

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 942**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2004 E 04750200 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 1618179**

54 Título: **Neublastina glucosilada conjugada con polímero**

30 Prioridad:

18.04.2003 US 463899 P

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

25.07.2014

73 Titular/es:

**BIOPEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 CAMBRIDGE CENTER
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142, US**

72 Inventor/es:

**SAH, DINAH WEN-YEE;
PEPINSKY, BLAKE R. y
ROSSOMANDO, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 479 942 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Neublastina glucosilada conjugada con polímero

5 Campo de la invención

La invención se refiere a química de proteínas, biología molecular, neurobiología, neurología y gestión del dolor.

10 Antecedentes de la invención

Los factores neurotróficos son proteínas de origen natural que regulan la supervivencia neuronal durante el desarrollo, y regulan la plasticidad y la integridad estructural del sistema nervioso adulto. Estos factores neurotróficos pueden clasificarse en superfamilias, familias, subfamilias y especies individuales según su estructura y su función.

15 Las superfamilias de factores neurotróficos incluyen la superfamilia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la superfamilia de la neurotrofina y la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). Los ligandos relacionados con el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) son una familia de proteínas dentro de la superfamilia del TGF- β . Los ligandos relacionados con el GDNF incluyen el GDNF, la persefina (PSP), la neurturina (NTN) y la Neublastina (NBN; conocida como Atermina o Enovina). Los miembros de la familia de ligandos
20 relacionados con el GDNF se distinguen, entre otras cosas, por sus siete residuos de cisteína conservados. Estos residuos forman puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares y dan lugar a la estructura terciaria y secundaria del ligando polipeptídico dimerizado. Los miembros de la familia también inducen la señalización a través de un complejo receptor multicomponente que consiste en un co-receptor anclado a glucosilfosfatidil inositol (GPI) de la familia GFR α , un miembro de la subfamilia de ligandos relacionados con el GDNF y el receptor de cinasa de
25 tirosina RET.

El RET activado inicia una cascada de transducción de señales que es responsable, al menos en parte, de los efectos cascada abajo de los ligandos relacionados con el GDNF.

30 La Neublastina se clasifica dentro de la familia del GDNF porque comparte regiones de homología con otros ligandos del GDNF, incluyendo el motivo de siete cisteínas (por ejemplo, como se describe en el documento EP02/02691, en las publicaciones PCT US02/02319 y US02/06388), y debido que se une a, y activa, el receptor RET como parte de un complejo GFR α . La Neublastina es muy selectiva para la unión al complejo receptor GFR α 3-RET. A este respecto, la Neublastina contiene subregiones únicas en su secuencia de aminoácidos en comparación con otros
35 miembros de la familia de ligandos relacionados con el GDNF

La administración de Neublastina es potencialmente útil en el tratamiento de enfermedades asociadas con una degeneración y una disfunción neuronal. Sin embargo, la Neublastina se elimina rápidamente del cuerpo, lo que puede afectar al paradigma de dosificación de Neublastina requerida en aplicaciones terapéuticas. Por tanto, existe
40 la necesidad de moléculas que muestren la actividad biológica de la Neublastina y al mismo tiempo tengan una potencia aumentada.

Sumario de la invención

45 Se ha descubierto que cuando una proteína de Neublastina, es decir, un dímero, es glucosilado internamente y conjugado en su amino terminal con un polímero sintético soluble en agua, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), se mejora significativamente la biodisponibilidad y la semivida en suero. Por lo tanto, se consigue una eficacia *in vivo* con dosis menores.

50 Basándose en este descubrimiento, la invención presenta un dímero que contiene un primer polipéptido de Neublastina y un segundo polipéptido de Neublastina, en los que: (a) al menos uno de los polipéptidos está glucosilado; (b) al menos uno de los polipéptidos está conjugado en su N-terminal con un polímero sintético soluble en agua; y (c) ninguno de los polipéptidos está conjugado con un polímero sintético soluble en agua en una posición
55 distinta al N-terminal.

El (los) polipéptido(s) de Neublastina puede(n) ser, por ejemplo, NBN113 (ID. SEC. N°: 2), NBN140 (ID. SEC. N°: 6), NBN116 (ID. SEC. N°: 7), NBN112 (ID. SEC. N°: 8), NBN111 (ID. SEC. N°: 9), NBN110 (ID. SEC. N°: 10), NBN109 (ID. SEC. N°: 11), NBN108 (ID. SEC. N°: 12), NBN107 (ID. SEC. N°: 13), NBN106 (ID. SEC. N°: 14), NBN105 (ID. SEC. N°: 15), NBN104 (ID. SEC. N°: 16), NBN103 (ID. SEC. N°: 17), NBN102 (ID. SEC. N°: 18), NBN101 (ID. SEC. N°: 19), NBN100 (ID. SEC. N°: 20) y NBN99 (ID. SEC. N°: 21). Un polipéptido preferido para su incorporación en el
60 dímero es NBN104 (ID. SEC. N°: 16).

En algunas formas de realización, la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de Neublastina y del segundo polipéptido de Neublastina es la misma. Preferiblemente, el polímero sintético soluble en agua es un polialquilenglicol, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).
65

Preferiblemente, el peso molecular total medio de la fracción o las fracciones de polialquilenglicol conjugadas con el dímero es de 10 - 50 kDa; más preferiblemente de 15 - 45 kDa; y lo más preferiblemente de 20 - 40 kDa. La fracción de polialquilenglicol puede ser lineal o ramificada.

5 La invención proporciona una composición que comprende el dímero de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona un método para el tratamiento del dolor neuropático en un mamífero, por ejemplo, en un ser humano. El método incluye la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de un dímero de la invención. La invención proporciona un método para el tratamiento de la alodinia táctil en un mamífero. El método incluye la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de un dímero de la invención. La invención proporciona un método para tratar la hiperalgesia térmica en un mamífero. El método incluye la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de un dímero de la invención. La invención proporciona un método para la activación del receptor RET en un mamífero. El método incluye la administración al mamífero de una cantidad eficaz de un dímero de la invención.

En algunas formas de realización de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz es desde 0,1 µg/kg hasta 1.000 µg/kg. En algunas formas de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es desde 1 µg/kg hasta 100 µg/kg. En algunas formas de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es desde 1 µg/kg hasta 30 µg/kg. En algunas formas de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es desde 3 µg/kg hasta 10 µg/kg. Preferiblemente, la vía de administración es intramuscular o subcutánea.

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado al comprendido habitualmente por el experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica de la invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, a continuación se describen los métodos y materiales adecuados.

Salvo que se indique de otro modo, cualquier referencia a un número de residuo de aminoácido del polipéptido de neublastina se corresponde con la numeración de la ID. SEC. N°: 1.

30 Según se usa en este documento, "neublastina consenso" significa la secuencia de la ID. SEC. N°: 1

Según se usa en este documento, "polipéptido de neublastina" significa un polipéptido que (1) muestra al menos una actividad biológica de neublastina cuando está dimerizado como un homodímero, y (2) incluye una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90 % a los aminoácidos 8 - 113 de la ID. SEC. N°: 2.

Según se usa en este documento, "polipéptido de neublastina de origen natural" significa un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia del polipéptido de neublastina de origen natural. Algunos ejemplos de neublastinas de origen natural son la neublastina humana (ID. SEC. N°: 2), la neublastina de ratón (ID. SEC. N°: 3), y la neublastina de rata (ID. SEC. N°: 4).

El porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos puede ser determinado mediante el uso del programa BLAST 2.0 (disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) o una versión posterior del mismo. La comparación entre secuencias puede realizarse mediante el uso de un alineamiento *ungapped* y mediante el uso de los parámetros por defecto (matriz Blossom 62, penalización por existencia de *gap* de 11, penalización por *gap* residual de 1, y una proporción lambda de 0,85). El algoritmo matemático usado en los programas BLAST se describe en Altschul y col., 1997, Nucleic Acids Research 25: 3389 - 3402.

Otras características y ventajas de la invención serán apreciables a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una línea discontinua quebrada que resume los datos que muestran una reversión sustancial de una alodinia táctil completamente establecida mediante la administración subcutánea de un homodímero de NBN104 en el que cada monómero está conjugado con una fracción de PEG en su amino terminal, y glucosilado en la posición 95 ("2 X PEG NBN104 de 20 KDa"), en ratas con una ligadura nerviosa medular L5/L6.

La FIG. 2 es una línea discontinua quebrada que resume los datos que muestran una reversión sustancial de una hiperalgesia térmica mediante la administración subcutánea de 2 X PEG NBN104 de 20 KDa en ratas con una ligadura nerviosa medular L5/L6.

La FIG. 3 es un alineamiento de las secuencias de neublastina madura de origen natural de ser humano, de ratón y de rata. También se muestra una secuencia consenso basada en las secuencias de ser humano, de ratón y de rata.

La FIG. 4 es una secuencia consenso basada en las secuencias de ser humano, de ratón y de rata, con las sustituciones opcionales de aminoácidos indicadas.

La FIG. 5 es un alineamiento de la prepro secuencia de la neublastina humana de origen natural, y tres secuencias humanas maduras de neublastina diferentes producidas de forma natural mediante un procesado post-traducciona

La FIG. 6 es un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de varios truncamientos del aminoácido 113 de la neublastina humana de origen natural que pueden ser incorporados en los dímeros de la invención.

Descripción detallada de la invención

Dímeros de neublastina glucosilados conjugados con polímero

Los dímeros de la invención muestran actividad en los ensayos de actividad biológica de la neublastina. Por ejemplo, los dímeros de la invención son activos en ensayos de activación del RET. Los dímeros de la invención muestran una biodisponibilidad mejorada y/o una semivida en suero más larga con respecto al correspondiente dímero sin la combinación de conjugación con polímero y glucosilación. En las formas de realización preferidas de la invención, el dímero glucosilado conjugado con polímero, muestra una potencia significativamente aumentada *in vivo*, con respecto a la potencia del correspondiente polipéptido sin conjugación con polímero ni glucosilación.

En general, los polipéptidos incorporados en los dímeros de la invención conservan al menos una de las siguientes características:

(i) siete residuos de cisteína conservados en las posiciones correspondientes a los residuos 16, 43, 47, 80, 81, 109 y 111 de la ID. SEC. N°: 1;

(ii) los residuos de aminoácidos como sigue:

C en la posición 16, L en la posición 18, V en la posición 25, L en la posición 28, G en la posición 29, L en la posición 30, G en la posición 31, E en la posición 36, F en la posición 40, R en la posición 41, F en la posición 42, C en la posición 43, G en la posición 45, C en la posición 47, C en la posición 80, C en la posición 81, R en la posición 82, P en la posición 83, F en la posición 91, D en la posición 93, N en la posición 95, S en la posición 105; A en la posición 106, C en la posición 109 y C en la posición 111;

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

Preferiblemente, los polipéptidos conservan todas las características anteriores.

Algunos ejemplos de secuencias de aminoácidos del polipéptido de neublastina de origen natural se presentan en la FIG. 3. Con respecto a los polipéptidos de neublastina y las secuencias de origen natural, véase la publicación PCT WO 00/01815. Se presenta una secuencia consenso de neublastina (consenso con respecto al ser humano, al ratón y a la rata) en la FIG. 4.

La secuencia de la prepro neublastina humana (ID. SEC. N°: 5) se muestra en la FIG. 5. Se han identificado otras formas maduras de la neublastina humana resultantes de tres procesados post-traduccionales diferentes. Las tres formas son:

(i) el polipéptido 140 AA designado como NBN140 (ID. SEC. N°: 6);

(ii) el polipéptido 116 AA designado como NBN116 (ID. SEC. N°: 7); y

(iii) el polipéptido 113 AA designado como NBN113 (ID. SEC. N°: 2).

La FIG. 5 es un alineamiento que compara la secuencia de aminoácidos de la prepro neublastina humana y las tres secuencias maduras. La línea 1 proporciona el polipéptido de la ID. SEC. N°: 5, la línea 2 proporciona el polipéptido de la ID. SEC. N°: 6, la línea 3 proporciona el polipéptido de la ID. SEC. N°: 7, y la línea 4 proporciona el polipéptido de la ID. SEC. N°: 2. Los siete residuos de cisteína conservados están designados por los símbolos ("*", "#", "+" y "|") para indicar los puentes de disulfuro intramoleculares (* con *, # con # y + con +) e intermoleculares ("|") formados en el ligando de neublastina dimerizado maduro.

Los polipéptidos de neublastina en los dímeros de la invención pueden ser los productos de una reacción de escisión con una proteasa o de una reacción de escisión química, o pueden ser expresados directamente a partir de un constructo de ADN recombinante. Alternativamente, pueden ser sintetizados químicamente, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador en fase sólida comercial.

Un conjugado con polímero polipéptido de neublastina dímero preferido es un homodímero de NBN104 en el que cada monómero está conjugado con una fracción de PEG en su amino terminal, y glucosilado en la posición 95 ("2 X PEG NBN 104 de 20 kDa "). En algunas formas de realización, el polipéptido del dímero consiste esencialmente en los aminoácidos 8 - 113 de la ID. SEC. N°: 1.

En las formas de realización preferidas de la invención, el dímero se une al GFR α 3 y estimula la fosforilación de una tirosina de un polipéptido del RET. En algunas formas de realización, el dímero aumenta la supervivencia de una neurona sensorial, o reduce o revierte los cambios patológicos de una neurona sensorial. En algunas formas de realización, el dímero mejora la supervivencia de una neurona neurovegetativa o de una neurona dopaminérgica.

La invención proporciona un método para la elaboración de un dímero de un polipéptido de neublastina glucosilado conjugado con un polímero. El método incluye proporcionar un dímero de neublastina glucosilado, por ejemplo, procedente de una célula eucariota, y conjugar al menos un polipéptido del dímero con un polímero sintético soluble en agua, por ejemplo, una fracción de polialquilenglicol.

Polipéptidos de neublastina

Los polipéptidos de neublastina pueden ser producidos mediante técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, puede insertarse una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un polipéptido de neublastina en un vector, por ejemplo, un vector de expresión, y el vector puede ser introducido en una célula hospedadora adecuada. Las células hospedadoras adecuadas son aquellas que glucosilan polipéptidos. Se prefieren las células hospedadoras eucariotas. Sin embargo, al menos una bacteria, es decir, *Campylobacter jejuni*, contiene un sistema de glucosilación unido por N que puede ser transferido a células hospedadoras bacterianas tales como *E. coli* (Wacker y col., 2002, Science 298: 1790 - 1793). La modificación química y/o la extensión de una glucosilación bacteriana pueden conseguirse *in vitro*, mediante el uso de métodos y materiales conocidos en la técnica. Por lo tanto, opcionalmente puede usarse un sistema bacteriano de glucosilación competente para producir los polipéptidos de neublastina para su uso de acuerdo con la invención.

Los polipéptidos de neublastina adecuados para su uso en la invención pueden ser producidos en una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana embrionaria de riñón ("HEK"), tal como una célula HEK 293, una célula BHK21 o una célula de ovario de hámster chino ("CHO"). Otras células de mamífero adecuadas incluyen las líneas celulares PC12, HiB5, RN33b, células progenitoras neurales humanas y otras células derivadas de células humanas, especialmente células neurales. Algunos ejemplos de líneas celulares humanas inmortalizadas útiles en la práctica de la invención incluyen células de melanoma de Bowes (n° de acceso de la ATCC, CRL 9607), células Daudi (n° de acceso de la ATCC, CCL 213), células HeLa y derivados de HeLa (n° de acceso de la ATCC, CCL 2, CCL 2.1 y CCL 2.2), células HL-60 (n° de acceso de la ATCC, CCL 240), células HT-1080 (n° de acceso de la ATCC, CCL 121), células Jurkat (n° de acceso de la ATCC, TIB 152), células de carcinoma KB (n° de acceso de la ATCC, CCL 17), células de leucemia K-562 (n° de acceso de la ATCC, CCL 243), células de cáncer de mama MCF-7 (n° de acceso de la ATCC, BTH 22), células MOLT-4 (n° de acceso de la ATCC, 1582), células Namalwa (n° de acceso de la ATCC, CRL 1432), células Raji (n° de acceso de la ATCC, CCL 86), células RPMI 8226 (n° de acceso de la ATCC, CCL 155), células U-937 (n° de acceso de la ATCC, CRL 1593), células WI-38VA13 sublínea 2R4 (n° de acceso de la ATCC, CLL 75.1) y células de carcinoma de ovario 2780AD (Van der Blick y col., Cancer Res. 48: 5927 - 5932, 1988). También pueden usarse cepas de fibroblastos humanos secundarios, tales como WI-38 (n° de acceso de la ATCC, CCL 75) y MRC-5 (n° de acceso de la ATCC, CCL 171).

Algunas células hospedadoras que no son de mamífero adecuadas incluyen ovocitos de *Xenopus laevis* ("XLO") y células de levaduras tales como *Pichia pastoris*. En algunas formas de realización, la célula hospedadora es una célula de insecto tal como una célula Sf9.

La transformación de la célula hospedadora puede ser mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, una infección (empleando un vector vírico), mediante transfección (empleando un vector plasmídico), mediante el uso de una precipitación con fosfato de calcio, una microinyección, una electroporación y una lipofección. Los métodos y los materiales para la transformación de una célula hospedadora eucariota son conocidos en la técnica.

Los polipéptidos de neublastina producidos mediante células hospedadoras transformadas pueden ser aislados a partir de las células o a partir del medio de cultivo de la célula hospedadora, mediante el uso de técnicas convencionales de purificación de proteínas. Pueden emplearse etapas de plegado según sea necesario.

Los polipéptidos de neublastina pueden ser modificados mediante el uso de métodos y materiales convencionales. Uno de dichos métodos es la mutagénesis dirigida, en la que se modifican uno o más nucleótidos con objeto de efectuar una sustitución predeterminada de uno o más aminoácidos en un polipéptido de neublastina. En el mercado hay disponibles kits de mutagénesis dirigida adecuados, por ejemplo, "Transformer Site Directed Mutagenesis Kit" (Clontech Laboratories, Palo Alto, Calif.).

Algunas formas de realización de la invención implican un polipéptido de neublastina que contiene sustituciones

conservativas de aminoácidos. Algunas sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, alanina y glicina; leucina, valina e isoleucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparragina y glutamina; serina, cisteína y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Los aminoácidos hidrófobos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina y glutamina. Los aminoácidos (básicos) cargados positivamente incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos (ácidos) cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

La neublastina glucosilada puede ser proporcionada en cualquier forma bioactiva, incluyendo la forma de pre-proteínas, pro-proteínas, proteínas maduras, proteínas fosforiladas, proteínas no fosforiladas, formas truncadas o cualquier otra proteína modificada post-traduccionalmente. En algunas formas de realización, un polipéptido de la invención tiene la secuencia de aminoácidos presentada como la ID. SEC. N°: 6, portando un residuo de asparragina glucosilado en la posición 122; o la secuencia de aminoácidos presentada como la ID. SEC. N°: 14, portando un residuo de asparragina glucosilado en la posición 95, o la posición análoga en cualquier polipéptido de neublastina cuando es alineado mediante, por ejemplo, el programa informático ClustalW.

En general, un dímero aislado a partir de una célula de mamífero o de cualquier otra célula capaz de glucosilar proteínas, será glucosilado en la posición del aminoácido 95. Los métodos para la glucosilación de proteínas *in vitro* son conocidos en la técnica y pueden emplearse para glucosilar polipéptidos de neublastina o polipéptidos dímeros si así se desea.

La práctica de la presente invención puede realizarse mediante el uso de técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, química de proteínas e inmunología. Dichas técnicas se describen en referencias generales. Véanse, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. (Sambrook y col., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; ADN Cloning, Vol. I y II (Glover, ed), 1985; Oligonucleotide Synthesis, (Gait, ed.), 1984; Mullis y col., Patente de EE.UU. N° 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (Haines y col., eds.), 1984; Transcription and Translation (Hames y col., eds.), 1984; Culture of Animal Cells (Freshney, ed) Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986; A Practical Guide to Molecular Cloning, 1984; Meth. Enzymol., Vol. 154 y 155 (Wu y col., eds), Academic Press, Nueva York; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller y col., eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; Immunochernical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer y col., eds.), Academic Press, Londres, 1987.

Conjugación con polímero de los polipéptidos de neublastina

El polímero conjugado con un polipéptido de neublastina es soluble en agua. Preferiblemente, el polímero es adecuado para su uso en una composición farmacéutica. Algunos ejemplos de polímeros adecuados solubles en agua incluyen PEG, copolímeros de etilenglicol / propilenglicol, carboximetil celulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno / anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona) PEG, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno / óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos.

El peso molecular medio por cadena polimérica se elige de acuerdo con el peso molecular total medio deseado del (los) polímero(s) conjugado(s) por dímero, por ejemplo, 10 - 50 kDa, 15 - 45 kDa o 20 - 40 kDa por dímero. En las preparaciones de PEG, algunas moléculas pesan más, otras menos, del peso molecular establecido. Por lo tanto, el peso molecular se especifica típicamente como "peso molecular medio". Se conocen varios métodos de conjugación en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 401384 (coupling PEG to G-CSF); Malik y col., Exp. Hematol. 20: 1028 - 1035, 1992 (PEGylation of GM-CSF using tresyl chloryde).

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

La PEGilación por acilación implica generalmente hacer reaccionar un derivado de éster activo de PEG. Puede usarse cualquier molécula de PEG reactiva conocida o descubierta posteriormente para llevar a cabo la PEGilación. Un éster de PEG activado preferido es el PEG esterificado a N-hidroxisuccinimida (NHS). Según se usa en este documento, "acilación" incluye, sin limitación, los siguientes tipos de enlaces entre la proteína terapéutica y un polímero soluble en agua tal como PEG: amida, carbamato, uretano, y similares. Véase Bioconjugate Chem. 5: 133 - 140, 1994. Las condiciones de reacción pueden elegirse de entre cualquiera de las conocidas en la técnica de la PEGilación o aquellas desarrolladas posteriormente, pero deberían evitar condiciones tales como la temperatura, el disolvente y el pH que inactivarían la proteína de neublastina o el polipéptido que se va a modificar.

En general, la PEGilación por acilación da como resultado un polipéptido poli-PEGilado. Sin embargo, en el caso de la neublastina, no hay residuos de lisina. Por lo tanto, puede emplearse la PEGilación por acilación para obtener un

polipéptido PEGilado exclusivamente en el amino terminal. Los polipéptidos PEGilados pueden separarse de la mezcla de reacción y de los polipéptidos sin reaccionar mediante técnicas convencionales, por ejemplo, diálisis, precipitación salina, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y electroforesis.

5 La PEGilación por alquilación implica generalmente la reacción de un derivado aldehído terminal de PEG con un polipéptido de neublastina o un dímero en presencia de un agente reductor. En general, la PEGilación por alquilación puede dar como resultado polipéptidos poli-PEGilados, y se pueden manipular las condiciones de reacción para favorecer la PEGilación en el amino terminal. Sin embargo, dado que la neublastina no contiene
10 residuos de lisina, no es necesario realizar dicha manipulación. Los grupos de PEG se unen preferiblemente a la proteína a través del un grupo $-CH_2-NH-$, es decir, a través de un enlace "alquilo".

15 Las moléculas de polímero usadas tanto en la metodología de acilación como en la de alquilación pueden elegirse de entre polímeros solubles en agua como se ha descrito anteriormente. El polímero elegido debería ser modificado para que tuviera un único grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, preferiblemente, de forma que el grado de polimerización pueda ser controlado según se prevé en los presentes métodos. Un aldehído de PEG reactivo ejemplar es el propionaldehído de PEG, que es estable en agua, o derivados mono C1-C10 alcoxi o ariloxi del mismo (véase la patente de EE.UU. 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o sin ramificar. Para las reacciones de acilación, el (los) polímero(s) elegido(s) debería(n) tener un único grupo éster
20 reactivo. Para la presente alquilación reductora, el (los) polímero(s) elegido(s) debería(n) tener un único grupo aldehído reactivo. Para el propósito de la invención, el PEG puede ser cualquiera de las formas de PEG conocidas en la técnica para la derivatización de otras proteínas, incluyendo mono-(C1-C10) alcoxi- y ariloxi-PEG.

25 **Formulaciones**

Las composiciones que contienen los dímeros de la invención pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados. Por ejemplo, pueden contener excipientes y/o auxiliares que faciliten el procesado de los dímeros en las preparaciones diseñadas para su administración en el sitio de acción. Algunas formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en una forma soluble en agua, por ejemplo, como sales solubles en agua. Además, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Algunos disolventes lipófilos o vehículos adecuados incluyen ácidos grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, por ejemplo, carboximetil celulosa de sodio, sorbitol y dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. También pueden usarse liposomas para encapsular las moléculas de la invención para su administración en células o en espacios intersticiales. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables son disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, agua, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, fisiológicamente compatibles. En algunas formas de realización, la composición comprende agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. En algunas formas de realización, las composiciones incluyen sustancias farmacéuticamente aceptables tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones.

45 Las composiciones de la invención pueden estar en varias formas, que incluyen, por ejemplo, líquida (por ejemplo, disoluciones inyectables e infusionables), dispersiones, suspensiones, formas de dosificación semisólidas y sólidas. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

50 La composición puede formularse como una disolución, una microemulsión, una dispersión, un liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles mediante la incorporación del principio activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado a vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución previamente filtrada estéril. La fluidez apropiada de una disolución puede ser mantenida, por ejemplo, mediante un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción. Algunos ejemplos de dichos agentes son sales de monoestearato y gelatina.

65 El principio activo puede formularse con una formulación o un dispositivo de liberación controlada. Algunos ejemplos de dichas formulaciones y dispositivos incluyen implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables, por ejemplo, vinil acetato de etileno,

polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones y dispositivos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

5 Las formulaciones depot inyectables pueden elaborarse mediante la formación de matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como de polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la proporción entre el fármaco y el polímero, y de la naturaleza del polímero empleado, puede controlarse la tasa de liberación del fármaco. Otros polímeros biodegradables ejemplares son poliortoésteres y polianhídridos. Las formulaciones depot inyectables también pueden prepararse atrapando el fármaco en liposomas o en microemulsiones.

10 En la formulación pueden incorporarse compuestos activos complementarios. Por ejemplo, un dímero de acuerdo con la invención puede ser coadministrado con un analgésico.

15 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo, o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es ventajoso formular las composiciones parenterales en formas de dosificación unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. Véase, de forma general, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA 1980).

20 Además de un dímero de la invención, una forma de dosificación líquida puede contener ingredientes inertes tales como agua, alcohol etílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano.

25 **Métodos de tratamiento**

La invención es útil para el tratamiento de neuronas sensoriales, de células ganglionares de la retina, de neuronas ganglionares de las raíces dorsales y de neuronas en cualquiera de los siguientes tejidos: los ganglios geniculado, petroso y nodoso; el complejo vestibuloacústico del octavo nervio craneal; el polo ventrolateral del lóbulo maxilomandibular del ganglio trigémino; y el núcleo trigémino mesencefálico.

35 Las composiciones y los métodos de la invención pueden usarse para tratar neuronas sensoriales, neuronas neurovegetativas o ambas. Pueden tratarse las neuronas nociceptivas y mecanorreceptoras, por ejemplo, las neuronas de fibra A-delta, de fibra C y de fibra A-beta. Además, pueden tratarse las neuronas del sistema autónomo simpático y parasimpático.

Dolor neuropático

40 Cuando se usa en el tratamiento del dolor neuropático, un dímero de la invención puede ser administrado solo o junto con un agente analgésico. Algunos ejemplos de agentes analgésicos incluyen un opioide, un antiarrítmico, un analgésico tópico, un anestésico local, un anticonvulsivante, un antidepresivo, un corticosteroide o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Algunos agentes analgésicos preferidos son gabapentina (ácido (1-aminometil) ciclohexano acético); y pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metilpropil) butanoico).

45 Los dímeros de la invención pueden usarse en el tratamiento del dolor asociado con neuropatías periféricas. Las neuropatías periféricas que pueden tratarse de acuerdo con esta invención incluyen neuropatías inducidas por traumatismos, lesiones físicas cerebrales, lesiones físicas de la médula espinal y apoplejía.

50 La invención también proporciona tratamientos de neuropatías inducidas por quimioterapia, entre otras neuropatías inducidas por fármacos, de neuropatías inducidas por patógenos, de neuropatías inducidas por toxinas, de neuropatías inducidas por deficiencias vitamínicas; de neuropatías idiopáticas; y de neuropatías diabéticas. La invención también puede usarse para tratar mononeuropatías, mononeuropatías múltiples y polineuropatías, incluyendo neuropatías axonales y desmielinizantes.

55 Algunos ejemplos de neuropatías inducidas por quimioterapia incluyen las neuropatías provocadas por la exposición a agentes quimioterapéuticos tales como taxol, taxotere, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina o vinblastina. Algunos ejemplos de otras neuropatías inducidas por fármacos incluyen las neuropatías causadas por ddl, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol e isoniacida. Algunos ejemplos de otras neuropatías inducidas por toxinas incluyen las neuropatías inducidas por alcoholismo, intoxicación con vitamina B6, intoxicación por hexacarbono, amiodarona, cloranfenicol, disulfiram, isoniacida, oro, litio, metronidazol, misonidazol y nitrofurantoina. Algunos ejemplos de neuropatías inducidas por virus incluyen las neuropatías causadas por un herpes zoster (que puede dar lugar a una neuralgia postherpética), un virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y un papilomavirus (HPV). Algunos ejemplos de neuropatías inducidas por déficit de vitaminas son aquellas causadas por el déficit en vitamina B12, el déficit en vitamina B6 y el déficit en vitamina E. Otros tipos de neuropatías que pueden ser tratadas de acuerdo con la invención incluyen las lesiones nerviosas inducidas por inflamación, neurodegeneración, neuropatía

hereditaria, por ejemplo, ataxia de Friedreich, polineuropatía amiloide familiar, enfermedad de Tangier, enfermedad de Fabry, trastornos metabólicos, por ejemplo, insuficiencia renal e hipotiroidismo, neuropatías infecciosas y víricas, por ejemplo, dolor neuropático asociado con la lepra y enfermedad de Lyme. Algunas neuropatías autoinmunes incluyen síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, gammopatía monoclonal de importancia indeterminada y polineuropatía, neuralgia del trigémino y síndromes de atrapamiento, por ejemplo, síndrome del túnel carpiano, y otros síndromes de dolor neuropático incluyendo neuralgia postraumática, dolor de la extremidad fantasma, dolor por esclerosis múltiple, síndromes de dolor regional complejo, por ejemplo, distrofia simpática refleja, causalgia, dolor asociado con neoplasia, neuropatía vasculítica / angiopática y ciática.

10 Alodinia táctil

La alodinia táctil es una afección en la que se provoca dolor por una estimulación de la piel (por ejemplo, el tacto) que normalmente es inocua. La alodinia táctil puede tratarse mediante la administración al sujeto de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un dímero de la invención. El dímero puede ser administrado solo o junto con una cantidad eficaz de un agente analgésico.

Un dímero de la invención puede coadministrarse con un agente terapéutico tal como un agente antineoplásico o un agente antivírico. Algunos ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen taxol, taxotere, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina. Algunos ejemplos de agentes antivíricos incluyen ddl, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol e isoniacida.

Reducción de la pérdida de sensibilidad al dolor

Las composiciones de la invención pueden usarse para reducir la pérdida de sensibilidad al dolor, por ejemplo, la pérdida de sensibilidad al dolor térmico, en un paciente con neuropatía diabética. El tratamiento puede ser profiláctico o terapéutico.

En el tratamiento profiláctico se administra un dímero de la invención a un paciente en riesgo de desarrollar una pérdida de sensibilidad al dolor, por ejemplo, un paciente con una neuropatía en etapa temprana.

En el tratamiento terapéutico se administra un dímero de la invención a un paciente que ha experimentado una pérdida de sensibilidad al dolor como resultado de una neuropatía, por ejemplo, una neuropatía en etapa tardía.

Neuropatías asociadas con virus

Las composiciones y los métodos de la invención pueden usarse para el tratamiento profiláctico de neuropatías asociadas con una infección vírica o bacteriana. El tratamiento profiláctico está indicado después de la determinación de la infección y antes de la aparición del dolor neuropático. Durante el tratamiento se administra un dímero de la invención para prevenir la aparición del dolor neuropático, tal como el dolor neuropático asociado con la lepra, con la enfermedad de Lyme o el dolor neuropático provocado por un virus. Los virus que pueden provocar dolor neuropático incluyen el virus del herpes zoster (que puede dar lugar a una neuralgia postherpética); el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV); y el papilomavirus humano (HPV).

Los síntomas de una infección vírica aguda incluyen a menudo la aparición de un exantema. Otros síntomas incluyen, por ejemplo, dolor persistente en el área afectada del cuerpo. Esta es una complicación común de una infección por un herpes zoster (culebrilla). La neuralgia postherpética puede durar un mes o más, y puede aparecer varios meses después de la desaparición de cualquier síntoma exantemático.

La invención también proporciona el tratamiento terapéutico del dolor neuropático asociado con una infección vírica o bacteriana. En el tratamiento terapéutico se administra un dímero de la invención a un paciente que está experimentando un dolor neuropático asociado con una infección.

Neuropatía diabética dolorosa

Las composiciones y los métodos de la invención pueden usarse para el tratamiento profiláctico de la neuropatía diabética dolorosa. El tratamiento profiláctico de las neuropatías diabéticas comenzaría después del diagnóstico inicial de la diabetes o de los síntomas asociados a la diabetes, y antes de la aparición del dolor neuropático. El tratamiento profiláctico de una neuropatía diabética dolorosa también puede comenzar tras la determinación de que un sujeto está en riesgo de desarrollar una diabetes o unos síntomas asociados a la diabetes. Se administra un dímero de la invención para prevenir la aparición del dolor neuropático y/o para reducir la gravedad del dolor neuropático que ya ha aparecido.

La invención también proporciona el tratamiento terapéutico del dolor neuropático asociado con la diabetes. En el tratamiento terapéutico se administra un dímero de la invención a un paciente que está experimentando un dolor neuropático asociado con la diabetes.

Dosis y vía de administración

Preferiblemente, una formulación que comprende un dímero de la invención se administra a una dosis de desde 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta 1.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del sujeto por dosis. Preferiblemente, la dosis es desde 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del sujeto por dosis. Más preferiblemente la dosis es desde 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del sujeto por dosis, por ejemplo, desde 3 mg/kg hasta 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del sujeto por dosis. Las cantidades terapéuticamente eficaces de la formulación de la invención pueden ser administradas a un sujeto en necesidad de la misma en un régimen de dosificación determinable por el experto en la técnica sin una excesiva experimentación.

La administración del dímero de la invención puede ser sistémica o local. Puede administrarse mediante cualquier sistema de administración adecuado, por ejemplo, una administración intravenosa, una administración intramuscular, una administración intrapulmonar, una administración subcutánea y una administración intraperitoneal, lo más preferiblemente a través de una administración intramuscular, de una administración intravenosa o de una administración subcutánea. El dímero también puede administrarse intratecalmente.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: expresión en células de mamífero

La neublastina humana madura (hNBN) se expresa de forma natural en forma de una pre-pro-proteína. Este polipéptido contiene una secuencia peptídica de señalización para dirigir la proteína a la vía secretora, un prodominio que es escindido y desechado tras la maduración, y una proteína madura. La proteína madura de 113 aminoácidos contiene un único sitio de glucosilación y siete residuos de cisteína. Los siete residuos de cisteína están implicados en tres puentes de disulfuro intermoleculares más un puente de disulfuro intermolecular para formar un homodímero glucosilado unido por disulfuro.

Construcción del plásmido pJC070.14 Con objeto de expresar el ADNc de la neublastina humana en células de ovario de hámster chino (CHO), se insertó un fragmento de ADNc que codifica para la forma prepro de la neublastina humana en el vector de expresión de mamífero pEAG347 para generar el plásmido pJC070.14. El plásmido pEAG347 contenía un tándem de los promotores temprano de SV40 y principal tardío de adenovirus (derivados del plásmido pAD2beta; Norton y col., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 281), un sitio de clonación Not-I único, seguido de la terminación de la transcripción tardía del SV40 y señales de poliA (derivados del plásmido pCMVbeta; MacGregor y col., 1989, Nucl. Acids. Res. 17: 2365). Además, el pEAG347 contenía un esqueleto de plásmido derivado de pUC19 y una dhfr derivada de pSV2dhfr para la selección con MTX y la amplificación en células CHO transfectadas.

El plásmido pJC070.14 fue generado en dos etapas. En primer lugar se aisló un fragmento que codifica para la forma prepro de la neublastina humana a partir del plásmido pUbi1Z-NBN mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa con los oligonucleótidos KD2-824 5'AAG-GAAAAA GCGGCCGCCA TGGAACTTGG ACTTGGAGG3' (ID. SEC. Nº: 22), KD2-825 5'TTTTTTCCTT GGCG-GCCGCT CAGCCCAGGC AGCCGCAGG3' (ID. SEC. Nº: 23) y la polimerasa PFU. El fragmento fue clonado en el sitio Srf-1 del pPCR-Script Amp SK(+) para generar el plásmido pJC069. En la segunda etapa se realizó una digestión parcial con Not-1 del plásmido pJC069 para generar un fragmento de 685 pb (que contiene el gen de la neublastina) que fue clonado en el sitio Not-1 del plásmido pEAG347 para generar el plásmido pJC070.14. La transcripción del gen de la neublastina en el plásmido pJC070.14 fue controlada por el promotor tardío principal del adenovirus.

Líneas celulares CHO que expresan la neublastina humana. En primer lugar se linealizaron 200 μg de pJC070.14 mediante una digestión con Mlu-1. Entonces se añadieron 200 μg de ADN de esperma de salmón sonicado. El ADN se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó con etanol. El ADN linealizado se resuspendió en Hepes 20 mM a pH 7,05, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 0,7 mM, dextrosa 6 mM (HEBS) y se introdujo en $\sim 4\text{E}7$ células CHO dukx B1(dhfr-) (p23) mediante una electroporación (280 V y 960 μF). Después de la electroporación, las células fueron devueltas al cultivo en medio de Eagle modificado $\alpha+$ (MEM) complementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS) durante dos días. Después las células se tripsinizaron y se volvieron a colocar en placas de 100 mm (100.000 células/placa) en α -MEM (sin ribo ni desoxirribonucleósidos), complementado con un 10 % de FBS dializado, durante cinco días. Subsiguientemente las células se dividieron a una densidad de 100.000 células/placa de 100 mm y se seleccionaron en metotrexato 200 nM. Las colonias resistentes se recogieron y se amplió su escala a placas de 6 pocillos; el medio condicionado de cada clon se cribó mediante el uso de un ensayo específico para la neublastina descrito a continuación.

Se aumentó la escala de los doce clones que expresan el mayor nivel de neublastina a matraces T162 y subsiguientemente se volvieron a ensayar. Estas líneas celulares CHO produjeron neublastina en el intervalo de 25 - 50 ng/ml/día. Las cuatro líneas celulares que mejor expresaban la neublastina fueron amplificadas en metotrexato

1.200 nM y adaptadas a un cultivo en suspensión en matraces rotatorios. Los clones resultantes produjeron aproximadamente 2 µg/ml en un cultivo rotatorio de alta densidad.

5 Ensayo de complejo ternario para la neublastina. Se evaluó la presencia de neublastina en el medio de los sobrenadantes de la línea celular CHO mediante el uso de una forma modificada de un ensayo de complejo ternario. El ensayo era esencialmente según describen Sanicola y col., 1997, Proc. Natl Acad Sci EE.UU. 94: 6238.

10 Expresión de NBN104 en células CHO. Se expresó una forma de 104 aminoácidos de la hNBN madura en células de ovario de hámster chino (CHO) mediante el siguiente procedimiento. Se creó un gen sintético de la hNBN mediante el uso de los codones más habitualmente utilizados para la traducción de proteínas en células CHO. Se introdujo un único sitio de escisión de la endonucleasa de restricción. Los codones del péptido de señalización de la albúmina de rata (rAlb), es decir, MKWVTFLLLLFISGSAFSAAGARG (ID. SEC. Nº: 24), y la secuencia de la hormona de crecimiento humana (hGH), es decir, MATGSRTSLLAFGLLCLSWLQEGSAAAGARG (ID. SEC. Nº: 25), se fusionaron independientemente a la hNBN para crear genes de fusión (el péptido de señalización está en una fuente normal y la secuencia de la NBN está en cursiva; el péptido de señalización de la hGH incluye un intrón).
15 Cada gen de fusión se puso bajo el control transcripcional de un promotor constitutivo y se transfectó en células CHO. Se aislaron los transformantes estables.

20 Se analizó la expresión de la hNBN secretada en las líneas celulares. Los datos del análisis reductor con SDS-PAGE / inmunotransferencia Western mostraron la presencia de una banda de proteína que se correspondía con la hNBN secretada en el medio. Un análisis adicional del medio condicionado mostró la presencia de un componente valorable tanto en un ensayo directo dirigido por anticuerpo como en un ensayo funcional indirecto basado en células.

25 La conclusión es que la hNBN funcional puede ser expresada en células CHO en ausencia de un prodominio y con unas secuencias peptídicas de señalización heterólogas.

Ejemplo 2: expresión de la neublastina de rata en células CHO

30 Construcción del plásmido pCWEX017.1. Se generó un gen para la neublastina de rata mediante la ligación de dos fragmentos que codifican conjuntamente para la neublastina de rata. El plásmido pJC102 consistía en un fragmento de ADN que codifica para los primeros 156 aminoácidos de la forma prepro de la neublastina de rata insertado en el sitio de clonación TOPO de pCRII-TOPO r (Invitrogen). El fragmento fue amplificado a partir de ADNc de hígado de rata Marathon-Ready t (Clontech) mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa con los oligonucleótidos AP2 5'ACT-CACTATAGGGCTC GAGCGGC3' (ID. SEC. Nº: 26) y KD3-171
35 5'GAACCGCTGCAGAAGCGGAAACGTATC3' (ID. SEC. Nº: 27). En primer lugar se amplificó un fragmento que contenía el dominio prepro y los primeros 29 aminoácidos de la forma madura de 113 aminoácidos de la neublastina mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa a partir del plásmido pJC102 con los oligonucleótidos KD3-214 5'AAGGAAAAAGCGGCCCGCCATGGAAGTGGACTTGGAGA3' (ID. SEC. Nº: 28) y KD3-247 5'AGT-TCGTCGGAAGAGTGTCCAGGCCGAGAGCGC TCACCG3' (ID. SEC. Nº: 29). Se amplificó un segundo fragmento que codifica para los aminoácidos 30 - 113 de la forma madura de 113 aminoácidos de la neublastina a partir de pCWEX015 con los oligonucleótidos KD3-246 5'CGGTGAGCGCTCTCGGCCTGGGACACTCTT CCGACGAACT3' (ID. SEC. Nº: 30) y KD3-219 5'TTTTTT-TCCTTGGCGGCCGCT CATCCTAGACAGCCACATG3' (ID. SEC. Nº: 31). El plásmido pCWEX015 se generó mediante la inserción de un fragmento BamH1-Xho1 procedente de un ingen en los sitios complementarios del plásmido de expresión pMJB134. Los fragmentos resultantes de ADN se mezclaron en una proporción de 1:1 y se sometieron a una segunda reacción en cadena de la polimerasa con los oligonucleótidos KD3-214 y KD3-219 generando la forma prepro de longitud completa de la neublastina de rata. El fragmento de ADN resultante se clonó en el sitio de clonación TOPO del plásmido pCRII blunt-topo para generar pCWEX016. Se aisló un fragmento Not-1 que contenía la prepro neublastina completa y se clonó en el sitio Not-1 de
50 pEAG347 para crear pCWEX017.1.

Secuencia del gen sintético de la neublastina de rata

55 GCTCGAGCGGCC ATATCGACGACGACGAC AAGGCTGGAAGTGGCAGCTCT
CGTGCTCGTGCAACCGATGCACGTGGCTGTCTGCGTTCTCAACTAGTG
CCGGTGTCTGCACTCGGACTGGGACACTCTCCGACGAACTAATTCGTTTT
CGTTTTTGTTCAGGATCTTGTCTCGTGCACGTTCTCCGCATGATCTATCTC
TAGCATCTCTACTAGGAGCCGGAGCACTAAGATCTCCGCGGGATCTAGA
60 CCTATTTCTCAACCTTGTGTAGACCTACTAGATACGAAGCAGTATCTTTC
ATGGACGTAAACTCTACATGGAGAACCGTAGATCATCTATCTGCAACCGC
ATGTGGCTGTCTAGGATGATAATAGGGATCCG (ID. SEC. Nº: 32)

65 Líneas celulares CHO que expresan la neublastina de rata. Se linealizaron 200 µg del plásmido CWEX017.1 mediante una digestión con la endonucleasa de restricción Mlu-1. Después de la digestión se añadieron 200 µg de ADN de espermatozoos de salmón sonicado y la mezcla se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se

precipitó con etanol. El ADN linealizado se resuspendió en Hepes 20 mM a pH 7,05, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,7 mM, dextrosa 6 mM (HEBS) y se introdujo en ~ 4E7 células CHO DG44 (dhfr-) (p8) mediante electroporación (280 V y 960 µF). Después de la electroporación, las células fueron devueltas al cultivo en medio de Eagle modificado α+ (MEM) complementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS) durante dos días. Después las células se tripsinizaron y se volvieron a colocar en placas de 100 mm (100.000 células/placa) en α-MEM (sin ribo ni desoxirribonucleósidos), complementado con un 10 % de FBS dializado. Después de seis días en cultivo, se sustituyó el medio y las células se seleccionaron en metotrexato 200 nM. Las colonias resistentes se recogieron y se amplió su escala a placas de 6 pocillos; el medio condicionado de cada clon se cribó mediante el uso del ensayo específico para la neublastina referenciado anteriormente. Se aumentó la escala de los cinco clones que expresaban el mayor nivel de neublastina a matraces T162 y subsiguientemente se volvieron a ensayar. Estas líneas celulares CHO produjeron neublastina en el intervalo de 500 ng/ml/día. Las líneas celulares que más expresaban fueron subsiguientemente adaptadas a cultivos en suspensión y expresaron la neublastina aproximadamente a 2 µg/ml en un cultivo rotatorio de alta densidad.

Neublastina de rata derivada de CHO PEGilada. Se hicieron crecer cien litros de células CHO que expresaban la NBN de rata (clon 33s) durante 10 días a 37° C en medio BCM16 que contenía metotrexato 200 nM. El cultivo se filtró y se concentró 10 veces. Se añadió Hepes a pH 7,5 a una concentración final de 10 mM y el medio se cargó durante una noche a 4 C en una columna de 120 ml de SP-Sepharose (Pharmacia). La columna se lavó con Hepes 10 mM a pH 7,5, NaCl 100 mM y la proteína unida se eluyó desde la columna con un gradiente de NaCl (0,1 - 1 M) en Hepes 10 mM a pH 7,5. Se analizó la absorbancia de las muestras a 280 nm, para las proteínas totales mediante SDS-PAGE, y para la NBN funcional mediante el uso del ELISA de complejo ternario de RetL3. Se encontró actividad de NBN en el borde de salida del pico de la proteína. Se agruparon las fracciones que contenían el pico de NBN de la columna SP, se diluyeron 5 veces con Hepes 10 mM a 7,5, se cargaron en una columna de 22 ml de Heparin Sepharose (Pharmacia). La columna se lavó con 110 ml de Hepes 10 mM a pH 7,5, 500 mM y la NBN se eluyó con Hepes 10 mM a pH 7,5, NaCl 1 M. Las fracciones que contenían la NBN fueron identificadas mediante SDS-PAGE y se agruparon. La fracción agrupada se diluyó con Hepes 10 mM a pH 7,5 hasta una concentración salina final de 150 mM. La proteína se cargó en una columna de 20 ml de SP-Sepharose y se eluyó de nuevo con un gradiente de NaCl. Las fracciones que contenían la NBN fueron identificadas mediante SDS-PAGE, se agruparon, se filtraron y se almacenaron a -70 C. El contexto de la proteína se estimó a partir de la absorbancia a 280 nm mediante el uso de un coeficiente de extinción de 0,5 para una disolución de 1 mg/ml. La NBN purificada de CHO migró como una única banda ancha mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras con una masa aparente de 36 kDa, y en condiciones reductoras migró como una banda con una masa aparente de 18 kDa. El análisis de la secuencia N-terminal reveló que el N-terminal del producto era heterogéneo debido a la escisión en sitios alternativos produciendo aductos des 1-4, des 1-7 y des 1-9.

Para eliminar la heterogeneidad N-terminal en la NBN, la proteína se trató durante 2 h a 37 C a pH 8,5 con una proporción de 1:100 (p/p) de tripsina de NBN y se purificó en una columna de filtración en gel Superdex 75 en Hepes 10 mM a pH 7,5, NaCl 300 mM. El pico de las fracciones que contenían la NBN fue identificado mediante SDS-PAGE, agrupado (0,9 mg/ml final), filtrado a través de un filtro de 0,2 µm, alícuotado y almacenado a -70 C para estudios subsiguientes. La secuenciación N-terminal de la NBN después del tratamiento con tripsina reveló que la proteína se había convertido en una forma des 1-9, de 104 aminoácidos, partiendo de la secuencia ATDARGC. Los datos de la espectroscopía de masas para el producto reducido y desglucosilado revelaron una masa de 11.104 Da, que concordaba altamente con la masa predicha para la forma des 1-9 de la NBN.

La des 1-9 NBN purificada se descongeló a la temperatura ambiente. Se añadió Hepes a pH 7,5 a 50 mM desde una disolución madre 1 M y se añadieron 20K de NHS-SPA PEG (Shearwater Polymers, Inc.) a una concentración final de 8 mg de PEG/ml. La concentración final de NBN en la reacción era de 0,7 mg/ml. La muestra se incubó a la temperatura ambiente durante 3 h y después se dializó durante una noche a 4 C frente a 50 volúmenes de Hepes 10 mM a pH 7,5, NaCl 100 mM. La forma dipegilada se purificó a partir de otros productos de reacción y de PEG libre mediante una cromatografía de intercambio catiónico en SP-Sepharose a la temperatura ambiente a una concentración de carga de 3 mg de NBN/ml de resina. La columna se lavó con fracciones de la mitad del volumen de la columna de 4-ona de Hepes 10 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, después el producto dipegilado se eluyó con fracciones de la mitad del volumen de la columna de 4-ona de Hepes 10 mM a pH 7,5, NaCl 200 mM. La NBN monopegilada se eluyó entonces con Hepes 10 mM a pH 7,5, NaCl 350 mM y la NBN sin reaccionar con Hepes 10 mM a pH 7,5, NaCl 800 mM. Las fracciones que contenían la NBN fueron evaluadas mediante SDS-PAGE y las fracciones que contenían > 90 % del producto dipegilado se agruparon, se dializaron durante una noche frente a PBS y se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm. Se midieron los niveles de endotoxinas y se determinó que eran inferiores a 1 UE/mg. Se ensayó la función del material en el KIRA ELISA y el ensayo de supervivencia neuronal y se determinó que era completamente activo. El material final fue alícuotado y almacenado a -70 C para pruebas subsiguientes. En estudios tempranos también se recogió el producto monopegilado para pruebas *in vivo*. Sin embargo, debido a las mejores propiedades del material dipegilado, fue seleccionado para todo lo demás. Para aumentar el rendimiento del material dipegilado, tratamos adicionalmente la NBN dipegilada con PEG reciente y de nuevo se purificó el producto dipegilado desde la mezcla de reacción.

Ejemplo 3: farmacocinética de la neublastina PEGilada y glucosilada

Se examinaron las propiedades farmacéuticas de la neublastina glucosilada PEGilada en rata y en ratón. La PEGilación N-terminal de la neublastina glucosilada truncada de rata (truncamiento N-terminal de 9 aminoácidos; NBN104) con dos fracciones de PEG de 20.000 Da (2 X PEG NBN104 de 20 KDa) rindió una mejora significativa en la semivida y la biodisponibilidad de la neublastina. Después de una administración subcutánea de 1,5 mg/kg a ratones CD, se detectaron unos niveles séricos de 97 ng/ml de neublastina glucosilada PEGilada a las 24 horas. Por el contrario, después de una administración subcutánea de 1,5 mg/kg de no NBN glucosilada PEGilada con dos PEGs de 20.000 Da (2 X PEG de 20 KDa) a ratones, los niveles séricos de neublastina eran de 39 ng/ml a las 24 horas. La neublastina no era detectable a las 24 horas después de una administración subcutánea de 1,5 mg/kg de NBN104 glucosilada no modificada a ratones, lo que indica que los niveles séricos de la neublastina eran menores de 5 ng/ml. Sorprendentemente, el nivel sérico conseguido con la neublastina glucosilada PEGilada era aproximadamente 2,5 veces mayor que los niveles séricos conseguidos con la neublastina no glucosilada PEGilada.

También se observó un aumento en los niveles séricos de la neublastina glucosilada PEGilada N-terminal en estudios con ratas. Después de una administración s.c. de 1 mg/kg de 2 X PEG NBN104 de 20 KDa a ratas Sprague-Dawley, se detectó un pico en los niveles séricos de 50 ng/ml de neublastina PEGilada a las 48 horas. Después de una administración subcutánea de 1 mg/kg de neublastina no PEGilada, los niveles séricos a las 48 horas eran menores de 2 ng/ml. Estos datos indicaron que la PEGilación N-terminal de la neublastina glucosilada (2 X PEG NBN104 de 20 KDa) da como resultado un pico de los niveles séricos de neublastina que eran al menos 19 veces mayores que el pico de los niveles séricos alcanzados tras la administración de neublastina glucosilada no PEGilada. Estos datos demuestran que la combinación de una PEGilación en el N-terminal y una glucosilación en el aminoácido 95 daban como resultado una mejora sustancial en las propiedades farmacocinéticas y la biodisponibilidad de la neublastina.

Ejemplo 4: neublastina glucosilada PEGilada en un modelo animal de dolor neuropático

Se estudió el efecto de reversión de la neublastina glucosilada PEGilada sobre la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica en el modelo de Chung de ligadura nerviosa medular L5/L6 ("SNL"). Se dividieron ratas macho Sprague-Dawley (200 - 250 g) en tres grupos. Todas las ratas recibieron la ligadura nerviosa medular. A un grupo de ratas (n = 6) se les administró vehículo mediante una inyección subcutánea. A un segundo y un tercer grupo de ratas (n = 6 por grupo) se les administraron 3 y 30 µg/kg de neublastina glucosilada PEGilada, (2 X PEG NBN104 de 20 KDa) mediante una inyección subcutánea, en la que la proteína era derivada de CHO, truncada (truncamiento N-terminal de 9 aminoácidos; NBN104), y PEGilada en cada N-terminal con un PEG de 20.000 Da. Dado que la neublastina existe como un dímero, cada dímero contiene dos PEGs de 20.000 Da. El vehículo consistía en fosfato 5 mM y cloruro sódico 150 mM a pH 6,5. Las inyecciones subcutáneas se administraron en los días 3, 5, 7, 10, 12 y 14 después de la operación (post-SNL). Se usaron las pruebas de comportamiento de Von Frey y Hargreave (Chaplan y col., 1994, J. Neurosci. Meth. 53: 55 - 63; Hargreaves y col., 1988, Pain 32: 77 - 88) para monitorizar las respuestas táctiles y térmicas, respectivamente. Estas respuestas al dolor fueron monitorizadas antes de la ligadura nerviosa medular para establecer las respuestas de la línea basal, y después antes de la administración del fármaco en el día 3 post-SNL, y aproximadamente 1 hora después de la administración del fármaco en los días 5, 7, 10, 12 y 14 post-SNL. Para evaluar la significación estadística del tratamiento farmacológico con respecto al tratamiento con vehículo se realizó un análisis de la varianza bifactorial con medidas repetidas (2-way RM ANOVA) seguido de una prueba post-hoc de Student Neuman Keuls (SNK).

Los resultados se resumen en las FIGS. 1 y 2 (en forma de medias \pm errores estándar de la media). Ambos tipos de comportamiento de dolor neuropático (la alodinia táctil mostrada en la FIG. 1 y la hiperalgesia térmica mostrada en la FIG. 2) se desarrollaron completamente el día 3, como se esperaba. La administración subcutánea de 3 o de 30 µg/kg de 2 X PEG NBN104 de 20 KDa (indicada por las flechas hacia abajo de las FIGS. 1 y 2) condujo a una reversión sustancial y estadísticamente significativa de ambos tipos de dolor neuropático en las ratas con la ligadura nerviosa medular. En las ratas con la ligadura nerviosa medular, el efecto de 2 X PEG NBN104 de 20 KDa sobre la sensibilidad térmica y la alodinia táctil se volvió en primer lugar estadísticamente significativo 4 y 7 días, respectivamente, después de iniciar la administración de la neublastina glucosilada PEGilada. El efecto de 2 X PEG NBN104 de 20 KDa sobre la sensibilidad térmica y la alodinia táctil alcanzó una meseta aproximadamente 7 días después de iniciar la administración de la neublastina glucosilada PEGilada. Los efectos de 2 X PEG NBN104 de 20 KDa no disminuyeron durante los intervalos de 2 a 3 días entre las administraciones. De hecho, hubo una normalización sustancial de los comportamientos frente al dolor entre las administraciones de la neublastina glucosilada PEGilada en los días 5, 7 y 10.

Estos resultados demuestran que 2 X PEG NBN104 de 20 KDa tiene un aumento de la potencia de al menos 333 veces sobre la neublastina no glucosilada no PEGilada en el comportamiento frente al dolor en la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica en el modelo de SNL.

Otras formas de realización

Otras formas de realización están incluidas en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

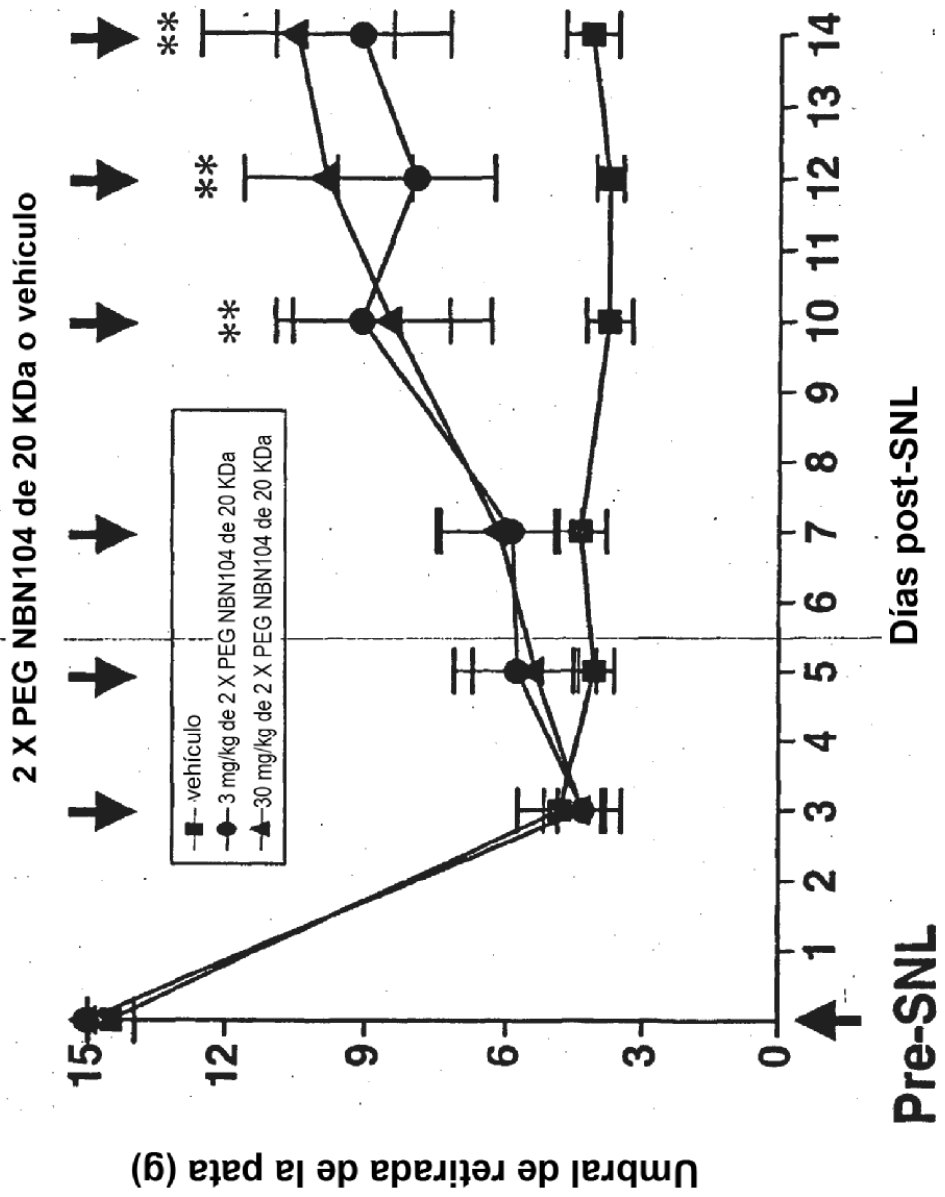
- 5 1. Un dímero que comprende un primer polipéptido de neublastina y un segundo polipéptido de neublastina, en el que: (a) al menos uno de los polipéptidos está glucosilado; (b) al menos uno de los polipéptidos está conjugado en su N-terminal con un polímero sintético soluble en agua; y (c) ninguno de los polipéptidos está conjugado con un polímero sintético soluble en agua en una posición distinta al N-terminal.
- 10 2. El dímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer polipéptido de neublastina se elige de entre el grupo que consiste en NBN140 (ID. SEC. N°: 6), NBN116 (ID. SEC. N°: 7), NBN112 (ID. SEC. N°: 8), NBN111 (ID. SEC. N°: 9), NBN110 (ID. SEC. N°: 10), NBN109 (ID. SEC. N°: 11), NBN108 (ID. SEC. N°: 12), NBN107 (ID. SEC. N°: 13), NBN106 (ID. SEC. N°: 14), NBN105 (ID. SEC. N°: 15), NBN103 (ID. SEC. N°: 17), NBN102 (ID. SEC. N°: 18), NBN101 (ID. SEC. N°: 19), NBN100 (ID. SEC. N°: 20) y NBN99 (ID. SEC. N°: 21).
- 15 3. El dímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de neublastina es NBN113 (ID. SEC. N°: 2).
- 20 4. El dímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de neublastina es NBN104 (ID. SEC. N°: 16).
5. El dímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de neublastina y del segundo polipéptido de neublastina son la misma.
- 25 6. El dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polímero sintético soluble en agua es una fracción de polialquilenglicol.
- 30 7. El dímero de la reivindicación 6, en el que el aminoácido N-terminal del primer polipéptido de neublastina y el aminoácido N-terminal del segundo polipéptido de neublastina están conjugados cada uno con una fracción de polialquilenglicol.
8. El dímero de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en el que la fracción de polialquilenglicol es lineal.
9. El dímero de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en el que la fracción de polialquilenglicol está ramificada.
- 35 10. El dímero de la reivindicación 6 ó 7, en el que la fracción de polialquilenglicol es una fracción de polietilenglicol.
- 40 11. El dímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que al menos uno de los polipéptidos está glucosilado en el residuo de asparragina correspondiente a la asparragina de la posición 95 de la ID. SEC. N°: 2.
- 45 12. Una composición que comprende el dímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un portador farmacéuticamente aceptable.
13. El dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11 para su uso como un medicamento.
- 50 14. El dímero para su uso como en la reivindicación 13, en el que el medicamento es para su uso en un ser humano.
15. Uso del dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del dolor neuropático, de la alodinia táctil o de la hiperalgia térmica en un ser humano.
- 55 16. El uso de la reivindicación 15, en el que al ser humano se le coadministra una cantidad eficaz del dímero y de un agente analgésico.
17. El uso de de la reivindicación 15, en el que la vía de administración al ser humano es intravenosa, intramuscular o subcutánea.
- 60 18. El dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11 para su uso en el tratamiento del dolor neuropático en un ser humano.
19. El dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11 para su uso en el tratamiento de una neuropatía periférica en un ser humano.
- 65 20. El dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11 para su uso en el tratamiento de una neuropatía diabética dolorosa en un ser humano.

21. El dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11 para su uso en el tratamiento de la alodinia táctil o de la hiperalgesia térmica en un ser humano.

5 22. El dímero para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18 - 21, en el que al ser humano se le coadministra una cantidad eficaz del dímero y de un agente analgésico.

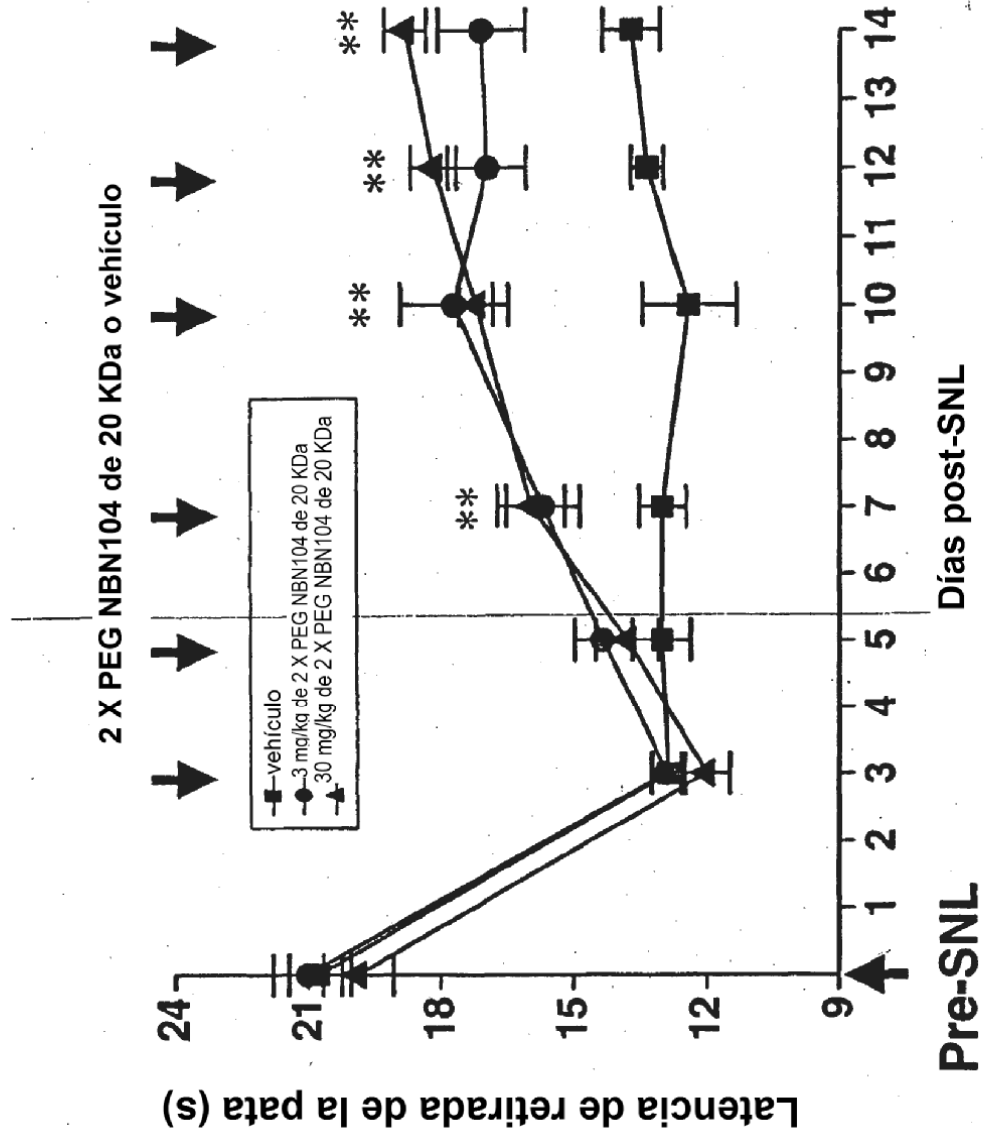
23. El dímero para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18 - 21, en el que la vía de administración al ser humano es intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Figura 1



* p < 0,05 frente a vehículo (2-way RM ANOVA; SNK)

Figura 2



* p < 0,05 frente a vehículo (2-way RM ANOVA; SNK)

FIG. 3

1	<p>AGGPGSRARAAGARGCRLRSQVLPVVRALGLGHRSDLVRF ACTRSSRARTTDARGCRLRSQVLPVSALGLGHSSDELIRF ACTRSSRARATDARGCRLRSQVLPVSALGLGHSSDELIRF ag---srar---argcrlrsqvpv-alglgh-sdel-rf</p>	<p>ser humano ratón rata consenso</p>
41	<p>RFCSGSCRARRSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC RFCSGSCRARRSQHDLSLASLLGAGALRSPPGSRPISQPC RFCSGSCRARRSPHDLSLASLLGAGALRSPPGSRPISQPC rfcsgscrarrs-hdlslasllgagalr-ppgsrp-sqpc</p>	<p>ser humano ratón rata consenso</p>
81	<p>CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLSATACGCLG CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLSATACGCLG crptryeavsfmdvnstwrtd-lsatacgclg</p>	<p>ser humano (ID. SEC. N°: 2) ratón (ID. SEC. N°: 3) rata (ID. SEC. N°: 4) consenso (ID. SEC. N°: 1)</p>
	*	* = Asn95

FIG. 4

Secuencia consenso: (ID. SEC. N°: 1)

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

en la que:

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

FIG. 5

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
PrePro -----MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALL 33
NBN140 -----
NBN116 -----
NBN113 -----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
PrePro SSVAEASLGSA PRSPAPREGPPV LASPAGHLPGGRTARWCSGRARRPPP 83
NBN140 -----PPP 3
NBN116 -----
NBN113 -----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
PrePro QPSRPAPPPAPPSALPRGGRAARAGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVR 133
NBN140 QPSRPAPPPAPPSALPRGGRAARAGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVR 53
NBN116 -----AARAGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVR 29
NBN113 -----AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVR 26

```

*

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
PrePro ALGLGHRSD ELVRF RFC SGSCRRARSP HDLSLASLLGAGALRPPPGSRPV 183
NBN140 ALGLGHRSD ELVRF RFC SGSCRRARSP HDLSLASLLGAGALRPPPGSRPV 103
NBN116 ALGLGHRSD ELVRF RFC SGSCRRARSP HDLSLASLLGAGALRPPPGSRPV 79
NBN113 ALGLGHRSD ELVRF RFC SGSCRRARSP HDLSLASLLGAGALRPPPGSRPV 76

```

+

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
PrePro SQPCCRPT RYEAVSFMDVNSTWR TVDRLSATACGCLG 220 (ID. SEC N°: 5)
NBN140 SQPCCRPT RYEAVSFMDVNSTWR TVDRLSATACGCLG 140 (ID. SEC N°: 6)
NBN116 SQPCCRPT RYEAVSFMDVNSTWR TVDRLSATACGCLG 116 (ID. SEC N°: 7)
NBN113 SQPCCRPT RYEAVSFMDVNSTWR TVDRLSATACGCLG 113 (ID. SEC N°: 2)

```

| * # +

FIG. 6

	10	20	30	40	50	
NBN113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					50
NBN112	GGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					49
NBN111	GPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					48
NBN110	PGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					47
NBN109	GSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					46
NBN108	SRARAAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					45
NBN107	RARAAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					44
NBN106	ARAAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					43
NBN105	RAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					42
NBN104	AAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					41
NBN103	AGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					40
NBN102	GARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					39
NBN101	ARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					38
NBN100	RGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					37
NBN99	GCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRC SGSCRR					36

	60	70	80	90	100	
NBN113	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					100
NBN112	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					99
NBN111	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					98
NBN110	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					97
NBN109	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					96
NBN108	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					95
NBN107	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					94
NBN106	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					93
NBN105	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					92
NBN104	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					91
NBN103	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					90
NBN102	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					89
NBN101	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					88
NBN100	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					87
NBN99	RSPHDSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRT					86

	110	
NBN113	VDRLSATAACGCLG	113 (ID. SEC N°: 2)
NBN112	VDRLSATAACGCLG	112 (ID. SEC N°: 8)
NBN111	VDRLSATAACGCLG	111 (ID. SEC N°: 9)
NBN110	VDRLSATAACGCLG	110 (ID. SEC N°: 10)
NBN109	VDRLSATAACGCLG	109 (ID. SEC N°: 11)
NBN108	VDRLSATAACGCLG	108 (ID. SEC N°: 12)
NBN107	VDRLSATAACGCLG	107 (ID. SEC N°: 13)
NBN106	VDRLSATAACGCLG	106 (ID. SEC N°: 14)
NBN105	VDRLSATAACGCLG	105 (ID. SEC N°: 15)
NBN104	VDRLSATAACGCLG	104 (ID. SEC N°: 16)
NBN103	VDRLSATAACGCLG	103 (ID. SEC N°: 17)
NBN102	VDRLSATAACGCLG	102 (ID. SEC N°: 18)
NBN101	VDRLSATAACGCLG	101 (ID. SEC N°: 19)
NBN100	VDRLSATAACGCLG	100 (ID. SEC N°: 20)
NBN99	VDRLSATAACGCLG	99 (ID. SEC N°: 21)

+