

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25.01.2002**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.02.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/266071**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.10.2003**
(Věstník č. 10/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US02/02319**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/060929**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 2080

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/495 A 61 K 48/00
C 12 N 15/22 A 61 P 25/02
C 12 N 15/63
C 12 N 15/11
C 12 N 15/80
C 12 N 15/81
C 12 N 15/85
A 61 K 38/18

(71) Přihlašovatel:

BIOGEN, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Původce:

Sah Dinah W. Y., Boston, MA, US;
Pepinsky R. Blake, Arlington, MA, US;
Borjack-Sjodin Paula Ann, Waltham, MA, US;
Miller Stephan S., Arlington, MA, US;
Rossomando Anthony, Revere, MA, US;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Varianty neublastinu, fúzní polypeptid obsahující
variantu neublastinu a farmaceutická kompozice
obsahující neublastin pro léčení poruch
nervového systému**

(57) Anotace:

Řešení poskytuje varianty polypeptidu neublastinu vhodné pro kondenzaci s polymerem obsahujícím polyalkylenglykolovou skupinu. Kondenzovaný produkt má delší biologický poločas a zlepšenou biologickou dostupnost ve srovnání s nemodifikovaným neublastinem nebo neublastinem divokého typu. Kondenzovaný produkt podle řešení je vhodný jak pro terapeutické použití, tak i pro diagnostické aplikace při poruchách nervového systému.

30.07.03

PV 2003 - 2040

181 666/HK

1

Varianty neublastinu, fúzní polypeptid obsahující variantu neublastinu a farmaceutická kompozice obsahující neublastin pro léčení poruch nervového systému

Oblast techniky

Předkládaný vynález se obecně týká polypeptidů a konkrétně modifikovaných neurotrofických polypeptidů a farmaceutických kompozic obsahujících tyto polypeptidy užitečných pro léčení poruch nervového systému.

Dosavadní stav techniky

Neurotrofické faktory jsou přirozeně se vyskytující proteiny, které podporují přežívání, udržování fenotypové diferenciaci, předcházejí degeneraci a zesilují aktivitu nervových buněk (neuronů) a tkání. Neurotrofické faktory byly izolovány z nervové tkáně a z jiných typů tkání, které jsou inervovány nervovým systémem, a byly klasifikovány do funkčně a strukturálně příbuzných skupin, také nazývaných rodiny, super-rodiny ("superfamilies") nebo sub-rodiny ("sub-families"). Mezi super-rodiny neurotrofických faktorů patří super-rodina fibroblastového růstového faktoru, neurotrofinu a transformujícího růstového faktoru β (TGF- β). Jednotlivé druhy ("species") neurotrofických faktorů se odlišují svou fyzikální strukturou, interakcemi s příslušnými receptory, které je rozpoznávají, a účinky na různé typy nervových buněk. Do super-rodiny TGF- β patří ligandy neurotrofického faktoru pocházejícího z linie gliových buněk (GDNF), kam patří GDNF, persephin (PSP) a neurturin (NTN).

Ligandy subrodiny GDNF mají společnou vlastnost, a sice schopnost indukovat signalizaci (signální dráhu) vedoucí přes receptorovou tyrosin kinázu RET. Uvedené tři ligandy subrodiny GDNF se liší v relativní afinitě k rodině neurotrofických receptorů, receptorů GFR α .

"Neublastin" nebo "NBN" je poměrně nedávno popsán neurotrofický faktor. Neublastin patří do subrodiny GDNF, protože sdílí úseky homologie s jiným GDNF ligandy, a také kvůli své schopnosti vázat se na RET a aktivovat ji. Na rozdíl od jiných GDNF ligandů je neublastin vysoce selektivní pro komplex GFR α 3-RET receptor. Kromě toho NBN obsahuje unikátní subúseky ve své aminokyselinové sekvenci.

Bohužel, neublastin je rychle odstraňován z organismu. Tato rychlá clearance může být vážným nedostatkem při léčebném využití neublastinu. Takže existuje potřeba nalézt varianty neublastinu, které by měly zvýšenou biologickou dostupnost.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález je založen částečně na objevu nových forem neublastinu, které vykazují zlepšené farmakokinetické vlastnosti a zvýšenou biologickou dostupnost *in vivo*. K těmto novým formám patří varianty neublastinového polypeptidu kondenzované (konjugované) s polymerními molekulami.

Jeden aspekt vynálezu se týká varianty polypeptidu neublastinu nebo muteinu polypeptidu neublastinu, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci mající jednu nebo více substitucí aminokyselin v poloze exponované rozpouštědлу zralého dimeru neublastinu. Tyto substituce vnášejí do nativního polypeptidu neublastinu jedno nebo více míst, na

která se mohou látky, jako například přirozeně se vyskytující nebo syntetické polymery, navázat a tím zvýšit rozpustnost polypeptidu a v důsledku toho zlepšit biologickou dostupnost *in vivo*. Výhodně varianta polypeptidu obsahuje aminokyselinovou sekvenci alespoň ze 70 % totožnou se sekvencí aminokyselin 8-113 ze sekvence uvedené zde v seznamu sekvencí jako sekvence identifikačního čísla 1 (dále jen zkráceně sekv. id. č.). Varianta polypeptidu neublastinu obsahuje jednu nebo více substituovaných aminokyselin, přičemž se aminokyselina jiná než arginin vyskytuje v poloze 14 v aminokyselinové sekvenci varianty polypeptidu, aminokyselina jiná než arginin se vyskytuje v poloze 39 v aminokyselinové sekvenci varianty polypeptidu, aminokyselina jiná než arginin se vyskytuje v poloze 68 varianty polypeptidu nebo aminokyselina jiná než asparagin se vyskytuje v poloze 95 varianty polypeptidu, když jsou polohy aminokyselin označeny podle polypeptidové sekvence uvedené v seznamu sekvencí jako sekv. id. č. 1.

Termín "neublastin divokého typu" nebo zkráceně "wt-NBN", jak se v tomto textu používá, se týká přirozeně se vyskytující nebo nativní polypeptidové sekvence neublastinu, jako je například sekvence neublastinu laboratorního potkana, myši nebo člověka (viz např. sekv. id. č. 2, 3 nebo 4). Specifické varianty polypeptidu neublastinu jsou označovány v tomto textu jako "NBN- $X_1N_1X_2$ " nebo " $X_1N_1X_2$ -NBN" kde X_1 označuje aminokyselinu divokého typu polypeptidu neublastinu, N_1 znamená číslo polohy aminokyseliny X_1 v sekvenci při číslování podle sekv. id. č. 1 a X_2 označuje aminokyselinu, která nahrazuje aminokyselinu divokého typu v uvedené poloze dané sekvence. Tak například NBN-N95K znamená variantu polypeptidu neublastinu, kde asparagin v poloze 95 je nahrazen lysinem.

Varianta polypeptidu neublastinu podle vynálezu může být poskytnuta jako multimerní polypeptid. Například varianta polypeptidu neublastinu může být poskytnuta jako dimer, který obsahuje alespoň jednu variantu polypeptidu neublastinu. V některých provedeních je dimer homodimer varianty polypeptidu neublastinu. V jiném provedení je dimer heterodimer, který obsahuje jednu variantu polypeptidu neublastinu a jeden polypeptid neublastinu divokého typu. Ještě další dimery obsahují dvě různé varianty polypeptidu neublastinu.

V jiném varianta polypeptidu neublastinu obsahuje, navíc k aminokyselinám 8-113, ještě aminokyseliny 1-7 ze sekv. id. č. 1.

Ve výhodném provedení varianta polypeptidu neublastinu, když je dimerizován, váže $GFR\alpha 3$. V dalším výhodném provedení varianta polypeptidu neublastinu, když je dimerizován, stimuluje fosforylaci tyrosinu RET polypeptidu, buďt sama nebo jako vázaná k $GFR\alpha 3$.

V ještě jiném výhodném provedení varianta polypeptidu neublastinu, když je dimerizován, zlepšuje přežívání neuronů, např. zlepšuje přežívání senzorických neuronů.

V ještě jiném výhodný provedení varianta polypeptidu neublastinu, když je dimerizován, normalizuje patologické změny v neuronu, například v senzorickém neuronu.

V ještě dalším výhodném provedení varianta polypeptidu neublastinu, když je dimerizován, zlepšuje přežívání neuronů, např. autonomních neuronů nebo dopaminergních neuronů.

V některých provedeních varianta polypeptid obsahuje dvě, tři nebo více substituovaných aminokyselin vybraných ze skupiny, kterou tvoří aminokyselina kromě argininu v poloze 14

aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu, aminokyselina kromě argininu v poloze 39 aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu, aminokyselina kromě argininu v poloze 68 varianty polypeptidu a aminokyselina kromě asparaginu v poloze 95 varianty polypeptidu.

Ve výhodném provedení aminokyselina v jedné nebo ve více polohách z poloh č. 14, 39, 68 a 95 je lysin.

Výhodně, aminokyseliny 8-94 a 96-113 varianty polypeptidu neublastinu jsou alespoň z 90 % identické s aminokyselinami 8-94 a 96-113 ze sekv. id. č. 1. Výhodněji jsou uvedené aminokyselinové sekvence alespoň z 95 % identické. Nejvýhodněji aminokyselinová sekvence varianty polypeptidu neublastinu obsahuje v úsecích aminokyselin 8-94 a 96-113 aminokyselinovou sekvenci přirozeně se vyskytující v sekvenci polypeptidu neublastinu laboratorního potkana, člověka nebo myši. Například aminokyseliny 8-94 a 96-113 varianty polypeptidu neublastinu mohou obsahovat aminokyselinové sekvence aminokyselin 8-94 a 96-113 ze sekv. id. č. 2, sekv. id. č. 3 nebo sekv. id. č. 4.

Vynález dále poskytuje fúzní protein nebo polypeptid, který obsahuje variantu polypeptidu neublastinu nebo polypeptid neublastinu divokého typu, nebo protein, který je dimerem sestávajícím ze dvou neublastinových fúzních proteinů. Neublastinové fúzní proteiny mají zlepšené farmakokinetické vlastnosti a biologickou dostupnost *in vivo*.

V dalším aspektu předkládaný vynález poskytuje molekulu nukleové kyseliny kódující variantu polypeptidu neublastinu. Nukleová kyselina kódující variantu polypeptid neublastin je výhodně poskytnuta ve vektoru, např. v expresním vektoru. Nukleová kyselina kódující variantu neublastinu nebo vektor obsahující tuto nukleovou kysleinu mohou být poskytnuty v

buňce. Buňky mohou být např. savčí buňky, houbové buňky, kvasinkové buňky, hmyzí buňky nebo bakteriální buňky. Výhodné savčí buňky jsou buňky vaječníků čínského křečka ("CHO buňky").

Vynález dále poskytuje způsob přípravy varianty polypeptidu neublastinu spočívající v tom, že se kultivují buňky obsahující nukleovou kyselinu kódující variantu neublastinu v podmínkách, kdy se exprimuje varianta polypeptidu neublastinu. Je-li to třeba, varianta polypeptidu neublastinu pak může být izolována. Vynález se dále týká varianty polypeptidu neublastinu produkované buňkou. Podobně také nukleové kyseliny, vektory, hostitelské buňky a způsoby přípravy polypeptidů popsané v předkládané přihlášce pro fúzní proteiny (jako je například fúzní protein neublastin-sérový albumin) podle vynálezu.

Dále je předmětem vynálezu přípravek, který obsahuje polypeptid neublastin nebo variantu polypeptidu neublastinu kondenzovanou s polymerem, který se v přírodě nevyskytuje. Varianta polypeptidu neublastinu v přípravku výhodně obsahuje aminokyselinové sekvence alespoň ze 70 % identické s aminokyselinami 8-113 sekv. id. č. 1, za předpokladu, že varianta polypeptidu neublastinu obsahuje jeden nebo více substituovaných aminokyselin vybraných ze skupiny, kterou tvoří aminokyselina kromě argininu v poloze 14 v aminokyselinové sekvenci varianty polypeptidu, aminokyselina kromě argininu v poloze 39 v aminokyselinové sekvenci varianty polypeptidu, aminokyselina kromě argininu v poloze 68 varianty polypeptidu a aminokyselina kromě asparaginu v poloze 95 varianty polypeptidu, když jsou polohy aminokyseliny počítány podle polypeptidové sekv. id. č. 1.

Ve výhodném provedení polymer obsahuje

polyalkylenglykolovou skupinu, např. polyethylenglykolovou skupinu (PEG).

Ve výhodném provedení je polyalkylenglykolová skupina kondenzovaná s aminoskupinou z polypeptidu neublastinu nebo lysinem ve variantě polypeptidu neublastinu.

Kondenzace se může uskutečnit prostřednictvím N-hydroxylsukcinimidového (NHS) aktivního ester. Aktivní ester může být např. PEG sukcinimidylsukcinát (SS-PEG), sukcinimidylbutyrát (SPB-PEG) nebo sukcinimidylpropionát (SPA-PEG).

Polyalkylenglykolová skupina může být např. skupina karboxymethyl-NHS, norleucin-NHS, SC-PEG, tresylátová skupina, aldehydová skupina, epoxidová skupina, karbonylimidazolová skupina nebo PNP karbonátová skupina.

V některých provedeních je polyalkylenglykolová skupina kondenzována s cysteinem z polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu. Kondenzace může být provedena např. prostřednictvím maleimidové skupiny, vinylsulfonové skupiny, haloacetátové skupiny nebo thiolové skupiny.

V některých provedeních je polypeptid neublastin nebo varianta polypeptidu neublastinu v přípravku glykosylovaná. Když je polypeptid neublastin nebo varianta polypeptidu glykosylovaná, polymer může být kondenzován k sacharidové skupině glykosylovaného polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu. Například polymer může být kondenzován ke glykosylovanému polypeptidu neublastinu nebo variantě polypeptidu neublastinu po oxidaci hydrazolové skupiny nebo aminoskupiny glykosylovaného polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu nebo oxidaci reaktivní skupiny polymeru.

V různých provedeních polypeptid neublastinu nebo varianta polypeptidu neublastinu obsahuje dvě, tři nebo čtyři skupiny PEG.

Ve výhodném provedení polypeptid neublastin nebo varianta polypeptidu neublastinu nebo polymerní konjugát má delší sérový poločas ve srovnání s poločasem polypeptidu nebo varianty polypeptidu bez přítomnosti polymeru.

Ve výhodném provedení má polypeptid neublastin, varianta polypeptidu neublastinu nebo polymerní konjugát v komplexu fyziologickou aktivitu vybranou ze skupiny, kterou tvoří vazba GFR α 3, aktivace RET, normalizace patologických změn neuronu nebo zlepšení přežívání neuronů.

Termín "normalizace patologických změn neuronu" znamená, že konjugát podle vynálezu indukuje změnu v jednom nebo více z následujících buněčných parametrů: expresní hladina strukturálního protein, receptoru neurotrofického faktoru, iontového kanálu nebo neurotransmiteru, nebo indukuje změnu v buněčné morfologii, v každém případě tak, aby došlo v podstatě k navrácení těchto parametrů na hladiny v neuronu stejného nebo podobného fenotypu, který není dotčen onemocněním, degenerací, napadením nebo poraněním. Normalizace patologických změn neuron může být monitorována imunohistochemickým způsobem nebo tím, že se hodnotí změny v hladině sekretovaného produktu nebo tím, že zhodnotí *in vivo* změny v chování fyziologicky připisovaném funkci postižených neuronů. Například v případě patologických změn asociovaných se syndromem neuropatické bolesti může být monitorována bolest jako například hyperalgie, hypoalgie nebo alodynie.

Termín "zlepšení přežívání neuronů" znamená prodloužení přežití postižených neuronů ve srovnání s dobou přežití pozorovanou u odpovídajících neuronů postižených stejným typem

onemocnění, poškození nebo napadení, ale neléčených konjugátem neublastinu nebo fúzním proteinem podle předkládaného vynálezu.

V některých provedeních je polymer kondenzován na polypeptid v místě neublastinu, které je N koncem polypeptidu. V jiných provedeních je polymer kondenzován k polypeptidu v místě, které není koncovou aminokyselinou polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu.

Ve výhodném provedení je polymer kondenzován na aminokyselinu polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu, kterážto aminokyselina je eponivána rozpouštědлу.

Ve výhodném provedení vynálezu je polymer kondenzován na polypeptid neublastin nebo variantu polypeptidu neublastinu na zbytku, který je vybrán ze skupiny, kterou tvoří aminokyselina aminokonce varianty polypeptidu, aminokyselina v poloze 14 v aminokyselinové sekvenci polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu, v poloze 39 v aminokyselinové sekvenci polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu, v poloze 68 v aminokyselinové sekvenci polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu a v poloze 95 v aminokyselinové sekvenci polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu.

Předkládaný vynález dále poskytuje farmaceutický přípravek obsahující fyziologicky přijatelné vehikulum obsahující, případně dispergovaný, polypeptid neublastin nebo variantu polypeptidu neublastinu nebo konjugát podle předkládaného vynálezu.

V dalším aspektu předkládaný vynález poskytuje stabilní, ve vodě rozpustný komplex kondenzovaného polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu obsahující

polypeptid neublastin nebo variantu polypeptidu neublastinu kondenzovanou s polyethylenglykolovou skupinou, kde polypeptid neublastin nebo varianta polypeptidu neublastinu je kondenzována s polyethylenglykolovou skupinou prostřednictvím labilní vazby. V některých provedeních je labilní vazba štěpitelná biochemickou hydrolýzou, proteolýzou nebo sulfhydrylovým štěpením. Ve výhodném provedení je labilní vazba štěpitelná v *in vivo* podmínkách.

Vynález dáleposkytuje způsob přípravy modifikovaného polypeptidu neublastinu, který má prodlouženou aktivitu, a to *in vitro* nebo *in vivo*, vzhledem neublastinu divokého typu, spočívající v tom, že se připraví polypeptid neublastin nebo varianta polypeptidu neublastinu a tento polypeptid nebo modifikovaná varianta polypeptidu neublastinu se kondenzuje s polymerem, který se v přírodě nevyskytuje, čímž se připraví kondenzovaný polymerový přípravek polypeptidu neublastinu.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká léčení nebo prevence nemocí nervového systému u pacienta (jako například člověka), které spočívá v tom, že se podává pacientovi, který takovou léčbu potřebuje, terapeuticky účinné množství varianty polypeptidu neublastinu, přípravek obsahující polypeptid neublastin nebo variantu polypeptidu neublastinu kondenzovanou k polymeru nebo komplex, který obsahuje stabilní, ve vodě rozpustný komplex kondenzovaného polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu, obsahující polypeptid neublastin nebo variantu polypeptidu neublastinu kondenzovanou na polyethylenglykolovou skupinu.

Výhodně, onemocnění nervového systému je onemocnění periferních nervů, jako je například periferní neuropatie nebo syndrom neuropatické bolesti. Lidé jsou výhodnými pacienty.

Podávání přípravku podle vynálezu může být např. systémové

nebo lokální.

Není-li uvedeno jinak, všechny technické a vědecké termíny použité v tomto textu mají stejný význam jako je význam obecně chápaný odborníkem v oboru, do kterého spadá předkládaný vynález. Ačkoli způsoby a látky podobné nebo ekvivalentní těm, které jsou přímo popsány v tomto textu, mohou být použity při realizaci nebo testování vynálezu, příklady vhodných způsobů a látek jsou popsány níže. Všechny publikace, patentové přihlášky, patenty a jiné odkazy uvedené v tomto textu jsou v plném znění zahrnuty formou odkazu. V případě konfliktu je rozhodující předkládaný popis a v něm uvedené definice. Navíc všechny uvedené materiály, způsoby a zejména příklady mají pouze ilustrativní funkci a nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Další vlastnosti a výhody vynálezu budou patrné z následující podrobného popisu a připojených nároků.

Vynález poskytuje nové varianty polypeptidu neublastinu, které mohou být modifikovány tak, aby se zlepšily jejich farmakokinetické vlastnosti a biologická dostupnost. Výhodné varianty polypeptidu neublastinu obsahují substituované aminokyselinové sekvence, které usnadňují kondenzaci s polymerním činidlem jako je například polyalkylenglykolový polymer.

Varianty polypeptidu neublastinu

Vynález poskytuje polypeptidy neublastinu, které mají variantní aminokyselinové sekvence vzhledem k sekvenci polypeptidu neublastinu divokého typu. Aminokyselinové

sekvence humánního a myšího polypeptidu neublastinu jsou popsány v publikaci W000/01815. Příklady variant polypeptidu neublastinu podle vynálezu jsou uvedeny v tabulce 1.

Výhodně, změněné zbytky ve variantě polypeptidu neublastinu jsou zvoleny tak, aby se usnadnila kondenzace polymeru, jako je například polyalkylenglykolový polymer, v místě modifikované aminokyseliny. Výhodná místa modifikace polypeptidu neublastinu jsou v úsecích polypeptidu neublastinu, které jsou přístupné rozpouštědлу. Tato místa mohou být vybrána na základě vyšetření krystalové struktury příbuzného neurotrofického faktoru, GDNF, jehož krystalová struktura byla popsána v Nat. Struct. Biol. 4:435-38, 1997. Vhodná místa mohou být také vybrána na základě strukturně-funkčních informací získaných výzkumem chimérických proteinů persephin/neublastin. Tyto chiméry jsou popsány v J. Biol. Chem. 275:3412-20, 2000. Seznam aminokyselin vystavených rozpouštědлу nebo exponovaných na povrch neublastinu identifikovaných touto metodou je uveden v tabulce 2.

Vynález zahrnuje variantu polypeptidu neublastinu, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci alespoň ze 70 % identickou s aminokyselinami 8-113 ze sekv. id. č. 1, která je uvedena v tabulce 1. V některých provedeních je jeden nebo více z argininů v poloze 14, poloze 39, poloze 68, nebo asparaginu v poloze 95, v aminokyselinové sekvenci polypeptidu nahrazen jinou aminokyselinou s výjimkou argininu nebo asparaginu. Výhodně je aminokyselina divokého typu nahrazena lysinem nebo cysteinem.

Tabulka 1

1	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQLVVVRALGLGHRSDDELVR AGTRSSRARTTDARGCRLRSQLVVVSALGLGHSSDELIRF AGTRSSRARATDARGCRLRSQLVVVSALGLGHSSDELIRF	člověk myš potkan
	ag---srar---argcrlrsqlvpv-alglgh-sdel-r	kanon. sekvence
41	RFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPGSRPVSQPC RFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPGSRPISQPC RFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPGSRPISQPC	člověk myš potkan
	rfcsgscrrars-hdlslasllgagalr-ppgsrp-sqp	kanon. sekvence
81	CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLSATACGCLG CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLSATACGCLG	člověk (s.id.č.2) myš (s.id.č.3) potkan (s.id.č.4)
	crptryeavsfmdvnstwrtd-lsatacgclg	kanonická sekvence (sekv. id. č. 5)

Kanonická (konsenzní) sekvence:

Ala Gly Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Ser Arg Ala Arg Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Ala Arg Gly Cys
Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Xaa₇ Ala Leu Gly Leu Gly His Xaa₈ Ser
Asp Glu Leu Xaa₉ Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Xaa₉

Ser Xaa₁₀ His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg
Xaa₁₁ Pro Pro Gly Ser Arg Pro Xaa₁₂ Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Lys Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp
Xaa₁₃ Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly

kde

Xaa₁ je Gly nebo Thr

Xaa₂ je Pro nebo Arg

Xaa₃ je Gly nebo Ser

Xaa₄ je Ala nebo Thr

Xaa₅ je Ala nebo Thr

Xaa₆ je Gly nebo Asp

Xaa₇ je Arg nebo Ser

Xaa₈ je Arg nebo Ser

Xaa₉ je Val nebo Ile

Xaa₁₀ je Pro nebo Gln

Xaa₁₁ je Pro nebo Ser

Xaa₁₂ je Val nebo Ile

Xaa₁₃ je Arg nebo His

Tabulka 2 poskytuje seznam zbytků a čísla poloh humánního neublastinu, které jsou podle očekávání exponovány na povrchu. Povrchově exponované zbytky byly určeny tím, že byla zkoumána struktura GDNF dimeru laboratorního potkana tvořeného řetězcem A a B (PDB kód 1AGQ) a bylo určeno, zda byl zbytek na povrchu struktury. Tato struktura pak byla porovnána s přiřazením sekvencí GDNF a neublastinu podle publikace Baloh et al., Neuron, 121, 1291, 1998 pro determinaci odpovídajících zbytků v neublastinu. Schéma číslování je stejné jako je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 2

		8 Ala n/a	16 Cys -	70	24 Pro +	32 His +	40 Phe -
1 Ala n/a	55	9 Arg n/a	17 Arg +		25 Val -	33 Arg +	41 Arg +
2 Gly n/a		10 Ala n/a	18 Leu +		26 Arg +	80	42 Phe +
3 Gly n/a		11 Ala n/a	65	19 Arg +	27 Ala +	34 Ser -	43 Cys -
4 Pro n/a		12 Gly +		20 Ser +	28 Leu -	35 Asp +	44 Ser +
5 Gly n/a		13 Ala -		75	29 Gly +	36 Glu +	45 Gly +
6 Ser n/a	60	14 Arg +		30 Leu +	37 Leu +	38 Val -	46 Ser +
7 Arg n/a		15 Gly +		31 Gly +	85	39 Arg +	47 Cys -
48 Arg +		106 Ala -					
49 Arg +	60	107 Thr +					
50 Ala -		108 Ala +					
51 Arg +		109 Cys -					
52 Ser +		110 Gly +					
53 Pro +		111 Cys -					
54 His -	65	112 Leu +					
55 Asp -		113 Gly					
56 Leu +		n/a					
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							
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 +							
103 Arg +							
104 Leu -							
105 Ser -							

n/a ukazuje, že zbytky nejsou přítomné ve struktuře GDNF. To je buď z důvodu návrhu konstruktů, flexibility úseku nebo inzertů v neublastinu ve srovnání s GDNF (zbytky 68-71).

- ukazuje zbytky, které jsou vnořené a neleží na povrchu nebo jsou to cysteinové zbytky zapojené do disulfidické vazby. Jelikož je tento protein "cysteinový uzel", velká část zbytků je na povrchu.

+ ukazuje, že tyto zbytky jsou na povrchu ve struktuře GDNF, a proto se dedukuje, že odpovídající zbytky v neublastinu jsou také exponované na povrchu, ačkoli klička obsahující zbytky 66-75 je viditelný v pouze jednom z GDNF monomerů (pravděpodobně flexibilní). Tento klička také obsahuje 4 zbytky jakožto inzerty v neublastinu ve srovnání s GDNF.

Termíny "identita" a "homologie" nebo případně "identický" a "homologní", jak se v tomto textu používají, jsou zaměnitelné a týkají se sekvenční podobnosti dvou polypeptidových molekul nebo dvou nukleových kyselin. Když je poloha v obou srovnávaných sekvencích obsazena stejnou bází nebo aminokyselinovou monomerní podjednotkou (například jestliže je tatáž poloha v každé ze dvou DNA molekul obsazena adeninem nebo tatáž poloha v každém ze dvou polypeptidů je obsazena lysinem), pak jsou příslušné molekuly homologní v dané poloze. Homologie mezi dvěma sekvencemi vyjádřená v procentech je funkcí počtu odpovídajících nebo homologních poloh sdílených oběma sekvencemi děleného celkovým počtem srovnávaných poloh $\times 100$. Například jestliže z 10 poloh ve dvou sekvencích je 6 shodných nebo homologních, pak tyto dvě sekvence jsou z 60 % homologní. Tak například DNA sekvence

CTGACT a CAGGTT sdílejí 50% homologii (3 z celkem 6 poloh si odpovídají). Obecně srovnávání (přiřazení) sekvencí se provádí s cílem dosažení maximální homologie. Takové srovnání může být provedeno s použitím například způsobu podle Needleman et al., J. Mol Biol. 48:443-453 (1970), který lze realizovat pohodlně počítačovými programy jako například program Align (DNASTAR, Inc.). "Podobné" sekvence jsou ty sekvence, které při srovnání sdílejí identické a podobné aminokyselinové zbytky, kdy podobné zbytky představují konzervativní substituce pro "povolené bodové mutace" odpovídajících aminokyselinových zbytků ve srovnání s referenční sekvencí. V tomto smyslu "konzervativní substituce" zbytku v referenční sekvence je substituce zbytkem, který je fyzicky nebo funkčně podobný odpovídající referenční zbytku, např. který má podobnou velikost, tvar, elektrický náboj, chemické vlastnosti, včetně schopnosti vytvářet kovalentní nebo vodíkové vazby apod. Tedy "konzervativně substituovaná varianta" sekvence je taková sekvence, která se liší od referenční sekvence nebo sekvence divokého typu tím, že je zde přítomna jedna nebo více konzervativních substitucí nebo povolených genových mutací.

Ve výhodném provedení je polypeptid podle vynálezu z 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % nebo 99 % identický s úsekem aminokyselin 8-113 ze sekv. id. č. 1. V některých provedeních aminokyselinová sekvence varianty polypeptidu neublastinu obsahuje přirozeně se vyskytující aminokyselinové sekvence polypeptidu neublastinu laboratorního potkana, člověka nebo myš v úseku aminokyselin 1-94 a 96-113 varianty polypeptidu neublastinu, např. polypeptid má aminokyselinovou sekvenci id. č. 2, 3 nebo 4 v těchto uvedených polohách.

Varianta polypeptidu neublastinu lišící se sekvenčně od

sekvencí uvedených jako sekv. id. č. 1 až 4 může obsahovat jednu nebo více konzervativních substitucí aminokyselin. Alternativně, nebo kromě toho, se varianta polypeptidu neublastinu může lišit v jedné nebo více nekonzervativních aminokyselinových substitucích, nebo delecí nebo inzercí. Výhodně, substituce, inserce nebo delece nenarušují biologickou aktivitu izolované bílkoviny.

Konzervativní substituce typicky zahrnují substituce jedné aminokyseliny jinou aminokyselinou s podobnými vlastnostmi, například substituce v rámci následujících skupin: valin, alanin a glycin, leucin, valin a izoleucin, asparagová kyselina a glutamová kyselina, asparagin a glutamát, serin, cystein a threonin, lysin a arginin, a fenylalanin a tyrosin.

K nepolárním hydrofobním aminokyselinám patří alanin, leucin, izoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan a methionin. Polární neutrální aminokyseliny zahrnují glycin, serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin a glutamin. Pozitivně nabitě (bazické) aminokyseliny zahrnují arginin, lysin a histidin. Záporně nabitě (kyselé) aminokyseliny zahrnují asparagovou kyselinu a glutamovou kyselinu. Kterákoliv substituce jednoho člena výše uvedené polární, bazické nebo kyselé skupiny jiným členem ze stejné skupiny je považována za konzervativní substituci.

Další substituce mohou být odborníkem snadno identifikovány. Například pro aminokyselinu alanin vhodná substituce může být vybrána z kterékoliv z následujících aminokyselin: D-alanin, glycin, beta-alanin, L-cystein a D-cysteie. Lysin může být nahrazen kterýkoliv z aminokyselin: D-lysin, arginin, D-arginin, homo-arginin, methionin, D-methionin, ornithin nebo D-orinthin. Obecně substituce ve funkčně důležitém úseku, u kterého může být očekávána

indukce změny ve vlastnostech izolovaného polypeptidu, jsou ty, kde: (i) polární zbytek, např. serin nebo threonin, je nahrazen nebo nahradí hydrofobní zbytek, např. leucin, izoleucin, fenylalanin nebo alanin, (ii) cysteinový zbytek je nahrazen nebo nahradí kterýkoliv jiným zbytek, (iii) zbytek mající elektropozitivní postranní řetězec, např. lysin, arginin nebo histidin, je nahrazen nebo nahradí zbytek mající elektronegativní postranní řetězec, např. glutamová kyselina nebo asparagová kyselina, nebo (iv) zbytek mající objemný postranní řetězec, např. fenylalanin, je nahrazen nebo nahradí zbytek, který nemá takový postranní řetězec, např. glycin. Pravděpodobnost, že jedna z předcházejících nekonzervativních substitucí může změnit funkční vlastnosti proteinu je také ve vztahu k poloze substituce vzhledem k funkčně důležitým úsekům proteinu: některé nekonzervativní substituce mohou mít tudíž malý nebo nulový vliv na biologické vlastnosti.

Předkládaný vynález dále poskytuje multimerní polypeptidy, které obsahují variantu polypeptidu neublastinu. Multimerní polypeptidy jsou výhodně poskytnuty jako purifikované multimerní polypeptidy. K příkladům multimerních komplexů patří např. dimerní komplexy. Multimerní komplexy mohou být poskytnuty jako heteromerní nebo jako homomerní komplexy. Takže multimerní komplex může být heterodimerní komplex obsahující jednu variantu polypeptidu neublastinu a jeden nonvariantní neublastin nebo heterodimerní komplex obsahující dvě nebo více variant polypeptidu neublastinu.

V některých provedeních vynálezu se varianta polypeptidu neublastinu váže na GFR α 3. Výhodně, vazba varianty polypeptidu neublastinu stimuluje fosforylaci RET polypeptidu. Pro určení toho, zda se polypeptid váže na GFR α 3, mohou být provedeny testy, jak byly popsány v publikaci WO00/01815. Například

přítomnost neublastinu v supernatantu média CHO buněčná linie může být zjištěna použitím modifikovaného testu ternárních komplexů podle Sanicola et al. (Pros. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 6238). V tomto testu se hodnotí schopnost GDNF-podobných molekul zprostředkovat vazbu mezi extracelulární doménou RET a různými ko-receptory, $GFR\alpha I$, $GFR\alpha 2$ a $GFR\alpha 3$. Rozpustné formy RET a ko-receptory jsou generovány jakožto fúzní proteiny. Fúzní protein mezi extracelulární doménou RET laboratorní potkana a alkalickou fosfatázou z placenty (RET-AP) a fúzní protein mezi extracelulární doménou $GFR\alpha-1$ laboratorního potkana (popsaný v publikaci W097/44356, 27. listopadu 1997, v tomto textu zahrnuta formou odkazu) a Fc doménou humánního IgG1 (rGFR(αI -IS) již byly popsány (Sanicola et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 6238).

V některých provedeních varianta polypeptidu neublastinu zlepšuje přežívání neuronů nebo normalizuje patologické změny v neuronech nebo obojí. Testy ke stanovení toho, zda polypeptid zlepší přežití neuronu nebo normalizuje patologické změny neuronu, jsou popsán např. v publikaci W000/01815. Výhodně neuron je senzorický neuron, autonomní neuron nebo dopaminergní neuron.

Syntéza a izolace varianty polypeptidu neublastinu

Varianty polypeptidu neublastinu mohou být izolovány metodami, které jsou odborníkům známy. Přirozeně se vyskytující polypeptid neublastin může být izolován ze zdrojových buněk nebo tkání vhodným purifikačním postupem, s využitím standardních postupů purifikace proteinů. Alternativně varianty polypeptidu neublastinu mohou být syntetizovány chemicky s využitím standardních postupů syntézy peptidů. Syntéza krátkých aminokyselinových sekvencí je dobře

v oboru dobře zavedena, viz, např. Stewart et al., Solid Phase Peptid Synthesis (2d ed., 1984).

V dalším provedení je varianta polypeptidu neublastinu připravena technikou rekombinantní DNA. Například molekula nukleové kyseliny kódující variantu polypeptidu neublastinu může být vložena do vektor, např. do expresního vektoru, a nukleová kyselina je takto vnesena do buňky. Vhodné buňky zahrnují např. savčí buňky (jako například humánní buňky nebo buňky vaječníků čínského křečka), houbové buňky, kvasinkové buňky, hmyzí buňky a bakteriální buňky. Když je exprimována v rekombinantní buňce, buňka je výhodně pěstována v podmínkách vhodných pro expresi varianty polypeptidu neublastinu. Varianta polypeptidu neublastinu může pak být získána/izolována z buněčné suspenze je-li to třeba. "Získána" nebo "izolována" v tomto případě znamená, že varianta polypeptidu je izolována od těch součástí buněk nebo kultivačního média, které byly v preparátu přítomny před izolačním postupem. Izolační postup může zahrnovat jeden nebo více kroků purifikace nebo znovusestavení molekuly proteinu ("refolding").

Varianty polypeptidu neublastinu mohou být konstruovány s využitím kterýkoliv metod známých v oboru. Jedním takovým způsobem je místně cílená mutageneze, kdy se specifický nukleotid (nebo, jestliže je to potřeba, malý počet specifických nukleotidů) zamění, aby došlo ke změně jedné aminokyseliny (nebo, je-li to třeba, malého počtu předem určených aminokyselinových zbytků) v kódovaném polypeptidu neublastinu. Místně cílená mutageneze je široce užívaná metoda a pro odborníka je rutinním postupem. Je také k dispozici mnoho komerčně dostupných souprav pro místně cílenou mutagenezi. Jedna taková souprava je souprava "Transformer

Site Directed Mutagenesis" od firmy Clontech Laboratory (Palo Alto, Calif.).

Při realizaci předkládaného vynálezu se užívají, pokud není specificky uvedeno jinak, obvyklé metody buněčné biologie, tkáňových kultur, molekulární biologie, mikrobiologie, rekombinantní DNA, proteinové chemie a imunologie, který jsou odborníkům známy. Takové metody jsou dostatečně popsány v odborné literatuře, viz například Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. (Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; DNA Cloning, Volumes I and II, (D.N. Glover, ed), 1985; Oligonucleotide Synthesis, (M.J. Gait, ed.), 1984; U.S. Patent No. 4,683,195 (Mullis et al.); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Haines and S.J. Higgins, eds.), 1984; Transcription and Translation (B.D. Hames and S.J. Higgins, eds.), 1984; Culture of Animal Cells W. Freshney, ed). Alan R. Liss, in., 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986; A Practical Guide to Molecular Cloning (13. Perbal), 1984; Methods in Enzymology, Volumes 154 and 155 (Wu et al., eds), Academic Press, New York; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; Immunochernical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds.), Academic Press, London, 1987; Handbook of Experiment Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.), 1986; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

Fúzní proteiny s variantou neublastinu

Je-li to žádoucí, varianty polypeptidu neublastinu mohou být poskytnuty ve formě fúzního proteinu. Fúzní polypeptidy

derivované z proteinů podle vynálezu také zahrnují různé strukturální formy primárního proteinu, který si zachovává svou biologickou aktivitu. Termín "fúze", jak se v tomto textu používá, se týká ko-lineární, kovalentní vazby dvou nebo více proteinů nebo jejich fragmentů prostřednictvím jejich individuálních peptidových "koster", nejvýhodněji pomocí genové exprese polynukleotidové molekuly kódující příslušné proteiny ve shodném čtecím rámci ("in frame"). Je výhodné, když proteiny nebo jejich fragmenty jsou z různých zdrojů. Tak výhodné fúzní proteiny zahrnují variantu proteinu neublastinu nebo jeho fragment kovalentně spojený s druhou skupinou, která není variantou neublastinu. Výhodně druhá skupina pochází z polypeptidu, který existuje jako monomer a který je dostatečný k tomu, aby polypeptidu neublastinu propůjčil zvýšenou rozpustnost a/nebo biologickou dostupnost.

Například fúze "varianta neublastinu/humánní sérový albumin" je protein obsahující variantu polypeptidu neublastinu podle vynálezu nebo jeho fragment, jehož N-konec C-konec je spojen ve shodném čtecím rámci polypeptidem humánního sérového albuminu (Viz Syeda et al, Blood, 1997, 89: 3243 a Yeh et al., P.N.A.S. USA 1992, 89:1904) a US Patenty č. 5,876,969 a 5,302,697. Termín "fúzní protein" navíc obsahuje variantu neublastinu chemicky spojenou prostřednictvím mono- nebo hetero- funkční molekuly s druhou skupinou, která není variantou proteinu neublastinu, a je vytvořen de novo z purifikovaného proteinu, jak je popsáno dále.

Fúze neublastin-sérový albumin mohou být konstruovány s využitím metod odborníkům známým. Kterékoli z mnoha zesíťovacích činidel ("cross-linkers") obsahujících odpovídající amin-reaktivní a thiol-reaktivní skupiny, může být použito k navázání neublastinu na sérový albumin. Příklady vhodných

zesíťovacích činidel (linkerů) zahrnují amin-reaktivní činidla, která vnášejí thiol-reaktivní maleimidovou skupinu. Patří sem např. SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS nebo GMBS. Jiné vhodné linkery vnášející thiol-reaktivní haloacetátovou skupinu. K těm patří např. SBAP, SIA, SIAB, Činidla, která poskytují chráněnou nebo nechráněnou thiolovou skupinu pro reakce se sulfhydrylovou skupinou k vytvoření redukovatelné vazby, jsou např. SPDP, SMPT, SATA nebo SATP, přičemž všechna činidla jsou komerčně dostupná (např. od firmy Pierce Chemicals). Odborník si může snadno navrhnout alternativní strategie pro spojení N-konce neublastinu se sérovým albuminem.

Lze si také snadno představit, že odborník může připravit konjugáty se sérovým albuminem, které nejsou zacíleny na N-konec NBN nebo na thiolové skupiny sérového albuminu. Je-li to třeba, fúze NBN-sérový albumin může být připravena s využitím techniky genového inženýrství, kde NBN je fúzován s genem pro sérový albumin na svém N-konci, C-konci nebo na obou koncích.

Lze předpokládat, že podobnou strategií může být připraven jakýkoliv NBN konjugát, který se vyznačuje prodlouženým biologickým poločasem u zvířat (včetně lidí).

Další deriváty varianty neublastinu zahrnují kovalentní nebo agregované konjugáty varianty neublastinu nebo jejího fragmentu s jinými proteiny nebo polypeptidy, jako například syntézou v rekombinantní kultuře jakožto dodatečné N-konce nebo C-konce. Například kondenzovaný peptid může být signální (nebo vedoucí) polypeptid sekvence v N-koncovém úseku proteinu, který ko-translačně nebo post-translačně řídí přenos proteinu z místa jeho syntézy na místo jeho uvnitř nebo vně buněčné membrány nebo stěny (např. vedoucí sekvence alfa-faktoru u kvasinek). Receptorové proteiny neublastinu

mohou obsahovat peptidy přidané pro usnadnění purifikace nebo identifikaci z neublastin (např. fúze histidin/neublastin). Aminokyselinová sekvence neublastinu může být také spojena s peptidem Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (Hopp et al., Biotechnology 6:1204,1988.) Uvedená sekvence je velmi antigenní a poskytuje epitop reverzibilně se vážající na specifickou monoklonální protilátku, umožňující rychlý test a snadnou purifikaci exprimovaného rekombinantního proteinu.

Tato sekvence je navíc specificky štěpena bovinní slizniční enterokinázou ve zbytku bezprostředně následujícím po páru Asp-Lys.

Varianta polypeptidu neublastinu kondenzovaná na polymer

Je-li to potřeba, jedna polymerní molekula může být použita pro kondenzaci s polypeptidem neublastinu, ale přichází do úvahy i kondenzace s více než molekulou polymeru. Kondenzované neublastinové přípravky podle vynálezu najdou použití jak v *in vitro* tak v *in vivo* aplikacích. Dále je zřejmé, že kondenzovaný polymer může využít jakékoliv jiné skupiny nebo jinou kondenzovanou molekulu, v závislosti na účelu aplikace. Tak například při některých aplikacích může být užitečné kovalentně navázat k polymeru funkční skupiny poskytující rezistenci proti degradaci UV zářením, nebo antioxidační vlastnosti nebo ještě jiné vlastnosti nebo charakteristiky polymeru. Jako další příklad může být výhodné v některých aplikacích funkcionalizovat polymer tak, aby získal reaktivní nebo zesíťovatelný charakter, aby se tak zesílili různé vlastnosti výsledné kondenzované sloučeniny (konjugátu). Tudiž polymer může obsahovat jakékoliv funkční skupiny, opakující se skupiny, vazebné skupiny nebo jiné konstitutivní struktury, které nezabraňují biologické

účinnosti kondenzovaného neublastinového muteinu pro zamýšlené použití.

V příkladech a reakčních schématech jsou pro ilustraci uvedeny některé polymery, který mohou být použity pro dosažení požadovaných vlastností. Při aplikacích s kovalentně navázaným peptidem může být polymer funkcionalizován a pak kondenzován k volné aminoskupině (aminoskupinám) peptidu (peptidů) za vzniku labilní vazby.

V některých provedeních vynálezu je polypeptid neublastin navázán k polymeru prostřednictvím koncové reaktivní skupiny na polypeptidu. Jinak, nebo ještě navíc, polypeptid neublastin může být navázán přes aminoskupinu postranního řetězce interního lysinového zbytku, např. lysinového zbytku vneseného do aminokyselinové sekvence přirozeně se vyskytujícího polypeptidu neublastinu. Takže kondenzace také může být rozvětvená z jiné než koncové reaktivní skupiny. Polymer s reaktivní skupinou (skupinami) se nazývá v tomto textu "aktivovaný polymer". Reaktivní skupina selektivně reaguje s volnou aminoskupinou nebo jiným reaktivní skupinou proteinu.

Navázání se může vyskytovat v aktivovaném polymeru na jakékoliv dostupné aminoskupině neublastinu jako je například alfa-aminoskupina nebo epsilon-aminoskupina lysinového zbytku nebo zbytků zavedených do aminokyselinové sekvence polypeptidu neublastinu nebo její varianty. Volné karboxylové skupiny, vhodně aktivované karbonylové skupiny, hydroxylové skupiny, guanidylové skupiny, imidazolové skupiny, oxidované cukerné skupiny a merkapto skupiny neublastinu (jestliže jsou přístupné) mohou také sloužit jako místa připojení.

Obecně se užije přibližně 1,0 až 10 mol aktivovaného polymeru na 1 mol proteinu, v závislosti na koncentraci proteinu. Konečné množství je rovnováhou mezi maximalizací

rozsahu reakce a současně minimalizace nespecifické modifikace produktu a, současně, definováním takového chemického postupu, který bude udržovat optimální aktivitu, při současné optimalizaci, jestliže je možná, poločasu proteinu. Výhodně, alespoň přibližně 50 % biologické aktivity proteinu je zachováno, a nejvýhodněji je zachováno téměř 100 % biologické aktivity proteinu.

Reakce se může provádět kterýmkoliv vhodným způsobem známým pro reakce biologicky účinných látek s inertními polymery, výhodně při pH přibližně 5 až 8, např. pH 5, 6, 7 nebo 8, jestliže reaktivní skupiny jsou na alfa-aminoskupinách N-konce. Obecně postup zahrnuje přípravu aktivovaného polymeru a potom reakci proteinu s aktivovaným polymerem za vzniku rozpustného proteinu vhodného k formulaci. Výše zmíněné modifikační reakce mohou být provedeny několika různými způsoby, které mohou zahrnovat jeden nebo více kroků.

Polymer může být kondenzován na variantu polypeptidu neublastinu s použitím metod, které jsou odborníkům známy. Například v jednom provedení, polyalkylenglykolová skupina je kondenzována na lysinovou skupinu polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu. Navázání na lysin může být provedeno s aktivním esterem N-hydroxylsukcinimidu (NHS), například PEG-sukcinimidylsukcinátem (SS-PEG) a sukcinimidylpropionátem (SPA-PEG). Vhodný polyalkylenglykolové skupiny zahrnují např. skupinu karboxymethyl-NHS, norleucin-NHS, SC-PEG, tresylátovou skupinu, aldehydovou skupinu, epoxidovou skupinu, karbonylimidazolovou skupinu a PNP-karbonátovou skupinu.

Sukcinimidyllová skupina může být nahrazena dalšími amin-reaktivními PEG linkery. Patří k nim např. isothiokyanáty, nitrofenylkarbonáty, epoxidy a karbonáty

benzotriazolu. Podmínky jsou výhodně voleny tak, aby se maximalizovala selektivita a rozsah reakce. Lineární a rozvětvené formy PEG mohou být použity, a také ostatní alkylové formy. Délka PEG může být různá. Nejběžnější formy mají velikost 2 K až 100 K. Popsané příklady ukazují, že cílená pegylace N-konce neovlivňuje farmakokinetické vlastnosti, a skutečnost, že si látka uchovává své fyziologické funkce ukazuje, že modifikace místa nebo míst popsaných v předkládané přihlášce nemají škodlivý vliv. Tudíž při vytváření mutantních forem NEN, které by mohly poskytovat další místa pro připojení, tím, že se vkládají lysinové zbytky, je považována za přijatelnou pravděpodobnost, že tyto formy by byly pegylované jak na lysinu tak i na N-konci.

Je-li to třeba, varianta polypeptidu neublastinu může obsahovat "přívěsek" ("tag"), např. značku, která se může následně uvolnit proteolýzou. Takže lysinové skupiny mohou být selektivně modifikovány první reakcí variány s his-značkou ("his-tag") s linkerem s nízkou molekulovou hmotností, jako je například Trautovo činidlo (Pierce), které reaguje jak s lysinem tak s N-koncem, a pak uvolněním his-značky. Polypeptid bude pak obsahovat volnou SH skupinu, která může být selektivně modifikována s hlavní thiol-reaktivní skupinou obsahující PEG, jako je například maleimidová skupina, vinylsulfonová skupina, haloacetátová skupina nebo volná nebo chráněná skupina SH.

Trautovo činidlo může být nahrazeno jakýmkoliv linkerem, který připraví specifické místo pro připojení PEG. Tak například Trautovo činidlo může být nahrazeno SPDP, SMPT, SATA nebo SATP (všechny dostupné od firmy Pierce). Podobně se může reagovat protein s amin-reaktivním linkerem, který vnáší maleimidovou skupinu (například SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS,

SMPB, SMPH, KMUS nebo GMBS), haloacetátovou skupinu (SBAP, SIA, SIABA) nebo vinylsulfonovou skupinu, a výsledný produkt reagovat s PEG, který obsahuje volnou skupinu SH. Jedinou limitací velikosti linkeru, který je použit, je to, aby neblokoval následné odstranění N-koncové značky.

Tak v jiném provedení je polyalkylenglykolová skupina kondenzována k cysteinové skupině polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu. Kondenzace může být provedena s využitím např. maleimidové skupiny, vinylsulfonové skupiny, haloacetátové skupiny a thiolové skupiny.

Jedno nebo více míst ve variantě polypeptidu neublastinu může být kondenzováno k polymeru. Například jedna, dvě, tři, čtyři nebo pět PEG skupin může být připojeno k polymeru. V některých provedeních je PEG skupina připojena na aminokonec a/nebo aminokyseliny 14, 39, 68 a 95 polypeptidu neublastinu, při číslování poloh podle tabulky 1.

Ve výhodném provedení má varianta polypeptidu neublastinu v přípravku delší sérový poločas vzhledem k poločas varianty polypeptidu bez přítomnosti polymeru. Alternativně nebo navíc varianta polypeptidu neublastinu v přípravku se váže na GFR α 3, aktivuje RET, normalizuje patologické změny neuronů nebo zlepšuje přežití neuronů nebo projevuje kombinaci těchto fyziologických funkcí.

Ve výhodném provedení je přípravek poskytnut jako stabilní, ve vodě rozpustný komplex kondenzovaného polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu obsahující polypeptid neublastin nebo varianta polypeptidu neublastinu kondenzovanou k polyethylenglykolové skupině. Je-li to třeba, polypeptid neublastinu nebo varianta polypeptidu neublastinu může být kondenzována k polyethylenglykolové skupině labilní vazbou. Labilní vazba může být štěpena např. biochemickou

hydrolýzou, proteolýzou nebo sulfhydrylovým štěpením. Například vazba může být štěpena v *in vivo* (fyziologických) podmínkách.

Farmaceutické přípravky obsahující variantu neublastinu kondenzovanou s polymerem

předkládaný vynález poskytuje dále farmaceutický přípravek obsahující variantu neublastinu kondenzovanou s polymerem. "Farmaceutický přípravek" je podle předkládaného popisu definován jako přípravek obsahující protein neublastinu podle vynálezu nebo jeho kondenzovanou formu (konjugát), dispergovanou ve fyziologicky přijatelném vehikulu, volitelně obsahující jednu nebo více dalších fyziologicky kompatibilních složek. Farmaceutický přípravek tak může obsahovat excipienty jako je například voda, jeden nebo více minerálů, sacharidů, detergentů, a jeden nebo více nosičů, jako je například inertní protein (např. heparin nebo albumin).

Konjugáty polymer-neublastin podle vynálezu mohou být podávány samotné (*per se*), a také ve formě farmaceuticky přijatelných esterů, solí a jiných fyziologicky funkční derivátů. V takových farmaceutických a lékových formulacích je použit konjugát varianty neublastinu výhodně společně s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči a volitelně s jakoukoliv další terapeutickou složkou.

Nosič (nosiče) musí být farmaceuticky přijatelný nosič v tom smyslu, že musí být kompatibilní s ostatními složkami formulace a nesmí mít škodlivé účinky pro příjemce. Varianta neublastinu je poskytnuta v množství, které je účinné pro dosažení požadovaného farmakologického účinku nebo lékařsky prospěšného účinku, jak bude dále popsáno v tomto textu, a v množství vhodném pro dosažení požadované biologicky dostupné

dávky nebo koncentrace *in vivo*.

Formulace podle vynálezu zahrnují formulace vhodné pro parenterální, a také jiné než parenterální podávání, a specifické způsoby podávání zahrnují perorální, rektální, bukální, topické, nazální, oční, subkutánní, intramuskulární, intravenózní, transdermální, intratekální, intraartikulární, intraarteriální, subarachnoidální, bronchiální, lymfatické, vaginální a intraděložní podávání. Výhodné jsou formulace vhodné pro aerosolové a parenterální podávání, jak lokální tak i systémové.

Když je použita varianta neublastinu ve formulaci obsahující kapalný roztok, formulace může být výhodně podávána perorálně, bronchiálně nebo parenterálně. Když je neublastin použit v kapalně suspenzní formulaci nebo je formulován jako prášek v biologicky kompatibilním nosiči, formulace může být výhodně podávána perorálně, rektálně nebo bronchiálně. Jinak může být podávána nazálně nebo bronchiálně, prostřednictvím nebulizace prášku v nosičovém plynu za vzniku plynné disperze prášku, která je vdechována pacientem z dýchacího okruhu obsahujícího vhodné nebulizační zařízení.

Formulace obsahující proteiny podle předkládaného vynálezu může výhodně být prezentována v jednotkové lékové formě a lze ji připravit jakoukoliv metodou dobře známou v oboru farmacie. Takové metody obecně zahrnují krok smíchání účinné složky nebo složek s nosičem, který představuje jednu nebo více druhotných složek.

Typicky se formulace připravuje uniformním a dokonalým smícháním účinné složky s tekutým nosičem nebo jemně mletým tuhým nosičem nebo s oběma, a pak, jestliže je to nutné, formulace produktu do požadované lékové formy.

Formulace podle předkládaného vynálezu vhodné pro

perorální podávání mohou být prezentovány jako jednotkové lékové formy, například tobolky, oplatky s práškem, tablety nebo pastilky, kdy každá z nich obsahuje předem určené množství účinné složky ve formě prášku nebo granulátu nebo suspenze ve vodné nebo nevodné kapalině, jako je například sirup, elixír, emulze nebo nálev.

Formulace vhodné k parenterálnímu podávání vhodně zahrnují sterilní vodný přípravek účinného konjugátu, který je výhodně izotonický s krví příjemce (např. fyziologický roztok). Taková formulace může zahrnovat suspendující činidla a zahušťovadla nebo jiné mikročasticové systémy, které jsou konstruovány s cílem směřovat sloučeninu na složky krve nebo do jednoho či více orgánů. Formulace mohou být prezentovány v jednodávkové lékové formě nebo vícedávkové lékové formě.

Nazální sprej obsahuje purifikovaný vodný roztok účinného konjugátu s konzervačními a izotonickými činidly. Takové formulace mají výhodně upraveno pH a izotonický stav tak, aby byly kompatibilní s nazální sliznicí.

Formulace pro rektální podávání mohou být prezentovány jako čípek s vhodným nosičem, jako je například kakaové máslo, hydrogenací ztužené tuky nebo mastná karboxylové kyseliny.

Oční formulace, jako jsou například oční kapky, jsou připravovány podobným způsobem jako formulace pro nazální sprej, kromě toho, že pH a izotonické faktory jsou výhodně upraveny pro oko.

Topické formulace obsahují konjugáty podle vynálezu rozpuštěné nebo suspendované v jednom nebo více médiích, jako je například minerální olej, petrolej, polyhydroxyalkoholy nebo jiná báze vhodná pro topické farmaceutické formulace.

Kromě výše uvedených složek formulace podle předkládaného

vynálezu mohou obsahovat jednu nebo více dalších složek vybraných ze skupiny obsahující ředidla, pufry, aromatizační činidla, rozvolňovadla, povrchově aktivní látky, zahušťovadla, lubrikanty, konzervační činidla (obsahující antioxidanty) apod. Vše výše uvedené půaltí taktéž pro fúzní proteiny neublastinu podle vynálezu (např. fúze neublastin-HSA).

Tudíž předkládaný poskytuje vhodný fúzní protein pro *in vitro* stabilizaci konjugátu varianty neublastinu v roztoku, jakožto jedno výhodné ilustrativní provedení vynálezu. Fúzní protein může být použit například ke zvýšení rezistence k enzymatickému rozkladu varianty polypeptidu neublastinu, a poskytuje tak prostředek ke zlepšení skladovatelnosti, stability při skladování při teplotě místnosti apod. Rozumí se, že totéž platí taképro fúzní proteiny neublastin-sérový albumin (včetně fúzních proteinů humánní neublastin-humánní sérový albumin) podle vynálezu.

Léčení

Varianty polypeptidu neublastinu, a také její fúzní proteiny nebo konjugáty, mohou být užity při léčení nebo zmírnění nemocí žijícího zvířecího organismu, výhodně savce, výhodněji primáta včetně člověka, jehož onemocnění nebo patologický stav reguje na aktivitu neurotrofického činidla.

Přípravky podle vynálezu může být použity přímo prostřednictvím např. injekce, implantátu nebo požitím farmaceutického přípravku, pro léčení patologického stavu vnímavého k polypeptidu neublastiny. Přípravky podle vynálezu mohou být použity pro zmírnění patologického stavu nebo nemoci žijícího zvířecího organismu, včetně člověka, jehož onemocnění nebo patologický stav reguje na aktivitu neurotrofického činidla. Patologický stav nebo onemocnění může konkrétně být

poškození nervového systému způsobené traumatem, chirurgický výkonem, ischemií, infekcí, metabolickou poruchou, nedostatkem živin, malignitou nebo toxickými činidly a genetickou nebo idiopatickou příčinou.

Poškození se může konkrétně vyskytnout na senzorickech neuronech nebo gangliovych buňkách sítnice, včetně neuronů v zadním kořenu ganglia míchy nebo ve kterékoliv z následujících tkání: kolínková, skalní a nodosní ganglia, vestibuloakustický komplex osmého lebečního nerv, ventrolaterální svazek maxilomandibulárního laloku trojklaného ganglia a mesencefalického jádro trigeminu.

Ve výhodném provedení způsobu podle vynálezu je onemocnění nebo chorobný stav neurodegenerativní onemocnění zahrnující léze a traumata neuronů, jako jsou traumatické léze periferních nervů, medully a/nebo míchy, ischemický poškození cerebrálních neuronů, neuropatie a obzvláště periferní neuropatie, trauma nebo poškození periferních nervů, ischemická mrtvice, akutní poškození mozku, akutní poškození míchy, nádory nervového systému, sclerosis multiplex, následky působení neurotoxinů, metabolických poruch jako například diabetu nebo renální dysfunkce, a poškození způsobené infekčními agens, neurodegenerativní onemocnění včetně Alzheimerovy nemoci, Huntingtonovy nemoci, Parkinsonovy nemoci, Parkinson-Plus syndromu, progresivní supranukleární ochrnutí (Syndrom Steele-Richardson-Olszewski), olivopontocerebellární atrofie (OPCA), Shy-Drager Syndrom (mnohočetná systémová atrofie), Guamanianův komplex parkinsonické demence, amyotrofická laterální skleróza nebo jakékoliv jiné vrozené nebo neurodegenerativní onemocnění a poškození paměti související s demencí.

Ve výhodném provedení mohou být léčeny neurony smyslového

a/nebo autonomního systému. Konkrétně například mohou být léčeny nociceptivní a mechanoreceptivní neurony, konkrétněji neurony delta-vlákna a C- vlákny. Kromě toho mohou být léčeny, sympatické a parasympatické neurony autonomního systému.

Další výhodné provedení vynálezu se týká léčení motorických neuronů při onemocnění jako je například amyotrofická laterální skleróza ("ALS") a spinální svalová atrofie. V ještě dalším výhodném provedení mohou být použity molekuly neublastinu podle předkládaného vynálezu ke zlepšení zotavení nervů po traumatickém. Jinak nebo navíc k výše uvedenému, nervový vodivý kanál s matricí obsahující variantu polypeptid neublastiny nebo fúzované nebo konjugované varianty polypeptidu neublastinu mohou být použity ve způsobech, popsaných v předkládané přihlášce. Takové nervové vedivé kanály byly popsány např. v US Patentu č. 5,834,029, který je ude zahrnut formou odkazu.

Ve výhodném provedení vynálezu jsou přípravky popsané v tomto textu (a farmaceutické přípravky, které je obsahují) jsou použity při léčení periferních neuropatií. Mezi periferní neuropatie, které připadají pro léčení molekulami podle tohoto vynálezu, patří neuropatie indukované traumatem, neuropatie způsobené fyzikálním poškozením nebo patologickým stavem, fyzickým poškozením mozku, fyzickým poškozením míchy, mrtvice asociovaná s poškozením mozku a neurologické patologické stavy asociované s neurodegenerací. Také jsou zde zahrnuty neuropatie následující po infekci, působení toxinu nebopůsobení léku. Dále jsou zde zahrnuty ty neuropatie, které jsou druhotné při systémovém nebo metabolickém onemocnění.

Přípravky popsané v předkládané přihlášce mohou také být použity k léčení neuropatií indukovaných chemoterapií (jako například způsobených aplikací chemoterapeutického přípravku,

např. taxolu nebo cisplatiny), neuropatie indukované toxiny, neuropatie indukované léčivy, neuropatie indukované nedostatkem vitamínů, idiopatické neuropatie a diabetické neuropatie. Viz např. US Patenty 5,496,804 a 5,916,555, z nichž každý je v tomto textu zahrnut formou odkazu.

Další nemoci a patologické stavy, které mohou být léčeny s použitím přípravků popsaných v předkládané přihlášce jsou mono neuropatie, mono-multiplex neuropatie a poly-neuropatie včetně axonální a demyelinizační neuropatie, s použitím přípravků podle vynálezu.

V dalších výhodných provedení se přípravky podle vynálezu (a farmaceutické přípravky, které je obsahují) používají při léčení různých nemocí oka, včetně ztráty fotoreceptorů na sítnici u pacientů postižených makulární degenerací, retinitida pigmentosa, glaukomem a podobnými nemocemi.

Vynález je ještě dále podrobněji znázorněn a vysvětlen pomocí následujících ilustrativních příkladů, které nijak neomezují rozsah vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Biologická dostupnost neublastinu pegylovaného na N-konci

Bylo pozorováno, že humánní rekombinantní neublastin získaný produkcí z CHO buněk byl rychle odstraňován z oběhu, jestliže byl podáván intravenózně laboratornímu potkanu. Žádný protein nebyl detekován v séru po subkutánním podání. Pro

zvýšení biologické dostupnosti neublastinu byly konstruovány pegylované formy.

Protože se v sekvenci NBN nevyskytoval žádný lysin, amin-specifický pegylační chemický postup vedl k pegylaci NBN polypeptidu na jeho aminokonci. Takže na každý neublastinový dimer měly být připojeny dvě PEG skupiny. V souladu s tím PEG formy byly nejdříve přímo cíleny na N-konec prostřednictvím amino-specifického chemického postupu. Překvapivě, pegylace dokonce se dvěma navázanými 20K PEG měla malý účinek na prodloužení biologického poločasu, což ukazuje na to, že mechanismus, na kterém je založná dráha clearance, převládá nad zvýšením poločasu, které mělo být dosaženo pegylací.

Příklad 2

Konstrukce pegylovaného muteinu neublastinu N95K

Biologická dostupnost pegylované formy NBN mutované v interním aminokyselinovém zbytku byla následně zkoumána. Série čtyři substitučních mutant se substitucemi přirozeně se vyskytujícími aminokyselin v polohách 14, 39, 68 a 95 byla zkonstruována tak, že do uvedených poloh v sekvenci byl vložen lysin. Tyto lysiny pak poskytly alternativní místa pro navázání PEG. Uvedená místa byla vybrána s využitím krystalové struktury GDNF (Nat. Struct. Biol. 4: 435-8, 1997) jakožto podkladu ke stanovení zbytků vyskytujících se na povrchu, a na základě výzkumu mutagenese chiméry persefin/neublastin (J. Biol. Chem. 275: 3412-20, 2000) vedoucímu k poznání funkčně důležitých úseků struktury, kterým je třeba se vyhnout.

Dvě mutace (R39 a R68) byly cíleny v úseku, který na

základě distribuce pozitivního náboje na povrchu, by mohl představovat heparinové vazebné místo, což je vlastnost proteinu, která by mohla pravděpodobně připívat k rychlé clearance. Třetí místo byl cíleno na N95, přírodní místo glykosylace u NBN divokého typu. Toto místo je přirozeně modifikováno komplexní sacharidovou strukturou. Proto se očekávalo, že modifikace PEG tohoto místa nebude mít žádný dopad na funkci. Čtvrté místo (R14) bylo vybráno v úseku, který nebyl pokryt žádnou jinou modifikací. Mutanta, kde asparaginový zbytek v poloze 95 byl nahrazen lysinem ("mutanta N95K") byla zvolena pro zkoumání popisované v následujících příkladech.

Byly zkonstruovány čtyři různé muteiny neublastinu laboratorního potkana obsahující jednu nebo více změn v sekvenci polypeptidu neublastinu divokého typu laboratorního potkana. Byl to mutein N95K a muteiny obsahující jednoduchou substituci v dalším místě aminokyselinové sekvence neublastinu laboratorního potkana: R14K, R68K a R39K. Podle " $X_1N_1X_2$ " názvosloví X_1 označuje aminokyselinu divokého typu polypeptidu neublastinu, N_1 označuje numericky polohu aminokyseliny X_1 v sekvenci, a to podle sekv. id. č. 1. X_2 označuje aminokyselinu, kterou byla substituována původní aminokyselina divokého typu v označené poloze sekvence.

Pro konstrukci mutanty neublastinu laboratorní potkana N95K, byla prováděna místně cílená mutageneze na pCMB020, plazmidu kódujícím neublastin laboratorní potkana divokého typu. Sekvence nukleové kyseliny kódující polypeptid neublastin laboratorního potkana a aminokyselinová sekvence polypeptidu divokého typu jsou prezentovány níže:

1 ATGGAAGTGG GACTTGGAGA GCCTACTGCA TTGTCCCACT GCCTCCGGCC
 51 TAGGTGGCAA CCAGCCTTGT GGCCAACCTT AGCTGCTCTA GCCCTGCTGA
 101 GCAGCGTCAC AGAAGCTTCC CTGGACCCAA TGTCCCGCAG CCCCGCCTCT
 151 CGCGATGTTT CCTCGCCGGT CCTGGCGCCC CCAACAGACT ACCTACCTGG
 201 GGGACACACC GCACATCTGT GCAGCGAAAG AGCCCTGCGA CCACCGCCGC
 251 AGTCTCCTCA GCCCGCACCC CCACCACCGG GTCCCGCGCT CCAGTCTCCT
 301 CCCGCTGCGC TCCGCGGGGC ACGCGCGGCG CGTGCAGGAA CCCGGAGCAG
 351 CCGCGCACGG GCTACAGATG CGCGCGGCTG CCGCCTGCGC TCACAGCTGG
 401 TGCCGGTGAG CGCTCTCGGC CTGGGCCACA GCTCCGACGA GCTGATACGT
 451 TTCCGCTTCT GCAGCGGTTT GTGCCGCCGA GCACGCTCCC CGCAGCATCT

 501 CAGCCTGGCC AGCCTGCTGG GCGCCGGGGC CCTGCGGTCT CCTCCCGGGT
 551 CCCGCGCGAT CAGCCAGCCC TGTGCGGCG CCACTCGCTA TGAGGCAGTC
 601 TCCTTCATGG ACGTGAACAG CACCTGGAGA ACCGTGGACC ATCTCTCCGC
 651 CACCGCCTGC GGCTGTCTGG GCTGA (sekv. id. č. 5)

1 MELGLGEPTA LSHCLRPRWQ PALWPTLAAL ALLSSVTEAS LDPMSRSPAS
 51 RDVPSPVLAP PTDYLPGGHT AHLCSERALR PPPQSPQAP PPPGPAQSP
 101 PAALRGARAA RAGTRSSRAR ATDARGCLR SQLVPVSALG LGHSSDELIR
 151 FRFCSGSCRR ARSPHDLSLA SLLGAGALRS PPGSRPISQP CCRPTRYEAV
 201 SFMDVNSTWR TVDHLSATAC GCLG* (sekv. id. č. 4)

Mutageneze pCM020 s použitím oligonukleotidů KD2-310 a KD3-211 vedla k vytvoření plazmidu pCMB027:

KD2-310 5'-GTATCTTTCATGGACGTAAAGTCTACATGGAGAACCGTAGATCATCTATCTGCAACC-
 3' (sekv. id. č. 6)

KD2-311 5'-GGTTGCAGATAGATGATCTACGGTTCTCCATGTAGACTTTACGTCCATGAAAGATAC-
 3' (sekv. id. č. 7)

V pCMB027 byl kodon kódující asparagin v poloze 95 nahrazen kodonem kódujícím lysin.

Mutein neublastinu R14K byl vytvořen nahrazením kodonu kódujícího arginin v poloze 14 kodonem kódujícím lysin v kódující sekvenci neublastinu z pCMB020. Místně cílená mutageneze byla provedena na pCMB020 s použitím oligonukleotidů KD3-254 a KD3-255:

KD3-254 5'-GCTGGAACTCGCAGCTCTCGTGCTCGTGCAACGGATGCAAAAGGCTGTCG-3'
(sekv. id. č. 8)

KD2-255 5'-CGACAGCCTTTTGCATCCGTTGCACGAGCACGAGAGCTGCGAGTTCAGC-3'
(sekv. id. č. 9)

Výsledný konstrukt byl nazván pCMB029.

Mutein neublastinu R68K byl vytvořen nahrazením kodonu kódujícího arginin v poloze 68 kodonem kódujícím lysin v kódující sekvenci neublastinu z pCMB020. Místně cílená mutageneze byl provedena na pCMB020 s použitím oligonukleotidů KD3-258 a KD3-259:

KD3-258 5'-GGAGCCGGAGCACTAAAATCTCCCCGGGATCTAGACC-3' (sekv. id. č. 10)

KD3-259 5'-GGTCTAGATCCCCGGGGGAGATTTTAGTGTCTCCGGCTCC-3' (sekv. id. č. 11)

Výsledný konstrukt byl nazván pCMB030.

Mutein neublastinu R39K byl vytvořen nahrazením argininu v aminokyselinové poloze 39 lysinem v kódující sekvenci neublastinu z pCMB020. Místně cílená mutageneze pCMB027 byla provedena s použitím oligonukleotidů KD3-256 a KD3-257:

KD3-256 5'-GACGAATTAATTAAGTTTCGTTTTGTTTCAGG-3' (sekv. id. č. 12)

KD3-257 5'-CCTGAACAAAAACGAAACTTAATTAATTCGTC-3' (sekv. id. č. 13)

Pro expresi a purifikace byl plazmid kódující mutein NBN N95K laboratorního potkana exprimován v *E.coli* jako His-začtený ("His-tagged") fúzní protein s enterokinázovým štěpným místem bezprostředně sousedícím s počátkem 113 aminokyselinové sekvence zralého NBN. *E.coli* byly pěstovány v 500 l fermentoru a byla tak získána zmražená buněčná hmota (pasta). Buňky *E.coli* byly lyzovány v lisu Manton Gaulin a NBN NK laboratorního potkana byl izolován z promyté nerozpustné peletované frakce.

NBN byl extrahován z peletu hydrochloridem guanidinia, svinut a his-začka byla odstraněna enterokinázou. Produkt pak byl podroben chromatografii na Ni NTA agaróza (Qiagen) a na kationtové výměnné pryskyřici Bakerbond WP CBX.

Působení enterokinázy na His-začtený produkt vedlo k aberantnímu štěpení proteinu v poloze argininu 7 zralé sekvence. Výsledný produkt desl-7 NBN byl plně aktivní při testování v KIRA ELISA a strukturálně byl nerozeznatelný od zralé formy pokud jde o citlivost ke guanidinem indukované denaturaci, a proto byl použit i pro následující zkoušky.

NBN N95K laboratorního potkan byl pegylován v průměru 3,3 PEG skupinami na 1 molekulu s použitím methoxypoly(ethylen-glykol)sukcinimidylpropionátu (SPA-PEG) s molekulovou hmotností 10000 Da jakožto reaktantu. Výsledný pegylovaný produkt byl podroben rozsáhlé charakterizaci včetně analýz jako je SDS-PAGE, vylučovací chromatografie (SEC), reverzní fázová HPLC, laserová desorpce pomocí matrice/hmotová

spektrometrie (MALD/IMS), peptidové mapování, hodnocení aktivity v KIRA ELISA a stanovení obsahu endotoxinu

Čistota produktu NBN N95K před pegylací, měřená pomocí SDS-PAGE a SEC byl vyšší než 95%. Produkt NBN N95K se pohyboval v neredukujících podmínkách jako dimer, v souladu s předpovězenou strukturou. Po pegylaci výsledný produkt sestával ze série modifikovaných adičních sloučenin obsahujících v 5 % produktu 2 PEG/molekula, v 60 % produktu 3 PEG/molekula, ve 30 % produktu 4 PEG/molekula a několik méně zastoupených forem s vyšší hmotností. V pegylovaném vzorku nebyly prokázány agregáty. Reziduální hladina nemodifikovaného NBN v produktu byla pod hranicí kvantifikační metody. Obsah endotoxin v získaném materiálu byl rutinně méně než 1 EU/mg. Specifická aktivita pegylovaného NBN stanovená testem KIRA ELISA je 10 nM. Pegylovaný produkt byl formulován v PBS pH 6,5 na koncentraci 1,1 mg/ml. Látka, který je podobná účinností wt-NBN může být dodávána jako zmražená kapalina a skladuje se v -70°C.

Muteiny R14K, R39K a R68K byly exprimovány v *E. coli* a byly podrobeny stejným metodám purifikace, pegylace a testování funkce, jak byly popsány výše pro N95K-NBN.

Příprava pegylovaného NBN

230 ml renaturovaného ("refolded") NBN N95K laboratorního potkana (2,6 mg/ml), který byl připraven v *E. coli* a uložen ve 4 °C v pufu: 5 mM fosforečnan sodný pH 6,5, 100 mM NaCl, byl naředěn 77 ml vody, 14,4 ml IMA HEPES pH 7,5 a 2,8 g (10 mg/ml výsledná koncentrace) PEG SPA 10000 Da (od firmy Shearwater Polymers, Inc.). Vzorek byl inkubován při teplotě místnosti po dobu 4 hodin ve tmě, pak byl ošetřen 5 mM imidazolem (výsledná koncentrace), filtrován a uložen přes noc ve 4 °C. Produkt byl

tvořen ve dvou várkách, jedna obsahovala 130 ml NBN N95K surového produktu a druhá obsahovala 100 ml surového produktu. Pegylovaný NBN byl purifikován z reakční směs pomocí Fractogel EMD SO_3^- (AQ (EM Industries)). Kolona byla provozována při teplotě místnosti. Všechny pufrы byly připraveny bez pyrogenů ("pyrogen free"). Chlorid sodný byl přidán do reakční směs na konečnou koncentraci 87 mM a vzorek byl nanesen na 45 ml kolonu Fractogel (vnitřní průměr 5 cm).

Kolona byla promyta jedním objemem pufru: 5 mM fosforečnan sodný pH 6,5, 80 mM NaCl, pak třemi objemovými alikvoty objemu kolony pufru: 5 mM fosforečnan sodný s 50 mM NaCl. Pryskyřice pak byla přenesena do kolony s průměrem 2,5 cm a pegylovaný NBN byl eluován z kolony v šesti krocích po 10 ml s 5 mM fosforečnanem sodným pH 6,5, 400 mM NaCl, třech krocích obsahujících 500 mM NaCl a šesti krociCH obsahujícíCH 600 mM NaCl. Eluované frakce byly analyzovány na obsah proteinu měřením absorbance ve 280 nm a pak na rozsah modifikací pomocí SDS-PAGE. Vybrané frakce byly sloučeny, filtrovány přes 0,2 μm filtr a naředěny vodou na 1,1 mg/ml pegylovaného NBN laboratorního potkana. Po vyhodnocení hladiny endotoxinu v jednotlivých várkách byly sloučeny a znovu filtrovány přes 0,2 μm membránu. Výsledný materiál byl rozdělen do alikvotů a uložen v -70°C .

UV spektrum purifikovaného pegylovaného NBN NK

UV spektrum (240-340 nm) pegylovaného NBN NK bylo změřeno na čistém vzorku. Vzorek byl analyzován ve třech opakováních. Pegylovaný vzorek vykazoval maximum absorbance ve 275-277 nm a minimum absorbance při ve 247-249 nm. Tento výsledek je ve shodě s tím, co bylo pozorováno pro nemodifikovaný surový meziprodukt NBN. Koncentrace proteinu v preparátu pegylovaného

produktu byla odhadnuta ze spektrum použitím extinkčního koeficientu $\Sigma_{280}^{0,1\%}=0,50$. Koncentrace proteinu ve vzorku pegylovaného NBN byla 1,1 mg/ml. Žádné zakalení (turbidita) nebylo ve vzorku pozorováno, jak dokazuje deficit absorbance ve 320 nm.

Charakterizace pegylovaného NBN NK pomocí SDS-PAGE

Alikvoty z preparátu pegylovaného NBN obsahující 3, 1,5, 0,75 a 0,3 μ g produktu byly podrobeny analýze SDS-PAGE na gradientovém gel 4-20% (Owl). Gel byl obarven Coomassie brilantní modří R-250. Paralelně byl na tomtéž gelu rozdělen standard molekulové hmotnosti (GIBCO-BRL).

SDS-PAGE analýza pegylovaného NBN NK v neredukujících podmínkách odhalila sérii pásů odpovídajících modifikacím se 2, 3, 4 a více než 4 PEG na 1 molekulu. Hlavní pás se zjevnou hmotností 98 kDa obsahoval 3 PEG/molekula. V purifikovaném pegylovaném produktu nebyl nemodifikovaný NBN detekován. Přítomnost směsi produktů se 2, 3 a 4 navázanými PEG byla ověřena MALDI hmotovou spektrometrickou analýzou. Podíl produktů obsahujících 2, 3 a 4 PEG byl určen pomocí densitometrie na 7, 62 a 30 % z celkového preparátu, v daném pořadí.

Charakterizace pegylovaného NBN vylučovací chromatografií

Pegylovaný NBN byl podroben analýze vylučovací chromatografií ("size exclusion chromatography") na analytické koloně Superose 6 HR10/30 FPLC s použitím mobilní fáze: 5 mM MES pH 6,5, 300 mM NaCl. Průtok kolonou byl 20 ml/hod. Eluované frakce byly monitorovány měřením absorbance v 280 nm. Pegylovaný NBN eluovaný jako jediný vrchol se zjevnou

molekulovou hmotností přibližně 200 kDa byl v souladu s velkým hydrodynamickým objemem PEG. Nebyly pozorovány žádné důkazy výskytu agregátů. V preparátu byl zaznamenán volný NBN, který se eluoval se zjevnou molekulovou hmotností přibližně 30 kDa.

Analýza pegylovaného NBN pomocí HPLC s reverzní fází

Pegylovaný NBN NK byl podroben analýze na HPLC koloně s reverzní fází Vydac C₄ (5 µm, 1 x 250 mm). Kolona byla vyvolána s použitím 60 mm gradient 40 až 60% pufru B (Pufra A: 0,1 % TFA, Pufra B: 75% acetonitril/0,085% TFA). Pufra po průtoku kolonou byl monitorován na absorbanci ve 214 nm a byly odebírány frakce pro následné analýzy. Pegylovaný NBN NK byl frakcionován na di- (60,5 mm), tri- (63,3 mm) a tetra- (67,8 mm) pegylované komponenty užitím HPLC s reverzní fází na koloně C₄. Relativní intenzity vrcholů ukazují, že poměry uvedených složek jsou 5,4, 60,5 a 30,1 %, v daném pořadí. Identity vrcholů byly ověřeny pomocí MALDI-MS. Nevyskytl se žádný důkaz přítomnosti nepegylovaného NBN NK (eluáty v 5 až 15 mm) v produktu.

Analýza pegylovaného NBN hmotovou spektrometrií

Pegylovaný NBN NK byl odsolen pomocí špičky Ca Zip Tip a pak analyzován hmotovou spektrometrií na spektrometru Voyager-DE™ STR (PerSeptive Biosystems) pro analýzu MALDI-TOF ("matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight") s použitím sinapinové kyseliny jakožto matrice. 0,5 µl purifikovaného proteinu byl smícháno s 0,5 µl matrice na cílové destičce. Hmotová spektrometrie pegylovaného NBN ukázala jednoduše a dvojitě nabitě formy třech adičních sloučenin. Pozorované hmotnosti 43803 Da, 54046 Da a 64438 Da

jsou v souladu s modifikacemi typu 2, 3 a 4 PEG/molekula.

Analýza pegylovaného NBN peptidovým mapováním

Specifita pegylační reakce byla vyhodnocena pomocí peptidového mapován. Pegylovaný NBN byl rozdělen na di-, tri- a tetra-pegylované komponenty, které pak byly redukovány, alkylovány a dále děleny na jednotlivé složky pomocí HPLC na koloně C₄. Tyto složky, společně s redukováným a alkylovaným nemodifikovaným NBN NK jakožto kontrolním vzorkem, byly štěpeny Asp-N proteinázou a výsledné štěpné produkty byly frakcionovány HPLC s reverzní fází na koloně Vydac₁₈ (5 µm, 1 x 250 mm) s použitím 60 mm gradientu 0 až 60% B (Pufr A: 0,1% TFA, Pufr B: 75% acetonitril, 0,085% TFA). Pufr proteklý kolonou byl monitorován na absorbance ve 214 nm.

Sekvence NBN laboratorního potkana obsahuje čtyři interní zbytky asparagové kyseliny a proto se očekával jednoduchý profil po štěpení endoproteinázou Asp-N. Všechny vrcholy NBN NK laboratorního potkana po štěpení Asp-N byly identifikovány hmotovou spektrometrií a/nebo Edmanovým N-koncovým sekvencováním a tak mohla být peptidová mapa použita jako jednoduchý nástroj ke zjišťování míst modifikace na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti vrcholu. Totožnost různých vrcholů je v přehledu uvedena v následující tabulce 3.

Tabulka 3

Vrchol dle retenčního času (mm)	Průměrná hodnota pozorované hmotnosti	Průměrná hodnota teoretické hmotnosti	Přiřazení	Aminokyselinová sekvence
38,8	1261,1 (M)	1262,4	102-113	DHLSATACGCLG
40,7	1090,9	1092,2	93-101	DVKSMRTV
44,6	2508,4	2508,9	35-54	DELJRPRFCSGSCRRARSPH
46,0	2437,0	2437,8	12-34	DARGCRLRSQ LVPVSALGLGHSS
51,4	3456,7	3456,0	55-86	DLSLAS...CRPIRY
51,9	4134,4		55-92 (oxid)	DLSLAS CRPTRYEAVSFM
53,2	4136,3*	4120,8	55-92	DLSLAS CRPTRYEAVSFM

(M): monolostop. hmota

*: z důvodu oxidace peptidu obsahujícího methionin v MALDI

Protože NBN existuje jak homodimer, produkt NBN NK laboratorního potkana obsahuje čtyři potenciální místa pro pegylaci, dva N-koncové aminy z každého řetězce a dvě místa N95K, který byla do konstruktu vnesena genetickou manipulací. V peptidové mapě dipegylovaného řetězce pouze vrchol, který obsahuje peptid s NK mutací byl změněn PEG modifikací. Žádný z ostatních vrcholů nebyl zasažen PEG modifikací. Mapová data proto ukazují, že skupina PEG je specificky připojena právě k tomuto peptidu a ne k některému jinému peptidu z peptidů podrobených screeningu. Druhé potenciální místo připojení, a sice N-konec, je na peptidu, který je pouze dlouhý pouhé tři aminokyseliny a nebyl detekován v peptidové mapě. Z toho se odvozuje, že jsou zde další PEG vazebná místa. V souladu s tím je skutečnost, že malé procento NBN NK laboratorního potkana

není zkráceno a obsahuje zralou Ala-1 sekvence. Tento peptid se eluoval ve 30 μ m a je viditelný v peptidové mapě ze štěpení nepegylovaného produktu, ale chybí v mapě ze štěpení pegylovaného NBN NK.

Příklad 3

Hodnocení funkčnosti interně pegylovaného neublastinu v aktivaci kinázového receptoru (KIRA) ELISA

Funkčnost pegylovaného NBN laboratorního potkana byla měřena s použitím na NBN závislé aktivace/fosforylace c-Ret jakožto reportérového genu pro NBN aktivitu v ELISA testu, který byl specifický na přítomnost fosforylované formy RET. Buňky NB41A3-MRL, adherentní myší neuroblastomová buněčná linie, která exprimuje Ret a GFR α 3, byly vysety na 24 jamkové destičky v množství 2 x 10⁵ buněk na jamku, v Dulbecco modifikovaném Eagleho médiu (DMEM), doplněném 10% fetálním bovinním sérem, a byly pěstovány po dobu 18 h v 37 °C a 5 % CO₂.

Buňky pak byly promyty PBS a ošetřeny sériovým ředěním NBN v 0,25 ml DMEM po dobu 10 minut ve 37 °C a 5 % CO₂. Každý vzorek byl analyzován ve dvou opakováních. Buňky byly promyty 1 ml PBS a lyzovány po dobu 1h ve 4 °C s 0,30 ml pufru: 10 mM Tris HCl, pH 8,0, 0,5 % Nonidet P40, 0,2 % deoxycholát sodný, 50 mM NaF, 0,1 mM Na₃VO₄, 1 mM fenylmethylsulfonylfluoridu, za jemného kývání destiček. Lyzáty byly dále promíchány opakovaným pipetováním a 0,25 ml vzorek byl přenesen na 96-jamkovou ELISA destičku, která byla potažena 5 mg/ml anti-Ret monoklonální protilátkou (mAb) (AA.GE7.3) v 50 mM

uhličitanovém pufru, pH 9,6 ve 4°C po dobu 18 h, a blokována při teplotě místnosti jednu hodinu blokovacím puforem (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20 (TBST) obsahující 1 % normální myší sérum a 3 % hovězí sérový albumin).

Po 2 hodinách inkubace při teplotě místnosti byly jamky promyty šestkrát TBST. Fosforylovaný Ret byl detekován tím, že se inkubovaly jamky při teplotě místnosti po dobu 2 hodin s 2 mg/ml konjugátu křenové peroxidázy (HRP) s protilátkou anti-fosfotyrosin 4G10 v blokovacím pufru, promyly šestkrát TBST a měřila se aktivita HRP ve 450 nm kolorimetrickým detekčním činidlem. Hodnoty absorbance jamek ošetřených lyzátem nebo s lyzačním puforem byly měřeny a odečtený signál korigovaný na hodnotu pozadí byl vynesena do grafu jako funkce koncentrace NBN přítomné v aktivační směsi. Funkčnost pegylovaného NBN v testu KIRA ELISA byla 10 nM, kterážto hodnota je nerozeznatelná od výchozí NBN NK. Nebyl patrný žádný účinek dvou cyklů mrznutí-tání na funkčnost a po tomto ošetření nedošlo k žádnému významnému zvýšení turbidity vzorku, což ukazuje, že vzorky mohou pro tuto studii bezpečně roztávat. V nezávislé studii, kde se byla samostatně hodnocena aktivita produktu se třemi a čtyřmi 10 kDa PEG/molekula, bylo zjištěno, že adiční sloučenina se třemi PEG plně funkční, zatímco produkt se čtyřmi PEG měl sníženou aktivitu.

Příklad 4

Farmakokinetické studie interně pegylovaného neublastinu laboratorního potkana a myši

Farmakokinetické vlastnosti různých pegylovaných a

nepeglylovaných NBN produktů byly zkoumány na modelu laboratorního potkana a myši.

Data ukázala, že pegylovaný NBN NK laboratorního potkana s 3,3 x 10000 Da PEG projevoval významný účinek biologický poločas a biologickou dostupnost neublastinu. Po i.v. podání 1 mg/kg potkanům Sprague Dawley byl vrchol hladiny 3000 ng/ml pegylovaného NBN detekován po 7 minutách, hladiny 700 ng/ml po 2,4 hod., 200 ng/ml po 48 hod. a 100 ng/ml po 72 hodinách. Na rozdíl od toho pro nepegylovaný NBN po i.v. podání 1 mg/kg vrchol hladiny 1500 ng/ml byl detekován po 7 minutách, ale pak hladiny rychle klesly až do 70 ng/ml po 3 hod. a žádný vrchol nebyl detekovatelný po 7 hod. Účinky pegylace byly ještě více vyjádřeny u zvířat, kterým byl pegylovaný NBN podáván subkutánním způsobem.

Po s.c. podání 1 mg/kg hladina pegylovaného NBN v oběhu dosáhla maxima 200 ng/ml po 24 hod. a zůstala na této hladině po celou dobu trvání tří denní studie. Na rozdíl od toho, žádná detekovatelná hladina NBN nebyla pozorována ani v jednom časovém bodě po podání nemodifikovaného NBN.

Analýza vzorků pegylovaného NBN byla komplikovaná pro přítomnost adičních sloučenin obsahujících 2, 3 a 4 PEG na molekulu, neboť každá vykazuje odlišný PK profil. V časných PK studiích byly užity myši pro usnadnění screeningu celé řady kandidátních sloučenin a způsobů podávání. Studie na myších odhalily dramatické rozdíly v biologické dostupnosti kandidátních sloučenin. Nicméně, když byla vyhodnocena 3,3 10 K PEG adiční sloučenina u laboratorního potkana, bylo zjištěno, že má nižší biologickou dostupnost u laboratorního potkana než u myši. Tento rozdíl v biologické dostupnosti byl konkrétně vyjádřen po i.p. podávání. Hladiny u myši dosáhly 1600 ng/ml po 7 hodinách a zůstaly na 400 ng/ml po 24 hodin.

Na rozdíl od toho hladiny u laboratorního potkana byly konstantní na 100 ng/ml po dobu 4 až 48 hodin.

Neublastin divokého typu (wt-NBN) laboratorního potkana a neublastin s Asn-Lys substitucí v poloze 95 (NK-NBN) byly svinuty („refolded“) a purifikovány na čistotu >95 % pro testy aktivity na modelu STZ diabetické neuropatie u laboratorního potkana. Wt-NBN byl formulován přímo pro testování na zvířatech, zatímco NK-NBN byl připraven pro pegylaci s 10 kDa PEG-SPA. Pro uskutečnění refoldingu a purifikace byla vyvinuta metoda užívající vylučovací chromatografii (SEC), která dovolila renaturaci NBN z inkluzních tělísek *E.coli* ve velkém množství a v vysoké koncentraci. Kromě SEC byly užity kroky sloupcové chromatografie na Ni-NTA a CM křemičitanové koloně pro zvýšení čistoty proteinu. Proteiny pak byly podrobeny rozsáhlé charakterizaci včetně analýzy SDS-PAGE, vylučovací chromatografie, ESMS, hodnocení aktivity v KIRA ELISA a stanovení obsahu endotoxinu. SDS-PAGE a SEC konečných proteinů ukázaly čistotu vyšší než 95 %. Endotoxinová hladina každého produktu byla < 0,2 EU/mg. Specifická aktivita obou proteinů v KIRA ELISA byla přibližně 10 nM. Wt-NBN byl formulován na 1,0 mg/ml a NK-NBN byl formulován na 2,6 mg/ml ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfáty (PBS) pH 6,5. wt-NBN byl rozdělen na alikvoty do 15 ml zkumavek a uložen v -70 °C, zatímco NK-NBN byl podroben pegylaci a pak byly alikvoty zmrazeny.

Příklad 5

Svinutí („refolding“) neublastinu divokého typu a muteinu N95K neublastinu

Obě formy NBN byly exprimovány v *E. coli* jako fúzní

proteiny označené His („His-tagged“) s enterokinázovým štěpným místem bezprostředně sousedícím se začátkem zralé 113 aminokyselinové sekvence. Baktérie exprimující buďto Wt- (1,8 kg pelet) nebo NK-NBN (2,5 kg pelet) byly podrobeny lýzi ve 2 litrech PBS s použitím Gaulinova lisu. Po peletaci inkluzních tělísek centrifugací (10000 rpm), byly supernatanty z každého preprátu odstraněny. Pelety inkluzních tělísek byly promyty dvakrát v pufru (0,02M Tris-HCl pH 8,5, 0,5 mM EDTA), pak promyty dvakrát ve stejném pufru obsahujícím Triton X-100 (2%, objem/objem), a pak následovala 2 promytí puftrem bez detergentu: Oba pelety byly solubilizovány s použitím 6M hydrochlorid guanidinu, 0,1M Tris pH 8,5, 0,1M DTT a 1 mM EDTA. Pro usnadnění solubilizace byl každý pelet podroben homogenizaci s použitím polytronového homogenizátoru, po které následovalo míchání přes noc při teplotě místnosti. Solubilizované proteiny byly projasněny centrifugací před denaturační chromatografií na Superdex 200 (5,5 l kolona ekvilibrována s 0,05M glycin/H₃PO₄ pH 3,0 s 2M guanidin-HCl) při průtoku 20 ml/minuta.

Denaturovaný NBN byl identifikován pomocí SDS-PAGE. Frakce obsahující buď Wt-NBN nebo NK-NBN byly sloučeny a koncentrovány přibližně do 250 ml s použitím míchaného buněčného koncentrátoru Amicon o objemu 2,5 litru. Po odstranění precipitátu filtrací koncentrovaný protein byl podroben renaturační chromatografii přes Superdex 200 ekvilibrováný 0,1 M Tris-HCl pH 7,8, 0,5M guanidin-HCl, 8,8 mM redukovaný glutathion a 0,22 mM oxidovaný glutathion. Kolona byl vyvolán s použitím 0,5M guanidin-HCl při průtoku 20 ml/minuta. Frakce obsahující renaturovaný wt-NBN nebo NK-NBN byly identifikovány pomocí SDS-PAGE, sloučeny a uloženy ve 4 °C do okamžiku potřeby pro odstranění značky His.

Koncentrace NBN chromatografií Ni-NTA (TR5919-138)

Renaturovaný NBN byl uložen ve 4 °C po dobu alespoň 24 hodin před procesem purifikace, aby se podpořilo vytvoření disulfidických vazeb mezi monomery NBN. Během této doby se vytvořil precipitát, který byl odstraněn filtrací přes 0,2 µ PES filtrační jednotku. Pro zeslabení nespecifické vazby byl proteinový roztok vnesen do 20 mM imidazolu před nanesením na 100 ml Ni-NTA (Qiagen) kolonu ekvilibrovanou kolonovým pufrem (0,5M guanidin a 20 mM imidazol) při průtoku 50 ml/minuta. Po nanesení proteinu byla kolona promyta na bazální hodnotu s použitím stejného pufru. NBN byl eluován z pryskyřice použitím přibližně 300 ml elučního pufru obsahujícího 0,5M guanidin-HCl a 0,4M imidazol. Po eluci byl NBN dialyzován přes noc (s použitím 10 kDa dialyzačního střeva) při teplotě místnosti proti deseti objemům 5 mM HCl. Dialýza podporovala hydrolýzu kontaminujících látek a snížila koncentrace guanidin-HCl a imidazolu na 0,05M a 0,04M, v daném pořadí.

Štěpení značky His lysylendopeptidázou nebo enterokinázou

Následující den byl jakýkoliv precipitát vytvořený během dialýzy odstraněn filtrací. Proteinový vzorek byl nastaven na 0,1 M NaCl přidáním 5M zásobního roztoku, přičemž konečná koncentrace soli zahrnovala zbývající guanidin-HCl přibližně ve výši 150mM. Tato koncentrace byla potvrzena měřením vodivosti. Dále byl přidán 1 M HEPES pH 8 na konečnou koncentraci 25 mM. Pro odštěpení značky His byla přidána lysylendopeptidáza k wt-NBN a enterokináza k NK-NBN, obě přibližně v poměru 1:300 proteáza:NBN. Enterokináza byla použita místo lysylendopeptidázy pro NK-NBN kvůli dalšímu proteázovému štěpnému místu v mutovaném proteinu Lys95. Vzorky byly míchány při teplotě místnosti po dobu 2 hodin a štěpení

bylo monitorováno pomocí SDS-PAGE.

Odstranění značky His Ni-NTA chromatografií

Proteázou ošetřený NBN byl nanesen na 100 ml Ni-NTA kolonu ekvilibrovanou 0,5M guanidin-HCl a 20 mM imidazolem při 50 ml/minuta. Kolona byla promyta na bazální hodnotu stejným pufrem. Všechny proteiny získané po promytí kolony byly sloučeny s proteinem proteklým kolonou obsahujícím NBN bez His značky.

Chromatografie na CM oxidu křemičitém

Po Ni-NTA chromatografii byl protein okamžitě podroben další purifikaci přes CM oxid křemičitý. 20 ml kolona s CM oxidem křemičitým ekvilibrovaná nanášecím pufrem (5 mM fosfát pH 6,5, 150 mM NaCl) byla naplněna NBN při 20 ml/minuta. Kolona byla promyta dvaceti objemy kolony promývacího pufru (5 mM fosfát pH 6,5, 400 mM NaCl) a protein byl postupně eluován elučním pufrem obsahujícím 5 mM fosfát pH 6,5, ale s 1 M NaCl. Eluovaný protein byl dialyzován přes noc proti fosfátu samotnému, aby se snížila koncentrace soli na 100 mM pro NK-NBN a 150 mM pro wt-NBN. Oba vzorky byly filtrovány přes 0,2µm PES filtrační jednotku, analyzovány pomocí SDS-PAGE a uloženy ve 4 °C až do okamžiku potřeby pro další charakterizaci a/nebo pegylaci.

Wt-NBN a NK-NBN byly podrobeny UV spektrální analýze pro vyhodnocení jejich absorbance ve 280 nm. S použitím křemenné mikrokvetky a proti samotnému pufru bylo kontinuálně skenováno 100 µl buďto wt-NBN nebo NK-NBN v rozsahu 230 až 330 nm s použitím spektrofotometru Beckman. Na základě této analýzy byla stanovena koncentrace Wt-NBN na 1,1 mg/ml a

NK-NBN na 2,6 mg/ml ($A_{280\text{ nm}} - E^{0,1\%} = 0,5$ bylo užito použit pro každý protein). Méně než 1 % precipitované látky bylo identifikováno na základě absorbance ve 330 nm.

Pro hodnocení čistoty obou proteinových preparátů byl každý vzorek (0,5 mg) podroben vylučovací chromatografii přes kolonu 16/30/Superdex 75. Kolona byla ekvilibrována 5mM fosfátem pH 6,5 obsahujícím 400 mM NaCl a vyvolána při průtoku 1,5 ml/minuta. Na základě absorbance ve 280 nm, oba wt- a NK-NBN se pohybovaly jako jednoduchý vrchol s očekávanou molekulovou hmotností (23-24 kDa) a neobsahovaly žádné významné proteinové kontaminace.

Jak wt-NBN tak i NK-NBN byly redukovány ve 2,5 M guanidin-HCl, 60 mM Tris pH 8,0 a 16 mM DTT. Redukované vzorky byly odsolovány přes krátkou C_4 kolonu a analyzovaný on-line ESMS s použitím trojitého čtyřpólového zařízení. Hrubá ESMS data byla dále zpracována programem MaxEnt pro vytvoření hmotnostního spektra. Tento postup umožňuje zpracovat vícekrát získaný signál do jednoho vrcholu, který přímo odpovídá molekulové hmotnosti v kilodaltonech (kDa). Hmotností spektrum po dekonvoluci pro wt-NBN ukazovalo jako převládající druh molekulu 12046 kDa, což je ve shodě s předpovězenou molekulovou hmotností 12046,7 kDa pro formu proteinu obsahujícího 113 aminokyselin. Byla také pozorována minoritní složka (12063 kDa) pravděpodobně v důsledku přítomnosti oxidačního produktu. Tři vrcholy byly identifikovány ve vzorku NK-NBN. Hlavní složka vykazovala zjevnou molekulovou hmotnost 11345 kDa ve shodě s předpovězenou hmotností pro formu proteinu obsahující 106 aminokyselin. Další dva vrcholy měly hmotnost 11362 a 12061 kDa, zřejmě v důsledku přítomnosti NK-NBN oxidačního produktu a přítomnosti formy se 113 aminokyselinami, v daném pořadí.

Přítomnost formy se 106 a 113 aminokyselinami v preparátu NK-NBN je připisována štěpení enterokinázou. Tato proteáza od firmy Biozyme je přírodní enzymový preparát purifikovaný z telecí střevní sliznice a bylo publikováno, že obsahuje slabou kontaminaci trypsinu (0,25 ng trypsinu na 1 µg enterokinázy). Proto může trypsin působit na karboxykoncovém Arg7 v NK-NBN za vzniku převládající formy se 106 aminokyselinami. Na druhé straně, lysylendopeptidáza použitá ke štěpení Wt-NBN je jednoduchá proteázová aktivita působící na lysinovém zbytku karboxykonce obsahujícím značku His za vzniku zralé formy proteinu NBN obsahující 113 aminokyselin. Obě formy NBN, tedy se 106 a 113 aminokyselinami, jsou stejně účinné ve všech testech a chovají se podobně v guanidin-HCl zkoušce na stabilitu.

NBN aktivita byla určena podle schopností stimulovat c-Ret fosforylaci v NB41A3-MRL3 buňkách s použitím IRA ELISA testu popsaného v příkladu 3. Fosforylovaný Ret byl detekován tím, že se inkuboval (2 hodiny) zachycený receptor s fosfotyrosinovou protilátkou konjugovanou s HRP (4G10, 0,2 µg na jamku). Po inkubaci byly jamky promyty šestkrát TBST a HRP aktivita byla detekována ve 450 nm kolorimetrickým testem. Hodnoty absorbance jamky ošetřené lyzátem nebo lyzačním pufrem samotným byly měřeny, byla provedena korekce na pozadí a data byla vynesena do grafu jako funkce koncentrace neublastinu přítomného v aktivační směsi. Data ukázala, že purifikovaný NBN vedl ke vzniku fosforylovaného RET, což ukazuje, že purifikovaný NBN byl v tomto testu aktivní.

Příklad 6

Příprava konjugátu „sérový albumin-neublastin“

Neublastin divokého typu z laboratorního potkana v koncentraci 1 mg/ml v PBS byl ošetřen 1 mM sulfo-SMCC (Pierce) a odsolen, aby se odstranil nadbytek zesítovacího činidla. Protože NBN protein divokého typu obsahuje pouze jednoduchý amin na svém N-konci a žádnou volnou sulfhydrylovou skupinu, reakce se SMCC podle očekávání poskytla místně specifickou modifikaci NBN se SMCC navázaným na N-konec.

60 µg NBN-SMCC konjugátu byl inkubováno se 120 µg bovinního sérového albuminu a analyzováno na rozsah zesítení pomocí SDS-PAGE. BSA obsahuje jednu volnou SH skupinu a tudíž reakce s NBN-SMCC konjugátem podle očekávání poskytla modifikaci tohoto místa prostřednictvím maleimidu na SMCC. Za těchto podmínek byly pozorovány dva další pásy s vyšší molekulovou hmotností, které souhlasily s hmotností modifikovaného NBN s navázanou jednou molekulou BSA a se dvěma molekulami BSA, protože každá NBN molekula obsahuje dva N-konce, které mohou podstoupit reakci, a jsou tudíž ve shodě s očekáváním. Současně se vznikem těchto pásů nastal pokles v intenzitě NBN-SMCC a BSA pásů. Na základě intenzity zbývajících NBN pásů reakce proběhla ze 70 až 80 %.

Monosubstituovaný produkt byl purifikován z reakční směsi tím, že reakční směs byla podrobena kationtové výměnné chromatografii a vylučovací chromatografii na koloně Superdex 200 (Pharmacia) v podstatě shodně jak bylo popsáno pro pegylační studii popsanou výše. Frakce z kolony po gelové filtraci byly analyzovány na SDS-PAGE a frakce obsahující monosubstituovaný produkt byly analyzovány ne obsah proteinu měřením absorbance ve 280 nm. Protože hmotnost BSA je

přibližně dvakrát vyšší než neublastinu, zjevná koncentrace byl dělena 3, aby se získal NBN ekvivalent. Tato frakce byla podrobena také testu KIRA ELISA na funkčnost. IC_{50} hodnoty jak pro wt- tak i BSA konjugovaný NBN byly 3 až 6 nM, což ukázalo, že konjugace s BSA se neprojevila zhoršením funkce.

Zatímco tyto předběžné studie byly provedeny s BSA, odpovídající sérové proteiny laboratorního potkana a člověka obsahují volné SH skupiny. takže podobný přístup lze uplatnit pro vytvoření konjugátu NBN laboratorního potkana se sérovým albuminem laboratorního potkana pro provedení studie PK a účinnosti u laboratorního potkana a také humánní sérový albumin-humánní NBN pro provádění klinických zkoušek. Podobně SMCC může být nahrazen kterýmkoliv z mnoha zesítujících činidel (cross-linkerů), která obsahují aminoreaktivní skupinu na jedné straně a thiolreaktivní skupinu na druhé straně. Příkladem aminreaktivního cross-linkeru, který vkládá thiolreaktivní maleimid je AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS nebo GMBS, příkladem crosslinkeru, který vkládá thiolreaktivní haloacetátovou skupinu je SBAP, SIA, SIAB, a příkladem cross-linkeru, který poskytuje chráněnou nebo nechráněnou chráněnou thiolovou skupinu pro reakci se sulfhydrylovou skupinou za vzniku redukovatelné vazby je SPDP, SMPT, SATA nebo SATP, přičemž všechny jsou komerčně dostupné od firmy Pierce. Tyto cross-linkery jsou pouze příklady a existuje řada alternativních strategií pro spojení N-konec NBN se sérovým albuminem. Odborník by také mohl vytvořit konjugáty se sérovým albuminem, který není cílen na N-konec NBN nebo na thiolovou skupinu sérového albuminu. Fúze NBN-sérový albumin vytvořená metodami genetického inženýrství, kde gen NBN je fúzován s genem sérového albuminu na N-konci, C-konci nebo na obou koncích, by mohly být také funkční.

Způsob podle vynálezu může být rozšířen rutinními adaptacemi na jakýkoliv konjugát NBN-sérový albumin, který by poskytl produkt s prodlouženým poločasem u zvířata tudíž i u lidí.

Seznam sekvencí

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Kanonická sekvence

<220>

<221> VARIANTA

<222> (3)

<223> Kde Xaa je Gly nebo Thr

<220>

<221> VARIANTA

<222> (4)

<223> Kde Xaa je Pro nebo Arg

<220>

<221> VARIANTA

<222> (5)

<223> Kde Xaa je Gly nebo Ser

<220>

<221> VARIANTA

<222> (10)

<223> Kde Xaa je Ala nebo Thr

<220>

<221> VARIANTA

<222> (11)

<223> Kde Xaa je Ala nebo Thr

<220>

<221> VARIANTA

<222> (12)

<223> Kde Xaa je Gly nebo Asp

<220>

<221> VARIANTA

<222> (26)

<223> Kde Xaa je Arg nebo Ser

<220>
 <221> VARIANTA
 5222> (33)
 <223> Kde Xaa je Arg nebo Ser

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (38)
 <223> Kde Xaa je Val nebo Ile

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (51)
 <223> Kde Xaa je Val nebo Ile

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (53)
 <223> Kde Xaa je Pro Nebo Gln

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (69)
 <223> Kde Xaa je Pro nebo Ser

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (76)
 <223> Kde Xaa je Val nebo Ile

<220>
 <221> VARIANTA
 <222> (103)
 <223> Kde Xaa je Arg nebo 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

30.07.03

62

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
 atggaactgg gacttgaga gcctactgca ttgtcccact gcctccggcc taggtggcaa 60
 ccagccttgt ggccaaccct agctgctcta gccctgctga gcagcgtcac agaagcttcc 120
 ctggaaccaa tgtccgcag cccgcctct cgcgatgttc cctgcgcggt cctggcgccc 180


```

ccaacagact acctacctgg gggacacacc gcacatctgt gcagcgaaag agccctgcga 240
ccaccgccgc agtctcctca gcccgacccc ccaccacggg gtcccgcgct ccagtctcct 300
cccgtgcgc tccgcggggc acgcgcggcg cgtgcaggaa cccggagcag ccgcgcacgg 360
gctacagatg cgcgcggctg ccgcctgcgc tcacagctgg tgccggtgag cgctctcggc 420
ctgggcccaca gtcgcgacga gctgatacgt ttccgcttct gcagcgggtc gtgcgcgcga 480
gcaagctccc cgcacgatct cagcctggcc agcctgctgg gcgcgggggc cctgcggtct 540
cctcccgggg cccggccgat cagccagccc tgttgccggc ccactcgcta tgaggcagtc 600
tccttcattg acgtgaacag cacctggaga accgtggacc atctctccgc caccgcctgc 660
ggctgtctgg gctga .. 675

```

<210> 6

<211> 57

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: KD2-310 Oligonukleotid

<400> 6

gtatctttca tggacgtaaa gtctacatgg agaaccgtag atcatctatc tgcaacc 57

<210> 7

<211> 57

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: KD3-211 Oligonukleotid

<400> 7

ggttgcagat agatgatcta cggttctcca tgtagacttt acgtccatga aagatac 57

<210> 8

<211> 50

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: KD3-254 Oligonukleotid

<400> 8

gctggaactc gcagctctcg tgctcgtgca acggatgcaa aaggctgtcg 50

<210> 9

<211> 50

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: KD2-255 Oligonukleotid

<400> 9

cgacagcctt ttgcatccgt tgcacgagca cgagagctgc gagttccagc 50

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: KD3-258 Oligonukleotid

<400> 10

ggagccggag cactaaaatc tccccgggat ctagacc 37

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: KD3-259 Oligonukleotid

<400> 11

ggtctagatc ccgggggaga ttttagtgct ccggctcc 38

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: KD3-256 Oligonukleotid

<400> 12

gacgaattaa ttaagtttcg tttttgttca gg 32

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

30.07.03

66

<223> Popis umělé sekvence: KD3-257 Oligonukleotid

<400> 13

cctgaacaaa aacgaaactt aattaattcg tc

32

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Varianta polypeptidu neublastinu obsahující aminokyselinovou sekvenci alespoň ze 70 % identickou s aminokyselinami 8 až 113 ze sekvence uvedené v seznamu sekvencí jako sekv. id. č. 1,

za předpokladu, že varianta polypeptidu neublastinu obsahuje jednu nebo více substituovaných aminokyselin vybraných ze skupiny, kterou tvoří:

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 14 aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 39 aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 68 varianty polypeptidu, a

jakákoliv aminokyselina kromě asparaginu v poloze 95 varianty polypeptidu,

příčemž polohy aminokyselin jsou počítány podle polypeptidové sekvence uvedené jako sekv. id. č. 1.

2. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, která dále obsahuje aminokyseliny 1 až 7 ze sekv. id. č. 1.

3. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, která ve formě dimeru váže GFR α 3.

4. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, která ve formě dimeru stimuluje fosforylaci tyrosinu

polypeptidu RET.

5. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, která ve formě dimeru zlepšuje přežívání neuronů.

6. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, která ve formě dimeru zlepšuje přežívání senzorických neuronů.

7. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, která ve formě dimeru normalizuje patologické změny neuronů.

8. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, která ve formě dimeru normalizuje patologické změny senzorického neuronu.

9. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, která ve formě dimeru zlepšuje přežívání autonomních neuronů.

10. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, která ve formě dimeru zlepšuje přežívání dopaminergních neuronů.

11. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, kde varianta polypeptidu obsahuje dvě nebo více substituovaných aminokyselin vybraných ze skupiny, kterou tvoří

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 14 aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 39 aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu,

jakákoliv aminokyselina kromě aragininu v poloze 68 varianty polypeptidu, a

jakákoliv aminokyselina kromě asparaginu v poloze 95 varianty polypeptidu.

12. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, kde varianta polypeptidu obsahuje tři nebo více substituovaných aminokyselin vybraných ze skupiny, kterou tvoří

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 14 aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 39 aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 68 varianty polypeptidu, a

jakákoliv aminokyselina kromě asparaginu v poloze 95 varianty polypeptidu.

13. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, kde varianta polypeptidu obsahuje dvě nebo více substituovaných aminokyselin vybraných ze skupiny, kterou tvoří

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 14 aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 39 aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 68 varianty polypeptidu, a

jakákoliv aminokyselina kromě asparaginu v poloze 95 varianty polypeptidu.

14. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, kde aminokyselina v poloze 95 varianty polypeptidu neublastinu je jiná aminokyselina než asparagin.

15. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 14, kde aminokyselina v poloze 95 varianty polypeptid neublastinu je lysin.

16. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 14, kde varianta polypeptidu neublastinu dále obsahuje substituce vybrané ze skupiny, kterou tvoří

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 14,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 39,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 68.

17. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 16, kde substituce v poloze 14, 39 nebo 68 je lysin.

18. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 14, která dále obsahuje dvě substituce vybrané ze skupiny, kterou tvoří

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 14,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 39,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 68.

19. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 18, kde dvě substituce jsou lysin.

20. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 14, kde varianta polypeptidu neublastin dále obsahuje tři následující substituce:

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 14,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 39,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 68.

21. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 20, kde tři substituce jsou lysin.

22. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 15, kde aminokyseliny 8 až 94 a 96 až 113 varianty polypeptidu neublastinu jsou alespoň z 90 % identické s aminokyselinami 8 až 94 a 96 až 113 sekv. id. č. 1.

23. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 14, kde aminokyseliny 8 až 94 a 96 až 113 varianty polypeptidu neublastinu jsou alespoň z 95 % identické s aminokyselinami 8 až 94 a 96 až 113 sekv. id. č. 1.

24. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 22, kde aminokyselinov sekvence varianty polypeptidu neublastinu v aminokyselinách 8 až 94 a 96 až 113 obsahuje aminokyselinovou sekvenci přirozeně se vyskytujícího polypeptidu neublastinu laboratorního potkana, člověka nebo

myši.

25. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 23, kde aminokyseliny 8 až 94 a 96 až 113 varianty polypeptidu neublastinu jsou vybrány ze skupiny, kterou tvoří aminokyselinová sekvence aminokyselin 8 až 94 a 96 až 113 ze sekv. id. č. 2, sekv. id. č. 3 a sekv. id. č. 4.

26. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 15, která obsahuje aminokyseliny 8 až 113 sekv. id. č. 2.

27. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 1, která je fúzní protein.

28. Varianta polypeptidu neublastinu podle nároku 27, kde fúzní protein obsahuje sekvenci humánního sérového albuminu fúzovanou ve shodném čtecím rámci se sekvencí varianty polypeptidu neublastinu.

29. Fúzní protein obsahující polypeptid neublastin operativně spojený s proteinem humánního sérového albuminu.

30. Molekula nukleové kyseliny kódující variantu polypeptidu neublastinu podle nároku 1.

31. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 30.

32. Vektor podle nároku 30, který je expresní vektor.

33. Buňka obsahující vektor podle nároku 32.

34. Buňka podle nároku 33, která je vybrána ze skupiny, kterou tvoří savčí buňku, houbová buňka, kvasinková buňka, hmyzí buňka a bakteriální buňka.

35. Buňka podle nároku 34, kde savčí buňka je buňka vaječníků čínského křečka .

36. Způsob přípravy varianty polypeptidu neublastinu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje krok kultivace buněk podle nároku 33 v podmínkách umožňujících expresi varianty polypeptidu neublastinu.

37. Způsob podle nároku 36 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje krok izolace varianty polypeptidu neublastinu.

38. Varianta polypeptidu neublastinu připravená způsobem podle nároku 36.

39. Molekula nukleové kyseliny kódující variantu polypeptidu neublastinu podle nároku 28.

40. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 39.

41. Vektor podle nároku 40, který je expresní vektor.
42. Buňka obsahující vektor podle nároku 41.
43. Buňka podle nároku 42, která je vybraná ze skupiny, kterou tvoří savčí buňka, houbová buňka, kvasinková buňka, hmyzí buňka a bakteriální buňka.
44. Buňka podle nároku 43, kde savčí buňka je buňka vaječníků čínského křečka.
45. Způsob přípravy varianty polypeptidu neublastinu v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje krok kultivace buněk podle nároku 42 v podmínkách umožňujících expresi varianty polypeptidu neublastinu.
46. Způsob podle nároku 45 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje krok izolace varianty polypeptidu neublastinu.
47. Varianta polypeptidu neublastinu připravená způsobem podle nároku 46.
48. Multimerní polypeptidová kompozice v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje variantu polypeptidu neublastinu podle nároku 1.

49. Multimerní polypeptidová kompozice podle nároku 48, vyznačující se tím, že multimerní polypeptidová kompozice je dimer.

50. Multimerní polypeptidová kompozice podle nároku 49, vyznačující se tím, že multimerní polypeptidová kompozice je homodimer.

51. Multimerní polypeptidová kompozice podle nároku 48, vyznačující se tím, že multimerní polypeptidová kompozice je heterodimer.

52. Kompozice vyznačující se tím, že obsahuje polypeptid neublastin nebo variantu polypeptidu neublastinu kondenzovanou s polymerem, který se v přírodě nevyskytuje.

53. Kompozice podle nároku 52 vyznačující se tím, že polymer, který se v přírodě nevyskytuje, je kondenzován k polypeptidu prostřednictvím aminokyseliny polypeptidu exponované rozpouštědлу.

54. Kompozice podle nároku 52 vyznačující se tím, že obsahuje variantu polypeptidu neublastinu obsahující aminokyselinovou sekvenci alespoň ze 70 % identickou s aminokyselinami 8 až 113 sekv. id. č. 1,

za předpokladu, že varianta polypeptidu neublastinu obsahuje jednu nebo více substituovaných aminokyselin vybraných ze skupiny, kterou tvoří:

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 14

aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 39
aminokyselinové sekvence varianty polypeptidu,

jakákoliv aminokyselina kromě argininu v poloze 68
varianty polypeptidu, a

jakákoliv aminokyselina kromě asparaginu v poloze 95
varianty polypeptidu,

příčemž polohy aminokyselin jsou počítány podle
polypeptidové sekvence uvedené jako sekv. id. č. 1.

55. Kompozice podle nároku 52 vyznačující se tím,
že polymer obsahuje polyalkylenglykolovou skupinu.

56. Kompozice podle nároku 55 vyznačující se tím,
že polyalkylenglykolová skupina je polyethylenglykolová
skupina (PEG).

57. Kompozice podle nároku 55 vyznačující se tím,
že polyalkylenglykolová skupina je kondenzována k aminoskupině
polypeptidu neublastinu nebo lysinu nebo jiné aminoskupině
varianty polypeptidu neublastinu.

58. Kompozice podle nároku 57 vyznačující se tím,
že polyalkylenglykolová skupina je kondenzována k aktivnímu
esteru N-hydroxylsukcinimidu (NHS).

59. Kompozice podle nároku 58 vyznačující se tím,
že aktivní ester je vybrán ze skupiny, kterou tvoří

PEG-sukcinimidylsukcinát (SS-PEG), sukcinimidylbutyrát (SPB-PEG) a sukcinimidylpropionát (SPA-PEG).

60. Kompozice podle nároku 57 vyznačující se tím, že polyalkylenglykolová skupina je vybrána ze skupiny, kterou tvoří skupiny karboxymethyl-NHS, norleucin-NHS, SC-PEG, tresylát, aldehydová skupina, epoxidová skupina, karbonylimidazolová skupina a PNP-karbonátová skupina.

61. Kompozice podle nároku 55 vyznačující se tím, že polyalkylenglykolová skupina je kondenzována k cysteinovému zbytku polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu.

62. Kompozice podle nároku 61 vyznačující se tím, že polyalkylenglykolová skupina je navázána prostřednictvím skupiny vybrané ze skupiny, kterou tvoří maleimidová skupina, vinylsulfonová skupina, haloacetátová skupina a thiolová skupina.

63. Kompozice podle nároku 52 vyznačující se tím, že polypeptid neublastin nebo varianta polypeptidu neublastinu jsou glykosylované.

64. Kompozice podle nároku 63 vyznačující se tím, že polymer je kondenzován k sacharidové skupině glykosylovaného polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu.

65. Kompozice podle nároku 64 vyznačující se tím, že polymer je kondenzován ke glykosylovanému polypeptidu neublastinu nebo variantě polypeptidu neublastinu následně po oxidaci hydrazolové skupiny nebo aminoskupiny glykosylovaného polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu.

66. Kompozice podle nároku 52 vyznačující se tím, že polypeptid neublastin nebo varianta polypeptidu neublastinu obsahuje dvě, tři nebo čtyři skupiny PEG.

67. Kompozice podle nároku 52 vyznačující se tím, že polypeptid neublastinu nebo varianta polypeptidu neublastinu má delší poločas v séru ve srovnání s poločasem polypeptidu nebo variantou polypeptidu bez přítomnosti polymeru.

68. Kompozice podle nároku 52 vyznačující se tím, že polypeptid neublastinu nebo varianta polypeptidu neublastinu ve formě dimeru má fyziologickou aktivitu vybranou ze skupiny, kterou tvoří: vazba $\text{GFR}\alpha 3$, aktivace RET, normalizace patologických změn neuronů a zlepšení přežívání neuronů.

69. Kompozice podle nároku 68 vyznačující se tím, že polymer je kondenzován k polypeptidu na jeho N konci.

70. Kompozice podle nároku 68 vyznačující se tím, že polymer je kondenzován k polypeptidu na aminokyselině, která není koncová.

71. Kompozice podle nároku 68 vyznačující se tím, že polymer je kondenzován k aminokyselině z polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu, která je exponována rozpouštědлу.

72. Kompozice podle nároku 68 vyznačující se tím, že polymer je kondenzován k polypeptidu neublastinu nebo variantě polypeptidu neublastinu na zbytku, který je vybrán ze skupiny, kterou tvoří: koncová aminoskupin varianty polypeptidu, poloha 14 v aminokyselinové sekvenci polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu, poloha 39 v aminokyselinové sekvenci polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu, poloha 68 v aminokyselinové sekvenci polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu, a poloha 95 v aminokyselinové sekvenci polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu.

73. Farmaceutický přípravek vyznačující se tím, že obsahuje fyziologicky přijatelné vehikulum, ve kterém je dispergována kompozice podle nároku 68.

74. Stabilní, ve vodě rozpustný komplex kondenzovaného polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu obsahující dimerní polypeptid neublastinu nebo dimer varianty polypeptidu neublastinu kondenzovaný k polyethylenglykolové skupině, kde polypeptid neublastin nebo varianta polypeptidu neublastinu je kondenzován k polyethylenglykolové skupině labilní vazbou.

75. Komplex podle nároku 74, kde labilní vazba je štěpitelná biochemickou hydrolýzou, proteolýzou nebo sulfhydrylovým štěpením.

76. Komplex podle nároku 75, kde labilní vazba je štěpitelná v podmínkách *in vivo*.

77. Způsob přípravy modifikovaného polypeptidu neublastinu, který ve formě dimeru prodlužuje aktivitu *in vitro* nebo *in vivo*, ve srovnání s polypeptidem neublastinu divokého typu, vyznačující se tím, že zahrnuje kroky

poskytnutí polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu a

kondenzace polypeptidu nebo modifikované varianty polypeptidu neublastinu na polymer, který se v přírodě nevyskytuje, čímž se připraví kondenzovaná kompozice polymeru a polypeptidu neublastinu.

78. Způsob léčení nebo prevence poruch nervového systému u pacienta, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání pacientovi, který léčení potřebuje, terapeuticky účinného množství: polypeptidu podle nároku 1 obsahujícího dimer, kompozice podle nároku 52 obsahující kondenzovaný dimer polypeptidu neublastinu nebo varianty polypeptidu neublastinu, farmaceutického přípravku podle nároku 69 nebo komplexu podle nároku 74.

79. Způsob podle nároku 78 vyznačující se tím, že nervová porucha je porucha periferních nervů.

80. Způsob podle nároku 78 vyznačující se tím, že nervová porucha je periferní neuropatie.

81. Způsob podle nároku 78 vyznačující se tím, že nervová porucha neuropatický bolestivý syndrom.

82. Způsob podle nároku 78 vyznačující se tím, že pacient je člověk.

83. Způsob podle nároku 78 vyznačující se tím, že podávání je systémové.

84. Způsob podle nároku 78 vyznačující se tím, že podávání je lokální.