

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2002.01.25</b>	(73) Titular(es): <b>BIOGEN IDEC MA INC.</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2001.02.01 US 266071 P</b>	<b>14 CAMBRIDGE CENTER CAMBRIDGE,</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2003.10.29</b>	<b>MASSACHUSETTS 02142</b>	<b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2007.06.27</b> <b>090/2007</b>	(72) Inventor(es): <b>R. BLAKE PEPINSKY</b>	<b>US</b>
	<b>DINAH W. Y. SAH</b>	<b>US</b>
	<b>PAULA ANN BORJACK-SJODIN</b>	<b>US</b>
	<b>STEPHAN S. MILLER</b>	<b>US</b>
	<b>ANTHONY ROSSOMANDO</b>	<b>US</b>
	(74) Mandatário: <b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b>	
	<b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **CONJUGADOS POLIMÉRICOS DE NEUBLASTINA E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

**RESUMO****"CONJUGADOS POLIMÉRICOS DE NEUBLASTINA E MÉTODOS  
PARA A SUA UTILIZAÇÃO"**

É divulgado um polipéptido de neublastina variante adequado para a formação de um conjugado compreendendo polipéptido de neublastina variante acoplado a um polímero contendo uma unidade de polialquilenoglicol. O presente conjugado possui biodisponibilidade prolongada e, em formas de realização preferidas, actividade biológica prolongada em relação a formas de neublastina não modificadas ou do tipo selvagem. Os conjugados da invenção são empregues de modo útil em aplicações terapêuticas e não terapêuticas, e. g., em diagnóstico.

**DESCRIÇÃO****"CONJUGADOS POLIMÉRICOS DE NEUBLASTINA E  
MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO"****CAMPO DA INVENÇÃO**

A invenção refere-se de um modo geral a polipéptidos e, mais particularmente, a polipéptidos neurotróficos modificados e métodos de utilização destes polipéptidos modificados.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Os factores neurotróficos são proteínas de origem natural que promovem a sobrevivência, mantêm a diferenciação fenotípica, evitam a degeneração, e potenciam a actividade de células e tecidos neurais. Os factores neurotróficos são isolados a partir de tecido neural e a partir de tecido não neural que é enervado pelo sistema nervoso, e foram classificados em grupos funcionalmente e estruturalmente aparentados, também designados como famílias, superfamílias, ou subfamílias. Entre as superfamílias de factores neurotróficos encontram-se as superfamílias do factor de crescimento do fibroblasto, da neurotrofina, e do factor de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). As espécies indivi-

duais de factores neurotróficos são identificadas pela sua estrutura física, pela sua interacção com os seus receptores cognato, e pelos seus efeitos em vários tipos de células nervosas. Classificada na superfamília TGF- $\beta$  encontram-se os ligandos do factor neurotrófico derivado da linha celular glial (GDNF), que incluem GDNF, persefina (PSP) e neurturina (NTN).

Os ligandos da subfamília GDNF possuem em comum a capacidade de indução de sinalização através do receptor da tirosina quinase RET. Estes três ligandos da subfamília GDNF diferem nas suas afinidades relativas para uma família de receptores neurotróficos, os receptores GFR $\alpha$ .

Um factor neurotrófico recentemente descrito é a "neublastina", ou "NBN". A Neublastina é classificada na subfamília GDNF uma vez que partilha regiões de homologia com outros ligandos GDNF e devido à sua capacidade para se ligar, e activar, RET. Ao contrário de outros ligandos GDNF, a Neublastina é muito selectiva para o complexo receptor GFR $\alpha$ 3-RET. Adicionalmente, a NBN possui sub-regiões únicas na sua sequência de aminoácidos.

Infelizmente, a Neublastina é rapidamente eliminada pelo corpo. Esta eliminação rápida pode frustrar a utilização de Neublastina em aplicações terapêuticas. Deste modo, existe a necessidade de se identificarem variantes da Neublastina que possuam uma biodisponibilidade aumentada.

A presente invenção é parcialmente baseada na descoberta de novas formas de neublastina que exibem propriedades farmacocinéticas e de biodisponibilidade melhorada *in vivo*. Estas novas formas incluem polipéptidos de neublastina variante conjugados com moléculas poliméricas.

Num aspecto, a invenção compreende um polipéptido de neublastina variante, ou polipéptido de muteína de neublastina, que inclui uma sequência de aminoácidos possuindo uma ou mais substituições de aminoácidos em posições expostas a solvente do dímero neublastina maduro. As presentes substituições introduzem no polipéptido de neublastina nativa um ou mais sítios aos quais substâncias, tais como polímeros de origem natural ou sintéticos, se podem ligar ao polipéptido para aumentar a sua solubilidade, e consequentemente a sua biodisponibilidade, *in vivo*. De modo preferido, os presentes polipéptidos variantes incluem uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica aos aminoácidos 8-113 da SEQ ID NO: 1. O polipéptido de neublastina variante inclui uma ou mais substituições de aminoácidos em que um aminoácido outro que não arginina aparece na posição 14 na sequência de aminoácidos do polipéptido variante, um aminoácido outro que não arginina na posição 39 aparece na sequência de aminoácidos do polipéptido variante, um aminoácido outro que não arginina na posição 68 está presente no polipéptido variante, ou um aminoácido outro que não asparagina na posição 95 está presente no polipéptido variante, quando as posições dos aminoácidos são numeradas de acordo com a sequência polipeptídica da SEQ ID NO: 1.

Como aqui utilizado, "neublastina tipo selvagem" ou "wt-NBN" refere-se a uma sequência polipeptídica neublastina de origem natural ou nativa, tal como a neublastina de ratazana, ratinho, ou humana (ver, e.g., SEQ ID NO: 2, 3, ou 4). Os polipéptidos de neublastina variante específicos são aqui designados como "NBN-X<sub>1</sub>N<sub>1</sub>X<sub>2</sub>" ou "X<sub>1</sub>N<sub>1</sub>X<sub>2</sub>-NBN" em que X<sub>1</sub> se refere a um aminoácido de um polipéptido de neublastina de tipo selvagem, N<sub>1</sub> se refere a uma posição numérica dos aminoácidos X<sub>1</sub> na sequência, como numerados de acordo com a SEQ ID NO: 1. X<sub>2</sub> refere-se a um aminoácido substituído pelo aminoácido tipo selvagem na posição numérica indicada na sequência. Deste modo, por exemplo, NBN-N95K identifica os polipéptidos de neublastina variante em que a asparagina na posição 95 é substituída por uma lisina.

O polipéptido de neublastina variante pode ser apresentado como um polipéptido multimérico. Por exemplo, o polipéptido de neublastina variante pode ser proporcionado como um dímero que inclui pelo menos um polipéptido de neublastina variante. Em algumas formas de realização, o dímero é um homodímero de polipéptidos de neublastina variante. Noutras formas de realização, o dímero é um heterodímero que inclui um polipéptido de neublastina variante e um polipéptido de neublastina tipo selvagem. Outros dímeros podem incluir duas formas diferentes de polipéptido de neublastina variante.

Em algumas das formas de realização, o polipéptido de neublastina variante inclui os aminoácidos 1-7 da SEQ ID NO: 1 para além dos aminoácidos 8-113.

Em formas de realização preferidas, o polipéptido de neublastina variante, quando dimerizado, liga-se à GFR $\alpha$ 3. Noutras formas de realização preferidas, o polipéptido de neublastina variante, quando dimerizado, estimula a fosforilação da tirosina de um polipéptido RET, quer sozinho ou quando ligado à GFR $\alpha$ 3.

Ainda noutras formas de realização preferidas, o polipéptido de neublastina variante, quando dimerizado, aumenta a sobrevivência dos neurónios, e.g., aumenta a sobrevivência de um neurónio sensorial.

Ainda noutras formas de realização preferidas, o polipéptido de neublastina variante, quando dimerizado, normaliza alterações patológicas de um neurónio, tal como um neurónio sensorial.

Em formas de realização adicionais, o polipéptido de neublastina variante, quando dimerizado, aumenta a sobrevivência de um neurónio, e.g., um neurónio anatómico, ou um neurónio dopaminérgico.

Em algumas das formas de realização, o polipéptido variante inclui duas, três, ou mais das substituições de aminoácidos seleccionadas do grupo constituído

por um aminoácido outro que não arginina na posição 14 na sequência de aminoácidos do polipéptido variante, um aminoácido outro que não arginina na posição 39 na sequência de aminoácidos do polipéptido variante, um aminoácido outro que não arginina na posição 68 do polipéptido variante, e um aminoácido outro que não asparagina na posição 95 do polipéptido variante.

Em formas de realização preferidas, o aminoácido numa ou mais das posições, 14, 39, 68, e 95 é lisina.

De modo preferido, os aminoácidos 8-94 e 96-113 do polipéptido de neublastina variante são pelo menos 90% idênticos aos aminoácidos 8-94 e 96-113 da SEQ ID NO: 1. De modo mais preferido, as sequências de aminoácidos são pelo menos 95% idênticas. De modo mais preferido, a sequência de aminoácidos do polipéptido de neublastina variante inclui a sequência de aminoácidos de um polipéptido de neublastina de origem natural de ratazana, humano ou de ratinho nos aminoácidos 8-94 e 96-113 do polipéptido de neublastina variante. Por exemplo, os aminoácidos 8-94 e 96-113 do polipéptido de neublastina variante podem incluir uma sequência de aminoácidos dos aminoácidos 8-94 e 96-113 da SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4.

É também proporcionada pela invenção uma proteína ou polipéptido de fusão que inclui um polipéptido de neublastina variante ou um polipéptido de neublastina tipo selvagem, ou uma proteína que é um dímero de duas proteínas



neublastina de fusão. As proteínas neublastina de fusão possuem também propriedades farmacocinética e de biodisponibilidade aumentadas *in vivo*.

Num outro aspecto, a invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipéptido de neublastina variante. O ácido nucleico que codifica o polipéptido de neublastina variante é de modo preferido apresentado num vector, e.g., vector de expressão. Um ácido nucleico de neublastina variante, ou um vector que inclua o mesmo, pode ser proporcionado numa célula. A célula pode ser, e.g., uma célula de mamífero, célula fúngica, célula de levedura, célula de insecto, ou célula bacteriana. Uma célula de mamífero preferida é uma célula de ovário de hamster chinês ("célula CHO").

É também proporcionado pela invenção um método de produção de um polipéptido de neublastina variante, cultivando uma célula contendo um ácido nucleico que codifica um ácido nucleico de neublastina variante sob condições que permitem a expressão de um polipéptido de neublastina variante. Se desejável, o polipéptido de neublastina variante pode posteriormente ser recuperado. A invenção inclui ainda o polipéptido de neublastina variante produzido pela célula. São aqui divulgados ácidos nucleicos similares, vectores, células hospedeiras, e métodos para a produção de polipéptido para as proteínas de fusão (tais como as proteínas de fusão neublastina-albumina do soro) desta invenção.

É também proporcionada pela invenção uma composição que inclui um polipéptido de neublastina ou um polipéptido de neublastina variante acoplado a um polímero de origem não natural. O polipéptido de neublastina variante da composição inclui de modo preferido uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica aos aminoácidos 8-113 da SEQ ID NO: 1, desde de que o polipéptido de neublastina variante inclua uma ou mais das substituições de aminoácidos seleccionadas a partir do grupo constituído por um aminoácido outro que não arginina na posição 14 na sequência de aminoácidos do polipéptido variante, um aminoácido outro que não arginina na posição 39 na sequência de aminoácidos do polipéptido variante, um aminoácido outro que não arginina na posição 68 do polipéptido variante, e um aminoácido outro que não asparagina na posição 95 do polipéptido variante, em que as posições dos aminoácidos são numeradas de acordo com a sequência polipeptídica da SEQ ID NO: 1.

Em formas de realização preferidas, o polímero compreende uma unidade polialquilenoglicol, *e.g.*, unidade polietilenoglicol (PEG).

Em formas de realização preferidas, a unidade polialquilenoglicol está acoplada a um grupo amina do polipéptido de neublastina, ou a uma lisina num polipéptido neublastina variante.

O acoplamento pode ocorrer via um éster de N-hidroxilsuccinimida (NHS) activo. O éster activo pode ser, e.g., succinato de succinimidilo com PEG (SS-PEG), butirato de succinimidilo com PEG (SPB-PEG), ou propionato de succinimidilo com PEG (SPA-PEG).

A unidade polialquilenoglicol pode ser, e.g., NHS-carboximetilo, NHS-norleucina, SC-PEG, tresilato, aldeído, epóxido, carbonilimidazole, ou carbonato de PNP.

Em algumas das formas de realização, a unidade polialquilenoglicol está acoplada a um grupo cisteína do polipéptido de neublastina ou do polipéptido de neublastina variante. Por exemplo, o acoplamento pode ocorrer via um grupo maleimida, um grupo vinilsulfono, um grupo haloacetato, e um grupo tiol.

Em algumas das formas de realização, o polipéptido de neublastina ou polipéptido de neublastina variante da composição encontra-se glicosilado. Quando o polipéptido de neublastina ou o polipéptido variante se encontra glicosilado, o polímero pode ser acoplado a uma unidade hidrato de carbono do polipéptido de neublastina glicosilado ou do polipéptido de neublastina variante. Por exemplo, o polímero pode ser acoplado ao polipéptido de neublastina glicosilado ou ao polipéptido de neublastina variante após oxidação de um grupo hidrazole ou de um grupo amino do polipéptido de neublastina glicosilado ou do polipéptido de neublastina variante, ou oxidação de um grupo reactivo do polímero.

Em várias das formas de realização, o polipéptido de neublastina ou o polipéptido de neublastina variante compreende uma, duas, três, ou quatro unidades PEG.

Em formas de realização preferidas, o polipéptido de neublastina, o polipéptido de neublastina variante ou o conjugado polimérico possui um período de semi-vida no soro mais longo relativamente ao período de semi-vida do polipéptido ou polipéptido variante na ausência do polímero.

Em formas de realização preferidas, o polipéptido de neublastina, o polipéptido de neublastina variante ou o conjugado polimérico do complexo possui uma actividade fisiológica seleccionada a partir do grupo constituído por: ligação à  $GFR\alpha 3$ , activação do RET, normalização de alterações patológicas de um neurónio, ou aumentar a sobrevivência dos neurónios.

"Normalização de alterações patológicas de um neurónio" significa que o presente conjugado induz uma alteração num ou mais dos seguintes parâmetros celulares: nível de expressão de uma proteína estrutural, um receptor de factor neurotrófico, um canal iónico, ou um neurotransmissor, ou, induz uma alteração na morfologia celular, em qualquer dos casos de modo a restaurar substancialmente tal parâmetro para o seu nível num neurónio do mesmo ou similar fenótipo que não é afectado por doença, degeneração, trauma, ou lesão. A normalização

de alterações patológicas de um neurónio pode ser monitorizada imuno-histoquimicamente, ou medindo alterações nos níveis de produtos celulares segregados ou libertados, ou medindo *in vivo* alterações em comportamento fisiologicamente imputável a função do(s) neurónio(s) afectado(s). Por exemplo, no caso de alterações patológicas associadas com um síndrome de dor neuropática, podem ser monitorizados comportamentos de dor, tais como, hiperalgesia, hipoalgesia, ou alodínia.

"Aumentar a sobrevivência dos neurónios" significa aumentar a sobrevivência de um neurónio afectado para além do período de sobrevivência observado num neurónio correspondente afectado pelo mesmo tipo de doença, distúrbio, trauma, ou lesão mas não tratado com o conjugado de neublastina ou proteína de fusão desta invenção.

Em algumas das formas de realização, o polímero está acoplado a um polipéptido num sítio na neublastina que é um terminal N. Em algumas das formas de realização, o polímero está acoplado a um polipéptido num sítio num aminoácido não-terminal do polipéptido de neublastina ou do polipéptido de neublastina variante.

Em formas de realização preferidas, o polímero está acoplado a um aminoácido do polipéptido de neublastina ou polipéptido de neublastina variante exposto a solvente.

Em formas de realização preferidas, o polímero

está acoplado ao polipéptido de neublastina ou ao polipéptido de neublastina variante num resíduo seleccionado a partir do grupo constituído pelo aminoácido amino terminal do polipéptido variante, posição 14 na sequência de aminoácidos do polipéptido de neublastina ou polipéptido de neublastina variante, posição 39 na sequência de aminoácidos do polipéptido de neublastina ou polipéptido de neublastina variante, posição 68 na sequência de aminoácidos do polipéptido de neublastina ou polipéptido de neublastina variante, e posição 95 na sequência de aminoácidos do polipéptido de neublastina ou polipéptido variante.

É também proporcionada pela invenção composição farmacêutica compreendendo um veículo fisiologicamente aceitável contendo ou possuindo um polipéptido de neublastina, um polipéptido de neublastina variante, ou um conjugado da presente invenção disperso.

Num outro aspecto, a invenção inclui um polipéptido de neublastina conjugado estável, solúvel em água ou um complexo de polipéptido de neublastina variante compreendendo um polipéptido de neublastina ou polipéptido de neublastina variante acoplado a uma unidade polietilenoglicol, em que o polipéptido de neublastina ou o polipéptido de neublastina variante está acoplado à unidade polietilenoglicol por uma ligação lábil. Em algumas das formas de realização, a ligação lábil pode ser cortada por hidrólise bioquímica, proteólise, ou clivagem de sulfidriolo. Em formas de realização preferidas, a ligação lábil pode ser cortada em condições *in vivo*.

É também proporcionado pela invenção um método para a produção de um polipéptido de neublastina modificado que possui actividade prolongada, *in vitro* ou *in vivo*, comparado com uma neublastina tipo selvagem proporcionado um polipéptido de neublastina ou polipéptido de neublastina variante, e acoplando o polipéptido ou polipéptido de neublastina variante modificado a uma unidade polímero de origem não natural, formando assim uma composição de polipéptido de neublastina - polímero acoplados.

Num outro aspecto, a invenção proporciona um método para tratar ou prevenir um distúrbio do sistema nervoso num sujeito (tal como um humano), administrando a um sujeito em necessidade uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido de neublastina variante, uma composição contendo um polipéptido de neublastina ou polipéptido de neublastina variante acoplado a um polímero, ou um complexo que inclui um polipéptido de neublastina conjugado estável, solúvel em água ou um complexo de polipéptido de neublastina variante compreendendo um polipéptido de neublastina ou polipéptido de neublastina variante acoplado a uma unidade polietilenoglicol.

De modo preferido, o distúrbio do sistema nervoso é um distúrbio nervoso periférico, tais como uma neuropatia periférica ou uma síndrome de dor neuropática. Os humanos são os sujeitos preferidos para tratamento.

A administração pode ser, *e.g.*, sistêmica ou local.

A menos que de outro modo definidos, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem o mesmo significado como geralmente aceite por peritos na técnica a que esta invenção pertence. Apesar dos métodos e materiais similares ou equivalentes aqueles aqui descritos poderem ser utilizados na execução ou teste da invenção, os métodos e materiais adequados são descritos em baixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes, e outras referências aqui mencionadas são incorporadas por referência na sua integridade. No caso de conflito, a especificação presente, incluindo definições, prevalecerá. Adicionalmente, os materiais, métodos, e exemplos são apenas ilustrativos e não se pretende que sejam limitantes.

Outras características e vantagens da invenção tornar-se-ão aparentes a partir da descrição detalhada e reivindicações que se seguem.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A invenção proporciona novos polipéptidos de neublastina variante que podem ser modificados para melhorar as suas propriedades farmacocinéticas e biodisponibilidade. Os polipéptidos de neublastina variante preferidos possuem sequências de aminoácidos alteradas o que facilita o acoplamento a um agente polimérico tal como um polímero polialquilenoglicol.



Polipéptidos de Neublastina Variante

A invenção proporciona polipéptidos de neublastina que possuem sequências de aminoácidos variantes em relação a uma sequência polipeptídica de neublastina de tipo selvagem. As sequências de aminoácidos de polipéptidos de neublastina humana e de ratinho são divulgadas no documento W000/01815. Os exemplos de polipéptidos de neublastina variante de acordo com a invenção são apresentados na Tabela 1.

De modo preferido, os resíduos alterados no polipéptido de neublastina variante são escolhidos para facilitar a ligação de um polímero tal como um polímero polialquilenoglicol no local do aminoácido modificado. Os sítios preferidos de modificação de um polipéptido de neublastina são os em regiões acessíveis a solvente no polipéptido de neublastina. Tais sítios podem ser escolhidos com base na inspecção da estrutura cristalina do factor neurotrófico aparentado, GDNF, cuja estrutura cristalina é descrita na *Nat Struct. Biol.* **4**: 435-38, 1997. Os sítios podem também ser escolhidos com base na informação estrutural-funcional proporcionada para proteínas quiméricas persefina/neublastina. Estas quimeras são descritas na *J. Biol. Chem.* **275**: 3412-20, 2000. É apresentada na Tabela 2 uma listagem com exemplos de aminoácidos neublastina acessíveis a solvente ou expostos à superfície identificados através desta metodologia.

A invenção inclui um polipéptido de neublastina variante que inclui uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70% idêntica aos aminoácidos 8-113 da SEQ ID NO: 1, que é apresentado na Tabela 1. Em algumas das formas de realização, uma ou mais das argininas na posição 14, posição 39, posição 68, ou a asparagina na posição 95, na sequência de aminoácidos do polipéptido, é substituída por um aminoácido outro que não arginina ou asparagina. De modo preferido, o aminoácido tipo selvagem é substituído por lisina ou cisteína.

Tabela 1

1	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQVLPVVRALGLGHRSEDELVR	humano
	AGTRSSRARTTDARGCRLRSQVLPVSALGLGHSSDELIRF	ratinho
	AGTRSSRARATDARGCRLRSQVLPVSALGLGHSSDELIRF	ratazana
	ag---srar---argcrlrsqvpv-alglgh-sdel-rf	consenso
41	RFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC	humano
	RFCSGSCRRARSQHDLASLLGAGALRSPPGSRPISQPC	ratinho
	RFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRSPPGSRPISQPC	ratazana
	rfcsgscrrars-hdlsasllgagalr-ppgsrp-sqpc	consenso
81	CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGCLG	humano (SEQ ID NO: 2)
	CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLSATAACGCLG	ratinho (SEQ ID NO: 3)
	CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLSATAACGCLG	ratazana (SEQ ID NO: 4)
	crptryeavsfmdvnstwrtd-lsataacgclg	consenso (SEQ ID NO: 1)

Sequência consenso:

Ala Gly Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Ser Arg Ala Arg Xaa<sub>4</sub> Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Ala Arg Gly Cys  
 Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Xaa<sub>7</sub> Ala Leu Gly Leu Gly His Xaa<sub>8</sub> Ser  
 Asp Glu Leu Xaa<sub>9</sub> Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg  
 Ser Xaa<sub>10</sub> His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg  
 Xaa<sub>11</sub> Pro Pro Gly Ser Arg Pro Xaa<sub>12</sub> 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  
 Xaa<sub>13</sub> Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly

em que

Xaa<sub>1</sub> é Gly ou Thr  
 Xaa<sub>2</sub> é Pro ou Arg  
 Xaa<sub>3</sub> é Gly ou Ser  
 Xaa<sub>4</sub> é Ala ou Thr  
 Xaa<sub>5</sub> é Ala ou Thr  
 Xaa<sub>6</sub> é Gly ou Asp  
 Xaa<sub>7</sub> é Arg ou Ser  
 Xaa<sub>8</sub> é Arg ou Ser  
 Xaa<sub>9</sub> é Val ou Ile  
 xaa<sub>10</sub> é Pro ou Gln  
 Xaa<sub>11</sub> é Pro ou Ser  
 Xaa<sub>12</sub> é Val ou Ile  
 Xaa<sub>13</sub> é Arg ou His

A tabela 2 proporciona uma lista de resíduos e números em neublastina humana que se esperam que fiquem expostos à superfície. Os resíduos expostos à superfície

foram determinados por exame da estrutura do dímero GDNF de ratazana formado pelas cadeias A e B (PDB código 1AGQ) e determinando se um resíduo estava na superfície da estrutura. Essa estrutura foi posteriormente comparada com um alinhamento de sequências de GDNF e neublastina em Baloh *et al.*, *Neuron*, vol 21, pag 1291, 1998 para determinação dos resíduos apropriados na neublastina. O esquema de numeração é o indicado na Tabela 1.

Tabela 2

1	Ala	n/a
2	Gly	n/a
3	Gly	n/a
4	Pro	n/a
5	Gly	n/a
6	Ser	n/a
7	Arg	n/a
8	Ala	n/a
9	Arg	n/a
10	Ala	n/a
11	Ala	n/a
12	Gly	+
13	Ala	-
14	Arg	+
15	Gly	+
16	Cys	-
17	Arg	+
18	Leu	+

(continuação)

19 Arg +  
20 Ser +  
21 Gln +  
22 Leu +  
23 Val -  
24 Pro +  
25 Val -  
26 Arg +  
27 Ala +  
28 Leu -  
29 Gly +  
30 Leu +  
31 Gly +  
32 His +  
33 Arg +  
34 Ser -  
35 Asp +  
36 Glu +  
37 Leu +  
38 Val -  
39 Arg +  
40 Phe -  
41 Arg +  
42 Phe +  
43 Cys -  
44 Ser +  
45 Gly +  
46 Ser +

(continuação)

47 Cys -

48 Arg +

49 Arg +

50 Ala -

51 Arg +

52 Ser +

53 Pro +

54 His -

55 Asp -

56 Leu +

57 Ser -

58 Leu -

59 Ala +

60 Ser +

61 Leu -

62 Leu +

63 Gly +

64 Ala +

65 Gly +

66 Ala +

67 Leu -

68 Arg n/a

69 Pro n/a

70 Pro n/a

71 Pro n/a

72 Gly +

73 Ser +

74 Arg n/a

(continuação)

75 Pro n/a

76 Val -

77 Ser +

78 Gln +

79 Pro -

80 Cys -

81 Cys -

82 Arg -

83 Pro -

84 Thr +

85 Arg +

86 Tyr +

87 Glu +

88 Ala +

89 Val +

90 Ser +

91 Phe -

92 Met +

93 Asp +

94 Val +

95 Asn +

96 Ser +

97 Thr +

98 Trp +

99 Arg +

100 Thr +

101 Val -

102 Asp +

(continuação)

103 Arg +

104 Leu -

105 Ser -

106 Ala -

107 Thr +

108 Ala +

109 Cys -

110 Gly +

111 Cys -

112 Leu +

113 Gly

n/a

n/a indica que os resíduos não estão presentes na estrutura do GDNF. Isto é devido ou ao design da construção, regiões flexíveis, ou inserções na neublastina relativamente ao GDNF (resíduos 68-71).

- indica que os resíduos estão no interior e não na superfície ou são resíduos de cisteína envolvidos em ligações de persulfureto. Uma vez que esta proteína é um nódulo de cisteína, a grande maioria dos resíduos encontram-se na superfície.

+ indica que este resíduo se encontra exposto à superfície na estrutura do GDNF, e consequentemente presume-se que esteja exposto à superfície na neublastina, apesar do anel contendo os resíduos 66-75 seja apenas visí-



vel apenas num dos monómeros GDNF (presumivelmente flexível). Este anel possui também uma inserção de 4 resíduos na neublastina quando comparado com o GDNF.

Como aqui utilizado, "identidade" e "homólogo" ou "homologia" são utilizados alternadamente e dizem respeito à similaridade de sequência entre dois polipéptidos, moléculas ou entre dois ácidos nucleicos. Quando uma posição em ambas as sequências comparadas é ocupada pela mesma base ou subunidade monomérica de aminoácidos (por exemplo, se uma posição em cada uma das duas moléculas de DNA está ocupada por adenina, ou uma posição em cada um dos dois polipéptidos está ocupada por uma lisina), então as respectivas moléculas são homólogas nessa posição. A percentagem de homologia entre duas sequências é uma função do número de posições coincidentes ou homólogas partilhadas pelas duas sequências dividido pelo número de posições comparadas x 100. Por exemplo, se 6 das 10 das posições nas duas sequências coincidem ou são homólogas, então as duas sequências são 60% homólogas. Por exemplo, as sequências de DNA CTGACT e CAGGTT partilham 50% de homologia (3 das 6 posições totais coincidem). De modo geral, é feita uma comparação quando duas sequências estão alinhadas para produzir homologia máxima. Tal alinhamento pode ser proporcionado utilizando, por exemplo, o método de Needleman et al., *J. Mol Biol.* **48**: 443-453 (1970), convenientemente implementado por programas de computador tal como o programa Align (DNASTar, Inc.). Sequências "similares" são as que, quando alinhadas, partilham resíduos aminoacídicos

idênticos e similares, em que resíduos similares são substituições conservadoras para, ou "mutações pontuais permitidas" de, resíduos aminoacídicos correspondentes numa sequência de referência alinhada. Neste aspecto, uma "substituição conservadora" de um resíduo numa sequência de referência é uma substituição por um resíduo que é fisicamente ou funcionalmente similar ao resíduo de referência correspondente, e.g., que possui um tamanho similar, forma, carga eléctrica, propriedades químicas, incluindo a capacidade para formar ligações covalentes ou pontes de hidrogénio, ou afins. Deste modo, uma sequência "variante com substituição conservadora" é uma que difere de uma sequência de referência ou de uma sequência tipo selvagem por estarem presentes uma ou mais substituições conservadoras ou mutações pontuais permitidas.

Em formas de realização preferidas, um polipéptido de acordo com a invenção é 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% idêntico aos aminoácidos 8-113 da SEQ ID NO: 1. Em algumas das formas de realização, a sequência de aminoácidos do polipéptido de neublastina variante inclui a sequência de aminoácidos de um polipéptido de neublastina de origem natural de ratazana, humano ou ratinho nos aminoácidos 1-94 e 96-113 do polipéptido de neublastina variante, e.g., o polipéptido possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID NOs: 2, 3, ou 4 nestas posições.

Um polipéptido de neublastina variante que difere na sequência daqueles divulgados nas SEQ ID NOs: 1-4 pode

incluir uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras. Alternativamente, ou adicionalmente, o polipéptido de neublastina variante pode diferir por uma ou mais substituições de aminoácidos não conservadoras, ou por deleções ou inserções. De modo preferido, as substituições, inserções ou deleções não eliminam actividade biológica da proteína isolada.

As substituições conservadoras incluem tipicamente a substituição de um aminoácido por outro com características similares tal como substituições dentro dos seguintes grupos: valina, alanina e glicina; leucina, valina, e isoleucina; ácido aspártico e ácido glutâmico; asparagina e glutamina; serina, cisteína, e treonina; lisina e arginina; e fenilalanina e tirosina. Os aminoácidos hidrofóbicos não polares incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina. Os aminoácidos polares neutros incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina. Os aminoácidos carregados positivamente (básicos) incluem arginina, lisina e histidina. Os aminoácidos carregados negativamente (acídicos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. Qualquer substituição de um membro dos acima mencionados grupos polares, básicos ou acídicos por outro membro do mesmo grupo pode ser considerada uma substituição conservadora.

Outras substituições podem ser facilmente identificadas por trabalhadores da área. Por exemplo, para o

aminoácido alanina, pode ser efectuada uma substituição a partir de qualquer uma das D-alanina, glicina, beta-alanina, L-cisteína e D-cisteína. Para a lisina, uma substituição pode ser qualquer uma das D-lisina, arginina, D-arginina, homo-arginina, metionina, D-metionina, ornitina, ou D-ornitina. De modo geral, as substituições em regiões funcionalmente importantes que se pode esperar que induzam alterações nas propriedades de polipéptidos isolados são aquelas em que: (i) um resíduo polar, e.g., serina ou treonina, é substituído com (ou por) um resíduo hidrofóbico, e.g., leucina, isoleucina, fenilalanina, ou alanina; (ii) um resíduo de cisteína é substituído com (ou por) qualquer outro resíduo; (iii) um resíduo possuindo uma cadeia lateral electropositiva, e.g., lisina, arginina ou histidina, é substituído com (ou por) um resíduo possuindo uma cadeia lateral electronegativa, e.g., ácido glutâmico ou ácido aspártico; ou (iv) um resíduo possuindo uma cadeia lateral grande, e.g., fenilalanina, é substituído com (ou por) um que não possui tal cadeia lateral, e.g., glicina. A probabilidade de que uma das substituições não conservadoras anteriores possa alterar as propriedades funcionais da proteína está também correlacionada com a posição da substituição em relação a regiões funcionalmente importantes da proteína: algumas substituições não conservadoras podem deste modo ter pouco ou nenhum efeito nas propriedades biológicas.

São também proporcionados pela invenção polipéptidos multiméricos que incluem um polipéptido de

neublastina variante. Os polipéptidos multiméricos são de modo preferido proporcionados como polipéptidos multiméricos purificados. Exemplos de complexos multiméricos incluem, e.g., complexos diméricos. O complexo multimérico pode ser proporcionado como um complexo heteromérico ou homomérico. Deste modo, o complexo multimérico pode ser um complexo heteromérico incluindo um polipéptido de neublastina variante e um neublastina não variante ou um complexo heteromérico incluindo dois ou mais polipéptidos de neublastina variante.

Em algumas das formas de realização, o polipéptido de neublastina variante liga-se à  $GFR\alpha 3$ . De modo preferido, a ligação do polipéptido de neublastina variante estimula a fosforilação de um polipéptido RET. Para determinar se um polipéptido se liga à  $GFR\alpha 3$ , podem ser realizados ensaios como descrito no documento WO00/01815. Por exemplo, a presença de neublastina no meio dos sobrenadantes da linha celular CHO pode ser descrita utilizando uma forma modificada de um ensaio para complexo ternário descrito por Sanicola et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**: 6238). Neste ensaio, a capacidade de moléculas tipo GDNF pode ser avaliada para a sua capacidade para mediar a ligação entre o domínio extracelular do RET e os vários co-receptores,  $GFR\alpha 1$ ,  $GFR\alpha 2$ , e  $GFR\alpha 3$ . As formas solúveis de RET e os co-receptores são produzidos como proteínas de fusão. Foram descritas uma proteína de fusão entre o domínio extracelular de RET de ratazana e fosfatase alcalina placentária (RET-AP) e uma proteína de fusão entre

o domínio extracelular da GFR $\alpha$ -1 de ratazana (divulgado no pedido de patente publicado W09744356; 27 de Novembro, 1997, aqui incorporado por referência) e o domínio Fc de IgG1 humana (rGFR( $\alpha$ 1-Ig) (Sanicola et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, **94**: 6238).

Em algumas das formas de realização, o polipéptido de neublastina variante aumenta a sobrevivência de um neurónio, ou normaliza alterações patológicas de um neurónio ou ambos. Os ensaios para determinar se um polipéptido aumenta a sobrevivência de um neurónio, ou normaliza alterações patológicas de um neurónio, são descritos, e.g., no documento W000/01815. De modo preferido, o neurónio é um neurónio sensorial, um neurónio anatómico, ou um neurónio dopaminérgico.

#### Síntese e Isolamento de Polipéptidos de Neublastina Variante

Os polipéptidos de neublastina variante podem ser isolados utilizando métodos conhecidos na técnica. Os polipéptidos de neublastina de origem natural podem ser isolados a partir de fontes de células ou tecidos por intermédio de um esquema de purificação apropriado utilizando técnicas convencionais de purificação de proteínas. Alternativamente, os polipéptidos de neublastina variante podem ser sintetizados quimicamente utilizando técnicas convencionais de síntese de péptidos. A síntese de sequências de aminoácidos curtas encontra-se bem estabelecida na técnica

de péptidos. Ver, e.g., Stewart, et al., *Solid Phase Peptide Synthesis* (2ª ed., 1984).

Noutra forma de realização, são produzidos polipéptidos de neublastina variante por técnicas de DNA recombinante. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipéptido de neublastina variante pode ser inserido num vector, e.g., vector de expressão, e o ácido nucleico pode ser introduzido numa célula. As células adequadas incluem, e.g., células de mamífero (tais como células humanas ou células de ovário de hamster Chinês), células fúngicas, células de leveduras, células de insecto, e células bacterianas. Quando expressa numa célula recombinante, a célula é de modo preferido cultivada sob condições que permitem a expressão de um polipéptido de neublastina variante. O polipéptido de neublastina variante pode ser recuperado a partir de uma suspensão celular se desejado. "Recuperado" significa que o polipéptido variante é removido dos componentes de uma célula ou meio de cultura em que está presente antes do processo de recuperação. O processo de recuperação pode incluir um ou mais passos de redobragem ou purificação.

Os polipéptidos de neublastina variante podem ser construídos por qualquer dos vários métodos conhecidos na técnica. Um desses métodos é a mutagénese dirigida, em que um nucleótido específico (ou, se desejado um pequeno número de nucleótidos específicos) é alterado de modo a mudar um único aminoácido (ou, se desejado, um pequeno número de

resíduos aminoacídicos predeterminado) no polipéptido de neublastina codificado. Os peritos na técnica reconhecem que a mutagénese dirigida é uma técnica de rotina vastamente utilizada. De facto, muito dos estojos ("kits") de mutagénese dirigida encontram-se disponíveis comercialmente. Um desses estojos ("kits") é o "Transformer Site Directed Mutagenesis Estojo ("kit")" comercializado pela Clontech Laboratories (Palo Alto, Calif.).

A prática da presente invenção empregará, a menos que de outro modo indicado, técnicas convencionais de biologia celular, cultura celular, biologia molecular, microbiologia, DNA recombinante, química de proteínas, e imunologia, que se encontram no âmbito da técnica. Tais técnicas são descritas na literatura. Ver, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. (Sambrook, Fritsch e Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *DNA Cloning*, Volumes I e II (D.N. Glover, ed), 1985; *Oligonucleotide Synthesis*, (M.J. Gait, ed.), 1984; Patente U.S. Nº 4 683 195 (Mullis et al.); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Haines e S.J. Higgins, eds.), 1984; *Transcription and Translation* (B.D. Hames e S.J. Higgins, eds.), 1984; *Culture of Animal Cells* (R.I. Freshney, ed). Alan R. Liss, Inc., 1987; *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, 1986; *A Practical Guide to Molecular Cloning* (13.Perbal), 1984; *Methods in Enzymology*, Volumes 154 e 155 (Wu et al., eds), Academic Press, Nova Iorque; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.H. Miller e M.P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor



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

#### Proteínas de fusão de neublastina variante

Se desejado, o polipéptido de neublastina variante pode ser proporcionado como uma proteína de fusão. Os derivados polipeptídicos de fusão de proteínas da invenção incluem igualmente várias formas estruturais da proteína primária que retêm actividade biológica. Como aqui utilizado "fusão" refere-se to a uma ligação co-linear, covalente de duas ou mais proteínas ou seus fragmentos via os seus esqueletos peptídicos individuais, de modo mais preferido através de expressão genética de uma molécula polinucleotídica que codifica essas proteínas na mesma grelha de leitura (*i.e.*, "em grelha"). É preferível que as proteínas ou seus fragmentos sejam de fontes diferentes. Deste modo, as proteínas de fusão preferidas incluem uma proteína neublastina variante ou fragmento ligado covalentemente a uma segunda unidade que não é uma neublastina variante. De modo preferido, a segunda unidade é derivada de um polipéptido que existe como um monómero, e é suficiente para conferir propriedades de solubilidade e/ou biodisponibilidade aumentada ao polipéptido de neublastina.

Por exemplo, uma "fusão neublastina variante/albumina do soro humana" é uma proteína que compreende um polipéptido de neublastina variante da invenção, ou seu fragmento, cujo N-terminal ou C-terminal se encontra ligado em grelha a um polipéptido de albumina do soro humana (Ver Syed *et al*, *Blood*, 1997, **89**: 3243 e Yeh *et al.*, *P.N.A.S. USA* 1992, **89**: 1904) e Patentes US Nº 5 876 969 e 5 302 697. O termo "proteína de fusão" inclui adicionalmente uma neublastina variante quimicamente ligada via uma molécula mono- ou heterofuncional a uma segunda unidade que não é uma proteína neublastina variante e produzida *de novo* a partir de proteína como em baixo descrito.

As fusões de neublastina-albumina do soro podem ser construídas utilizando métodos conhecidos na técnica. Podem ser utilizados quaisquer dos vários ligantes de ligação reticulada que possuam um grupo amino reactivo e um grupo tiol reactivo correspondentes para ligar neublastina a albumina do soro. Exemplos de ligantes adequados incluem ligantes de ligação reticulada amino reactivos que inserem uma maleimida tiol reactiva. Estes incluem, *e.g.*, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS, ou GMBS. Outros ligantes adequados inserem um grupo haloacetato tiol reactivo. Estes incluem, *e.g.*, SBAP, SIA, SIAB e os que proporcionam um tiol protegido ou não protegido para reagir com grupos sulfidrilo para produzir uma ligação redutível são SPDP, SMPT, SATA, ou SATP, todos os quais estão disponíveis comercialmente (*e.g.*, Pierce Chemicals). Um perito na técnica pode igualmente pensar em estratégias

alternativas que ligaram o N-terminal da neublastina com albumina do soro.

Visiona-se também que um perito na técnica pode produzir conjugados de albumina do soro que não são alvo no N-terminal da NBN ou na unidade tiol da albumina do soro. Se desejado, as fusões NBN-albumina do soro podem ser produzidas utilizando técnicas de engenharia genética, em que a NBN é fundida com o gene da albumina do soro no seu N-terminal, C-terminal, ou em ambas as extremidades.

É ainda contemplado que qualquer conjugado NBN que resulte num produto com um período de semi-vida prolongado em animais (incluindo humanos) possa ser produzido utilizando uma estratégia similar.

Outros derivados de neublastinas variantes incluem conjugados covalentes ou agregados de neublastina variante ou seus fragmentos com outras proteínas ou polipeptídeos, tal como por síntese em cultura recombinante como terminais N, ou terminais C adicionais. Por exemplo, o péptido conjugado pode ser uma sequência polipeptídica sinal (ou líder) na região N-terminal da proteína que dirige durante a tradução ou após a tradução a transferência da proteína do seu local de síntese para o seu local de função dentro ou fora de uma membrana ou parede celular (e.g., o líder factor alfa de levedura). As proteínas receptor de neublastina podem compreender péptidos adicionados para facilitar a purificação ou identificação de neublastina

(e.g., fusões histidina/neublastina). A sequência de aminoácidos da neublastina pode também ser ligada ao péptido Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (Hopp et al., *Biotechnology* **6**: 1204, 1988.) A última sequência é altamente antigénica e proporciona uma ligação ao epitopo reversível por intermédio de um anticorpo monoclonal específico, permitindo um ensaio rápido e purificação fácil de proteína recombinante expressa.

Esta sequência é também especificamente cortada por enteroquinase mucosal bovina no resíduo que precede imediatamente o emparelhamento Asp-Lys.

Polipéptidos de neublastina variante conjugados com um polímero

Se desejado, pode ser utilizada uma única molécula de polímero para conjugação com um polipéptido de neublastina, embora seja também contemplado que mais do que uma molécula de polímero possa também ser ligada. As composições da invenção de neublastina conjugada podem ser úteis quer em aplicações *in vivo* assim como em não *in vivo*. Adicionalmente, será reconhecido que o polímero de conjugação pode utilizar quaisquer outros grupos, unidades, ou outras espécies conjugadas, como adequado para o fim da aplicação. Como por exemplo, pode ser útil em algumas aplicações para ligar covalentemente ao polímero uma unidade funcional que proporciona resistência à degradação por UV, ou anti-oxidação, ou outras propriedades ou

características ao polímero. Como um exemplo adicional, pode ser vantajoso em algumas aplicações tornar o polímero funcional para o tornar reactivo ou capaz de ligação reticulada em carácter, para melhorar várias propriedades ou características material conjugado como um todo. Deste modo, o polímero pode possuir qualquer funcionalidade, grupos repetidos, ligações, ou outras estruturas constituintes que não impedem a eficácia da composição de muteína de neublastina conjugada para os seus fins planeados.

Os polímeros ilustrativos que podem ser empregues utilmente para alcançar estas características desejadas são aqui descritos de seguida em esquemas de reacção exemplificativos. Em aplicações de péptidos covalentemente ligados, o polímero pode ser tornado funcional e seguidamente acoplado a aminoácido(s) livre(s) do(s) péptido(s) para formar ligações lábeis.

Em algumas das formas de realização, o polipéptido de neublastina está ligado ao polímero via um grupo reactivo terminal no polipéptido. Alternativamente, ou adicionalmente, o polipéptido de neublastina pode estar ligado via o grupo amino da cadeia lateral de um resíduo de lisina interno, e.g., um resíduo de lisina introduzido na sequência de aminoácidos de um polipéptido de neublastina de origem natural. Assim sendo, as conjugações também podem ser ramificadas a partir de grupos reactivos não terminais. O polímero com o(s) grupo(s) reactivo(s) é aqui designado como "polímero activado". O grupo reactivo reage selec-

tivamente com grupos amino livres ou outros grupos reactivos na proteína.

A anexação pode ocorrer no polímero activado em qualquer grupo amino disponível da neublastina tal como os grupos amino alfa ou os grupos amino épsilon de um resíduo lisina ou de resíduos introduzidos na sequência de aminoácidos de um polipéptido de neublastina ou seu variante. Podem também ser utilizados como locais de anexação (se disponíveis) grupos carboxílicos livres, grupos carbonilo adequadamente activados, unidades de hidroxilo, guanidilo, imidazole, carbohidrato oxidado e grupos mercapto da neublastina.

De modo geral é utilizado de cerca de 1,0 a cerca de 10 moles de polímero activado por mole de proteína, dependendo da concentração da proteína. A quantidade final é um equilíbrio entre maximizar a magnitude da reacção e minimizar modificações não específicas do produto e, ao mesmo tempo, definir químicas que irão manter actividade óptima, enquanto que ao mesmo tempo se optimiza, se possível, o período de semi-vida da proteína. De modo preferido, pelo menos cerca de 50% da actividade biológica da proteína é mantida, e de modo mais preferido perto de 100% é mantida.

As reacções podem-se realizar por qualquer método adequado utilizado para fazer reagir materiais biologicamente activos com polímeros inertes, de modo preferido à

volta de pH 5-8, e.g., pH 5, 6, 7, ou 8, se os grupos reactivos se encontram no grupo amino alfa no N-terminal. De modo geral o processo envolve a preparação de um polímero activado e seguidamente fazer reagir a proteína com o polímero activado para produzir a proteína solúvel adequada para a formulação. A modificação de reacção acima mencionada pode ser realizada por vários métodos, que podem envolver um ou mais passos.

O polímero pode ser acoplado ao polipéptido de neublastina variante utilizando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, numa forma de realização, a unidade polialquilenoglicol está acoplada a um grupo lisina do polipéptido de neublastina ou do polipéptido de neublastina variante. A ligação ao grupo lisina pode ser efectuada com um éster de N-hidroxilsuccinimida (NHS) activo tal como succinato de succinimidilo com PEG (SS-PEG) e propionato de succinimidilo com PEG (SPA-PEG). As unidades adequadas de polialquilenoglicol incluem, e.g., NHS-carboximetilo, NHS-norleucina, SC-PEG, tresilato, aldeído, epóxido, carbonilimidazole, e carbonato de PNP.

Ligantes PEG amino reactivos adicionais podem ser substituídos pela unidade succinimidilo. Estes incluem, e.g. isotiocianatos, nitrofenilcarbonatos, epóxidos, e carbonatos de benzotriazole. As condições são escolhidas de modo preferido para maximizar a selectividade e extensão ou reacção. Podem ser utilizadas formas lineares e ramificadas de PEG assim como outras formas alquilo. O tamanho do PEG

pode ser variado. As formas mais comuns variam em tamanho de 2K-100 K. Enquanto que os presentes exemplos relatam que a peguilação dirigida ao N-terminal não afecta as propriedades farmacocinéticas, o facto de que o material reteve função fisiológica indica que a modificação no sítio ou sítios aqui divulgada não é deletéria. Consequentemente, é considerável aceitável que a produção de formas mutantes de NBN que possam proporcionar sítios adicionais de ligação através da inserção de resíduos de lisina, tenha como resultado que estas formas sejam peguiladas tanto na lisina como no N-terminal.

Se desejado, os polipéptidos de neublastina variante podem possuir uma marcação, e.g., uma marcação que pode subsequentemente ser libertada por proteólise. Deste modo, a unidade lisina pode ser selectivamente modificada primeiro fazendo reagir uma variante da marcação his com um ligante de baixo peso molecular tal como o reagente de Traut (Pierce) que irá reagir quer com a lisina quer com o N-terminal, e seguidamente libertando a marcação his. O polipéptido possuirá então um grupo SH livre que pode ser selectivamente modificado com um PEG contendo um grupo de cabeça tiol reactivo tal como um grupo maleimida, um grupo vinilsulfona, um grupo haloacetato, ou um SH livre ou protegido.

O reagente de Traut pode ser substituído com qualquer ligante que proporcione um sítio específico para a ligação do PEG. Como por exemplo, o reagente de Traut



poderia ser substituído com SPDP, SMPT, SATA, ou SATP (todos comercializados pela Pierce). De modo semelhante, poder-se-ia fazer reagir a proteína com um ligante amino reactivo que insere uma maleimida (por exemplo, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS, ou GMBS), um grupo haloacetato (SBAP, SIA, SIAB), ou um grupo vinilsulfona e fazer reagir o produto resultante com um PEG que contenha um SH livre. A única limitação para o tamanho do ligante que é utilizado é que não pode bloquear a subsequente remoção da marcação N-terminal.

Deste modo, noutras formas de realização, a unidade polialquilenoglicol está ligada a um grupo cisteína do polipéptido de neublastina ou polipéptido de neublastina variante. A ligação pode ser efectuada utilizando, e.g., um grupo maleimida, um grupo vinilsulfona, um grupo haloacetato, e um grupo tiol.

Um ou mais sítios num polipéptido de neublastina variante podem ser acoplados a um polímero. Por exemplo, podem ser ligadas ao polímero uma, duas, três, quatro, ou cinco unidades PEG. Em algumas das formas de realização, é ligada uma unidade PEG ao terminal amino e/ou aminoácidos 14, 39, 68, e 95 de um polipéptido de neublastina numerado com apresentado na Tabela 1.

Em formas de realização preferidas, o polipéptido de neublastina variante da composição possui um período de semi-vida no soro maior relativamente ao período de semi-

vida do polipéptido variante na ausência do polímero. Alternativamente, ou adicionalmente, o polipéptido de neublastina variante da composição liga-se à GFR $\alpha$ 3, activa o RET, normaliza alterações patológicas de um neurónio, ou aumenta a sobrevivência de um neurónio, ou realiza uma combinação destas funções fisiológicas.

Em formas de realização preferidas, a composição é proporcionada como um polipéptido de neublastina conjugado estável, solúvel em água ou um complexo polipéptido de neublastina variante compreendendo um polipéptido de neublastina ou um polipéptido de neublastina variante acoplado a uma unidade polietilenoglicol. Se desejado, o polipéptido de neublastina ou o polipéptido de neublastina variante podem ser acoplados à unidade polietilenoglicol por uma ligação lábil. A ligação lábil pode ser cortada por, e.g., hidrólise bioquímica, proteólise, ou clivagem de sulfidriilo. Por exemplo, a ligação pode ser cortada em condições *in vivo* (fisiológicas).

Composições farmacêuticas contendo conjugados neublastina variante-polímero

É também proporcionada uma composição farmacêutica incluindo um conjugado neublastina variante-polímero da presente invenção. Uma "composição farmacêutica", como aqui utilizado, é definida como compreendendo uma proteína neublastina ou conjugado da invenção, disperso num veículo fisiologicamente aceitável, contendo opcionalmente um ou

mais de outros ingredientes fisiologicamente compatíveis. A composição farmacêutica pode assim conter um excipiente, tal como, água, um ou mais minerais, açúcares, detergentes, e um ou mais transportadores, tal como, uma proteína inerte (e.g., heparina ou albumina).

Os conjugados neublastina-polímero da invenção podem ser administrados *per se* assim como na forma de ésteres, sais, e outros seus derivados fisiologicamente funcionais farmacêuticamente aceitáveis. Em tais formulações farmacêuticas e medicamentosas, o conjugado neublastina variante é utilizado de modo preferido conjuntamente com um ou mais transportador(es) farmacêuticamente aceitável e opcionalmente com quaisquer outros ingredientes terapêuticos.

Os transportador(es) têm de ser farmacêuticamente aceitáveis no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes da formulação e não deletérios indevidamente para o seu recipiente. A neublastina variante é proporcionada numa quantidade efectiva para alcançar um efeito farmacológico desejado ou um efeito médico benéfico, como aqui descrito, e numa quantidade apropriada para alcançar a desejada dose ou concentração biodisponível *in vivo*.

As formulações incluem aquelas adequadas para administração parentérica assim como não parentérica, e modalidades de administração específicas incluem administração oral, rectal, bucal, tópica, nasal, oftálmica, sub-

cutânea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, intra-tecal, intra-articular, intra-arterial, sub-aracnóide, brônquica, linfática, vaginal, e intra-uterina. São preferidas as formulações adequadas para administração por aerossol e parentérica, tanto localmente como sistemicamente.

Quando é utilizada uma neublastina variante numa formulação compreendendo uma solução líquida, a formulação pode ser administrada de modo vantajoso oralmente, bronquialmente, ou parentalmente. Quando a neublastina é empregue numa formulação de suspensão líquida ou como um pó numa formulação de transportador biocompatível, a formulação pode ser administrada de modo vantajoso oralmente, rectalmente, ou bronquialmente. Alternativamente, pode ser administrada nasalmente ou bronquialmente, via nebulização do pó num gás transportador, para formar uma dispersão gasosa do pó que é inspirado pelo doente de um circuito de respiração compreendendo um dispositivo nebulizador adequado.

As formulações compreendendo as proteínas da presente invenção podem convenientemente ser apresentadas em formas de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer dos métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. Tais métodos incluem, de modo geral, o passo de associar o(s) ingrediente(s) activo(s) com um transportador que constitui um ou mais ingredientes acessórios.

Tipicamente, as formulações são preparadas associando de modo uniforme e intimamente o(s) ingrediente(s) activo(s) com um transportador líquido, um transportador sólido finamente dividido, ou ambos, e seguidamente, se necessário, moldando o produto em formas de dosagem da formulação desejada.

As formulações da presente invenção adequadas para administração oral podem ser apresentadas como unidades discretas, tais como, cápsulas, pílulas, comprimidos, ou pastilhas, cada um contendo uma quantidade predeterminada do ingrediente activo como um pó ou grânulos; ou uma suspensão num licor aquoso ou um líquido não-aquoso, tal como um xarope, um elixir, uma emulsão, ou uma inalação.

As formulações adequadas para administração parentérica compreendem convenientemente uma preparação aquosa estéril do conjugado activo, que de modo preferido é isotónico com o sangue do recipiente (e.g., solução de soro fisiológico). Tais formulações podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes ou outros sistemas micro-particulados que são planeados para dirigir o composto a componentes sanguíneos ou um ou mais órgão. As formulações podem ser apresentadas em formas de dose unitária ou de multi-dose.

As formulações de pulverização ("spray") nasal compreendem soluções aquosas purificadas do conjugado

activo com agentes de conservação e agentes isotónicos. Tais formulações são de modo preferido ajustadas para um pH e estado isotónico compatíveis com as membranas mucosas nasais.

As formulações para administração rectal podem ser apresentadas como um supositório com um transportador adequado, tal como, manteiga de cacau, gorduras hidrogenadas, ácido carboxílico gordo hidrogenado. As formulações oftálmicas, tal como, gotas para os olhos são preparadas por um método semelhante à pulverização ("spray") nasal, excepto que o pH e factores isotónicos são de modo preferido ajustados para coincidir com os do olho.

As formulações tópicas compreendem os conjugados da invenção dissolvidos ou suspensos num ou mais meios, tais como, óleo mineral, petróleo, álcoois poli-hidroxílicos, ou outras bases utilizadas para formulações farmacêuticas tópicas.

Adicionalmente aos ingredientes anteriormente mencionados, as formulações desta invenção podem ainda incluir um ou mais ingrediente(s) acessório(s) seleccionados a partir de diluentes, tampões, agentes aromatizantes, desintegrantes, agentes activos de superfície, espessantes, lubrificantes, conservantes (incluindo anti-oxidantes), e afins. As considerações anteriores aplicam-se também às proteínas neublastina de fusão da invenção (e.g., fusões neublastina-HSA).

Deste modo, a presente invenção contempla a preparação de proteínas de fusão adequadas para estabilização *in vitro* de um conjugado neublastina variante em solução, como uma aplicação ilustrativa preferida da invenção. As proteínas de fusão podem ser empregues por exemplo para aumentar a resistência à degradação enzimática do polipéptido neublastina variante e proporciona um meio de aumentar o tempo de armazenamento, estabilidade a temperatura ambiente, e afins. É aceite que as considerações acima mencionadas também se aplicam às proteínas de fusão neublastina-albumina do soro (incluindo as proteínas de fusão neublastina humana-albumina do soro humana) da invenção.

#### Métodos de tratamento

Os polipéptidos de neublastina variante, assim como as proteínas de fusão, ou seus conjugados, podem ser utilizados para o tratamento ou para aliviar um distúrbio ou doença de um corpo animal vivo, de modo preferido de um mamífero, de modo mais preferido de um primata incluindo um humano, cujo distúrbio ou doença responde à actividade de agentes neurotróficos.

As composições da invenção podem ser utilizadas directamente via, e.g., composições farmacêuticas injectadas, implantadas ou ingeridas para tratar um processo patológico que responde aos polipéptidos neublastina. As

composições podem ser utilizadas para aliviar um distúrbio ou doença de um corpo animal vivo, incluindo um humano, cujo distúrbio ou doença responde à actividade de agentes neurotróficos. O distúrbio ou doença pode em particular ser um dano no sistema nervoso provocado por trauma, cirurgia, isquémia, infecção, doenças metabólicas, deficiência nutricional, agentes malignos ou tóxicos, e processos genéticos ou idiopáticos.

O dano pode em particular ter ocorrido em neurónios sensoriais ou células do gânglio da retina, incluindo neurónios nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal ou em quaisquer dos seguintes tecidos: os gânglios geniculado, petroso e nodoso; o complexo vestibuloacústico do oitavo nervo craniano; o pólo ventrolateral do lóbulo maxilomandibular do gânglio trigeminal; e o núcleo mesencefálico trigeminal.

Numa forma de realização preferida do método da invenção, a doença ou distúrbio é uma doença neurodegenerativa que envolve neurónios lesionados e traumatizados, tal como, lesões traumáticas de nervos periféricos, da medula, e/ou da medula espinal, lesão neuronal cerebral isquémica, neuropatia e especialmente neuropatia periférica, trauma ou lesão de nervos periféricos, enfarte isquémico, lesão cerebral aguda, lesão aguda da medula espinal, tumores no sistema nervoso, esclerose múltipla, exposição a neurotoxinas, doenças metabólicas, tais como, diabetes ou disfunções renais e danos provocados por agentes infec-



ciosos, distúrbios neurodegenerativos incluindo doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, síndromes Parkinson-Mais, Palsy Supranuclear progressiva (Síndrome de Steele-Richardson-Olszewski), Atrofia Olivo-pontocerebelar (OPCA), Síndrome de Shy-Drager (atrofia de múltiplos sistemas), complexo doença de Parkinson-demência de Guam, esclerose lateral amiotrófica, ou qualquer outra doença congénita ou neurodegenerativa, e problemas de memória associados com demência.

Numa forma de realização preferida, os neurónios do sistema sensorial e/ou autónomo podem ser tratados. Em particular, os neurónios nociceptivos e mecanorreceptores podem ser tratados, mais particularmente os neurónios de fibra delta e fibra e C-. Adicionalmente, os neurónios simpáticos e parassimpáticos do sistema autónomo podem ser tratados.

Noutra forma de realização preferida, as doenças de neurónio motores, tais como, esclerose lateral amiotrófica ("ALS") e atrofia muscular espinal podem ser tratadas. Ainda noutra forma de realização preferida, as moléculas de neublastina desta invenção podem ser utilizadas para melhorar a recuperação dos nervos após lesão traumática. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser utilizado um canal director de nervos com uma matriz contendo polipéptidos de neublastina variante, ou fusão ou conjugados de polipéptidos de neublastina variante nos métodos aqui descritos. Tais canais directores de nervos são divulgados,

e.g., Patente dos Estados Unidos Nº 5 834 029, aqui incorporada por referência.

Numa forma de realização preferida, as composições aqui divulgadas (e as composições farmacêuticas contendo o mesmo) são utilizadas no tratamento de neuropatias periféricas. Entre as neuropatias periféricas contempladas para tratamento com as moléculas desta invenção encontram-se as neuropatias induzidas por trauma, e.g., aquelas provocadas por lesão física ou estado de doença, dano físico no cérebro, dano físico na medula espinal, enfarte associado com dano cerebral, e distúrbios neurológicos relacionados com neurodegeneração. Estão também aqui incluídas as neuropatias secundárias à infecção, exposição a toxinas, e exposição a fármacos. São ainda aqui incluídas as neuropatias secundárias a doença sistêmica ou metabólica. As composições aqui divulgadas podem também ser utilizadas para tratar neuropatias induzidas por quimioterapia (tal como as provocadas por libertação de agentes quimioterapêuticos, e.g., taxol ou cisplatina); neuropatias induzidas por toxinas, neuropatias induzidas por fármacos, neuropatias induzidas por deficiências vitamínicas; neuropatias idiopáticas; e neuropatias diabéticas. Ver, e.g., Patentes dos Estados Unidos 5 496 804 e 5 916 555, cada uma das quais aqui incorporada por referência.

Condições adicionais que podem ser tratadas utilizando as composições aqui descritas incluem mono-neuropatias, neuropatias mono-multiplex, e poli-neuropatias.

tias, incluindo neuropatias axonais e desmielinizantes, utilizando as composições aqui descritas.

Noutra forma de realização preferida, as composições da invenção (e composições farmacêuticas contendo o mesmo) são utilizadas no tratamento de vários distúrbios no olho, incluindo a perda de fotorreceptores na retina em doentes afectados com degeneração macular, retinite pigmentosa, glaucoma, e doenças similares.

A invenção será ilustrada adicionalmente nos seguintes exemplos não limitativos.

**Exemplo 1 - Biodisponibilidade de neublastina peguilada no N-terminal**

Observou-se que a neublastina humana recombinante derivada de células CHO desaparece rapidamente de circulação se administrada intravenosamente em ratazanas. A proteína não foi detectada no soro após administração subcutânea. Para aumentar a biodisponibilidade da neublastina, foram construídas formas peguiladas.

Devido a não ocorrerem lisinas na sequência NBN, as químicas de peguilação específicas para aminas resultarão em peguilação de um polipéptido de NBN no seu terminal amino. Deste modo, por cada dímero de neublastina, deverão ser ligadas duas unidades PEG. Deste modo, as formas PEG foram em primeiro lugar directamente dirigidas

para o N-terminal por intermédio de químicas específicas para aminas. Surpreendentemente, a peguilação mesmo com dois PEGs de 20 K ligados teve pouco efeito benéfico no período de semi-vida, indicando que uma via de remoção baseado num mecanismo estava a sobrepor-se ao aumento no período de semi-vida que se esperava atingir através da peguilação.

### **Exemplo 2 - Construção de uma muteína N95K de neublastina peguilada**

A biodisponibilidade de formas NBN mutantes peguiladas em resíduos aminoacídicos internos foi examinada de seguida. Foram concebidos uma série de quatro mutantes substituindo resíduos de origem natural nas posições 14, 39, 68, e 95 para inserção de lisinas em sítios seleccionados na sequência. Estas lisinas proporcionarão sítios alternativos para ligação de PEG. Estes sítios foram seleccionados utilizando a estrutura cristalina do GDNF (*Nat.Struct.Biol.* **4**: 435-8, 1997) como um esqueleto para identificar resíduos de superfície e o estudo de mutagénesis da quimera persefina/neublastina (*J.Biol.Chem.* **275**: 3412-20, 2000) para identificar regiões funcionalmente importantes da estrutura que devem ser evitadas.

Duas das mutações (R39 e R68) foram escolhidas para uma região que com base na distribuição de cargas positivas na superfície pode representar um sítio de ligação de heparina, uma propriedade da proteína que

provavelmente contribui para o seu rápido desaparecimento. Foi escolhido um terceiro sítio na N95, o sítio natural de glicosilação na NBN tipo selvagem. Este sítio é modificado naturalmente com uma estrutura complexa de carboidratos. Consequentemente, não se esperava que a modificação neste sítio com PEG tivesse impacto na função. O quarto sítio (R14) foi seleccionado numa região que não estava abrangida por nenhuma outra das modificações. Foi escolhido para os estudos aqui divulgados um mutante em que o resíduo de asparagina na posição 95 foi substituído com uma lisina (o "mutante N95K").

Foram construídas quatro muteínas diferentes de neublastina de ratazana contendo uma ou mais alterações na sequência tipo selvagem do polipéptido de neublastina de ratazana. As muteínas incluem a muteína N95K individual, e as muteínas contendo substituições singulares noutros sítios na sequência de aminoácidos de neublastina de ratazana: R14K; R68K; e R39K. Na nomenclatura " $X_1N_1X_2$ ",  $X_1$  refere-se a um aminoácido de um polipéptido de neublastina tipo selvagem,  $N_1$  refere-se à posição numérica dos aminoácidos  $X_1$  na sequência, numerado de acordo com a SEQ ID NO: 1.  $X_2$  refere-se a um aminoácido substituído pelo aminoácido tipo selvagem na posição numérica indicada na sequência.

Para construir a mutação N95K de neublastina de ratazana, foi realizada mutagénesse dirigida em pCMB020, um plasmídeo que codifica neublastina tipo selvagem de

ratazana. A sequência nucleica da neublastina tipo selvagem de ratazana e a de aminoácidos do polipéptido por si codificada são apresentadas de seguida:

```

1  ATGGAAGTGG GACTGGGAGA GCCTACTGCA TTGTCCCACT GCCTCCGGCC
51  TAGGTGGCAA CCAGCCTTGT GGTCAACCCCT AGCTGCTCTA GGCCTGCTGA
101 GCAGCGTCAC AGAAGCTTCC CTGGACCCAA TGTCCCGCAG CCCCAGCTCT
151 CGGATGTTT CCTGCGCGGT CTTGGCGCCC CCAACAGACT ACCTACCTGG
201 GGSACACACC GCACATCTGT GCAGCGAAAG AGCCCTGCGA CCACCGCCGC
251 AGTCTCTCTA GCGCGACCC CCACACCCG GTCCCGCGCT CCAGTCTCTT
301 CCCGCTGCGC TCCGCGGCGC ACCCGCGGCG CGTGCAGGAA CCGCGAGCAG
351 CCGCGACAGG GCTACAGATG CGCGCGGCTG CCGCCTGCGC TCACAGCTGG
401 TGCCGCTGAG CGCTCTCGGC CTGGGCGACA GCTCCGACGA GCTGATACGT
451 TTCCGCTTCT GCAGCGGTTT GTGCGGCCGA GCAGCTCCC CCGACGATCT
501 CAGCCTGGCC AGCCTGCTGG GCGCGCGGCG CCTGCGGTCT CTTCCCGGGT
551 CCGCGCGGAT CAGCCAGCCC TGTGCGGCG CCACTCGCTA TGAGGCAGTC
601 TCCTTCATGG ACGTGAACAG CACCTGGAGA ACCGTGGACC ATCTCTCCGC
651 CACCGCCTGC GGTGTCTTGG GCTGA (SEQ ID NO:5)

```

```

1  MELGLGEPTA LSHCLAPRWQ PALWPTLAAL ALLSSVTEAS LDPMSRSPAS
51  RDVPSVLAP PTDYLPQHT AHLCSEKALR FPGSQPQAP PFGPALQSP
101 PAALRCARAA RAGTRSSRAR ATDARGCRLR SOLVPVSALG LGHSSDELIR
151 FRFCSGSRR ARSPHDLILA SLGAGALRS PPGSRFISQP CCRPTRYEAV
201 SFMDVNSTWR TVDHLSATAC GCLG* (SEQ ID NO:4)

```

A mutagénese do pCM020 utilizando os oligonucleótidos KD2-310 e KD3-211 resultou na formação do plasmídeo pCMB027:

KD2-310 5'-GTATCTTTCATGGACGTAAAGTCTACATGGAGAACCGTAGATCATCT  
ATCTGCAACC-3' (SEQ ID NO: 6)

KD2-311 5'-GGTTGCAGATAGATGATCTACGGTTCTCCATGTAGACTTTACGTCCAT  
GAAAGATAC-3' (SEQ ID NO: 7)

No pCMB027, o codão que codifica asparagina na posição 95 foi substituído por um codão que codifica lisina.

Uma muteína R14K de neublastina formada pela substituição de um codão que codifica arginina na posição 14 por um codão que codifica lisina na sequência codificante de neublastina no pCMB020. Foi realizada mutagénese dirigida no pCMB020 utilizando os oligonucleótidos KD3-254 e KD3-255:

KD3-254 5'-GCTGGAACTCGCAGCTCTCGTGCTCGTGCAACGGATGCAAAAGGCTGT CG-3' (SEQ  
ID NO: 8)

KD2-255 5'-CGACAGCCTTTTGCATCCGTTGCACGAGCACGAGAGCTGCGAGTTCCA  
GC-3' (SEQ ID NO: 9)

A construção resultante foi designada pCMB029.

Uma muteína R68K de neublastina formada por substituição de um codão que codifica arginina na posição 68 por um codão que codifica lisina na sequência que codifica neublastina do pCMB020. Foi realizada mutagénese dirigida no pCMB020 utilizando os oligonucleótidos KD3-258 e KD3-259:

KD3-258 5'-GGAGCCGGAGCACTAAAATCTCCCCGGGATCTAGACC-3' (SEQ ID NO: 10)

KD3-259 5'-GGTCTAGATCCCGGGGAGATTTTAGTGCTCCGGCTCC-3' (SEQ ID NO: 11)

A construção resultante foi designada pCMB030.

Uma muteína R39K de neublastina formada por substituição de arginina no aminoácido 39 por lisina na sequência que codifica neublastina do pCMB020. Foi realizada mutagênese dirigida do pCMB027 utilizando os oligonucleótidos KD3-256 e KD3-257:

KD3-256 5'-GACGAATTAATTAAGTTTCGTTTTGTTTCAGG-3' (SEQ ID NO: 12)

KD3-257 5'-CCTGAACAAAAACGAACTTAATTAATTCGTC-3' (SEQ ID NO: 13)

Para expressão e purificação, foi expresso um plasmídeo que codifica a muteína N95K de NBN de ratazana em *E. coli* como uma proteína de fusão marcada com His com um sítio de corte da enteroquinase imediatamente adjacente ao início da sequência madura de NBN de 113 aminoácidos. A *E. coli* foi cultivada num fermentador de 500 L e foi proporcionada pasta celular congelada. As células de *E. coli* foram lisadas numa Prensa de Manton Gaulin e a NK de NBN de



ratazana recuperada da fracção insolúvel do sedimento lavado.

A NBN foi extraída do sedimento com cloridrato de guanidina, redobrada, e a marcação his removida com enteroquinase. O produto foi subsequentemente sujeito a cromatografia em agarose Ni NTA (Qiagen) e em resina de troca catiónica Bakerbond WP CBX.

O tratamento com enteroquinase do produto marcado com his resultou num corte aberrante da proteína na arginina 7 na sequência madura. O produto resultante NBN des 1-7 apresentava actividade plena na ELISA tipo KIRA e era estruturalmente indistinguível da forma madura na sua susceptibilidade a desnaturação induzida por guanidina e foi consequentemente utilizado para trabalho subsequente.

A NBN N95K de ratazana foi peguilada a um média de 3,3 unidades PEG/molécula utilizando como reagente propionato de metoxilpoli(etilenoglicol)-succinimidilo (SPA-PEG) com uma massa molecular de 10 000 Da. O produto peguilado resultante foi sujeito a caracterização extensiva incluindo análise por SDS-PAGE, cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), HPLC de fase reversa, espectrometria de massa de ionização/dessorção de matriz assistida por laser (MALD/IMS), mapeamento peptídico, determinação de actividade na ELISA tipo KIRA, e determinação de conteúdo de endotoxinas. A pureza do produto NBN N95K antes da peguilação medida por SDS-PAGE e SEC era maior do que 95%. O

produto NBN N95K migrou como um dímero sob condições não redutoras, o que é consistente com a sua estrutura prevista. Após peguilação, o produto resultante consistia numa série de aductos modificados contendo 5% do produto 2 PEGs/molécula, 60% do produto 3 PEGs/molécula, 30% do produto 4 PEGs/molécula, e várias formas de menor importância de massa maior. Não existia evidência de agregados na amostra peguilada. Os níveis residuais de NBN não modificada no produto estavam abaixo dos limites de quantificação.

O conteúdo de endotoxinas do material é geralmente inferior a 1 EU/mg. A actividade específica da NBN peguilada na ELISA tipo KIRA é 10 nM. O produto peguilado foi formulado a 1,1 mg/mL em PBS pH 6,5. O material, que é similar em potência à wt-NBN, pode ser fornecido como um líquido congelado, que é armazenado a -70 °C.

As muteínas R14K, R39K, e R68K foram expressas em *E. coli* e podem ser sujeitas aos mesmos métodos para purificação, peguilação e determinação da função como acima descrito para a NBN-N95K.

#### Preparação de NBN peguilada

Foram diluídos 230 mL de NBN N95K de ratazana redobrada (2,6 mg/mL) que foi produzida em *E. coli* e armazenada a 4 °C em fosfato de sódio a 5 mM pH 6,5, NaCl a 100 mM com 77 mL de água, 14,4 mL de HEPES a 1 M pH 7,5, e

2,8 g (10 mg/mL final) de SPA PEG de 10 000 Da (Shearwater Polymers, Inc.). A amostra foi incubada à temperatura ambiente durante 4 horas no escuro, subsequentemente tratada com imidazole a 5 mM (final), filtrada, e armazenada durante a noite a 4 °C. O produto foi produzido em dois conjuntos, um contendo 130 mL do NBN N95K bruta e o outro contendo 100 mL.

A NBN peguilada foi purificada a partir da mistura de reacção em Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (M) (EM Industries). A coluna foi corrida à temperatura ambiente. Todos os tampões foram preparados sem pirogénio. Foi adicionado cloreto de sódio à mistura de reacção para uma concentração final de 87 mM e a amostra foi carregada numa coluna Fractogel de 45 mL (diâmetro interno 5 cm).

A coluna foi lavada com um volume da coluna de fosfato de sódio a 5 mM pH 6,5, NaCl a 80 mM, subsequentemente com três aliquotas de um volume da coluna de fosfato de sódio a 5 mM contendo NaCl a 50 mM. A resina foi transferida para uma coluna de 2,5 cm de diâmetro e a NBN peguilada foi eluída da coluna com seis passos de dez mL passos contendo fosfato de sódio a 5 mM pH 6,5, NaCl a 400 mM, três passos contendo NaCl a 500 mM, e seis passos contendo NaCl a 600 mM. As fracções de eluição foram analisadas para o conteúdo proteico por absorvência a 280 nm e subsequentemente para extensão de modificação por SDS-PAGE. Foram agrupadas fracções seleccionadas, filtradas através de um filtro de 0,2 µm, e diluídas com água para

1,1 mg de NBN peguilada de ratazana/mL. Após a determinação dos níveis de endotoxinas em cada conjunto, eles foram agrupados e refiltrados através de uma membrana de 0,2 µm. O material final foi dividido em alíquotas e armazenado a - 70 °C.

#### Espectro UV de NBN NK peguilada purificada

O espectro UV (240-340 nm) da NBN NK peguilada foi produzido a partir da amostra limpa. A amostra foi analisada em triplicado. A amostra peguilada apresentou uma absorvência máxima a 275-277 nm e uma absorvência mínima a 247-249. Este resultado é consistente com o que se observa no intermediário NBN bruto não modificado. A concentração proteica do produto peguilado foi estimada a partir do espectro utilizando um coeficiente de extinção de  $\Sigma_{280}^{0,1\%} = 0,50$ . A concentração proteica da NBN peguilada bruta é 1,1 mg/mL. A amostra não se apresentava turva como evidenciado pela ausência de absorvência a 320 nm.

#### Caracterização de NBN NK peguilada por SDS-PAGE

Alíquotas de NBN peguilada contendo 3, 1,5, 0,75, e 0,3 µg do produto foram submetidas a SDS-PAGE num gel de gradiente a 4-20% (Owl). O gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250. Foram corridos em paralelo marcadores de peso molecular (GIBCO-BRL).

A análise por SDS-PAGE de NBN NK peguilada em

condições não redutoras revelou uma série de bandas correspondendo a modificações com 2, 3, 4, e mais do que 4 PEGs/molécula. A banda mais importante com massa aparente de 98 kDa contém 3 PEGs/molécula. Não foi detectado NBN não modificada no produto peguillado purificado. A presença de uma mistura de produtos com 2, 3 e 4 PEGs ligadas foi verificada por análise de espectrometria de massa MALDI. A proporção de produto contendo 2, 3, e 4 PEGs foi determinada por densiometria e determinou-se ser respectivamente 7, 62, e 30 por cento do total.

#### Caracterização de NBN peguillada por cromatografia de exclusão por tamanho

A NBN peguillada foi sujeita a cromatografia de exclusão por tamanho numa coluna analítica Superose 6 HR10/30 FPLC utilizando MES a 5 mM pH 6,5, NaCl a 300 mM como a fase móvel. A coluna foi corrida a 20 mL/h. As fracções de eluição foram monitorizadas para absorvência a 280 nm. A NBN peguillada eluiu como um pico único com um peso molecular aparente de cerca de 200 kDa consistente com o grande volume hidrodinâmico do PEG. Não se observaram nenhuma evidências de agregados. Não foi detectada na preparação NBN livre, a qual elui com uma massa molecular aparente de cerca de 30 kDa.

#### Análise de NBN peguillada por HPLC de fase reversa

A NBN NK peguillada foi sujeita a HPLC de fase

reversa numa coluna Vydac C<sub>4</sub> (5 µm, 1 x 250 mm). A coluna foi processada utilizando um gradiente de 60 mm de 40 a 60% B (Tampão A: TFA a 0,1%, Tampão B: 75% acetonitrilo/0,085% TFA). O efluente da coluna foi monitorizado para absorvência a 214 nm e foram subsequentemente recolhidas fracções para análise. A NBN NK peguilada foi fraccionada nos seus vários componentes di (60,5 mm), tri (63,3 mm), e tetra (67,8 mm) peguilados por HPLC de fase reversa numa coluna C<sub>4</sub>. A intensidade relativa dos picos sugere que as proporções dos componentes são respectivamente 5,4, 60,5, e 30,1%. As identidades dos picos foram verificadas por MALDI-MS. Não existiam evidências de NBN NK não peguilada (elui a 5-15 mm) no produto.

#### Análise de NBN peguilada por espectrometria de massa

Foram removidos os sais à NBN NK peguilada numa C<sub>4</sub> Zip Tip e analisada por espectrometria de massa num espectrómetro de massa Voyager-DE™ STR (PerSeptive Biosystems) ionização/dessorção de matriz assistida por laser tempo-de-vôo (MALDI-TOF) utilizando como matriz ácido sinápico. Foi misturado 0,5 µL da proteína purificada com 0,5 µL de matriz na placa alvo. A espectrometria de massa de NBN peguilada revelou formas uni e duplamente carregadas de três aductos. As massas observadas de 43 803 Da, 54 046 Da, e 64 438 Da são consistentes com modificações de 2, 3, e 4 PEGs/ molécula.

Análise de NBN peguilada por mapeamento peptídico.

A especificidade da reacção de peguilação foi avaliada por mapeamento peptídico. A NBN peguilada foi separada em componentes di, tri, e tetra peguilados, os quais foram, subsequentemente reduzidos, alquilados, e separados adicionalmente nos seus componentes de cadeia única por HPLC numa coluna C<sub>4</sub>. Estes componentes e NBN NK não modificada reduzida e alquilada como controlo foram digeridos com proteinase Asp-N e os produtos resultantes do corte foram fraccionados por HPLC de fase reversa numa coluna Vydac C<sub>18</sub> (5 µm, 1 x 250 mm) utilizando um gradiente de 60 mm de 0 a 60% B (Tampão A: 0,1% TFA, Tampão B: 75% acetonitrilo/0,085% TFA). O efluente da coluna foi monitorizado para absorvência a 214 nm.

A sequência NBN de ratazana contém quatro ácidos aspártico internos e consequentemente esperar-se-ia que produzisse um perfil de corte simples quando digerida com endoproteínase Asp-N. Todos os picos da digestão com Asp-N de NBN NK de ratazana foram identificados por espectrometria de massa e/ou sequenciação de Edman do N-terminal e deste modo o mapa peptídico pode ser utilizado como uma ferramenta simples para procurar os sítios de modificação pela presença ou ausência de um pico. A identidade dos vários picos encontra-se sumariada em baixo na Tabela 3

Tabela 3

Pico por Tempo de Retenção (mm)	Massa Média Observada	Massa Média Teórica	Atribuição	Sequência de aminoácidos
38,8	1 261,1 (M)	1 262,4	102-113	DHLSATACGCLG
40,7	1 090,9	1 092,2	93-101	DVKSTWRTV
44,6	2 508,4	2 508,9	35-54	DELIRFRFCSGSCRRARSPH
46,0	2 437,0	2 437,8	12-34	DARGCRLRSQVLPVSALGLGHSS
51,4	3 456,7	3 456,0	55-86	DLSLAS.....CRPTRY
51,9	4 134,4		55-92 (oxid)	DLSLAS CRPTRYEAVSFM
53,2	4 136,3*	4 120,8	55-92	DLSAS CRPTRYEAVSFM
(M): massa monolostópica				
*: devido a oxidação péptido contendo metionina no MALDI				

Uma vez que a NBN existe como um homodímero, o produto NBN NK de ratazana contém quatro sítios potenciais para peguilação, as duas amins N-terminal de cada um das cadeias e os dois sítios N95K que foram produzidos por engenharia na construção. No mapa peptídico da cadeia dipeguilada, foi alterado pela modificação PEG apenas o pico que contém o péptido com a mutação NK. Nenhum dos outros picos foram afectados pela modificação PEG. Os dados de mapeamento indicam consequentemente que a unidade PEG é especificamente ligada a este péptido e não a qualquer dos outros péptidos que foram rastreados. O segundo sítio potencial para ligação, o N-terminal está num péptido que tem apenas três aminoácidos e não é detectado no mapa



peptídico. Infere-se que existem ligações PEG adicionais neste sítio. De modo consistente com esta noção, uma pequena percentagem da NBN NK de ratazana não se encontra truncada e contém a sequência Ala-1 madura. Este péptido elui a 30  $\mu$ m e é visível no mapa peptídico do produto de digestão não peguilado, mas está ausente dos produtos de digestão de NBN NK peguilada.

**Exemplo 3. Determinação da potência de neublastina peguilada internamente numa ELISA tipo activação do receptor quinase (KIRA)**

A potência de NBN peguilada de ratazana foi determinada utilizando activação/fosforilação dependente de NBN de c-Ret como repórter para actividade de NBN numa ELISA que era específica para a presença de RET fosforilado. Células NB41A3-mRL3, uma linha celular aderente de neuroblastoma de murganho que expressa Ret e GFR $\alpha$ 3, foram plaqueadas a 2 x 10<sup>5</sup> células por poço em placas de 24-poços em meio de Eagle modificado com Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% soro fetal de bovino, e crescidas durante 18 h a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>.

As células foram lavadas com PBS, e tratadas com diluições em série de NBN em 0,25 mL de DMEM durante 10 min a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Cada amostra foi analisada em duplicado. As células foram lavadas com 1 mL de PBS, e lisadas durante 1h a 4 °C com 0,30 mL de Tris HCl a 10 mM, pH 8,0, 0,5% Nonidet P40, 0,2 % desoxicolato de sódio, NaF a 50 mM,

$\text{Na}_3\text{VO}_4$  a 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo a 1 mM com agitação suave das placas. Os lisados foram agitados adicionalmente por pipetagem repetida e foram transferidos 0,25 mL da amostra para uma placa ELISA de 96 poços que tinha sido revestida com 5  $\mu\text{g/mL}$  de mAb anti-Ret (AA.GE7.3) em tampão carbonato a 50 mM, pH 9,6 a 4 °C durante 18 h, e bloqueada à temperatura ambiente durante uma hora com tampão de bloqueamento (Tris HCl a 20 mM pH 7,5, NaCl a 150 mM, 0,1% Tween-20 (TBST) contendo 1% de soro de ratinho normal e 3% de albumina do soro bovina).

Após uma incubação de 2 h à temperatura ambiente, os poços foram lavados 6 vezes com TBST. O Ret fosforilado foi detectado incubando os poços à temperatura ambiente durante 2 h com 2 :g/mL de peroxidase de rábano bravo (HRP)-conjugada com o anticorpo anti-fosfotirosina 4G10 em tampão de bloqueamento, lavando 6 vezes com TBST, e medindo a actividade de HRP a 450 nm com um reagente colorométrico de detecção. Foram medidos os valores de absorvência para poços tratados com lisado ou com tampão de lise e o sinal com correcção para o ruído de fundo foi representado graficamente como uma função da concentração de NBN presente na mistura de activação. A potência da NBN peguilada na ELISA tipo KIRA era de 10 nM, que não é distinguível do material de partida NBN NK. Não houve efeito na potência de dois ciclos de congelação-descongelação e após este tratamento não houve um aumento significativo na turbidez da amostra, indicando que as amostras podem ser congeladas sem perigo para o estudo. Em

estudos independentes determinando a actividade do produto separadamente com três e quatro PEGs com 10 kDa/molécula, foi determinado que o aducto com três PEGs tinha actividade plena, enquanto que o produto com quatro PEGs tinha actividade reduzida.

**Exemplo 4. Estudos farmacocinéticos de neublastina de ratazana internamente peguilada em ratas e ratinhos**

Foram examinadas as propriedades farmacocinéticas de vários produtos NBN peguilada e não peguilada em modelos de ratazana e ratinho.

Os dados revelaram que a peguilação de NBN NK de ratazana com 3,3 PEGs de 10 000 Da teve como resultado um efeito significativo no período de semi-vida e biodisponibilidade da neublastina. Após a administração de 1 mg/kg IV em ratas Sprague Dawley, foram detectados níveis extremos de NBN peguilada de 3 000 ng/mL após 7 minutos, e foram detectados níveis de 700 ng/mL após 24 h, 200 ng/mL após 48 h, e 100 ng/mL após 72 h. Contrariamente, para a NBN não peguilada após a administração de 1 mg/kg IV, foram detectados níveis de 1 500 ng/mL após 7 minutos, mas subsequentemente os níveis desceram rapidamente para 70 ng/mL após 3 h e não eram detectáveis após 7 h. Os efeitos da peguilação foram ainda mais pronunciados em animais tratados com NBN peguilada por administração subcutânea.

Após a administração s.c. de 1 mg/kg, os níveis de NBN peguilada em circulação atingiram um máximo de 200 ng/mL após 24 h e mantiveram-se a este nível durante os três dias do estudo. Contrariamente, não foi observada NBN detectável em nenhum momento após administração de NBN não modificada.

A análise das amostras de NBN peguilada é complicada pela presença de aductos contendo 2, 3 e 4 PEGs por molécula, os quais irão apresentar diferentes perfis PK. Nos estudos PK iniciais, eram utilizados ratinhos para facilitar o rastreamento através de vários candidatos e vias de administração. Os estudos com ratinhos revelaram diferenças dramáticas na biodisponibilidade dos candidatos. No entanto, quando o aducto 3,3 10 K PEG foi avaliado em ratazanas, verificou-se ser menos biodisponível em ratazanas do que em ratinhos. Esta diferença em biodisponibilidade foi particularmente marcada após administração i.p.. Os níveis em ratinhos atingiram 1 600 ng/mL após 7 horas e mantiveram-se a 400 ng/mL após 24 horas. Contrariamente, os níveis em ratazana foram constantes a 100 ng/mL durante 4-48 horas.

Ambas a neublastina de ratazana tipo selvagem (wt-NBN) e a neublastina com uma substituição Asn-para-Lys na posição 95 (NK-NBN) foram redobradas e purificadas a > 95% para testes de eficácia no modelo de ratazana STZ de neuropatia diabética. A Wt-NBN foi formulada para ser imediatamente utilizada em testes em animais enquanto que a

NK-NBN foi preparada para peguilação com PEG-SPA de 10 kDa. Para alcançar o objectivo de redobragem e purificação, foi desenvolvido um método de redobragem utilizando cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) que permite a renaturação de NBN a partir de corpos de inclusão de *E. coli* em grandes quantidades e elevadas concentrações. Para além de SEC, foram utilizados passos de cromatografia em Ni-NTA e em coluna de CM sílica para aumentar a pureza final da proteína. As proteínas foram sujeitas a intensa caracterização incluindo análise por SDS-PAGE, cromatografia de exclusão por tamanho, ESMS, determinação de actividade por ELISA tipo KIRA, e determinação do conteúdo de endotoxinas. A SDS-PAGE e SEC dos produtos proteicos finais revelaram uma pureza maior do que 95%. O nível de endotoxinas de cada produto era < 0,2 EU/mg. A actividade específica de ambas as proteínas na ELISA tipo KIRA é aproximadamente de 10 nM. A wt-NBN foi formulada a 1,0 mg/mL e a NK-NBN foi formulada a 2,6 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 6,5. A wt-NBN foi dividida em alíquotas em tubos de 15 mL e armazenada congelada a -70 °C enquanto que a NK-NBN foi sujeita a peguilação antes de ser dividida em alíquotas e congelada.

#### **Exemplo 5. Redobragem de uma neublastina tipo selvagem e da muteína N95K de neublastina**

Ambas as formas de NBN foram expressas em *E. coli* como proteínas de fusão marcadas com His com um sítio de corte para a enteroquinase imediatamente adjacente ao

início da sequência madura de 113aminoácidos. As bactérias expressando quer Wt- (1,8 kg de sedimento) ou NK-NBN (2,5 kg de sedimento) foram sujeitas a lise em 2 litros de PBS utilizando uma prensa de Gaulin. Após centrifugação (10 000 rpm) para sedimentar os corpos de inclusão, os sobrenadantes de cada preparação foram postos de parte. Os sedimentos de corpos de inclusão foram lavados duas vezes com tampão (Tris-HCl a 0,02M pH 8,5, EDTA a 0,5 mM) depois lavados duas vezes com o mesmo tampão contendo Triton X-100 (2%, v/v) seguido por duas lavagens adicionais com tampão sem detergente. Ambos os sedimentos foram solubilizados utilizando cloridrato de guanidina a 6 M, Tris a 0,1 M pH 8,5, DTT a 0,1 M, e EDTA a 1 mM. Para ajudar no processo de solubilização, cada sedimento foi sujeito a homogeneização utilizando um homogeneizador politron seguido de agitação durante a noite à temperatura ambiente. As proteínas solubilizadas foram clarificadas por centrifugação antes de cromatografia desnaturante através de Superdex 200 (coluna de 5,5 litros equilibrada com glicina/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,05M pH 3,0 com Guanidina-HCl a 2 M) a 20 mL por minuto.

A NBN desnaturada foi identificada por SDS-PAGE. As frações contendo quer Wt-NBN ou NK-NBN foram agrupadas e concentradas para aproximadamente 250 mL utilizando um concentrador de células com agitação, de 2,5 litros, da Amicon. Após filtração para remoção de qualquer precipitado, a proteína concentrada foi sujeita a cromatografia de exclusão por tamanho renaturante através de Superdex 200 equilibrada com Tris-HCl a 0,1 M pH 7,8, guanidina-HCl a

0,5 M, glutathione reduzida a 8,8 mM e glutathione oxidada a 0,22 mM. A coluna foi processada utilizando guanidina-HCl a 0,5 M a 20 mL por minuto. As frações contendo wt-NBN ou NK-NBN renaturadas foram identificadas por SDS-PAGE, agrupadas, e armazenadas a 4 °C até precisas para a remoção da marcação His.

Concentração da NBN por cromatografia em Ni-NTA (TR5919-138).

A NBN renaturada foi armazenada a 4 °C pelo menos durante 24 horas antes de se continuar com a purificação para promover a formação persulfureto de entre os monómeros de NBN. Durante este período, formou-se um precipitado e foi removido por filtração através de uma unidade de filtração PES de 0,2 µ. Para diminuir ligações não específicas, a solução proteica foi ajustada para imidazole a 20 mM antes de ser carregada numa coluna de 100 mL de Ni-NTA (Qiagen) equilibrada com tampão da coluna (guanidina a 0,5 M e imidazole a 20 mM) a 50 mL por minuto. Após a aplicação da proteína, a coluna foi lavada até à linha de base utilizando o mesmo tampão. A NBN foi eluída da resina utilizando aproximadamente 300 mL de tampão de eluição contendo guanidina-HCl a 0,5 M e imidazole a 0,4 M. Após eluição, a NBN foi dialisada durante a noite (utilizando tubagem de diálise de 10 kDa) à temperatura ambiente contra dez volumes de HCl a 5 mM. A diálise promove a hidrólise de substâncias contaminantes e diminui as concentrações de guanidina-HCl e imidazole para respectivamente 0,05 M e 0,04 M.

Excisão da marcação His por Endopeptidase Lisil ou Enteroquinase.

No dia seguinte, qualquer precipitado que se tenha formado durante a diálise foi removido por filtração. A amostra proteica foi ajustada para NaCl a 0,1 M pela adição de um stock a 5 M para uma concentração final de sal, incluindo a guanidina-HCl restante, de aproximadamente 150 mM. Esta concentração foi confirmada utilizando um medidor de condutividade. Adicionalmente, foi adicionado HEPES a 1 M pH 8 para uma concentração final de 25 mM. Para excisar a marcação, foi adicionada endopeptidase lisil à wt-NBN e foi adicionada Enteroquinase à NK-NBN, aproximadamente numa proporção de 1:300 de protease para NBN em ambos os casos. Foi utilizada enteroquinase em vez de endopeptidase lisil para NK-NBN devido à presença de um sítio de corte de protease adicional na proteína mutada na Lys95. As amostras foram agitadas à temperatura ambiente durante 2 horas e as digestões foram monitorizadas por SDS-PAGE.

Remoção da marcação His por cromatografia em Ni-NTA.

A NBN tratada com protease foi aplicada numa coluna de Ni-NTA de 100 mL equilibrada com guanidina-HCl a 0,5 M e imidazole a 20 mM a 50 mL por minuto. A coluna foi lavada até à linha de base com o mesmo tampão. Qualquer proteína que tenha sido arrastada da coluna foi agrupada com proteína de passagem contendo NBN sem a marcação His.



Cromatografia em CM sílica.

Após a cromatografia em Ni-NTA, a proteína foi imediatamente sujeita a purificação adicional através de resina de CM sílica. Foi carregada uma coluna de CM sílica de 20 mL equilibrada com tampão de aplicação (fosfato a 5 mM pH 6,5, NaCl a 150 mM) com NBN a 20 mL por minuto. A coluna foi lavada com vinte volumes de coluna de tampão de lavagem (fosfato a 5 mM pH 6,5, NaCl a 400 mM) e a proteína eluída com tampão de eluição contendo fosfato a 5 mM pH 6,5 mas com NaCl a 1 M. A proteína eluída foi dialisada durante a noite contra o fosfato sozinho para baixar a concentração salina para 100 mM para a NK-NBN e 150 mM para a wt-NBN. Ambas as amostras foram filtrada através de uma unidade de filtração PES de 0,2  $\mu$ , analisadas por SDS-PAGE, e armazenadas a 4 °C até necessárias para caracterizações e/ou peguilação adicionais.

A wt-NBN e NK-NBN foram sujeitas a análise por espectro de UV para determinar a sua absorvência a 280. Utilizando uma cuvete de micro quartzo e fazendo o branco contra o tampão apenas, foram continuamente examinados 100  $\mu$ L de wt-NBN ou NK-NBN de 230 a 330 nm utilizando um espectrofotômetro Beckman. Com base nesta análise, determinou-se que a Wt-NBN se encontrava a uma concentração de 1,1 mg/mL e NK-NBN a 2,6 mg/mL ( $A_{280\text{ nm}} - E^{0,1\%} = 0,5$  utilizado para cada proteína). Foi identificado menos do que 1% de material precipitado com base em absorvência a 330 nm.

Para determinação da pureza de ambas as preparações proteicas, cada amostra (0,5 mg) foi sujeita a cromatografia de exclusão por tamanho através de uma coluna Superdex 75 16/30. A coluna foi equilibrada com fosfato a 5 mM pH 6,5 contendo NaCl a 400 mM e processada com uma velocidade de fluxo de 1,5 mL por minuto. Com base na absorvência a 280 nm, ambas as wt- e NK-NBN migraram como um pico único com um peso molecular esperado (23-24 kDa), e não continham nenhuma contaminação proteica significativa.

Tanto a wt- como a NK-NBN foram reduzidas em guanidina-HCl a 2,5 M, Tris a 60 mM pH 8,0 e DTT a 16 mM. Foram retirados os sais às amostras reduzidas numa coluna C4 curta e analisadas on-line por ESMS utilizando um instrumento triplo quádruplo. Os dados brutos de ESMS foram processados pelo programa MaxEnt para produzir o espectro de massa. Este procedimento permite que múltiplos sinais carregados colapsem num pico que corresponde directamente à massa molecular em quilodaltons (kDa). O espectro de massa processado para wt-NBN revelou que a espécie predominante é 12 046 kDa, o que está de acordo com o peso molecular previsto de 12 046,7kDa para a forma de 113 aminoácidos da proteína. Foi também observado um componente menos importante (12 063 kDa) o que sugere a presença de um produto de oxidação. Foram identificados três picos na amostra de NK-NBN. O componente principal apresentou uma massa molecular aparente de 11 345 kDa de acordo com a massa prevista para a forma de 106 aminoácidos da proteína.

Os outros dois picos tinham massas de 11 362 e 12 061 kDa, o que sugere respectivamente oxidação de NK-NBN e a presença da forma de 113 aminoácidos.

A presença das formas de 106 e 113 aminoácidos na preparação de NK-NBN é atribuível à digestão com Enteroquinase. Esta protease da Biozyme é uma preparação de enzima natural purificada a partir de mucosa intestinal de vitela e é sabido que contém uma pequena contaminação com tripsina (0,25 ng de Tripsina por µg de Enteroquinase). Consequentemente, a tripsina pode estar a actuar na NK-NBN no lado terminal carboxilo da Arg7 produzindo a forma predominante de 106 aminoácidos. Por outro lado, a Endopeptidase Lisil utilizada para cortar a Wt-NBN é uma protease de actividade única que actua no lado do terminal carboxilo do resíduo de lisina contido na marcação His produzindo a forma NBN madura de 113 aminoácidos. Ambas as formas de 106 e 113 aminoácidos de NBN são igualmente activas em todos os ensaios testados e comportam-se de modo semelhante em testes de estabilidade de guanidina-HCl.

A actividade da NBN foi determinada pela sua capacidade de simular fosforilação de c-Ret em células NB41A3-mRL3 utilizando a ELISA tipo KIRA descrita no Exemplo 3. O Ret fosforilado foi detectado incubando (2 horas) o receptor capturado com anticorpo contra a fosfotirosina conjugado com HRP (4G10; 0,2 µg por poço). Após a incubação, os poços foram lavados seis vezes com TBST, e a actividade de HRP detectada a 450 nm com um

ensaio colorimétrico. Foram medidos os valores de absorvência de poços tratados com lisado ou com tampão de lise apenas, corrigidos para ruído de fundo, e os dados foram representados graficamente como uma função da concentração de neublastina presente na mistura de activação. Os dados demonstram que a NBN purificada resultou no aparecimento de RET fosforilado, indicando que a NBN purificada estava activa neste ensaio.

**Exemplo 6. Preparação de um conjugado de albumina do soro-neublastina.**

Neublastina de tipo selvagem de ratazana a uma concentração de 1 mg/mL em PBS foi tratada com sulfo-SMCC (Pierce) a 1 mM e foram-lhe removidos os sais para remoção de ligante de ligação reticulada em excesso. Uma vez que a proteína NBN de tipo selvagem contém apenas uma única amina no seu N-terminal e nenhuns grupos sulfidriilo livres, esperava-se que a reacção com SMCC resultasse em modificação específicas para o sítio da NBN com SMCC ligado no seu N-terminal.

Foram incubados 60 µg do conjugado NBN-SMCC com 120 µg albumina do soro bovina e analisado para a extensão de ligação reticulada por SDS-PAGE. A BSA contém um único grupo SH livre e consequentemente espera-se que a reacção com o conjugado NBN-SMCC resulte numa modificação neste sítio através da maleimida no SMCC. Nestas condições, foram observadas duas bandas adicionais de peso molecular mais

elevado, que são consistentes na massa com modificação da NBN com uma única unidade de BSA e com duas moléculas de BSA uma vez que cada molécula NBN contém dois N-terminais que podem reagir, e consequentemente estão de acordo com esta noção. Ao mesmo tempo que se formam estas bandas, observou-se uma diminuição na intensidade das bandas de NBN-SMCC e BSA. Com base na intensidade da restante banda de NBN parece que a reacção foi concluída em 70-80%.

O produto monossubstituído foi purificado a partir da mistura de reacção sujeitando o material a cromatografia de troca catiónica e cromatografia de exclusão por tamanho numa coluna Superdex 200 (Pharmacia) essencialmente como descrito para os estudos de peguilação acima discutidos. As fracções da coluna da corrida de filtração em gel foram analisadas por SDS-PAGE e as contendo o produto monossubstituído foram analisadas para o conteúdo proteico por absorvência a 280 nm. Uma vez que a massa da BSA é aproximadamente duas vezes a de neublastina, a concentração aparente foi dividida por um factor de 3 para produzir o equivalente NBN. Esta fracção foi sujeita a análise para função na ELISA tipo KIRA. Os valores de IC<sub>50</sub> para ambos os conjugados de NBN e wt e BSA foram de 3-6 nM, indicando que a conjugação à BSA não possuía função comprometida.

Enquanto que estes estudos preliminares foram produzidos com BSA, as proteínas albumina do soro correspondentes de ratas e humanos também contém um SH livre. Consequentemente, pode ser aplicada uma abordagem similar

para a produção de um conjugado albumina do soro de ratazana - NBN de ratazana para a realização de estudos de PK e eficácia em albumina do soro - NBN de ratazanas e humana para se realizarem testes clínicos. De modo semelhante o SMCC pode ser substituído com qualquer de vários ligantes de ligação reticulada que contém um grupo amino reactivo de um lado e um grupo tiol reactivo no outro lado. Os exemplos de ligantes de ligação reticulada amino reactivos que inserem um maleimida reactiva a tiol são AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS, ou GMBS, que inserem grupo haloacetato reactivo a tiol são SBAP, SIA, SIAB e que proporcionam um tiol protegido ou não protegido para reacção com grupos sulfidrilos para produzir uma ligação redutível são SPDP, SMPT, SATA, ou SATP, todos os quais são comercializados pela Pierce. Tais ligantes de ligação reticulada são apenas exemplos e são antecipadas muitas estratégias alternativas para a ligação do N-terminal da NBN com albumina do soro. Um perito pode também produzir conjugados de albumina do soro que não são direccionados para o N-terminal da NBN ou para a unidade tiol na albumina do soro. Espera-se igualmente que as fusões de NBN-albumina do soro criadas utilizando engenharia genética em que a NBN é fundida ao gene da albumina do soro no seu N-terminal, C-terminal, ou em ambas as extremidades sejam funcionais.

Este método pode ser estendido através de adaptações de rotina a qualquer conjugado NBN-albumina do soro que resultaria num produto com período de semi-vida prolongado em animais e consequentemente em humanos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Biogen, Inc.

Sah, Dinah W.Y.

Pepinsky, Blake R

Borjack-Sjodin, Paula Ann

Miller, Stephan S

Rossomando, Anthony

<120> Conjugados poliméricos de Neublastina e Métodos para Sua Utilização

<130> 00689-506-061

<140> Ainda Não Atribuído

<141> 2002-01-23

<150> 60/266,071

<151> 2001-02-01

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Sequência Consenso

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)

<223> Em que Xaa é Gly ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)

<223> Em que Xaa é Pro ou Arg

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)

<223> Em que Xaa é Gly ou Ser

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)  
<223> Em que Xaa é Ala ou Thr

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (11)  
<223> Em que Xaa é Ala ou Thr

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (12)  
<223> Em que Xaa é Gly ou Asp

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (26)  
<223> Em que Xaa é Arg ou Ser

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (33)  
<223> Em que Xaa é Arg ou Ser

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (38)  
<223> Em que Xaa é Val ou Ile

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (51)  
<223> Em que Xaa é Val ou Ile

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (53)  
<223> Em que Xaa é Pro ou Gln

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (69)  
<223> Em que Xaa é Pro ou Ser

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (76)  
<223> Em que Xaa é Val ou Ile

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (103)  
<223> Em que Xaa é Arg ou 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 Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg
      35              40              45

Ala Arg Ser Xaa His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly
 50              55              60

Ala Leu Arg Xaa Pro Pro Gly Ser Arg Pro Xaa Ser Gln Pro 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 Xaa Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      100              105              110

```

<210> 2  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<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*

<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*

<400> 4

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> 675

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 5

```
atggaaactgg gaattggaga gcttactgca ttgtccact gcctccggc taggtggcaa 60
ccagccttgt ggccaacct agctgctcta gcttggctga gcagcgtcac agaagcttc 120
ctggacccaa tgtccgcag ccccgctct cggatgttc cctccgggt cctggcgccc 180
```

```
ccaacagact acctacctgg gggacacacc gcacatctgt gcagcgaaag agccttgcga 240
ccacccgcgc agtctcctca gcccgacccc ccaccaaccg gtcccgcgct ccagtctcct 300
cccgtcgcgc tccggggggc acggcgggcg cgtgcaggaa cccggagcag ccgcgcacgg 360
gctacagatg cgcgcggctg ccgcctgcgc tcaacgctgg tgcgggtgag cgtctccggc 420
ctggggcaca gctccgacga gctgatacgt tccgcttct gcagcggctc gtgcccgcga 480
gcacgctccc cgcacgatct cagcctggcc agcctgctgg gcgcgggggc cctgcggtct 540
cctcccggtt cccggccgat cagccagccc tgttgcgggc ccactcgcta tgaggcagtc 600
tccttcattg acgtgaacag cactgggaga accgtggacc atctctccgc caccgcctgc 660
ggctgtctgg gctga
```

<210> 6

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Oligonucleótido KD2-310

<400> 6

```
gtatctttca tggacgtaaa gtctacatgg agaaccgtag atcatctatc tgcaacc 57
```

<210> 7

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Oligonucleótido KD3-211

<400> 7

```
ggttgcagat agatgatcta cgttctcca tgtagacttt acgtccatga aagatac 57
```

<210> 8

<211> 50

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Oligonucleótido KD3-254

<400> 8

```
gctggaactc gcagctctcg tgctcgtgca acggatgcaa aaggctgtcg 50
```

<210> 9

<211> 50

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Oligonucleótido KD2-255

<400> 9

cgacagcctt ttgcatccgt tgcacgagca cgagagctgc gagttccagc 50

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Oligonucleótido KD3-258

<400> 10

ggagccggag cactaaaatc tccccgggat ctagacc 37

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Oligonucleótido KD3-259

<400> 11

ggtctagatc ccgggggaga ttttagtgct ccggtcc 38

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Oligonucleótido KD3-256

<400> 12

gacgaattaa ttaagtttcg tttttgttca gg 32

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Oligonucleótido KD3-257

<400> 13

cctgaacaaa aacgaaactt aattaattcg tc 32

listagem de sequências corrigidas.txt LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Biogen, Inc.

Sah, Dinah W.Y.

Pepinsky, Blake R

Borjack-sjodin, Paula Ann

Miller, Stephan S

Rossomando, Anthony

<120> Conjugados poliméricos de Neublastina e Métodos para a Sua Utilização

<130> 00689-506-061

<140> Ainda Não Atribuído

<141> 2002-01-23

<150> 60/266,071

<151> 2001-02-01

<160> 13

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Sequência Consenso

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)

<223> em que Xaa é Gly ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)

<223> em que xaa é Pro ou Arg

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)

<223> em que Xaa é Gly ou Ser

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)

<223> em que Xaa é Ala ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)

<223> em que Xaa é Ala ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)

<223> em que Xaa é Gly ou Asp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (26)

<223> em que Xaa é Arg ou Ser

<220>

<221> VARIANTE

<222> (33)

<223> em que Xaa é Arg ou Ser

<220>

<221> VARIANTE

<222> (38)

<223> em que Xaa é val ou Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> (51)

<223> em que Xaa é val ou Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> (53)

<223> em que Xaa é Pro ou Gln

<220>

<221> VARIANTE

<222> (69)

<223> em que xaa é Pro ou Ser

<220>

<221> VARIANTE

<222> (76)

<223> em que Xaa é val ou Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> (103)

<223> em que Xaa é Arg ou 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 Arg  
 35 40 45  
 Ala Arg Ser Xaa His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly  
 50 55 60 65  
 Ala Leu Arg Xaa Pro Pro Gly Ser Arg Pro Xaa Ser Gln Pro Cys Cys Arg  
 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 Xaa Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly  
 100 105 110

<210> 2  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<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*

<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*

<400> 4

```

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> 675  
 <212> DNA  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 5



```

atggaactgg gacttggaga gcctactgca ttgtccact gcctccggcc taggtggcaa 60
ccagccttgt ggccaaccct agctgctcta gccctgctga gcagcgctac agaagcttcc 120
ctggaccctaa tgteccgcag ccccgctctt cgcgatgttc cctcgccggt cctggcgccc 180
ccaacagact acctacctgg gggacacacc gcacatctgt gcagcgaaaag agccctgcga 240
ccaccgcgcg agtctctctca gcccgctacc ccaccaccgg gtcccgcgct ccagtctcct 300
cccgctgcgc tcccgggggc acgcgcggcg cgtgcaggaa cccggagtag ccgcgcacgg 360
gctacagatg cgcggggctg ccgcctgcgc tcacagctgg tgcgggtgag cgtctcggc 420
ctggggccaca gctccgacga gctgatacgt ttccgcttct gcagcgggtc gtgcgcgcga 480
gcacgcctccc cgcacgatct cagcctggcc agcctgctgg gcgcgggggc cctgcgggtc 540
cctcccgsgt cccggccgat cagccagccc tgttgccggc ccactcgcta tgaggcagtc 600
tccttcagtg acgtgaacag cacctggaga accgtggacc atctctccgc caccgcctgc 660
ggctgtctgg gctga 675

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 57

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descrição de Sequência Artificial: Oligonucleótido KD2-310

&lt;400&gt; 6

gtatctttca tggacgtaaa gtctacatgg agaaccgtag atcatctatc tgcaacc 57

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 57

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descrição de Sequência Artificial: oligonucleótido KD3-211

&lt;400&gt; 7

ggttgcagat agatgatcta cggttctcca tgtagacttt acgtccatga aagatac 57

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descrição de Sequência Artificial: oligonucleótido KD3-254

&lt;400&gt; 8

gctggaactc gcagctctcg tgctcgtgca acggatgcaa aaggctgtcg 50

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descrição de Sequência Artificial: oligonucleótido KD2-255

&lt;400&gt; 9

cgacagcctt ttgcatccgt tgcacgagca cgagagctgc gagttccagc 50

<210> 10  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Descrição de Sequência Artificial: oligonucleótido KD3-258

<400> 10  
ggagccggag cactaaaatc tccccgggat ctagacc 37

<210> 11  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Descrição de Sequência Artificial: oligonucleótido KD3-259

<400> 11  
ggtctagatc ccgggggaga ttttagtgct ccggtcc 38

<210> 12  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Descrição de Sequência Artificial: oligonucleótido KD3-256

<400> 12  
gacgaattaa ttaagtttcg tttttgttca gg 32

<210> 13  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Descrição de Sequência Artificial: oligonucleótido KD3-257

<400> 13  
cctgaacaaa aacgaaactt aattaattcg tc 32

Lisboa, 18 de Setembro de 2007

**REIVINDICAÇÕES**

1. Polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica aos aminoácidos 8-113 da SEQ ID NO: 1, em que o polipéptido inclui um aminoácido outro que não asparagina na posição que corresponde à posição 95 na SEQ ID NO: 1, em que o aminoácido substituído na posição que corresponde à posição 95 introduz um sítio ao qual pode ser ligado um polialquilenoglicol ao polipéptido.

2. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, em que o aminoácido na posição que corresponde à posição 95 na SEQ ID NO: 1 é lisina.

3. Polipéptido de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que o polipéptido compreende uma sequência seleccionada a partir do grupo constituído por:

- (a) aminoácidos 8-94 e 96-113 da SEQ ID NO: 2;
- (b) aminoácidos 8-94 e 96-113 da SEQ ID NO: 3; e
- (c) aminoácidos 8-94 e 96-113 da SEQ ID NO: 4.

4. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, compreendendo os aminoácidos 1-94 e 96-113 da SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4, em que a lisina substitui asparagina na posição 95.

5. Polipéptido de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que a sequência de aminoácidos é pelo menos 95% idêntica aos aminoácidos 8-113 da SEQ ID NO: 1.

6. Polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido polipéptido, quando dímerizado, é **caracterizado pelo** menos por uma actividade biológica seleccionada a partir do grupo constituído por:

- a. ligação à GFR $\alpha$ 3;
- b. estimulação da fosforilação de tirosina de um polipéptido RET;
- c. aumento da sobrevivência dos neurónios; e
- d. normalização de alterações patológicas num neurónio.

7. Proteína de fusão compreendendo o polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores fundido com uma segunda unidade.

8. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 7, em que a segunda unidade é um polipéptido de albumina do soro humana.

9. Ácido nucleico que codifica o polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou a proteína de fusão de acordo com as reivindicações 7 ou 8.

10. Vector compreendendo o ácido nucleico da reivindicação 9.

11. Célula hospedeira compreendendo o vector da reivindicação 10.

12. Célula hospedeira da reivindicação 11, em que a célula hospedeira é uma célula do ovário de hamster chinês.

13. Método de produção do polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou a proteína de fusão de acordo com as reivindicações 7 ou 8, compreendendo

- (a) cultivar a célula hospedeira de acordo com as reivindicações 11 ou 12 em condições que permitem a expressão do polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou a proteína de fusão de acordo com as reivindicações 7 ou 8, e
- (b) recuperar o referido polipéptido ou proteína de fusão.

14. Dímero compreendendo dois polipéptidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou duas proteínas de fusão de acordo com as reivindicações 7 ou 8.

15. Conjugado compreendendo o polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 conjugado com um polialquilenoglicol, em que o polialquilenoglicol é

conjugado com o polipéptido no aminoácido substituído na posição que corresponde à posição 95 na SEQ ID NO: 1.

16. Conjugado compreendendo a proteína de fusão de acordo com as reivindicações 7 ou 8 conjugado com um polialquilenoglicol, em que o polialquilenoglicol é conjugado com a proteína de fusão no aminoácido substituído na posição que corresponde à posição 95 na SEQ ID NO: 1.

17. Conjugado das reivindicações 15 ou 16, em que o polialquilenoglicol é polietilenoglicol.

18. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, em que o polipéptido está glicosilado.

19. Composição farmacêutica compreendendo o polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, a proteína de fusão de acordo com as reivindicações 7 ou 8, ou o conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18 e um veículo fisiologicamente aceitável.

20. Polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, a proteína de fusão de acordo com as reivindicações 7 ou 8, ou o conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18 para utilização em terapêutica.

21. Utilização do polipéptido de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 6, a proteína de fusão de acordo com as reivindicações 7 ou 8, ou o conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18 para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio do sistema nervoso.

22. Utilização da reivindicação 21, em que a doença ou distúrbio é uma neuropatia periférica ou uma síndrome de dor neuropática.

Lisboa, 18 de Setembro de 2007