

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 971**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02719102 .2**
96 Fecha de presentación: **28.02.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1395279**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2004**

54 Título: **USO DE POLIPÉPTIDOS DE NEUBLASTINA PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR NEURÓPÁTICO.**

30 Prioridad:
28.03.2001 US 287554 P
28.03.2001 US 820421

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.02.2012

73 Titular/es:
BIOPEN IDEC MA INC.
14 CAMBRIDGE CENTER
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142, US

72 Inventor/es:
SAH, Dinah, W., Y.

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 374 971 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

Uso de polipéptidos de neublastina para el tratamiento del dolor neuropático

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** La invención se refiere a usos de un polipéptido de neublastina para su uso en tratamientos para el dolor neuropático, en los que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** El dolor neuropático es una categoría de dolor que incluye varias formas de dolor crónico y que se produce como resultado de la disfunción de tejido nervioso más que somático. El dolor neuropático, que es el dolor que procede de la disfunción del sistema nervioso central o periférico, también puede ser una consecuencia de daños a nervios periféricos o a regiones del sistema nervioso central, puede ser el resultado de una enfermedad, o puede ser idiopático. Los síntomas de dolor neuropático incluyen sensaciones de ardor, hormigueo, electricidad, parestesia, rigidez, entumecimiento en las extremidades, sensaciones de distorsión corporal, alodinia (dolor provocado por una estimulación de la piel que normalmente es inocua), hiperalgesia (sensibilidad anormal al dolor) e hiperpatía (una respuesta dolorosa exagerada que persiste mucho después de que haya cesado el estímulo).

- 20 **[0003]** Son varias causas comunes de dolor neuropático la diabetes, la quimioterapia del cáncer, la infección por herpes zóster, la compresión de raíces cervicales o lumbares debida a una enfermedad degenerativa de la columna, lesiones malignas de plexos o raíces nerviosas, degeneración nerviosa, tal como por amputación, infección por VIH y lesiones de las vías centrales del dolor, incluyendo el tracto espinotalámico, tálamo o radiaciones talámicas. Las causas adicionales de dolor neuropático incluyen neuropatías inducidas por fármacos o inducidas por toxinas. Por ejemplo, antivirales tales como ddI, ddC y d4T causan comúnmente neuropatías periféricas, como lo hacen la fenitoína (una medicación para convulsiones), isoniazid (una medicación para la tuberculosis), vincristina, vinblastina, taxol, taxotere y cisplatino (agentes quimioterápicos del cáncer), vitaminas a alta dosis y antagonistas del ácido fólico.

- 25 **[0004]** Las terapias actuales para el manejo del dolor neuropático son de un beneficio limitado para muchos pacientes, e implican efectos secundarios indeseables o toxicidades limitantes de dosis. Además, las terapias actuales son sintomáticas, no modificadoras de la enfermedad. Continúa existiendo la necesidad de terapias mejoradas para el manejo y tratamiento del dolor neuropático, especialmente las que se dirijan a la patología subyacente.

30 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

- 35 **[0005]** Esta invención proporciona usos mejorados de un polipéptido de neublastina para su uso en el tratamiento, prevención o retraso del dolor neuropático, en el que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma. Los presentes usos aplican polipéptidos de neublastina ("NBN"), incluyendo polipéptidos de neublastina de longitud completa o polipéptidos de neublastina truncados bioactivos, incluyendo, por ejemplo, al menos las SEC ID N°: 2, 4, 5 y 11-27. Además, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido de neublastina de longitud completa o un polipéptido de neublastina truncado suspendido, disuelto o dispersado en un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento, prevención o retraso del dolor neuropático, en el que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma.

- 40 **[0006]** En una realización específica, el polipéptido de neublastina puede ser cualquier polipéptido de AA₈₀-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2, AA₄₁-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2, AA₁-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2, AA₂₅-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2, AA₂₈-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2, AA₈₀-AA₁₄₄ de SEC ID N°: 4, AA₁-AA₁₄₄ de SEC ID N°: 4, AA₁-AA₂₂₄ de SEC ID N°: 5 o AA₈₁-AA₂₂₄ de SEC ID N°: 5; al menos un polipéptido que comprende la secuencia C-terminal expuesta en AA₁₀₇-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2 o AA₇₆-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2, y que conserva los siete restos de Cys característicos de la familia de GDNF y de la superfamilia de TGF-beta; al menos un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26 o SEC ID N°: 27; o al menos una secuencia polipeptídica que tiene una homología de aminoácidos superior al 70% con una secuencia enumerada anteriormente.

- 50 **[0007]** El polipéptido de neublastina puede modificarse por un resto derivado para tener un tiempo de permanencia prolongado y/o una concentración aumentada en el cuerpo. Los polipéptidos de neublastina pueden ser polipéptidos de neublastina N-glicosilados. Además, el polipéptido de neublastina puede derivatizarse con uno o más restos incluyendo, pero sin limitación, restos de polietilenglicol, ésteres alifáticos, amidas, derivados de N-acilo o derivados de O-acilo.

- 55 **[0008]** En una realización, la invención presenta un uso de un polipéptido de neublastina incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las SEC ID N°: 2, 4, 5 y 11-27, para su uso en el tratamiento, la prevención o el retraso del dolor neuropático, en el que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma en un sujeto, en solitario o en combinación con un compuesto inductor de analgesia seleccionado del grupo que consiste en opioides, antiarrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivantes, antidepresivos, corticosteroides y

fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). En una realización preferida, el compuesto inductor de analgesia es un anticonvulsivante. En otra realización preferida, el compuesto inductor de analgesia es gabapentina (ácido (1-aminometil)ciclohexano acético) o pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metilpropil)butanoico).

5 **[0009]** En otra realización, la invención presenta un uso de un polipéptido de neublastina, incluyendo, por ejemplo, al menos una de las SEC ID N°: 2, 4, 5 y 11-27, para tratar la alodinia táctil en un sujeto, en solitario o en combinación con un compuesto inductor de analgesia seleccionado del grupo que consiste en opioides, antiarrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivantes, antidepressivos, corticosteroides y AINE. En una realización preferida, el compuesto inductor de analgesia es un anticonvulsivante. En otra realización preferida, el compuesto inductor de analgesia es gabapentina (ácido (1-aminometil)ciclohexano acético) o pregabalina (ácido S-

10 (+)-4-amino-3-(2-metilpropil)butanoico).

[0010] El polipéptido de neublastina puede administrarse junto con un agente terapéutico, incluyendo, pero sin limitación, un agente anticanceroso o un agente antiviral. Los agentes anticancerosos incluyen, pero sin limitación, taxol, taxotere, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina. Los agentes antivirales incluyen, pero sin limitación, ddl, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol e isoniazid.

15 **[0011]** La invención incluye un uso de un polipéptido de neublastina para su uso en el tratamiento, prevención o retraso del dolor neuropático en un sujeto, en el que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma. En una realización específica, el dolor neuropático está asociado con neuropatía diabética. En otra realización, el dolor neuropático está asociado con una infección de un sujeto por un virus, incluyendo, pero sin limitación, un herpesvirus, un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y un papilomavirus. El dolor neuropático

20 puede estar asociado con una infección por un virus herpes zóster, o especialmente con una neuralgia postherpética. En una realización adicional, el dolor neuropático está asociado con ciática. También se describe un uso para modular la pérdida de sensibilidad dolorosa en un sujeto aquejado de una neuropatía, tal como neuropatía diabética. La pérdida de sensibilidad dolorosa puede ser una pérdida en la sensibilidad dolorosa térmica.

[0012] En realizaciones adicionales, el dolor neuropático es dolor hiperalgésico, dolor fantasma o hiperalgnesia térmica. Además, el dolor neuropático también puede estar asociado con neuropatía hereditaria (incluyendo, pero sin limitación, ataxia de Friedreich, polineuropatía amiloide familiar, enfermedad de Tangier, enfermedad de Fabry), trastornos metabólicos (incluyendo, pero sin limitación, insuficiencia renal e hipotiroidismo), deficiencias vitamínicas (incluyendo, pero sin limitación, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de vitamina B6 y deficiencia de vitamina E), neuropatías tóxicas y yatrogénicas (incluyendo, pero sin limitación, alcoholismo,

30 intoxicación por vitamina B6, intoxicación por hexacarbono, amiodarona, cloranfenicol, disulfiram, isoniazida, oro, litio, metronidazol, misonidazol, nitrofurantoína), neuropatías infecciosas (incluyendo, pero sin limitación, lepra, enfermedad de Lyme), neuropatías autoinmunes (incluyendo, pero sin limitación, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, gammapatía monoclonal de importancia indeterminada y polineuropatía), neuralgia trigeminal, síndromes de atrapamiento (incluyendo, pero sin limitación, túnel carpiano),

35 neuralgia postraumática, dolor de miembro fantasma, dolor por esclerosis múltiple, síndromes de dolor regional complejos (incluyendo, pero sin limitación, distrofia simpática refleja, causalgia), neoplasia, neuropatía vasculítica/angiopática y neuropatía idiopática.

[0013] Los usos anteriores contemplan administrar al sujeto, preferentemente por vía sistémica, una formulación que comprende un polipéptido de neublastina a una dosificación de entre 1 µg/kg y 30.000 µg/kg de peso corporal del

40 sujeto, por dosis. En realizaciones alternativas, la dosificación está entre 10 µg/kg y 30.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis; entre 10 µg/kg y 10.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis; entre 25 µg/kg y 10.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis; entre 25 µg/kg y 3.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis; y entre 50 µg/kg y 3.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis.

[0014] El polipéptido de neublastina aplicado en los usos anteriores puede administrarse por cualquier sistema de administración adecuado, y preferentemente, del grupo que consiste en administración intravenosa, administración intramuscular, administración intrapulmonar, administración subcutánea y administración intraperitoneal, más preferentemente por administración intramuscular o administración subcutánea. El polipéptido de neublastina aplicado en los usos anteriores también puede administrarse por administración intratecal.

45

[0015] La formulación que contiene polipéptido de NBN de la invención puede administrarse en una composición de liberación prolongada.

50

[0016] A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de

55 conflicto, dominará la presente memoria descriptiva,

[0017] incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

[0018] Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y reivindicaciones siguientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019]

- 5 La FIG. 1 es una representación de línea quebrada que ilustra una prevención casi completa de la alodinia táctil por neublastina (NBN) subcutánea en ratas con ligación de nervios espinales (SNL) L5/L6;
- la FIG. 2 es una representación de línea quebrada que ilustra una prevención casi completa de la hiperalgia térmica por neublastina (NBN) subcutánea en ratas con ligación de nervios espinales (SNL) L5/L6.
- 10 La FIG. 3 es una representación de línea quebrada que ilustra la reversión casi completa de una alodinia táctil completamente establecida por neublastina (NBN) subcutánea en ratas con ligación de nervios espinales (SNL) L5/L6;
- la FIG. 4 es una representación de línea quebrada que ilustra la reversión casi completa de una hiperalgia térmica completamente establecida por neublastina (NBN) subcutánea en ratas con ligación de nervios espinales (SNL) L5/L6.
- 15 La FIG. 5 es una gráfica de barras que ilustra la normalización casi completa de la hipoalgia térmica por neublastina subcutánea en ratas con neuropatía inducida por STZ (estreptozotocina).
- La FIG. 6A y la FIG. 6B son representaciones gráficas que ilustran la prevención de la hiperalgia térmica (FIG. 6A), la prevención de la hipoalgia térmica (FIG. 6B) y la reversión de la hiperalgia térmica (FIG. 6B) por neublastina subcutánea en ratas con neuropatía inducida por STZ (estreptozotocina) a las 4 semanas (FIG. 6A) y 8 semanas (FIG. 6B) postratamiento con STZ.
- 20 La FIG. 7 es una representación de línea quebrada que ilustra la reversión por neublastina (NBN) dependiente de la dosis de una alodinia táctil completamente establecida por neublastina subcutánea en ratas con ligación de nervios espinales (SNL) L5/L6.
- 25 La FIG. 8 es una representación de línea quebrada que ilustra la reversión por neublastina (NBN) dependiente de la dosis de una hiperalgia térmica completamente establecida por neublastina subcutánea en ratas con ligación de nervios espinales (SNL) L5/L6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] Esta invención se refiere a usos de un polipéptido de neublastina y a composiciones que lo comprenden para tratar, prevenir o retrasar el dolor neuropático, en los que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma, en un sujeto en riesgo de, o aquejado de, dicho dolor neuropático.

[0021] Los polipéptidos de neublastina son proteínas que promueven la supervivencia, mantienen la diferenciación fenotípica, previenen la degeneración, promueven la regeneración y restauran la actividad de células y tejidos neuronales. Como alternativa, se ha hecho referencia a la neublastina (inicialmente descrita, por ejemplo, en el documento WO 00/01815) como "artemina" (véase, por ejemplo, el documento WO 00/18799) y "enovina" (véase, por ejemplo, el documento WO 00/04050). La neublastina se ha clasificado como un miembro distante de la superfamilia de TGF- β (Massague, *et al.*, 1994, *Trends in Cell Biology*, 4: 172-178) y es un miembro de la familia del ligando del factor neurotrófico derivado de una línea celular glial ("GDNF"; documento WO 93/06116), en la familia que incluye GDNF, persefina ("PSP"; Milbrandt *et al.*, 1998, *Neuron* 20: 245- 253) y neurturina ("NTN"; documento WO 97/08196). Los ligandos de la subfamilia de GDNF tienen en común su capacidad para inducir la señalización a través de la tirosina quinasa receptora RET. Estos tres ligandos de la subfamilia de GDNF difieren en sus afinidades relativas por una familia de factores neurotróficos, los receptores GFR α . La neublastina actúa preferentemente a través del complejo de GFR α 3-RET. Baudet *et al.*, *Development*, 127, págs. 4335-44 (2000); Baloh *et al.*, *Neuron*, 21, págs. 1291-1302 (1998); Airaksinen *et al.*, *Mol. Cell. Neuroscience*, 13, págs. 313-325 (1999).

[0022] En la Tabla 1 se muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos de Neublastina (SEC ID N°: 2) con los miembros de la subfamilia de GDNF Neurturina (SEC ID N°: 6), Persefina (SEC ID N°: 7) y GDNF (SEC ID N°: 8). Los polipéptidos de neublastina útiles en esta invención mantienen preferentemente la huella molecular de la subfamilia de GDNF, es decir, los restos aminoacídicos subrayados en la Tabla 1.

Tabla 1:
Comparación de secuencia de aminoácidos de Neublastina (SEC ID N°: 2) con Neurturina (SEC ID N°: 6), Persefina (SEC ID N°: 7) y GDNF (SEC ID N°: 8)

Neurturina - completa	-----MQRWKAALASVLCSSVLSIWMCREGLLLSHRLGPA
Neublastina	MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALLSSVAEASLGSAPRSPAPREGPPP
Persefina - completa	-----
GDNF_HUMANO - completo	-----MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPEAPAEEDRSLGRRRAPFALSDDS
Neurturina - completa	LVPLHRLPRTL DARIARLAQYRALQOGAPDAMELRELTWPAGRPPGPRRRAGPRRR
Neublastina	VLASPAGHLPGGRTARWCSGRARRPPPQPSRPAPPPPAPPSALPRGGRRAARAGGPG
Persefina - completa	-MAVGKFLGSLLLSLQLGQGWGPDARGVPVADGEFSSEQVAKAGGTWLGTHRPL
GDNF_HUMANO - completo	NMPEDYDPQFDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQMAVLP RRERNRQAAAANPENSRGKG
Neurturina - completa	RARARLGARPCGLRELEVRVSE <u>LGLGYASDETVLFRYCAGACEA</u> -AARVYDLGLRR
Neublastina	SRARAAGARGCRLRSQVLPVRA <u>LGLGHR</u> SDELVRF <u>FRCSGSCRR</u> -ARSPHDLSLAS
Persefina - completa	ARLRRALSGPCQLWSLTLVSAEL <u>LGLGYASEEKVI</u> <u>FRYCAGSC</u> PRGARTQHGLALAR
GDNF_HUMANO - completo	RRGQRGKNRGCVLTAIHLNVTDL <u>LGLGYETKEELI</u> <u>FRYCSGSCDA</u> -AETTYDKILKN * * : * * : : * : * : * : * : * : * : *
Neurturina - completa	LRQRRRLRRE---RVRA <u>QPCCRP</u> TAYEDEVSFDAHSRYHTVHEL <u>SARECACV</u> -
Neublastina	LLGAGALRPPPGSRPVS <u>QPCCRP</u> TRYE-AVSFMDVNSTWRTVDRL <u>SATACGCLG</u>
Persefina - completa	LQGQGRAHGG----- <u>PCCRP</u> TRYT-DVAFLDDRHRWQLPQL <u>SAAACGCGG</u>
GDNF_HUMANO - completo	LSRNRRLVSD---KVG <u>QACCRP</u> IAFDDDLFLDDNLVYHILRKH <u>SAKRCGCI</u> - * . * * * : : * : * : * : * : * : * : *
* indica posiciones que tienen un solo resto totalmente conservado.	
: indica que uno de los siguientes grupos "fuertes" está totalmente conservado: -STA, NEQK, NHQK, NEDQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW.	
. indica que uno de los siguientes grupos "mas débiles" está totalmente conservado: -CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, HFY.	

[0023] A partir del alineamiento de secuencias de aminoácidos mostrado en la Tabla 1, puede observarse que la neublastina tiene siete restos de cisteína en localizaciones que están conservadas dentro de la superfamilia de TGF-β. Basándose en este alineamiento de secuencias, se demostró que la neublastina es un miembro de la subfamilia de GDNF de factores neurotróficos (LGLG - FR(Y/F)CSGSC - QxCCRP - SAxxCGC, la huella molecular de la subfamilia de GDNF, subrayada en la Tabla 1).

[0024] Los polipéptidos de neublastina útiles en la presente memoria pueden proporcionarse en cualquier forma bioactiva, incluyendo la forma de pre-pro-proteínas, pro-proteínas, proteínas maduras, proteínas glicosiladas, proteínas fosforiladas, formas truncadas o cualquier otra proteína modificada postraduccionalmente. Se asume que una neublastina bioactiva está en la forma dimerizada para cada variante de NBN, ya que la formación del dímero es necesaria para la actividad. Se observa escasa o ninguna actividad en un polipéptido de NBN monomérico. Un polipéptido de neublastina bioactivo incluye un polipéptido dimerizado que, en presencia de un cofactor (tal como GFRα3 o RET), se une a GFRα3 o a un complejo de GFRα3 y RET, induce la dimerización de RET y la autofosforilación de RET. Por consiguiente, un "polipéptido de neublastina," como se usa en la presente memoria, es un polipéptido que posee actividad neurotrófica (por ejemplo, como se describe en el documento WO 00/01815) de la forma siguiente:

1. Neublastina de tipo silvestre

[0025] Las secuencias de aminoácidos ("aa" o "AA") de neublastina de "tipo silvestre" siguientes son ejemplares de las que se aplican en los usos de las composiciones de esta invención:

- 20 -- AA₈₀-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2 (prepro humana de "tipo silvestre",
- AA₄₁-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2 (pro humana),
- AA₁-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2 (140AA madura (SEC ID N°: 11); en lo sucesivo "140NBN"),
- AA₂₅-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2 (116AA madura (SEC ID N°: 12); en lo sucesivo "116NBN"),
- AA₂₈-AA₁₄₀ de SEC ID N°: 2 (113AA madura (SEC ID N°: 13); en lo sucesivo "113NBN"),
- 25 -- AA₈₀-AA₁₄₄ de SEC ID N°: 4 (prepro murina),
- AA₁-AA₁₄₄ de SEC ID N°: 4 (madura murina -- 144 AA),

-- AA₁-AA₂₂₄ de SEC ID N°: 5 (prepro de rata),

-- AA₈₁-AA₂₂₄ de SEC ID N°: 5 (madura de rata -- 144 AA),

-- Péptidos con una secuencia C-terminal expuesta en los AA₁₀₇-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2, más preferentemente AA₇₆-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2, y que conservan los 7 restos de Cys característicos de la familia de GDNF y de la superfamilia de TGF-β.

[0026] En una realización, el polipéptido de neublastina preferido contiene (siete) cisteínas conservadas como en la SEC ID N°: 2 en las posiciones 43, 70, 74, 107, 108, 136 y 138. Se sabe que estos siete restos de cisteína conservados dentro de la superfamilia de TGF-β forman tres enlaces disulfuro intramonómicos (contemplados, por ejemplo, en la SEC ID N°: 2 entre los restos de cisteína 43-108, 70-136 y 74-138) y un enlace disulfuro intermonomérico (contemplado, por ejemplo, en la SEC ID N°: 2 entre los restos de cisteína 107-107), que junto con la región de cadena beta extendida constituyen el motivo estructural conservado para la superfamilia de TGF-β. Véase, por ejemplo, Daopin *et al.*, *Proteins* 1993, 17: 176-192.

2. Neublastinas truncadas ("NBN")

[0027] Los polipéptidos de neublastina útiles en la presente invención también incluyen formas truncadas de la molécula de neublastina de longitud completa. En dichas moléculas truncadas, se han delecionado uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o del extremo C-terminal, preferentemente del extremo N-terminal. El polipéptido de neublastina truncado puede obtenerse proporcionando un polipéptido de neublastina maduro y poniendo el polipéptido de neublastina maduro en contacto con al menos una proteasa en condiciones suficientes para producir el polipéptido de neublastina truncado. Preferentemente, al menos una proteasa es una exoproteasa, y la puesta en contacto del polipéptido de neublastina maduro da como resultado la formación de un producto de digestión de polipéptido de neublastina con exopeptidasa que puede digerirse adicionalmente con una dipeptidil peptidasa.

[0028] Los polipéptidos de neublastina truncados descritos en la presente memoria incluyen preferentemente una secuencia polipeptídica que incluye los siete restos de cisteína conservados en la secuencia de neublastina madura. En ciertas realizaciones preferidas, el polipéptido de neublastina truncado incluye al menos los 85 aminoácidos carboxi-terminales del polipéptido de neublastina maduro 113NBN.

[0029] Otras variantes de Neublastina incluyen formas de NBN truncadas. Los ejemplos de éstas incluyen:

- (i) la secuencia polipeptídica de 112AA denominada en la presente memoria NBN112, que posee los 112 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 29-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 14).
- (ii) la secuencia polipeptídica de 111AA denominada en la presente memoria NBN111, que posee los 111 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 30-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 15).
- (iii) la secuencia polipeptídica de 110AA denominada en la presente memoria NBN110, que posee los 110 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 31-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 16).
- (iv) la secuencia polipeptídica de 109AA denominada en la presente memoria NBN109, que posee los 109 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 32-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 17).
- (v) la secuencia polipeptídica de 108AA denominada en la presente memoria NBN108, que posee los 108 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 33-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 18).
- (vi) la secuencia polipeptídica de 107AA denominada en la presente memoria NBN107, que posee los 107 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 34-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 19).
- (vii) la secuencia polipeptídica de 106AA denominada en la presente memoria NBN106, que posee los 106 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 35-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 20).
- (viii) la secuencia polipeptídica de 105AA denominada en la presente memoria NBN105, que posee los 105 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 36-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 21).
- (ix) la secuencia polipeptídica de 104AA denominada en la presente memoria NBN104, que posee los 104 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los

aminoácidos 37-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 22).

- (x) la secuencia polipeptídica de 103AA denominada en la presente memoria NBN103, que posee los 103 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 38-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 23).
- 5 (xi) la secuencia polipeptídica de 102AA denominada en la presente memoria NBN102, que posee los 102 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 39-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 24).
- (xii) la secuencia polipeptídica de 101AA denominada en la presente memoria NBN101, que posee los 101 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 40-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 25).
- 10 (xiii) la secuencia polipeptídica de 100AA denominada en la presente memoria NBN100, que posee los 100 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 41-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 26).
- 15 (xiv) la secuencia polipeptídica de 99AA denominada en la presente memoria NBN99, que posee los 99 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina maduro, por ejemplo, los aminoácidos 42-140 de la SEC ID N°: 2 (SEC ID N°: 27).

[0030] Se entiende que las formas truncadas de Neublastina descritas en la presente memoria (por ejemplo, las formas de 112AA a 99AA) tienen actividad neurotrófica.

[0031] En realizaciones más preferidas, el polipéptido de neublastina truncado son los 99 aa, 100 aa, 101 aa, 102 aa, 103 aa, 104 aa, 105 aa, 106 aa, 107 aa, 108 aa, 109 aa, 110 aa, 111 aa o 112 aa aminoácidos carboxi-terminales del polipéptido de neublastina maduro de 113 AA (es decir, NBN99, NBN100, NBN101, NBN102, NBN103, NBN104, NBN105, NBN106, NBN107, NBN108, NBN109, NBN110, NBN111 o NBN112, respectivamente). Las secuencias también pueden encontrarse en los polipéptidos de neublastina murina y de rata como los 99 aa, 100 aa, 101 aa, 102 aa, 103 aa, 104 aa, 105 aa, 106 aa, 107 aa, 108 aa, 109 aa, 110 aa, 111 aa o 112 aa carboxi-terminales, respectivamente, en las SEC ID N°: 4 y 5. Estos ejemplos más preferidos de formas de NBN truncadas son bioactivos (denominados "polipéptidos de neublastina truncados bioactivos") ya que se ha demostrado en la presente memoria que tienen actividad neurotrófica. Como se ha indicado anteriormente, es necesaria la dimerización de NBN para la bioactividad, ya que se observa de escasa a ninguna actividad con el polipéptido monomérico de NBN.

30 3. Neublastinas variantes ("NBN") con una similitud o identidad sustancial

[0032] Las NBN útiles en esta invención también incluyen los polipéptidos de NBN que tienen una secuencia de aminoácidos con una similitud o identidad sustancial con los diversos polipéptidos de "neublastina" prepro, pro, maduros y truncados expuestos anteriormente. Preferentemente, el polipéptido de neublastina usado tiene una identidad o similitud de al menos el 70%, más preferentemente del 85%, aún más preferentemente del 90%, o aún más preferentemente del 95% con los polipéptidos de neublastina en las SEC ID N°: 2, 4, 5 u 11-27. Más preferentemente, el polipéptido de neublastina usado tiene una similitud o identidad de al menos el 99% con los polipéptidos de neublastina en las SEC ID N°: 2, 4, 5 u 11-27.

[0033] El grado con el que un polipéptido candidato comparte homología con un polipéptido de neublastina de la invención se determina como el grado de similitud o identidad entre dos secuencias de aminoácidos.

[0034] Un alto nivel de identidad de secuencia indica una probabilidad de que la primera secuencia proceda de la segunda secuencia. La identidad de secuencia de aminoácidos requiere secuencias de aminoácidos idénticas entre dos secuencias alineadas. Por lo tanto, una secuencia candidata que comparta una identidad de aminoácidos del 70% con una secuencia de referencia requiere que, después del alineamiento, el 70% de los aminoácidos en la secuencia candidata sean idénticos a los aminoácidos correspondientes en la secuencia de referencia. La identidad se determina mediante análisis informático, tal como, sin limitaciones, el programa de alineamiento informático ClustalX (Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F y Higgins DG: 'The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools'; *Nucleic Acids Res.* 1997, **25** (24): 4876-82), y los parámetros por defecto sugeridos en el mismo. Usando este programa, la parte madura de un polipéptido codificado por una secuencia de ADN análoga de la invención presenta un grado de identidad de al menos el 70%, más preferentemente del 85%, aún más preferentemente del 90%, o aún más preferentemente del 95%, más preferentemente de al menos el 99% con las secuencias de aminoácidos presentadas en la presente memoria como SEC ID N°: 2 (NBN humana), SEC ID N°: 4 y 5 (NBN de roedor) o SEC ID N°: 11-27 (NBN maduras y truncadas).

[0035] Se conocen otras herramientas de alineamiento, tales como el algoritmo de programación dinámica descrito en Needleman *et al.*, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), y el Programa Align, un paquete informático comercial producido por DNASTar, Inc. Una vez que se realiza y se refina el alineamiento entre las secuencias candidata y de referencia,

se calcula una puntuación de porcentaje de homología. Los aminoácidos individuales de cada secuencia se comparan secuencialmente de acuerdo con su similitud entre sí.

[0036] Los factores de similitud incluyen tamaño, forma y carga eléctrica similares. Un método particularmente preferido de determinación de similitudes de aminoácidos es la matriz PAM250 descrita en Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure 345-352 (1978 y Supl.). Una puntuación de similitud se calcula primero como la suma de las puntuaciones de similitud de aminoácidos por parejas alineados. Las inserciones y deleciones se ignoran para los fines del porcentaje de homología e identidad. Por consiguiente, no se usan penalizaciones por huecos en este cálculo. La puntuación bruta se normaliza después dividiéndola por la media geométrica de las puntuaciones del compuesto candidato y del esqueleto de siete cisteínas de los polipéptidos de neublastina. La media geométrica es la raíz cuadrada del producto de estas puntuaciones. La puntuación bruta normalizada es el porcentaje de homología.

[0037] Como se ha señalado anteriormente, los polipéptidos de neublastina de la invención incluyen polipéptidos variantes. En el contexto de esta invención, la expresión "polipéptido variante" incluye un polipéptido (o proteína) que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de las secuencias presentadas como SEC ID N°: 2 (NBN humana), o SEC ID N°: 4 y 5 (NBN de roedor), o SEC ID N°: 11-27 (NBN maduras y truncadas), en una o más posiciones de aminoácidos. Dichos polipéptidos variantes incluyen los polipéptidos modificados descritos anteriormente, así como sustituciones conservativas, variantes de corte y empalme, isoformas, homólogos de otras especies y polimorfismos.

[0038] Como se define en la presente memoria, la expresión "sustituciones conservativas" denota la sustitución de un resto aminoacídico por otro resto biológicamente similar. Típicamente, la similitud biológica, como se ha mencionado anteriormente, refleja sustituciones en la secuencia de tipo silvestre con aminoácidos conservados. Por ejemplo, se esperaría que las sustituciones de aminoácidos conservativas tuvieran escaso o ningún efecto sobre la actividad biológica, particularmente si están presentes en menos del 10% del número total de restos en el polipéptido o proteína. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos conservativas representan cambios en menos del 5% del polipéptido o proteína, más preferentemente menos del 2% del polipéptido o proteína. Por ejemplo, cuando se calcula de acuerdo con, por ejemplo, la 113NBN humana, la mayoría de las sustituciones conservativas preferidas representarían menos de tres sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos madura de tipo silvestre. En una realización particularmente preferida, hay una sola sustitución de aminoácido en la secuencia madura, en la que ni el aminoácido sustituido ni el de reemplazo son cíclicos.

[0039] Otros ejemplos de sustituciones particularmente conservativas incluyen la sustitución de un resto hidrófobo por otro, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, o la sustitución de un resto polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por aspártico, o glutamina por asparagina y similares.

[0040] La expresión sustitución conservativa también incluye el uso de un resto aminoacídico sustituido en lugar de un resto aminoacídico precursor no sustituido con tal de que los anticuerpos generados contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.

[0041] Las modificaciones de esta secuencia de aminoácidos primaria pueden dar como resultado proteínas que tengan una actividad sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido homólogo no modificado y, por lo tanto, pueden considerarse análogos funcionales de las proteínas precursoras. Dichas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, como por mutagénesis dirigida, o pueden aparecer espontáneamente, e incluyen variantes de corte y empalme, isoformas, homólogos de otras especies y polimorfismos. Dichos análogos funcionales también están contemplados de acuerdo con la invención.

[0042] Además, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos primaria pueden dar como resultado proteínas que no conserven la actividad biológica de la proteína precursora, incluyendo formas negativas dominantes, etc. Una proteína negativa dominante puede interferir con la proteína de tipo silvestre por unión a, o secuestro de otro modo de agentes reguladores, tales como componentes aguas arriba o aguas abajo, que normalmente interactúan funcionalmente con el polipéptido. Dichas formas negativas dominantes también están contempladas de acuerdo con la invención.

4. NBN derivadas o modificadas

[0043] Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos quiméricos o polipéptidos de fusión escindibles en los que se fusiona otro polipéptido en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido quimérico puede producirse por fusión de una secuencia de ácido nucleico (o una porción de la misma) que codifica otro polipéptido con una secuencia de ácido nucleico (o una porción de la misma) de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos quiméricos son técnicas convencionales. Dichas técnicas requieren habitualmente unir las secuencias de modo que estén en la misma fase de lectura abierta, y la expresión del polipéptido fusionado bajo el control del mismo promotor o promotores y del mismo terminador.

[0044] Los polipéptidos de neublastina pueden ser polipéptidos N-glicosilados. En una realización, el resto de Asn en la posición 122 de la SEC ID N°: 2 está glicosilado.

Tabla 3. Comparación de distancia de neublastina humana, de ratón y rata

	10	20	30	40	50	60
NBN humana	MELGLGGLSTLSHCPPPRKQFALWPTLALALLSSVAEASLGSAPERSPAFRIGPFPVLAS					
NBN de ratónEPTA.....LR..W.S.W.....V.....C.T.....DPMS.....A.D.S.....P					
NBN de rataEPTA.....LR..W.....T.....DPMS.....S.DV.S.....P					
	70	80	90	100	110	120
NBN humana	PAGHLPGGRTARWCSGRARRPPPOFSPHPAPPPAPESALP---RGARRAARAGGFGSRAR					
NBN de ratón	TD.....H..HL..E..L.....SPQ.....G.ALQS.PAAL..A.....TRS....					
NBN de rata	TDY.....H..HL..E..L.....SPQ.....G.ALQS.PAAL..A.....TRS....					
	130	140	150	160	170	180
NBN humana	AAGARGCRLRSQLVVPRALGLGHRSDLVRFRCSCGSCRRARSPHDLASLLGAGALRF					
NBN de ratón	TD.....S.....S.....I.....Q.....S					
NBN de rata	TD.....S.....S.....I.....Q.....S					
	190	200	210	220		
NBN humana	PPGSREYSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDLRSATACGLG (SEC ID N° :2)					
NBN de ratónI.....H..... (SEC ID N° :4)					
NBN de rataI.....H..... (SEC ID N° :5)					

Métodos de producción del polipéptido de neublastina

[0048] El polipéptido de neublastina usado en la presente memoria puede aislarse de células de mamífero, preferentemente de una célula humana o de una célula de origen murino. En una realización más preferida, el polipéptido de neublastina puede aislarse de tejido cardiaco humano, de músculo esquelético humano, de páncreas humano o de tejido cerebral humano, en particular de núcleo caudado o de tálamo, o puede obtenerse a partir de ADN de origen de mamífero, como se analiza en más detalle a continuación.

[0049] Como alternativa, los polipéptidos de neublastina pueden obtenerse por expresión de polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos de neublastina. Dichos polinucleótidos incluyen secuencias de ADN, ADNc y ARN y están disponibles en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 00/01815, WO 00/04050 y WO 00/18799. Los polinucleótidos particularmente útiles tienen la secuencia de ADN presentada como SEC ID N°: 1 (ADNc de NBN humana), y la secuencia de ADN presentada como SEC ID N°: 3 (ADNc de NBN de ratón). Además, puede usarse la secuencia genómica para la NBN humana (véase el N° de Acceso de GenBank AC 005038).

[0050] Más específicamente, los polipéptidos de neublastina útiles en la presente memoria pueden obtenerse por cultivo de una célula que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina en condiciones que permitan la producción del polipéptido de neublastina, seguido de la recuperación del polipéptido de neublastina del medio de cultivo. La secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina puede ser una secuencia de ácido nucleico que normalmente sea endógena a la célula o una secuencia de ácido nucleico obtenida exógenamente que se introduce en una célula de "producción". Cuando las células se van a modificar genéticamente con el fin de producir un polipéptido de neublastina, las células pueden modificarse por métodos convencionales o por activación génica.

[0051] De acuerdo con métodos convencionales, una molécula de ADN que contiene una secuencia de ADNc o ADN genómico de neublastina puede estar contenida dentro de una construcción de expresión y transfectarse en células por métodos convencionales incluyendo, pero sin limitación, transfección mediada por liposomas, polibreno o DEAE dextrano, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección o microproyectiles impulsados por velocidad ("biolística"). Como alternativa, se podría usar un sistema que administre ADN mediante un vector viral. Los virus que se sabe que son útiles para la transferencia de genes incluyen adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus, herpesvirus, virus de las paperas, poliovirus, retrovirus, virus Sindbis y virus vaccinia tales como el virus de la viruela del canario, así como la infección por Baculovirus de células de insecto, en particular células de insecto Sf9.

[0052] Como alternativa, las células pueden modificarse para producir un polipéptido de neublastina usando una estrategia de activación génica ("GA"), tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.733.761 y 5.750.376.

[0053] Por consiguiente, la expresión "genéticamente modificada," como se usa en la presente memoria en referencia a células, pretende incluir células que expresan un producto génico particular después de la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica el producto génico y/o elementos reguladores que controlan la

expresión de una secuencia codificante endógena para el producto génico. La molécula de ácido nucleico puede introducirse por direccionamiento génico, que permite la incorporación de la molécula de ácido nucleico en un sitio genómico particular.

5 **[0054]** En una realización, el polipéptido de neublastina se produce en una célula bacteriana, preferentemente *E. coli*. En una realización diferente, el polipéptido de neublastina se produce en una célula derivada de insecto, particularmente Sf9.

10 **[0055]** En otra realización, el polipéptido de neublastina se produce, por ejemplo, en una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana, un ovocito o una célula de levadura. La célula de la invención puede ser, sin limitación, una célula de riñón embrionario humano ("HEK"), por ejemplo, una célula HEK 293, una célula BHK21, una célula de ovario de hámster chino ("CHO"), una célula de ovocito de *Xenopus laevis* ("XLO") o *Pichia pastoris* (levadura). En una realización, la célula de la invención es una célula fúngica, por ejemplo, una célula fúngica filamentosa. En otra realización más, la célula es una célula de insecto, más preferentemente la célula Sf9. Son células de mamífero adicionales de la invención las líneas celulares PC12, HiB5, RN33b, células progenitoras neuronales humanas, y otras células derivadas de células humanas, especialmente células neuronales.

15 **[0056]** Los ejemplos de células primarias o secundarias incluyen fibroblastos, células epiteliales incluyendo células epiteliales mamarias e intestinales, células endoteliales, elementos formados de la sangre, incluyendo linfocitos y células de médula ósea, células gliales, hepatocitos, queratinocitos, células musculares, células neuronales o los precursores de estos tipos celulares. Los ejemplos de líneas celulares humanas inmortalizadas útiles en los presentes métodos incluyen, pero sin limitación, células de melanoma de Bowes (N° de Acceso ATCC CRL 9607),
 20 células de Daudi (N° de Acceso ATCC CCL 213), células HeLa y derivados de células HeLa (N° de Acceso ATCC CCL 2, CCL 2.1 y CCL 2.2), células HL-60 (N° de Acceso ATCC CCL 240), células HT-1080 (N° de Acceso ATCC CCL 121), células de Jurkat (N° de Acceso ATCC TIB 152), células de carcinoma KB (N° de Acceso ATCC CCL 17), células de leucemia K-562 (N° de Acceso ATCC CCL 243), células de cáncer de mama MCF-7 (N° de Acceso ATCC BTH 22), células MOLT-4 (N° de Acceso ATCC 1582), células Namalwa (N° de Acceso ATCC CRL 1432), células
 25 Raji (N° de Acceso ATCC CCL 86), células RPMI 8226 (N° de Acceso ATCC CCL 155), células U-937 (N° de Acceso ATCC CRL 1593), células WI-38VA13 sublínea 2R4 (N° de Acceso ATCC CLL 75.1) y células de carcinoma de ovario 2780AD (Van der Blick *et al.*, *Cancer Res.* 48: 5927-5932, 1988), así como células de heterohibridoma producidas por fusión de células humanas y células de otras especies. También pueden usarse cepas de fibroblastos humanos secundarios, tales como WI-38 (N° de Acceso ATCC CCL 75) y MRC-5 (N° de Acceso ATCC
 30 CCL 171).

[0057] Cuando la célula es una célula eucariota, la incorporación del polinucleótido heterólogo de la invención puede llevarse a cabo en particular por infección (empleando un vector viral), por transfección (empleando un vector plasmídico), usando precipitación con fosfato de calcio, microinyección, electroporación, lipofección u otros métodos físico-químicos conocidos en la técnica.

35 **[0058]** Los polipéptidos de NBN se aíslan de cultivos de células de producción, o de medio de cultivo acondicionado por células de producción, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales incluyendo el replegamiento si es aplicable. A continuación se describen técnicas adecuadas en los Ejemplos.

Sujetos para tratamiento

40 **[0059]** Esta invención puede usarse para el tratamiento, profilaxis o retraso del dolor neuropático, en el que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma, en un sujeto mamífero aquejado del mismo, o en riesgo del mismo, por aplicación de un polipéptido de neublastina. Los sujetos en riesgo de desarrollar una neuropatía incluyen sujetos con diabetes, sujetos que están recibiendo quimioterapia, sujetos que han experimentado ciertos traumatismos, sujetos que han ingerido diversas toxinas o fármacos, sujetos que experimenten ciertas deficiencias vitamínicas, sujetos infectados con ciertos patógenos víricos, sujetos aquejados de
 45 diversos trastornos autoinmunes y trastornos metabólicos, y sujetos que han experimentado ciertos daños nerviosos o neurodegeneración. Los sujetos mamíferos incluyen ovejas, caballos, perros, gatos, cerdos, conejos, cobayas, ratas, hámsteres, jerbos y ratones, pero más preferentemente son seres humanos.

[0060] Típicamente, en sujetos humanos, el paciente es resistente a otras terapias del dolor tradicionales o el sujeto responde insuficientemente a otras de dichas terapias del dolor para proporcionar un control del dolor satisfactorio.

50 **[0061]** En general, esta invención presenta protocolos tanto de tratamiento profiláctico como de tratamiento terapéutico. En el tratamiento profiláctico, se prepara un polipéptido de neublastina que se administrará a un sujeto en riesgo de dolor neuropático, en el que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma; se esperaría que dichos sujetos fueran sujetos con una neuropatía en fase temprana. El tratamiento con neublastina en tales circunstancias serviría para tratar de forma preventiva a pacientes en riesgo.

55 **[0062]** En el tratamiento terapéutico, se prepara un polipéptido de neublastina que se administrará a un sujeto que ha experimentado dolor neuropático, en el que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma; se esperaría que dichos sujetos fueran sujetos con una neuropatía en fase tardía. El tratamiento con neublastina en tales circunstancias serviría para aliviar dicho dolor neuropático. Dichos pacientes en fase tardía pueden haber

recibido varias terapias, comenzando con la automedicación (tal como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, ibuprofeno). Dichos tratamientos pueden aumentarse a escala a antidepresivos (por ejemplo, antidepresivos tricíclicos, venlafaxina e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina —las medicaciones específicas incluyen amitriptilina, desipramina, imipramina y nortriptilina) o anticonvulsivantes (por ejemplo, gabapentina, carbamazepina, lamotrigina, topiramato y fenitoína). Otra medicación incluye analgésicos tópicos (por ejemplo, capsaicina y lidoderm), antiarrítmicos y opioides. Puede realizarse una cirugía en casos de neuropatía grave. Los estudios indican que menos del 50% de los pacientes responden a analgésicos tópicos, antiarrítmicos, opioides o cirugía.

Métodos y composiciones farmacéuticas

- 10 **[0063]** Esta invención proporciona usos de un polipéptido de neublastina para tratar, prevenir o retrasar el dolor neuropático, en los que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma. Los presentes usos aplican polipéptidos de neublastina, incluyendo polipéptidos de neublastina de longitud completa o polipéptidos de neublastina truncados bioactivos. Además, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido de neublastina de longitud completa o un polipéptido de neublastina truncado suspendido, disuelto o dispersado en un vehículo farmacéuticamente aceptable para tratar, prevenir o retrasar el dolor neuropático, en las que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma.

1. Tratamiento del dolor neuropático

- 20 **[0064]** En una realización, la invención presenta un uso de un polipéptido de neublastina para tratar, prevenir o retrasar el dolor neuropático, en el que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma. El polipéptido de neublastina puede administrarse en solitario (monoterapia) o como parte de un régimen de terapia de combinación. Las terapias de combinación preferidas incluyen un compuesto inductor de analgesia seleccionado del grupo que consiste en opioides, antiarrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivantes, antidepresivos, corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

- 25 **[0065]** La invención también proporciona tratamientos de neuropatías inducidas por quimioterapia (tales como las causadas por administración de agentes quimioterápicos, por ejemplo, taxol o cisplatino); neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por patógenos (por ejemplo, inducidas por virus), neuropatías inducidas por deficiencias vitamínicas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas, por aplicación de un polipéptido de neublastina. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.496.804 y 5.916.555. La invención puede usarse todavía además para el tratamiento de mononeuropatías, mononeuropatías múltiples y polineuropatías, incluyendo neuropatías axonales y desmielinizantes, usando los nucleótidos y polipéptidos de neublastina de esta invención.

[0066] El dolor neuropático puede estar asociado con varias neuropatías periféricas, incluyendo:

- (a) neuropatías inducidas por quimioterapia,
- (b) neuropatías inducidas por toxinas (incluyendo, pero sin limitación, neuropatías inducidas por alcoholismo, intoxicación por vitamina B6, intoxicación por hexacarbono, amiodarona, cloranfenicol, disulfiram, isoniazida, oro, litio, metronidazol, misonidazol, nitrofurantoína),
- (c) neuropatías inducidas por fármacos, incluyendo dolor neuropático inducido por fármacos terapéuticos (tal como el causado por agentes anticancerosos, particularmente agentes anticancerosos seleccionados del grupo que consiste en taxol, taxotere, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina; y tal como el causado por agentes antivirales, particularmente agentes antivirales seleccionados del grupo que consiste en ddl, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol e isoniazid).
- (d) neuropatías inducidas por deficiencias vitamínicas (incluyendo, pero sin limitación, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de vitamina B6 y deficiencia de vitamina E),
- (e) neuropatías idiopáticas,
- (f) neuropatías diabéticas,
- (g) daños nerviosos inducidos por patógenos,
- (h) daños nerviosos inducidos por inflamación,
- (i) neurodegeneración,
- (j) neuropatía hereditaria (incluyendo, pero sin limitación, ataxia de Friedreich, polineuropatía amiloide familiar, enfermedad de Tangier, enfermedad de Fabry),
- (k) trastornos metabólicos (incluyendo, pero sin limitación, insuficiencia renal e hipotiroidismo),

(l) neuropatías infecciosas y virales (incluyendo, pero sin limitación, dolor neuropático asociado con lepra, enfermedad de Lyme, dolor neuropático asociado con infección por un virus, particularmente un virus seleccionado del grupo que consiste en un herpesvirus (por ejemplo, herpes zóster que puede conducir a neuralgia postherpética), un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y un papilomavirus),

5 (m) neuropatías autoinmunes (incluyendo, pero sin limitación, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, gammapatía monoclonal de importancia indeterminada y polineuropatía),

(n) neuralgia trigeminal y síndromes de atrapamiento (incluyendo, pero sin limitación, túnel carpiano),

(o) otros síndromes de dolor neuropático incluyendo neuralgia postraumática, dolor de miembro fantasma, dolor por esclerosis múltiple, síndromes de dolor regional complejos (incluyendo, pero sin limitación, distrofia simpática refleja, causalgia), dolor asociado a neoplasia, neuropatía vasculítica/angiopática y ciática.

[0067] El dolor neuropático puede manifestarse como alodinia, dolor hiperalgésico, hiperalgesia térmica o dolor fantasma.

2. Tratamiento de la alodinia táctil

[0068] La expresión "alodinia táctil" se refiere típicamente a la afección en un sujeto en la que se provoca dolor por 15 una estimulación de la piel (por ejemplo, tacto) que normalmente es inocua. Esta invención presenta un uso de un polipéptido de neublastina para su uso en el tratamiento de la alodinia táctil en un sujeto. En una realización, la alodinia táctil se trata mediante un polipéptido de neublastina solamente.

[0069] En una segunda realización, la alodinia táctil se trata por administración al sujeto de una cantidad eficaz de un polipéptido de neublastina en combinación con una cantidad eficaz de un compuesto inductor de analgesia 20 seleccionado del grupo que consiste en opioides, antiarrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivantes, antidepressivos, corticosteroides y AINE. En una realización preferida, el compuesto inductor de analgesia es un anticonvulsivante. En otra realización preferida, el compuesto inductor de analgesia es gabapentina (ácido (1-aminometil)ciclohexano acético) o pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metilpropil)butanoico).

3. Tratamiento para la reducción de la pérdida de la sensibilidad dolorosa

25 **[0070]** También se describe un uso para reducir la pérdida de la sensibilidad dolorosa en un sujeto aquejado de una neuropatía. En una realización preferida, la neuropatía es neuropatía diabética. En una realización preferida, la pérdida de sensibilidad dolorosa es una pérdida de sensibilidad dolorosa térmica. Esta invención contempla un tratamiento tanto profiláctico como terapéutico.

30 **[0071]** En el tratamiento profiláctico, se administra un polipéptido de neublastina a un sujeto en riesgo de desarrollar una pérdida de sensibilidad dolorosa; se esperaría que dichos sujetos fueran sujetos con una neuropatía en fase temprana. El tratamiento con neublastina en tales circunstancias serviría para tratar de forma preventiva a pacientes en riesgo.

35 **[0072]** En el tratamiento terapéutico, también se describe que se administra un polipéptido de neublastina a un sujeto que ha experimentado una pérdida de sensibilidad dolorosa como resultado de su afección por una neuropatía; se esperaría que dichos sujetos fueran sujetos con una neuropatía en fase tardía. El tratamiento con neublastina en tales circunstancias serviría para rescatar la sensibilidad dolorosa apropiada en el sujeto.

4. Tratamiento de infecciones víricas y neuropatías asociadas a virus

40 **[0073]** Se contempla el tratamiento profiláctico de neuropatías infecciosas y víricas. El tratamiento profiláctico está indicado después de la determinación de una infección vírica y antes de la aparición del dolor neuropático. Durante el tratamiento, el polipéptido de NBN se administra para prevenir la aparición del dolor neuropático asociado con lepra, enfermedad de Lyme, dolor neuropático asociado con una infección por un virus, particularmente un virus seleccionado del grupo que consiste en un herpesvirus (y más particularmente por un virus herpes zóster, que puede conducir a una neuralgia postherpética), un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y un papilomavirus). En una realización alternativa, se usa un polipéptido de NBN para reducir la gravedad del dolor neuropático, si apareciese.

45 **[0074]** Los síntomas de una infección vírica aguda incluyen con frecuencia la aparición de una erupción. Otros síntomas incluyen, por ejemplo, el desarrollo de dolor persistente en el área del cuerpo afectada, que es una complicación común de una infección por herpes zóster (zóster). La neuralgia postherpética puede durar un mes o más, y puede aparecer varios meses después de que haya desaparecido cualquier síntoma de tipo erupción. La neuralgia postherpética puede ser muy grave y prolongada, y puede ser muy resistente al tratamiento.

50 5. Tratamiento de neuropatías diabéticas

[0075] Se contempla el tratamiento profiláctico de neuropatías asociadas a diabetes. El tratamiento profiláctico de las neuropatías diabéticas comenzaría después de la determinación del diagnóstico inicial de diabetes o de síntomas asociados con diabetes y antes de la aparición del dolor neuropático. El tratamiento profiláctico de las neuropatías

diabéticas también puede comenzar tras la determinación de que un sujeto está en riesgo de desarrollar diabetes o síntomas asociados con diabetes. Durante el tratamiento, se usa un polipéptido de NBN para prevenir la aparición del dolor neuropático o reducir la gravedad del dolor neuropático, si apareciese.

5 [0076] Los resultados de la FIG. 6A y FIG. 6B son relativos al tratamiento de la neuropatía diabética en pacientes humanos que necesitan dicho tratamiento. Se contempla la prevención de la hipoalgesia térmica y la prevención y reversión de la hiperalgesia térmica, como se describe en el Ejemplo 6.

6. Dosificación

10 [0077] Los usos anteriores contemplan, preferentemente como administración sistémica, una formulación que comprende un polipéptido de neublastina a una dosificación de entre 1 µg/kg y 30.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis; preferentemente la dosificación está entre 10 µg/kg y 10.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis; más preferentemente la dosificación está entre 25 µg/kg y 3.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis.

15 [0078] Se contemplan diversos regímenes de dosificación para el tratamiento o la prevención de la alodinia táctil. En una realización, se aplica una formulación que comprende un polipéptido de neublastina en los usos de administración a un sujeto de una dosificación de entre 1 µg/kg y 30.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis. En otra realización, la dosificación está entre 10 µg/kg y 30.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis. En una realización adicional, la dosificación está entre 10 µg/kg y 10.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis. En una realización diferente, la dosificación está entre 25 µg/kg y 10.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis. En otra realización más, la dosificación está entre 25 µg/kg y 3.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis. En una realización más preferible, la dosificación está entre 50 µg/kg y 3.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis.

20 [0079] Asimismo, se describen diversos programas de dosificación para un tratamiento para modular la pérdida de sensibilidad dolorosa. La administración a un sujeto de una formulación que comprende un polipéptido de neublastina incluye administrar NBN a una dosificación de entre 1 µg/kg y 30.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis; preferentemente la dosificación está entre 10 µg/kg y 10.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis; más preferentemente la dosificación está entre 25 µg/kg y 3.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis.

7. Administración

30 [0080] El polipéptido de neublastina aplicado en los usos anteriores puede administrarse mediante cualquier sistema de administración adecuado, y preferentemente del grupo que consiste en administración intravenosa, administración intramuscular, administración intrapulmonar, administración subcutánea y administración intraperitoneal, más preferentemente por administración intramuscular, administración intravenosa o administración subcutánea. El polipéptido de neublastina aplicado en los usos anteriores también puede administrarse mediante administración intratecal.

8. Formulación

35 [0081] Esta invención también describe nuevas composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptidos de neublastina suspendidos, disueltos o dispersados en un vehículo farmacéuticamente aceptable para tratar, prevenir o retrasar el dolor neuropático, en las que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalгésico o dolor fantasma.

40 [0082] Para su uso en terapia el polipéptido de la invención puede administrarse en cualquier forma conveniente. En una realización preferida, el polipéptido de la invención se incorpora en una composición farmacéutica junto con uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos y/o diluyentes, y la composición farmacéutica se prepara por el experto en la materia usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre técnicas para la formulación y administración en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, PA). Típicamente, los diluyentes, vehículos y excipientes aceptables no afectan perjudicialmente a la homeostasia del destinatario, particularmente al equilibrio electrolítico. Los vehículos aceptables pueden incluir sales biocompatibles, inertes o bioabsorbibles, agentes tamponantes, oligo- o polisacáridos, polímeros, agentes de mejora de la viscosidad, conservantes y similares. Un vehículo ejemplar comprende solución salina fisiológica normal (NaCl 0,15 M, pH 7,0 a 7,4). Otro vehículo ejemplar comprende fosfatos sódico 50 mM, cloruro sódico 100 mM.

9. Regímenes

50 [0083] La frecuencia de dosificación para los polipéptidos de neublastina de esta invención está dentro de las habilidades y del juicio clínico de los médicos. Típicamente, el régimen de administración se establece por ensayos clínicos que pueden establecer los parámetros de administración óptimos. Sin embargo, el experto puede variar dichos regímenes de administración de acuerdo con la edad, salud, peso, sexo y estado médico del sujeto. La frecuencia de dosificación también puede variar entre tratamientos agudos y crónicos para la neuropatía. Además, la frecuencia de dosificación puede variarse dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Expresión de polipéptido de neublastina**A. Expresión en *E. coli***

- [0084]** Para la expresión y purificación en bacterias, un plásmido que codifica neublastina de rata se expresó en *E. coli* como una proteína de fusión marcada con His con un sitio de escisión por enteroquinasa inmediatamente adyacente al inicio de la secuencia de NBN madura de 113 aminoácidos. Las células de *E. coli* se cultivaron en un fermentador de 500 l y se proporcionó una pasta celular congelada. Las células de *E. coli* se lisaron en una prensa Manton Gaulin y la NBN de rata se recuperó a partir de la fracción de sedimento lavado insoluble.
- [0085]** La NBN se extrajo a partir del sedimento con clorhidrato de guanidina, se replegó, y la etiqueta de His se eliminó con enteroquinasa. Para una purificación adicional, el producto se sometió después a cromatografía en Ni NTA agarosa (Qiagen) y a cromatografía en una resina de intercambio catiónico Bakerbond WP CBX.
- [0086]** El producto resultante se sometió a una caracterización exhaustiva, incluyendo el análisis por SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), HPLC de fase inversa, desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masas (MALDI/MS), mapeo de péptidos, evaluación de actividad en el ELISA KIRA y determinación del contenido de endotoxina. La pureza del producto de NBN según se midió por SDS-PAGE y SEC era superior al 95%. El producto de NBN migraba en condiciones no reductoras como un dímero, lo que concuerda con su estructura esperada. El contenido de endotoxina del material es de forma rutinaria inferior a 1 UE/mg. La actividad específica de la NBN en el ELISA KIRA es de aproximadamente 10 nM. El producto se formuló a 1 mg/ml en PBS pH 6,5. El material puede suministrarse como un líquido congelado, que se almacena a -70°C.
- [0087]** También se han construido sistemas de expresión similares para la NBN humana. A partir de estas construcciones, la NBN humana se ha expresado en *E. coli*.

B. Expresión en células de mamífero

- [0088] Construcción del plásmido pJC070.14.** Para expresar el ADNc de neublastina en células de ovario de hámster chino, se insertó un fragmento de ADNc que codifica la forma prepro de neublastina humana en el vector de expresión de mamífero pEAG347 para generar el plásmido pJC070.14. El pEAG347 contiene los promotores temprano de SV40 y tardío principal de adenovirus en tándem (derivados del plásmido pAD2beta; Norton y Coffin, Mol. Cell. Biol. 5: 281 (1985)), un sitio de clonación NotI único, seguido de señales de terminación de la transcripción tardía de SV40 y poliA (derivadas del plásmido pCMVbeta; MacGregor y Caskey, Nucl. Acids. Res. 17: 2365 (1989)). Además, el pEAG347 contiene una cadena principal plasmídica derivada de pUC19 y un dhfr derivado del pSV2dhfr para la selección y amplificación con MTX en células CHO transfectadas.
- [0089]** El plásmido pJC070.14 se generó en dos etapas. En primer lugar, se aisló un fragmento que codifica la forma prepro de neublastina humana del plásmido pUbi1Z-NBN usando la reacción en cadena de la polimerasa con los oligonucleótidos KD2-824 5'AAGGAAAAA GCGGCCGCCA TGGAAGTTGG ACTTGGAGG3' (SEC ID N°: 9), KD2-825 5'TTTTTTCTT GGCGCCGCT CAGCCAGGC AGCCGCAGG3' (SEQ ID N°: 10) y polimerasa PFU. El fragmento se clonó 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 en el plásmido pJC069 para generar un fragmento de 685 pb (que contiene el gen de neublastina) que se clonó en el sitio Not-1 del plásmido pEAG347 para generar el plásmido pJC070.14. La transcripción del gen de neublastina en el plásmido pJC070.14 está controlada por el promotor tardío principal de adenovirus.
- [0090] Generación de líneas celulares CHO que expresan neublastina.** 200 µg de pJC070.14 se linealizaron por digestión con la endonucleasa de restricción Mlu-1. 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 pH 7,05, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,7 mM, dextrosa 6 mM (HEBS) y se introdujo en ~4E7 células CHO dukx B1 (*dhfr*-) (p23) por electroporación (280 V y 960 µF). Después de la electroporación, las células se devolvieron a cultivo en medio de Eagle modificado α+ (MEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) durante dos días. Después, las células se trataron con tripsina y se volvieron a sembrar en placas de 100 mm (100.000 células/placa) en α-MEM (que carece de ribo- y desoxirribonucleósidos), complementado con FBS dializado al 10%, durante cinco días. Las células se dividieron posteriormente a una densidad de 100.000 células/placa de 100 mm, y se seleccionaron en metotrexato 200 nM. Se escogieron las colonias resistentes y se aumentaron a escala a placas de 6 pocillos; los medios acondicionados de cada clon se exploraron usando un ensayo específico para neublastina descrito a continuación. Los doce clones que expresaban el mayor nivel de neublastina se aumentaron a escala a matraces T162 y posteriormente se volvieron a ensayar. Estas líneas celulares CHO producían neublastina en el intervalo de 25 a 50 ng/ml/día.
- [0091] Ensayo de complejo ternario para neublastina.** La presencia de neublastina se evaluó en los medios de sobrenadantes de la línea celular CHO usando una forma modificada de un ensayo de complejo ternario descrito por Sanicola et al. (Proc Natl Acad Sci USA 94: 6238 (1997)).

[0092] Se han generado construcciones de expresión de mamífero similares y se han realizado estudios similares tanto para NBN humana como para NBN de rata. Se ha realizado un ensayo *in vivo* de la actividad de NBN en ratas. Los estudios en rata se realizaron casi exclusivamente con NBN de rata.

EJEMPLO 2: Eficacia de neublastina de longitud completa en un modelo animal de ligación de nervios de dolor neuropático – Prevención del dolor neuropático

[0093] El efecto preventivo de la neublastina sobre la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica se estudió en el modelo de ligación de nervios espinales ("SNL") L5/L6 de Chung (Kim y Chung (1992), *Pain* 50: 355-363. Se dividieron ratas macho Sprague-Dawley (250-300 g) en cuatro grupos. Un grupo de ratas (n = 7) recibió una operación simulada, y se les administró vehículo por inyección subcutánea. Un segundo grupo de ratas (n = 7) recibió una operación simulada y se les administró Neublastina de rata (1 mg/kg) por inyección subcutánea. Un tercer grupo de ratas (n = 7) recibió la ligación de nervios espinales, y se les administró vehículo por inyección subcutánea. Un cuarto grupo de ratas (n = 7) recibió la ligación de nervios espinales, y se les administró neublastina de rata (1 mg/kg) por inyección subcutánea. El vehículo consistía en fosfato 5 mM y cloruro sódico 150 mM a pH 6,5. Se inyectó neublastina o vehículo 30 minutos antes de la ligación de nervios espinales o de la operación simulada, y después los días 2, 4, 7, 9, 11 y 14 después de la ligación o de la operación (post-SNL). Se usaron los ensayos de comportamiento de Von Frey (Chaplan et al. (1994), *J. Neurosci. Meth.* 53: 55-63) y Hargreaves (Hargreaves et al. (1988), *Pain* 32: 77-88) para controlar las respuestas táctil y térmica, respectivamente. Estas respuestas dolorosas se controlaron antes de la ligación de nervios espinales o de la operación simulada para establecer las respuestas basales, y después diariamente durante dos semanas después de la operación.

[0094] Los resultados se representan en las FIGS. 1 y 2 como promedios \pm errores típicos de la media. La administración subcutánea de neublastina (como se indica por flechas hacia abajo en las FIGS. 1 y 2) condujo a una normalización casi completa de ambos tipos de dolor neuropático (táctil, FIG. 1 y térmico, FIG. 2) en ratas con ligación de nervios espinales. En ratas con operación simulada, la administración subcutánea de neublastina no alteró significativamente la sensibilidad táctil (FIG. 1) o térmica (FIG. 2). En ratas con ligación de nervios espinales, el efecto de la neublastina sobre la sensibilidad térmica se hizo evidente por primera vez 3 días después del inicio de la administración de neublastina, mientras que el efecto sobre la alodinia táctil se hizo evidente por primera vez ligeramente después, a los 4-5 días después del inicio de la administración de neublastina. El efecto de la neublastina sobre la sensibilidad térmica alcanzó una meseta aproximadamente 7-8 días después del inicio de la administración de neublastina, mientras que el efecto sobre la alodinia táctil alcanzó una meseta aproximadamente 10-11 días después del inicio de la administración de neublastina. Los efectos de la neublastina no disminuyeron durante el intervalo de 2-3 días entre administraciones. De hecho, hubo una normalización sustancial de ambos comportamientos dolorosos entre las administraciones de neublastina los días 4 y 7, según se midió los días 5 y 6. Después de la administración de neublastina el día 11, la normalización máxima existente de ambos comportamientos dolorosos se mantuvo constante, sugiriendo que el efecto de normalización de la neublastina sobre el dolor neuropático se mantiene durante al menos 3 días.

EJEMPLO 3: Tratamiento de neuropatía con un polipéptido de neublastina truncado

[0095] El efecto preventivo de un polipéptido que contiene los 102 aminoácidos carboxi-terminales de la neublastina de rata madura en el tratamiento de la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica, dos afecciones neuropáticas periféricas, se demuestra en un modelo de ligación de nervios espinales ("SNL") L5/L6 de Chung.

[0096] Se dividieron ratas macho Sprague-Dawley (aproximadamente 250-300 gramos) en cuatro grupos. Un grupo de ratas (n = 6) recibe una operación simulada y se les administra vehículo por inyección subcutánea. Un segundo grupo de ratas (n = 6) recibe una operación simulada y se les administra neublastina truncada (1 mg/kg) por inyección subcutánea. Un tercer grupo de ratas (n = 6) recibe una ligación de nervios espinales y se les administra vehículo por ligación subcutánea. Un cuarto grupo (n = 6) recibe la ligación de nervios espinales, y se les administra neublastina truncada (1 mg/kg) por inyección subcutánea. El vehículo incluye fosfato 5 mM y cloruro sódico 150 mM a pH 6,5. Se administra neublastina truncada o vehículo los días 0, 2, 4, 7, 9, 11 y 14. El día 0, se administra neublastina truncada 30 minutos antes de la ligación de nervios espinales o de la operación simulada. Las respuestas dolorosas se determinan usando ensayos de comportamiento como se describen en Chaplan et al. (1994), *J. Neurosci. Meth.* 53: 55-63 y Hargreaves et al. (1988), *Pain* 32: 77-88. Estos ensayos controlan las respuestas táctil y térmica, respectivamente. Las respuestas dolorosas se controlan antes de la ligación de nervios espinales o de la operación simulada para establecer las respuestas basales. Después, las respuestas dolorosas se controlan diariamente durante dos semanas después de la operación.

[0097] Se espera que la administración subcutánea de neublastina truncada conduzca a la normalización de ambos tipos de dolor neuropático en ratas con ligación de nervios espinales. En ratas con operación simulada, no se espera que la administración subcutánea de neublastina truncada altere significativamente la sensibilidad táctil o térmica. Se espera que el efecto de la neublastina sobre la sensibilidad térmica se haga evidente aproximadamente 3 días después de la administración de neublastina, mientras que se espera que el efecto sobre la alodinia táctil se haga evidente por primera vez ligeramente después.

EJEMPLO 4: Eficacia de la neublastina en un modelo animal de ligación de nervios de dolor neuropático – Reversión del dolor neuropático

[0098] El efecto de reversión de la neublastina sobre la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica se estudió en el modelo de ligación de nervios espinales ("SNL") L5/L6 de Chung. Se dividieron ratas macho Sprague-Dawley (270-275 g) en cuatro grupos. Un grupo de ratas (n = 8) recibió una operación simulada, y se les administró vehículo por inyección subcutánea. Un segundo grupo de ratas (n = 8) recibió una operación simulada y se les administró neublastina de rata (1 mg/kg) por inyección subcutánea. Un tercer grupo de ratas (n = 8) recibió la ligación de nervios espinales, y se les administró vehículo por inyección subcutánea. Un cuarto grupo de ratas (n = 8) recibió la ligación de nervios espinales, y se les administró neublastina de rata (1 mg/kg) por inyección subcutánea. El vehículo consistía en fosfato 5 mM y cloruro sódico 150 mM a pH 6,5. Se usaron los ensayos de comportamiento de Von Frey (Chaplan et al. (1994), *J. Neurosci. Meth.* 53: 55-63) y Hargreaves (Hargreaves et al. (1988), *Pain* 32: 77-88) para controlar las respuestas táctil y térmica, respectivamente. Estas respuestas dolorosas se controlaron antes de la ligación de nervios espinales o de la operación simulada para establecer las respuestas basales, y después diariamente durante 2 semanas después de la operación. Se inyectó neublastina o vehículo 60 minutos antes del ensayo de comportamiento los días 3, 5, 7, 10, 12 y 14 después de la ligación o de la operación (post-SNL).

[0099] Los resultados se representan en las FIGS. 3 y 4 como promedios \pm errores típicos de la media. Ambos tipos de comportamiento de dolor neuropático (alodinia táctil mostrada en la FIG. 3, e hiperalgesia térmica mostrada en la FIG. 4) se habían desarrollado completamente el día 3, como se esperaba. La administración subcutánea de neublastina (como se indica por flechas hacia abajo en las FIGS. 3 y 4) condujo a una reversión casi completa de ambos tipos de dolor neuropático (táctil en la FIG. 3 y térmico en la FIG. 4) en ratas con ligación de nervios espinales, de modo que se normalizaron las respuestas táctil y térmica. En ratas con operación simulada, la administración subcutánea de neublastina no alteró significativamente la sensibilidad táctil (FIG. 3) o térmica (FIG. 4). En ratas con ligación de nervios espinales, el efecto de la neublastina sobre la sensibilidad térmica y la alodinia táctil se hizo evidente por primera vez de 2 a 3 días después del inicio de la administración de neublastina. El efecto de la neublastina sobre la sensibilidad térmica y la alodinia táctil alcanzó una meseta aproximadamente 7-8 días después del inicio de la administración de neublastina. Los efectos de la neublastina no disminuyeron durante el intervalo de 2 a 3 días entre administraciones. De hecho, hubo una normalización sustancial de ambos comportamientos dolorosos entre las administraciones de neublastina los días 3, 5, 7 y 10.

EJEMPLO 5: Eficacia de la neublastina en un modelo animal de estreptozotocina de dolor neuropático – Prevención de la pérdida de sensibilidad dolorosa (Ejemplo ilustrativo)

[0100] El efecto preventivo de la neublastina sobre la pérdida de sensibilidad térmica (hipoalgesia térmica) se estudió en el modelo de estreptozotocina ("STZ") de neuropatía diabética. Se dividieron ratas hembra Sprague-Dawley (250-275 g) en 4 grupos, comprendiendo cada uno 10 animales. Un grupo de ratas no recibió STZ; estas ratas recibieron vehículo por inyección subcutánea. Tres grupos de ratas recibieron 1 inyección de STZ (50 mg/kg en solución salina estéril) y posteriormente se confirmó que estaban hiperglucémicas por ensayo espectrofotométrico de muestras de sangre. De los 3 grupos de ratas hiperglucémicas, 1 grupo recibió vehículo por inyección subcutánea, a un segundo grupo se le administró neublastina de rata (0,1 mg/kg) por inyección subcutánea, y a un tercer grupo de ratas se le administró neublastina de rata (1 mg/kg) por inyección subcutánea. El vehículo consistía en fosfato 5 mM y cloruro sódico 150 mM a pH 6,5. Se administró neublastina o vehículo 3 veces por semana (programa de lunes, miércoles y viernes) durante 8 semanas, y se inició en el momento de la inducción de hiperglucemia con STZ. Las latencias de respuesta térmica se evaluaron después de 8 semanas como se describe en Calcutt et al. (2000), *Anesthesiology* 93: 1271-1278. En resumen, se aplicó una fuente de calor radiante a la superficie plantar de la pata de modo que la temperatura superficial aumentaba de 30°C a 38,5°C en 20 segundos, y se midió el tiempo de latencia entre el inicio del calentamiento y la retirada de la pata para evaluar la latencia de la respuesta térmica. Un aumento en la latencia de la retirada de la pata indica una pérdida de sensibilidad térmica (hipoalgesia térmica).

[0101] Los resultados se representan en la FIG. 5 como promedios \pm errores típicos de la media. Como se esperaba a las 8 semanas post-STZ, la latencia de la retirada de la pata aumentó en las ratas con STZ tratadas con vehículo (STZ vehículo) en comparación con ratas normales, indicando que se había inducido hipoalgesia térmica mediante la inyección de STZ. La administración de neublastina prevenía el aumento en la latencia de la respuesta térmica en ratas hiperglucémicas (STZ). Ambas dosis de neublastina (1 mg/kg y 0,1 mg/kg) normalizaban casi completamente la sensibilidad térmica después de 8 semanas de administración a 3 veces por semana. Estos resultados demuestran que la neublastina previene la hipoalgesia térmica, la pérdida de sensibilidad térmica que se produce en el modelo de rata con STZ de neuropatía diabética.

EJEMPLO 6: Prevención de la hipoalgesia térmica, y prevención y reversión de la hiperalgesia térmica por neublastina in ratas con estreptozotocina.

[0102] Se preparó NBN113 de rata en *E. coli* como se describe en el Ejemplo 1. El efecto preventivo de la neublastina sobre la pérdida de sensibilidad térmica (hipoalgesia térmica), y la prevención y reversión por neublastina de la sensibilidad térmica aumentada (hiperalgesia térmica) se estudió en el modelo de rata con estreptozotocina ("STZ") de neuropatía diabética, como se describe en el Ejemplo 5. Los estudios de dosificación descritos en el Ejemplo 5 se confirmaron y se ampliaron. Los resultados se muestran en la FIG. 6A y la FIG. 6B.

[0103] Los resultados en la FIG. 6A y la FIG. 6B se representan como promedios \pm errores típicos de la media. Como se esperaba a las 4 semanas post-STZ, la latencia de la retirada de la pata disminuyó en las ratas con STZ tratadas con vehículo, en comparación con las ratas normales, indicando que se había inducido hiperalgesia térmica mediante la inyección de STZ. Todas las dosis de neublastina subcutánea (0,03 mg/kg y 0,1 mg/kg) prevenían la hiperalgesia térmica en ratas con STZ después de 4 semanas de administración a 3 veces por semana, como se muestra en la FIG. 6A. Todas las dosis de neublastina subcutánea (0,03 mg/kg y 0,1 mg/kg) prevenían la hipoalgesia térmica en ratas con STZ después de 8 semanas de administración a 3 veces por semana, como se muestra en la FIG. 6B. Además, como se muestra en la FIG. 6B, la neublastina subcutánea (0,1 mg/kg) administrada durante las segundas 4 semanas del estudio de tratamiento de 8 semanas (veh; NBN 0,1 mg/kg) no sólo revertía la hiperalgesia térmica que era evidente a las 4 semanas postratamiento con STZ, sino que también prevenía el desarrollo de hipoalgesia térmica a las 8 semanas en ratas con STZ. Estos resultados demuestran que la neublastina previene y revierte la hiperalgesia térmica en el modelo de rata con STZ de neuropatía diabética, y que la neublastina previene la pérdida de sensibilidad térmica (hipoalgesia térmica) que se produce en el modelo de rata con STZ de neuropatía diabética.

EJEMPLO 7: Eficacia de la neublastina en un modelo animal de ligación de nervios de dolor neuropático – La reversión del dolor neuropático es dependiente de la dosis.

[0104] Se preparó NBN113 de rata en *E. coli* como se describe en el Ejemplo 1. Se realizó un análisis de la reversión dependiente de la dosis por NBN113 de la alodinia táctil y de la hiperalgesia térmica en ratas usando el modelo animal de ligación de nervios espinales ("SNL") L5/L6 de Chung, como se describe en el Ejemplo 4, con dosis de NBN de 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,6 mg/kg y 2 mg/kg. Los resultados experimentales mostrados en las FIGS 3 y 4 se confirmaron y se ampliaron. Los resultados se muestran en la FIG. 7 y la FIG. 8.

[0105] Los resultados de las FIGS. 7 y 8 se representan como promedios \pm errores típicos de la media. BL indica las respuestas basales. Ambos tipos de comportamiento de dolor neuropático (alodinia táctil mostrada en la FIG. 7, e hiperalgesia térmica mostrada en la FIG. 8) se habían desarrollado completamente el día 2, como se esperaba. La administración subcutánea de neublastina (NBN) 2 mg/kg 3 veces por semana (como se indica por las flechas) condujo a una reversión casi completa de ambos tipos de dolor neuropático (táctil en la FIG. 7 y térmico en la FIG. 8) en ratas con ligación de nervios espinales, de modo que se normalizaron las respuestas táctil y térmica. Como se muestra en la FIG. 7, la reversión por neublastina de la alodinia táctil inducida por ligación de nervios espinales era dependiente de la dosis. La dosificación de neublastina (NBN) a 0,1 mg/kg s.c. o 0,6 mg/kg s.c. revertía parcialmente la alodinia táctil después de 9 (así como 11) días de dosificación tres veces por semana, mientras que la NBN a 2 mg/kg s.c. revertía significativamente la alodinia táctil después de 7 (así como 9 y 11) días de dosificación tres veces por semana, con reversión casi completa de la alodinia táctil después de 9 y 11 días de dosificación tres veces por semana. Además, la reversión media de la alodinia táctil inducida por ligación de nervios espinales el día 14 post-SNL era superior con dosis subcutáneas crecientes de neublastina de 0,1 mg/kg a 0,6 mg/kg a 2 mg/kg. La neublastina (NBN) a 0,03 mg/kg s.c. no revertía significativamente la alodinia táctil inducida por ligación de nervios espinales durante 11 días de dosificación a tres veces por semana.

[0106] Como se representa en la FIG. 8, la reversión por neublastina (NBN) de la hiperalgesia térmica inducida por ligación de nervios espinales (SNL) también era dependiente de la dosis. La dosificación de NBN a 0,1 mg/kg revertía significativamente la hiperalgesia térmica después de 9 (así como 11) días de dosificación tres veces por semana, la NBN a 0,6 mg/kg revertía significativamente la hiperalgesia térmica después de 7 (así como 9 y 11) días de dosificación tres veces por semana, y la NBN a 2 mg/kg revertía significativamente la hiperalgesia térmica después de 4 (así como 7, 9 y 11) días de dosificación tres veces por semana. Además, la reversión media de la hiperalgesia térmica inducida por ligación de nervios espinales el día 14 post-SNL era superior con dosis subcutáneas crecientes de neublastina de 0,1 mg/kg a 0,6 mg/kg a 2 mg/kg. La NBN a 0,03 mg/kg s.c. no revertía significativamente la hiperalgesia térmica inducida por ligación de nervios espinales durante 11 días de dosificación a tres veces por semana.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

[0107]

<110> Biogen, Inc.

Sah, Dinah Wen-Yee

- 5 <120> Tratamiento usando polipéptidos de neublastina
 <130> 00689-507 (A118) utilidad
 <140> Presentada con la misma
 <141> 28-02-2002
 <150> USSN 06/287.554
- 10 <151> 28-03-2001
 <160> 27
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 861
- 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (58)..(717)
- 20 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(57)
 <220>
 <221> 3'UTR
- 25 <222 > (718)..(861)
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (58)..(174)
 <220>
- 30 <221> mat_peptide
 <222> (298)..(717)
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (370)..(717)
- 35 <220>
 <221> mat_peptide
 <222 > (379)..(717)
 <220>
 <221> misc_structure
- 40 <222> (661)..(663)
 <223> CARBOHID: asparagina glicosilada en Asn122
 <220>
 <221> misc_structure
 <222 > (424)..(621)

<223> DISULFUR: puente disulfuro Gly43-Gly108

<220>

<221> misc_structure

<222> (505)..(705)

5 <223> DISULFUR: puente disulfuro Gly70-Gly136

<220>

<221> misc_structure

<222> (517)..(711)

<223> DISULFUR: puente disulfuro Gly74-Gly138

10 <220>

<221> misc_structure

<222> (616)..(618)

<223> DISULFUR: puente disulfuro intercatenario Gly107-Gly107

<400> 1

ES 2 374 971 T3

aggaggggtgg gggaacagct caacaatggc tgatgggagc tcttgggtgtt gatagag 57

atg gaa ctt gga ctt gga ggc ctc tcc acg ctg tcc cac tgc ccc tgg 105
 Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
 -80 -75 -70 -65

cct agg cgg cag cct gcc ctg tgg ccc acc ctg gcc gct ctg gct ctg 153
 Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
 -60 -55 -50

ctg agc agc gtc gca gag gcc tcc ctg ggc tcc gcg ccc cgc agc cct 201
 Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Pro Arg Ser Pro
 -45 -40 -35

gcc ccc cgc gaa ggc ccc ccg cct gtc ctg gcg tcc ccc gcc ggc cac 249
 Ala Pro Arg Glu Gly Pro Pro Pro Val Leu Ala Ser Pro Ala Gly His
 -30 -25 -20

ctg ccg ggg gga cgc acg gcc cgc tgg tgc agt gga aga gcc cgg cgg 297
 Leu Pro Gly Gly Arg Thr Ala Arg Trp Cys Ser Gly Arg Ala Arg Arg
 -15 -10 -5 -1

ccg ccg ccg cag cct tct cgg ccc gcg ccc ccg ccg cct gca ccc cca 345
 Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro
 1 5 10 15

tct gct ctt ccc cgc ggg ggc cgc gcg gcg cgg gct ggg ggc ccg ggc 393
 Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly
 20 25 30

agc cgc gct cgg gca gcg ggg gcg cgg ggc tgc cgc ctg cgc tgc cag 441
 Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln
 35 40 45

ctg gtg ccg gtg cgc gcg ctc ggc ctg ggc cac cgc tcc gac gag ctg 489
 Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu
 50 55 60

gtg cgt ttc cgc ttc tgc agc ggc tcc tgc cgc cgc gcg cgc tct cca 537
 Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro
 65 70 75 80

cac gac ctc agc ctg gcc agc cta ctg ggc gcc ggg gcc ctg cga ccg 585
 His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro
 85 90 95

ccc ccg ggc tcc cgg ccc gtc agc cag ccc tgc tgc cga ccc acg cgc 633
 Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
 100 105 110

tac gaa gcg gtc tcc ttc atg gac gtc aac agc acc tgg aga acc gtg 681
 Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val
 115 120 125

gac cgc ctc tcc gcc acc gcc tgc ggc tgc ctg gcc tgagggctcg 727
 Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 130 135 140

ctccagggct ttgcagactg gacccttacc ggtggctctt cctgectggg accctcccgc 787

agagtcccac tagccagcgg cctcagccag ggacgaaggc ctcaaagctg agaggcccct 847

accggtgggt gatg 861

ES 2 374 971 T3

<210> 2

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
-80 -75 -70 -65

Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
-60 -55 -50

Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Pro Arg Ser Pro
-45 -40 -35

Ala Pro Arg Glu Gly Pro Pro Pro Val Leu Ala Ser Pro Ala Gly His
-30 -25 -20

Leu Pro Gly Gly Arg Thr Ala Arg Trp Cys Ser Gly Arg Ala Arg Arg
-15 -10 -5 -1

Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro
1 5 10 15

Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly
20 25 30

Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln
35 40 45

Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu
50 55 60

Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro
65 70 75 80

His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro
85 90 95

Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
100 105 110

Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val
115 120 125

Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
130 135 140

5 <400> 2

<210> 3

<211> 2136

<212> ADN

<213> Murinae gen. sp.

10 <220>

<221> CDS

<222> (975)..(1646)

<220>

<221> 5'UTR

15 <222> (1)..(974)

<220>

<221> 3'UTR

ES 2 374 971 T3

<222> (1647)..(2136)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (975)..(1091)

5 <220>

<221> mat_peptide

<222> (1215)..(1646)

<220>

<221> mat_peptide

10 <222> (1290)..(1646)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1299)..(1646)

<400> 3

gcgggccgcga attcggcaag agggcgctctc gctgcagccc gcgatctcta ctctgcctcc 60

tgggggtcttc tccaaatgtc tagccccac cttagaggac ctagcctagc cagcggggac 120

cggatccgga ggggtggagcg gccagggtgag ccctgaaagg tggggcgggg cgggggcgct 180

ctgggccccca ccccgggatc tggtgacgcc ggggctgaa tttgacaccg gacggcggcg 240

ggcaggaggc tgctgaggga tggagttggg ctccggcccc agatgcggcc cgcgggctct 300

gccagcaaca agtccctcgg gccccagccc tcgctgcgac tggggcttgg agccctgcac 360

ccaagggcac agaccggctg ccaaggcccc acttttaact aaaagaggcg ctgccagggtg 420

cacaactctg ggcatgatcc acttgagctt cgggggaaag cccagcactg gtcccaggag 480

aggcgctctag aaggacacgg accaggaccc ctttggtagt gaggtaacgc tgagcatgga 540

gtggaaggaa ctcaagttac tactttctcc aaccaccctg gtaccttcag ccctgaagta 600

cagagcagaa gggctctaga agacaggacc acagctgtgt gagtctcccc cctgaggcct 660

tagacgatct ctgagctcag ctgagctttg tttgcccac tggagaagtg agccattgat 720

tgaccttgtg gcatcgcgaa ggaacaggtc ctgccaagca cctaacacag agagcaaggt 780

15 tctccatcgc agctaccgct gctgagttga ctctagctac tccaacctcc tgggtcgcct 840

ES 2 374 971 T3

cgagagactg gagtggaagg aggaataccc caaaggataa ctaactcatc tttcagtttg 900
caagctgccg caggaagagg gtggggaaac ggggccacga aggcttctga tgggagcttc 960

tggagccgaa agct atg gaa ctg gga ctt gca gag cct act gca ttg tcc 1010
Met Glu Leu Gly Leu Ala Glu Pro Thr Ala Leu Ser
-80 -75 -70

cac tgc ctc cgg cct agg tgg cag tca gcc tgg tgg cca acc cta gct 1058
His Cys Leu Arg Pro Arg Trp Gln Ser Ala Trp Trp Pro Thr Leu Ala
-65 -60 -55

gtt cta gcc ctg ctg agc tgc gtc aca gaa gct tcc ctg gac cca atg 1106
Val Leu Ala Leu Leu Ser Cys Val Thr Glu Ala Ser Leu Asp Pro Met
-50 -45 -40

tcc cgc agc ccc gcc gct cgc gac ggt ccc tca ccg gtc ttg gcg ccc 1154
Ser Arg Ser Pro Ala Ala Arg Asp Gly Pro Ser Pro Val Leu Ala Pro
-35 -30 -25

ccc acg gac cac ctg cct ggg gga cac act gcg cat ttg tgc agc gaa 1202
Pro Thr Asp His Leu Pro Gly Gly His Thr Ala His Leu Cys Ser Glu
-20 -15 -10 -5

aga acc ctg cga ccc ccg cct cag tct cct cag ccc gca ccc ccg ccg 1250
Arg Thr Leu Arg Pro Pro Pro Gln Ser Pro Gln Pro Ala Pro Pro Pro
-1 1 5 10

cct ggt ccc gcg ctc cag tct cct ccc gct gcg ctc cgc ggg gca cgc 1298
Pro Gly Pro Ala Leu Gln Ser Pro Pro Ala Ala Leu Arg Gly Ala Arg
15 20 25

gcg gcg cgt gca gga acc cgg agc agc cgc gca cgg acc aca gat gcg 1346
Ala Ala Arg Ala Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Thr Thr Asp Ala
30 35 40

cgc ggc tgc cgc ctg cgc tcg cag ctg gtg ccg gtg agc gcg ctc ggc 1394
Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Ser Ala Leu Gly
45 50 55 60

cta ggc cac agc tcc gac gag ctg ata cgt ttc cgc ttc tgc agc ggc 1442
Leu Gly His Ser Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly
65 70 75

tcg tgc cgc cga gca cgc tcc cag cac gat ctc agt ctg gcc agc cta 1490
Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Gln His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu
80 85 90

ctg ggc gct ggg gcc cta cgg tcg cct ccc ggg tcc cgg ccg atc agc 1538
Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser
95 100 105

cag ccc tgc tgc cgg ccc act cgc tat gag gcc gtc tcc ttc atg gac 1586
Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp
110 115 120

gtg aac agc acc tgg agg acc gtg gac cac ctc tcc gcc act gcc tgc 1634
Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys
125 130 135 140

ggc tgt ctg ggc tgaggatgat ctatctccaa gcctttgcac actagaccga 1686
Gly Cys Leu Gly

ES 2 374 971 T3

tgtgttgccc tacctggaac agctccaccg ggcctcacta accaggagcc tcaactcagc 1746
 aggatatgga ggctgcagag ctcaggcccc aggccggtga gtgacagacg tcgtcggcat 1806
 gacagacaga gtgaaagatg tcggaaccac tgaccaacag tcccaagttg ttcattggatc 1866
 ccagctctac agacaggaga aacctcagct aaagagaact cctctggggag aatccagaaa 1926
 tggccctctg tcttggggaa tgaattttga agagatatat atacatatat acattgtagt 1986
 cgcggttgctg gaccagcctg tgctgaaacc agtcccgtgt tcaattgtgg aagccgaagc 2046
 cctatttatt atttctaaat tatttattta ctttgaaaaa aaacggccaa gtcggcctcc 2106
 ctttagtgag ggtaatttg tgatccccggg 2136

<210> 4

<211> 224

<212> PRT

5 <213> Murinae gen. sp.

<400> 4

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

- <210> 5
- <211> 224
- <212> PRT
- <213> Rattus sp.
- 5 <220>
- <221> SEÑAL
- <222> (1)..(39)
- <220>
- <221> PROPEP
- 10 <222> (40)..(80)
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (81)..(224)
- <220>
- 15 <221> PÉPTIDO
- <222> (109)..(224)
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (112)..(224)
- 20 <220>
- <221> CARBOHID
- <222> (206)
- <220>
- <221> DISULFUR
- 25 <222> (127)..(192)
- <220>
- <221> DISULFUR
- <222> (154)..(220)
- <220>
- 30 <221> DISULFUR
- <222> (158)..(222)
- <220>
- <221> DISULFUR
- <222> (191)
- 35 <223> Enlace disulfuro intercatenario
- <400> 5

ES 2 374 971 T3

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

<210> 6

<211> 197

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 374 971 T3

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

<210> 7

<211> 156

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 374 971 T3

Met Ala Val Gly Lys Phe Leu Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Gln Leu Gly Gln Gly Trp Gly Pro Asp Ala Arg Gly Val Pro Val Ala
 20 25 30
 Asp Gly Glu Phe Ser Ser Glu Gln Val Ala Lys Ala Gly Gly Thr Trp
 35 40 45
 Leu Gly Thr His Arg Pro Leu Ala Arg Leu Arg Arg Ala Leu Ser Gly
 50 55 60
 Pro Cys Gln Leu Trp Ser Leu Thr Leu Ser Val Ala Glu Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser
 85 90 95
 Cys Pro Arg Gly Ala Arg Thr Gln His Gly Leu Ala Leu Ala Arg Leu
 100 105 110
 Gln Gly Gln Gly Arg Ala His Gly Gly Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
 115 120 125
 Tyr Thr Asp Val Ala Phe Leu Asp Asp Arg His Arg Trp Gln Arg Leu
 130 135 140
 Pro Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
 145 150 155

<210> 8

<211> 211

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Gly Lys Arg Pro Pro Glu Ala Pro
 20 25 30
 Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser

ES 2 374 971 T3

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

<210> 9

<211> 39

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

aaggaaaaa gcggccgcca tgaacttg acttgagg 39

<210> 10

<211> 39

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10

tttttctt ggcgccgct cagcccaggc agccgcagg 39

<210> 11

15 <211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARBOHID

20 <222> (122)

<223> asparagina glicosilada

ES 2 374 971 T3

<400> 11

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

<210> 12

<211> 116

5 <212> PRT

<213 > Homo sapiens

<220>

<221> CARBOHID

<222> (98)

10 <223> asparagina glicosilada

<400> 12

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

ES 2 374 971 T3

<210> 13
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> CARBOHID
 <222> (95)
 <223> asparagina glicosilada

<400> 13
 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

10
 <210> 14
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 14
 Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg
 1 5 10 15
 Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg
 20 25 30
 Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg
 35 40 45
 Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly
 50 55 60
 Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys
 65 70 75 80
 Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr
 85 90 95
 Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 100 105 110

ES 2 374 971 T3

<210> 15

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 15

```

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

```

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 109

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

ES 2 374 971 T3

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

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 18

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

<210> 19

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

ES 2 374 971 T3

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

<210> 20

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 20

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

<210>21

<211>105

10 <212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>21

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

ES 2 374 971 T3

Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu
 85 90 95

Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 100 105

<210> 22

<211> 104

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val
 1 5 10 15

Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg
 20 25 30

Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser
 35 40 45

Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser
 50 55 60

Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val
 65 70 75 80

Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser
 85 90 95

Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 100

<210> 23

<211> 103

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe
 20 25 30

Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu
 35 40 45

Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg
 50 55 60

Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser
 65 70 75 80

Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala
 85 90 95

Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 100

<210> 24

15 <211> 102

ES 2 374 971 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

5 <210> 25

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

10

<210> 26

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 26

Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido de neublastina para la preparación de una composición farmacéutica para tratar, prevenir o retrasar el dolor neuropático, en el que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma.
- 5 2. Un polipéptido de neublastina para su uso en el tratamiento, prevención o retraso del dolor neuropático, en el que el dolor neuropático es alodinia, dolor hiperalgésico o dolor fantasma.
3. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la composición farmacéutica o el polipéptido de neublastina se prepara para su administración por liberación sistémica.
4. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la composición farmacéutica o el polipéptido de neublastina se prepara para su administración por liberación intravenosa.
- 10 5. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la composición farmacéutica o el polipéptido de neublastina se prepara para su administración por liberación subcutánea.
6. El uso de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el dolor neuropático es alodinia.
7. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la alodinia es alodinia táctil.
- 15 8. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el dolor neuropático es dolor hiperalgésico.
9. El uso de la reivindicación 8, en el que el dolor hiperalgésico es dolor hiperalgésico térmico.
10. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el dolor neuropático está asociado con neuralgia postherpética, neuropatía diabética o ciática.
11. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho dolor neuropático está asociado con la infección por un virus.
- 20 12. El uso de la reivindicación 11, en el que dicho virus se selecciona del grupo que consiste en un herpesvirus, un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y un papilomavirus.
13. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho dolor neuropático es un dolor neuropático asociado con la administración de un agente terapéutico.
- 25 14. El uso de la reivindicación 13, en el que dicho agente terapéutico es un agente anticanceroso.
15. El uso de la reivindicación 14, en el que dicho agente anticanceroso se selecciona del grupo que consiste en taxol, taxótero, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina.
16. El uso de la reivindicación 13, en el que dicho agente terapéutico es un agente antiviral.
17. El uso de la reivindicación 16, en el que dicho agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en ddl, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol e izoniazid.
- 30 18. El uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el dolor neuropático está asociado con una neuropatía hereditaria (incluyendo, pero no limitándose a, ataxia de Friedreich, polineuropatía amiloide familiar, enfermedad de Tangier, enfermedad de Fabry), trastornos metabólicos (incluyendo, pero no limitándose a, insuficiencia renal e hipotiroidismo), deficiencias vitamínicas (incluyendo, pero no limitándose a, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de vitamina B6 y deficiencia de vitamina E), neuropatías tóxicas y yatrogénicas (incluyendo, pero no limitándose a, alcoholismo, intoxicación por vitamina B6, intoxicación por hexacarbono, amiodarona, cloranfenicol, disulfiram, izoniazida, oro, litio, metronidazol, misonidazol, nitrofurantoína), neuropatías infecciosas (incluyendo, pero no limitándose a, lepra y enfermedad de Lyme), neuropatías autoinmunes (incluyendo, pero no limitándose a, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, gammapatía monoclonal de importancia indeterminada y polineuropatía), neuralgia trigeminal, síndromes de atrapamiento (incluyendo, pero no limitándose a, túnel carpiano), neuralgia postraumática, dolor de miembro fantasma, dolor por esclerosis múltiple, síndromes de dolor regional complejos (incluyendo, pero no limitándose a, distrofia simpática refleja y causalgia), neoplasia, neuropatía vasculítica/angiopática, y neuropatía idiopática.
- 35 19. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido de neublastina se modifica con una porción derivada para tener un tiempo de permanencia prolongado o una concentración aumentada en fluidos corporales.
- 40 20. El uso de la reivindicación 19, en el que dicha porción derivada se selecciona del grupo que consiste en una porción de polietilenglicol, ésteres alifáticos, amidas, derivados de N-acilo y derivados de O-acilo.
- 45 21. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de aminoácidos

de dicho polipéptido de neublastina comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 a. al menos un polipéptido que comprende los AA₈₀-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2, los AA₄₁-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2, los AA₁-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2, los AA₂₅-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2, los AA₂₈-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2, los AA₈₀-AA₁₄₄ de la SEC ID N°: 4, los AA₁-AA₁₄₄ de la SEC ID N°: 4, los AA₁-AA₂₂₄ de la SEC ID N°: 5 o los AA₈₁-AA₂₂₄ de la SEC ID N°: 5;
- b. al menos un polipéptido que comprende la secuencia C-terminal expuesta en AA₁₀₇-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2 o AA₇₆-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2, y que conserva los siete residuos de Cys característicos de la familia de GDNF y de la superfamilia de TGF-;
- 10 c. al menos un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26 o SEC ID N°: 27; y
- d. al menos una secuencia polipeptídica que tiene una homología de aminoácidos superior al 70%, más preferentemente del 85%, aún más preferentemente del 90%, y aún más preferentemente del 95% con cualquiera de las secuencias de (a)-(c) anteriores.
- 15 22. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido de neublastina comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en al menos un polipéptido que comprende los AA₄₂-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2 o los AA₃₇-AA₁₄₀ de la SEC ID N°: 2.
23. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica comprende además un compuesto inductor de analgesia seleccionado del grupo que consiste en opioides, antiarrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antidepresivos, corticosteroides y AINE.
- 20 24. El uso de la reivindicación 23, en el que el compuesto inductor de analgesia es un anticonvulsivo.
25. El uso de la reivindicación 23, en el que el compuesto inductor de analgesia es gabapentina (ácido 1-(aminometil)ciclohexano acético) o pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metilpropil)butanoico).
26. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la dosificación del polipéptido de neublastina está entre 1 µg/kg y 30.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis, entre 10 µg/kg y 10.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis, o entre 25 µg/kg y 3.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis.
- 25 27. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica es una composición de liberación prolongada.

Figura 1: Prevención de la alodinia táctil por neublantina en ratas con ligación de nervios espinales (SNL)

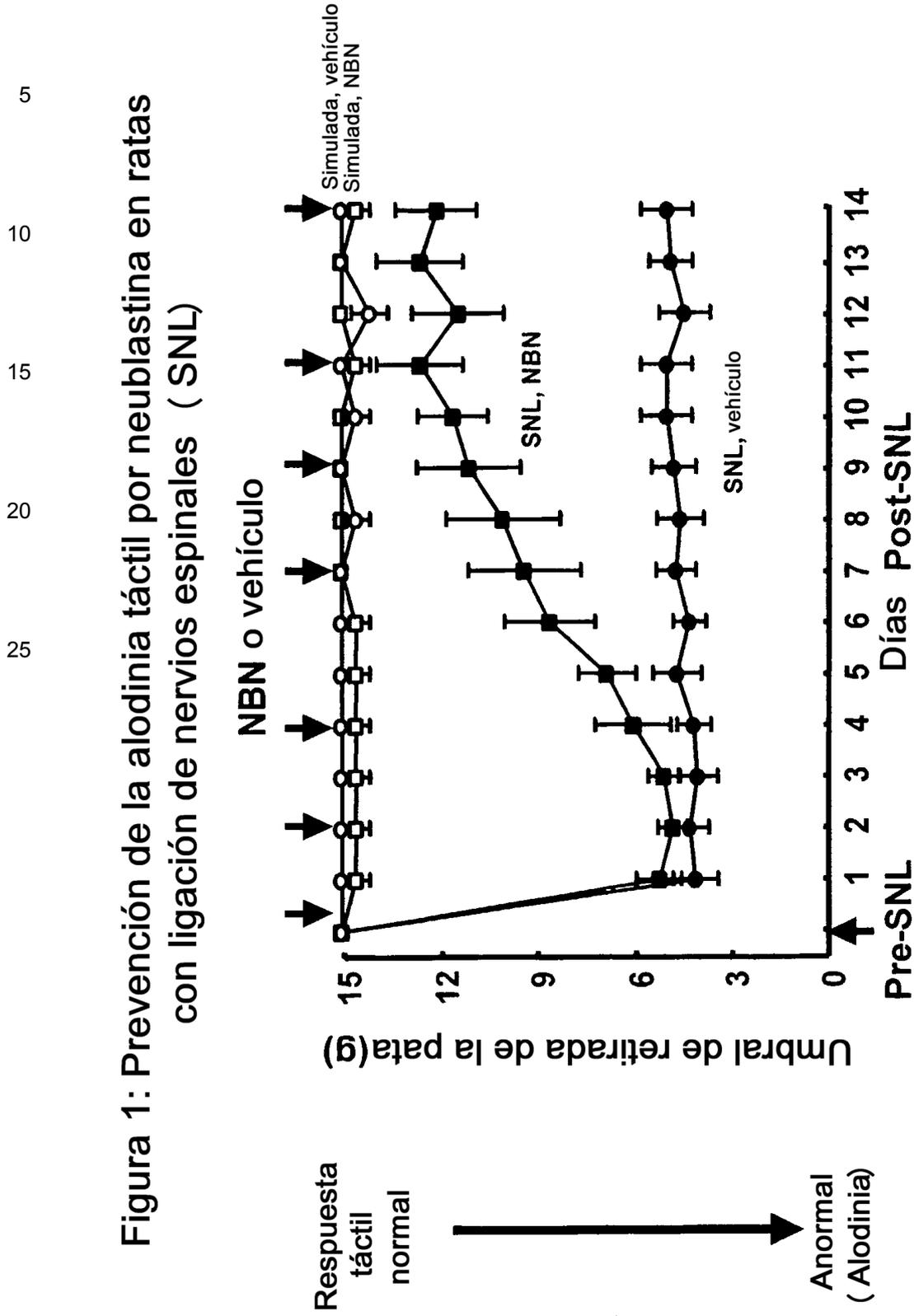


Figura 2: Prevención de la hiperalgesia térmica por neublantina en ratas con ligación de nervios espinales (SNL)

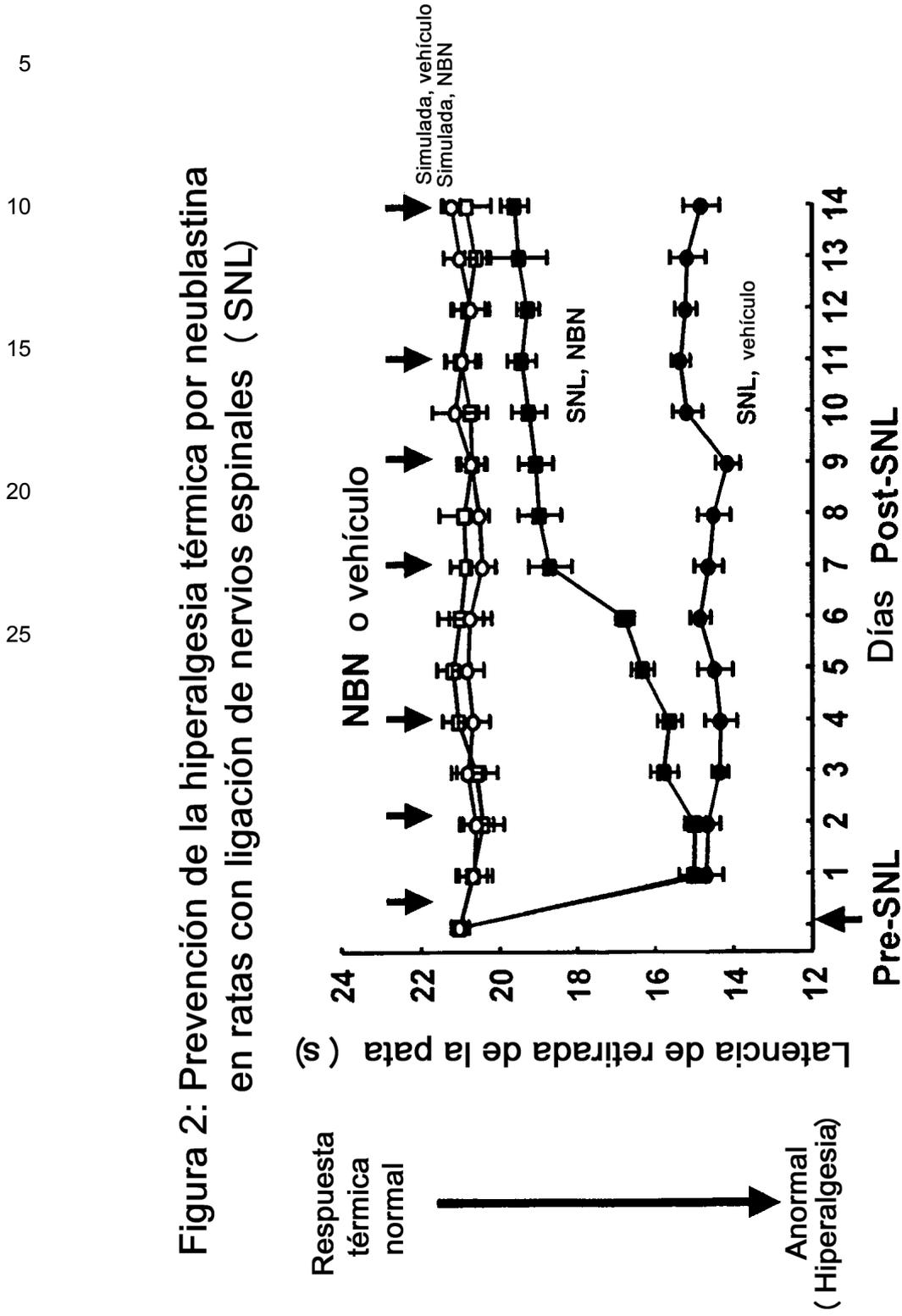


Figura 3: Reversión de la alodinia táctil por neublastina en ratas con ligación de nervios espinales (SNL)

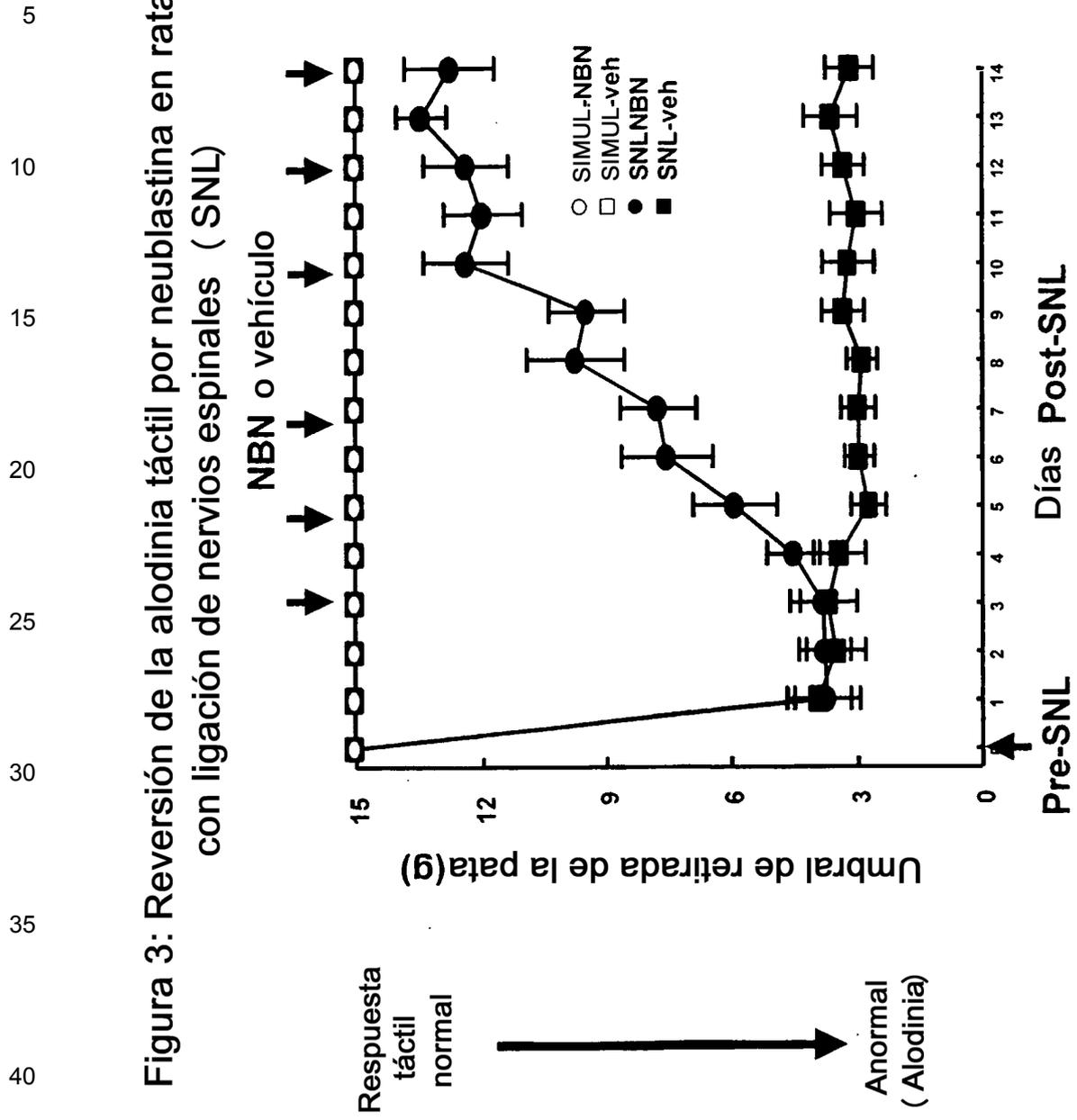


Figura 4: Reversión de la hiperalgesia térmica por neublantina en ratas con ligación de nervios espinales (SNL)

5
10
15
20
25

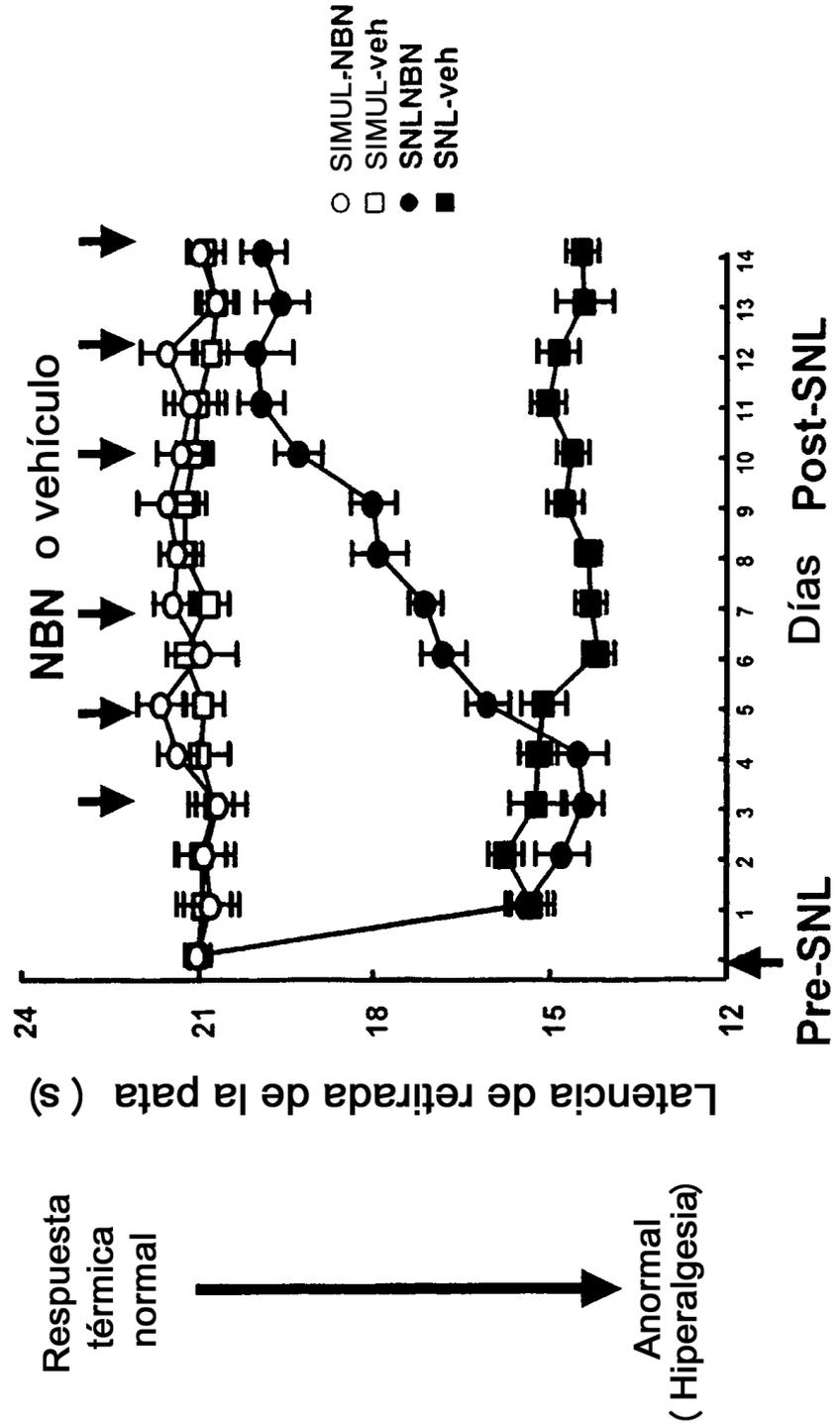
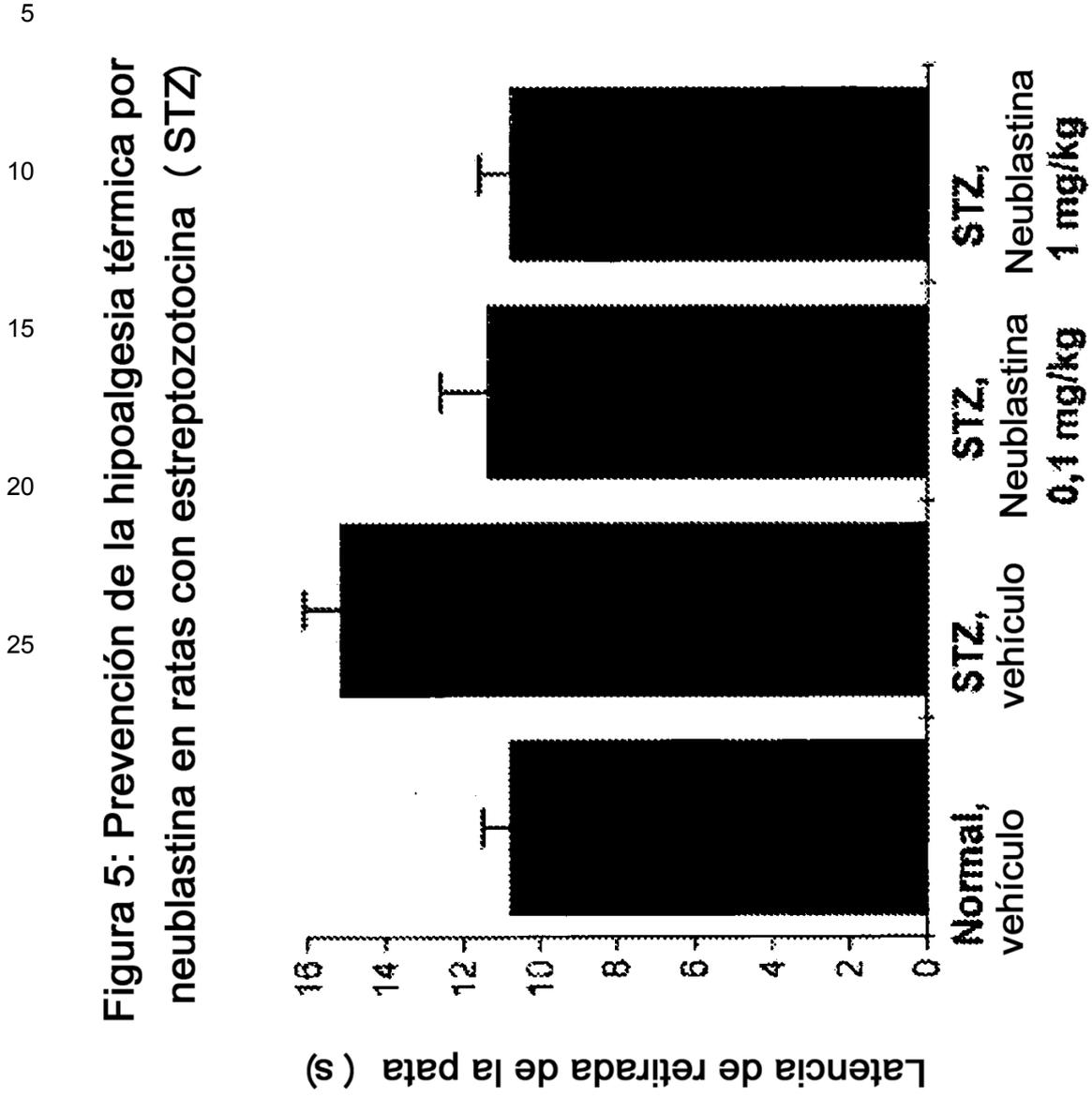
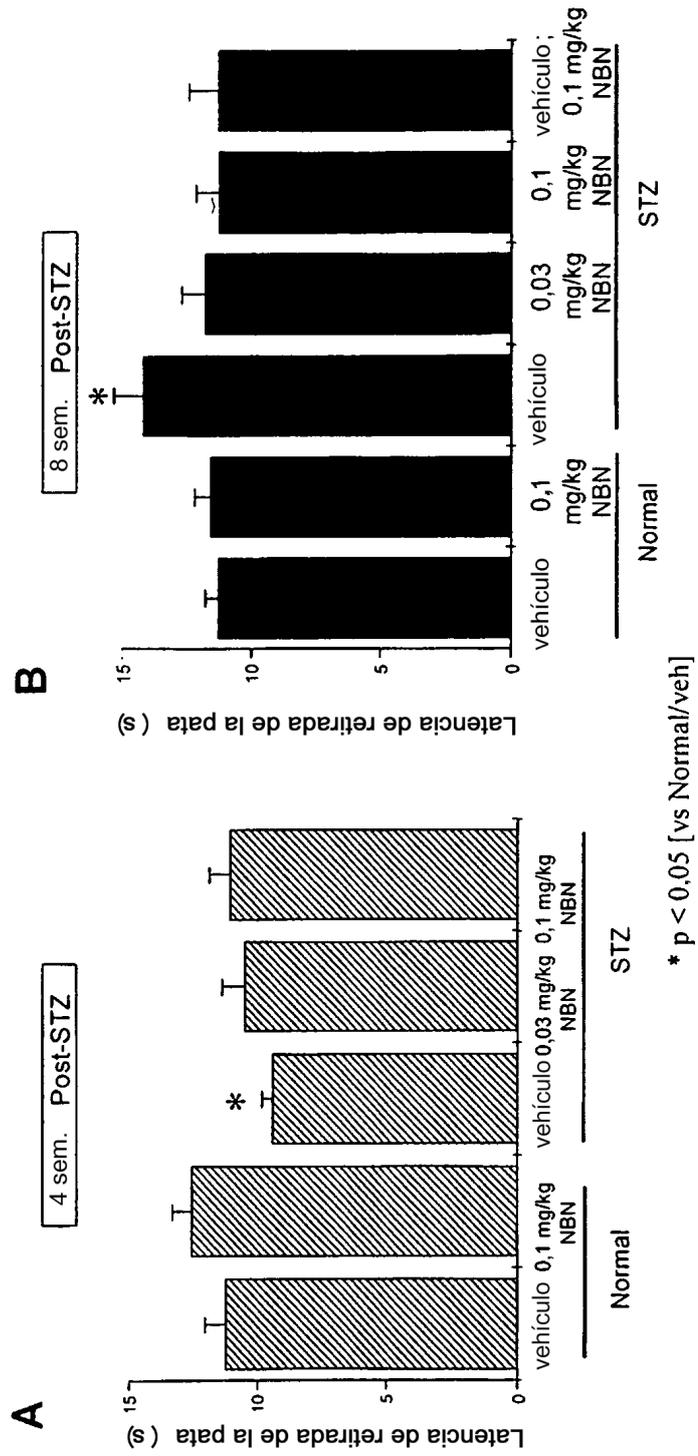


Figura 5: Prevención de la hipotalgesia térmica por neublantina en ratas con estreptozotocina (STZ)



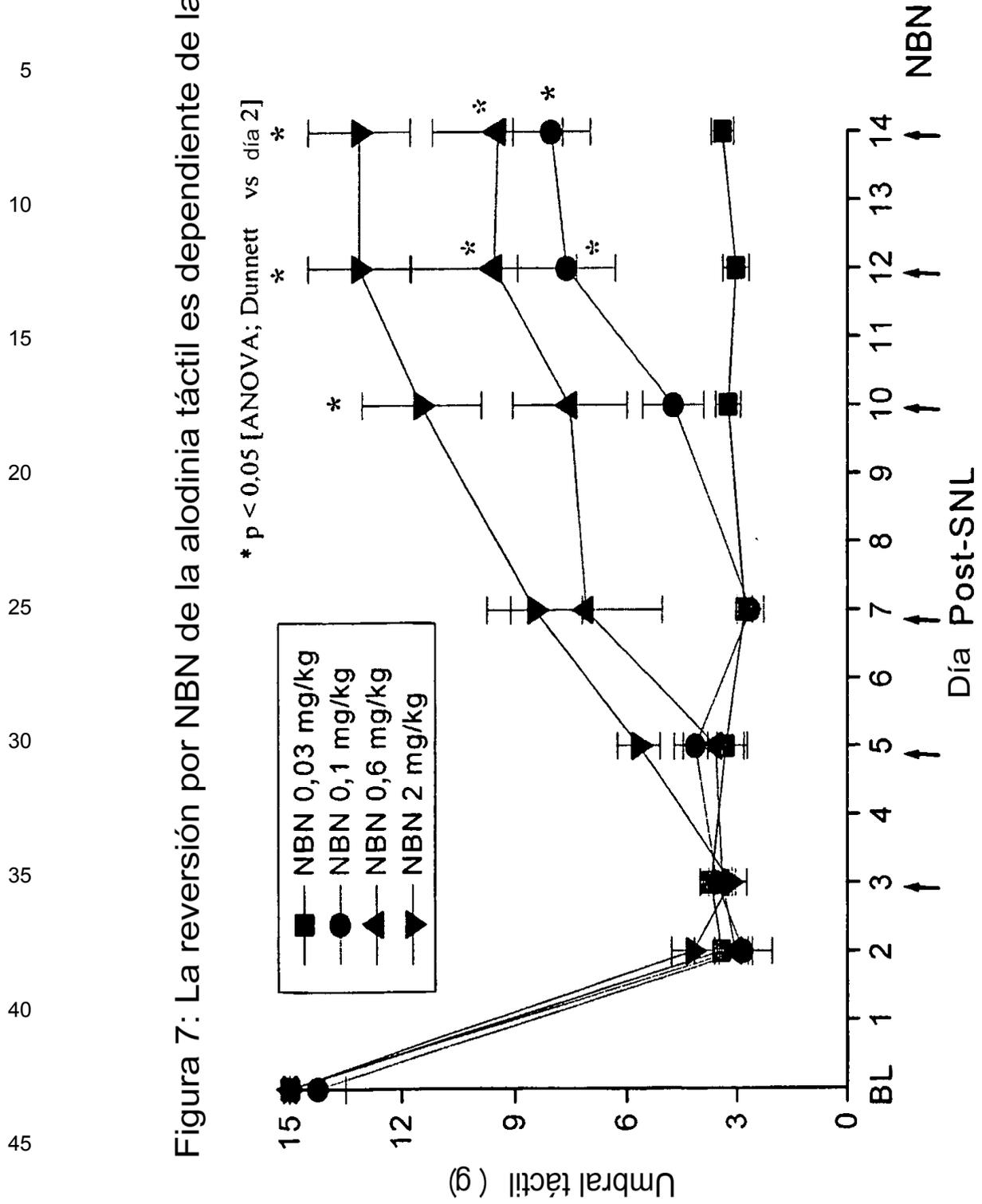
(Ejemplo ilustrativo)

Figura 6: Prevención de la hipoalgesia térmica, y prevención y reversión de la hiperalgesia térmica por neublantina en ratas con estreptozotocina (STZ)



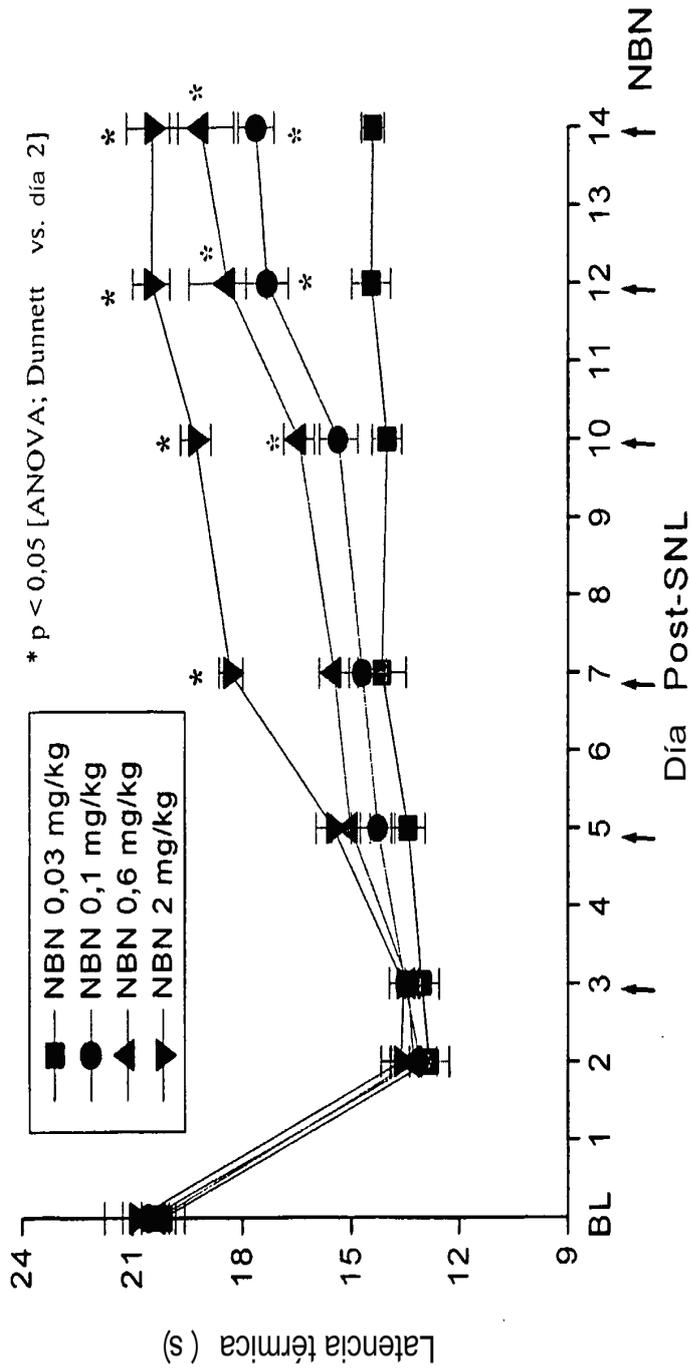
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

Figura 7: La reversión por NBN de la alodinia táctil es dependiente de la dosis



5
10
15
20

Figura 8: La reversión por NBN de la hiperalgesia térmica es dependiente de la dosis



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 0001815 A [0021] [0024] [0049]
- WO 0018799 A [0021] [0049]
- WO 0004050 A [0021] [0049]
- WO 9306116 A [0021]
- WO 9708196 A [0021]
- US 5434131 A [0045]
- US 5565335 A [0045]
- US 5541087 A [0045]
- US 5726044 A [0045]
- US 5733761 A [0052]
- US 5750376 A [0052]
- US 5496804 A [0065]
- US 5916555 A [0065]
- US SN06287554 A [0107]

10 Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- MASSAGUE et al. *Trends in Cell Biology*, 1994, vol. 4, 172-178 [0021]
- MILBRANDT et al. *Neuron*, 1998, vol. 20, 245-253 [0021]
- BAUDET et al. *Development*, 2000, vol. 127, 4335-44 [0021]
- BALOH et al. *Neuron*, 1998, vol. 21, 1291-1302 [0021]
- AIRAKSINEN et al. *Mol. Cell. Neuroscience*, 1999, vol. 13, 313-325 [0021]
- DAOPIN et al. *Proteins*, 1993, vol. 17, 176-192 [0026]
- THOMPSON JD ; GIBSON TJ ; PLEWNIAC F ; JEANMOUGIN F ; HIGGINS DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25 (24), 4876-82 [0034]
- NEEDLEMAN et al. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0035]
- DAYHOFF et al. ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE. 1978, 345-352 [0036]
- VAN DER BLICK et al. *Cancer Res.*, 1988, vol. 48, 5927-5932 [0056]
- REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Maack Publishing Co, [0082]
- NORTON ; COFFIN. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 281 [0088]
- MACGREGOR ; CASKEY. *Nucl. Acids. Res.*, 1989, vol. 17, 2365 [0088]
- SANICOLA et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 6238 [0091]
- KIM ; CHUNG. *Pain*, 1992, vol. 50, 355-363 [0093]
- CHAPLAN et al. *J. Neurosci. Meth.*, 1994, vol. 53, 55-63 [0093] [0096] [0098]
- HARGREAVES et al. *Pain*, 1988, vol. 32, 77-88 [0093] [0096] [0098]
- CALCUTT et al. *Anesthesiology*, 2000, vol. 93, 1271-1278 [0100]