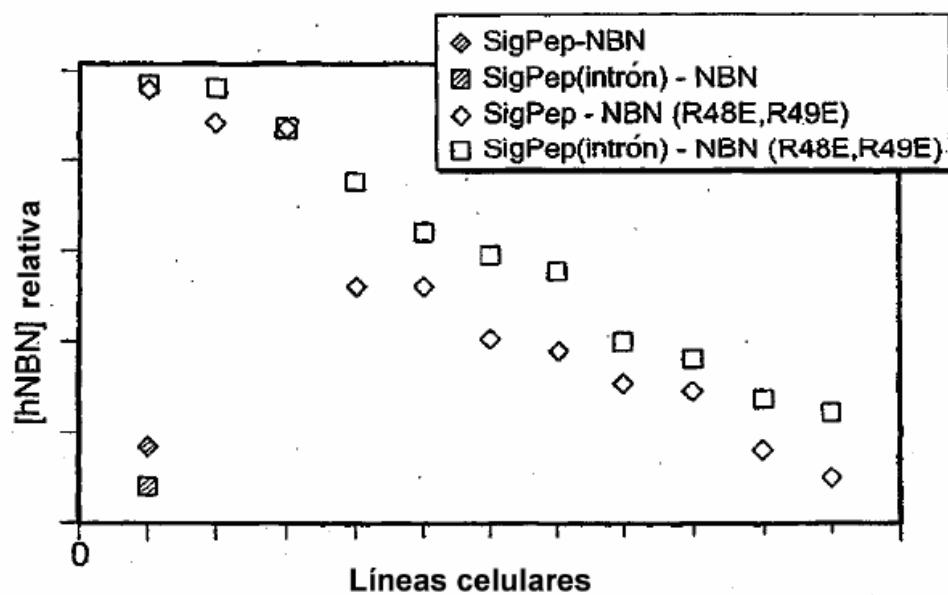


FIG. 14

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 60602825 B [0001]
- US 60694067 B [0001]
- WO 0001815 A [0031]
- WO 02060929 A [0041]
- WO 04069176 A [0041] [0078]
- US 5834029 A [0057]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- **Baudet et al.** *Development*, 2000, vol. 127, 4335 [0003] [0004]
- **Rosenblad et al.** *Mol. Cell Neurosci.*, 2000, vol. 15 (2), 199 [0003]
- **Roseblad et al.** *Mol. Cell Neurosci.*, 2000, vol. 15 (2), 199 [0003]
- **Baloh et al.** *Neuron*, vol. 21, 1291 [0003]
- **Baloh et al.** *Neuron*, 1998, vol. 21, 1291 [0004]
- **Orozco et al.** *Eur. J. Neurosci.*, 2001, vol. 13 (11), 2177 [0004]
- **Saarma.** *Microsc. Res. Tech.*, 1999, vol. 45, 292 [0005]
- **Rattenholl et al.** *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 305, 523 [0005] [0006]
- **Fairlie et al.** *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276 (20), 16911 [0006]
- **Rattenholl et al.** *Eur. J. Biochem.*, 2001, vol. 268, 3296 [0006]
- **Sadick et al.** *Anal. Biochem.*, 1996, vol. 235 (2), 207 [0032]
- **Altschul et al.** *Nucleic Acids Research*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0037]
- **Stewart et al.** *Solid Phase Peptide Synthesis*. 1984 [0043]
- REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Maack Publishing Co, [0046]