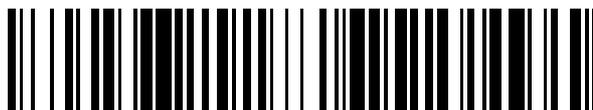


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 740**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2007 E 07752089 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1993589**

54 Título: **Tratamientos para trastornos neurológicos**

30 Prioridad:

**27.02.2006 US 777493 P**  
**01.11.2006 US 863852 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.01.2014**

73 Titular/es:

**BIOPEN IDEC MA INC. (50.0%)**  
**14 Cambridge Center**  
**Cambridge, MA 02142, US y**  
**ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF**  
**THE UNIVERSITY OF ARIZONA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROSSOMANDO, ANTHONY;**  
**PORRECA, FRANK y**  
**SAH, DINAH W.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 439 740 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

Tratamientos para trastornos neurológicos

**Campo técnico**

La invención se refiere a química de proteínas, biología molecular y neurobiología.

5 **Antecedentes**

La neublastina, también conocida como artemina y enovina, es una proteína secretada homodimérica de 24 kDa que estimula el crecimiento y supervivencia de neuronas del sistema nervioso periférico y central (Baudet et al., 2000, Development, 127: 4335; Masure et al., 1999, Eur. J. Biochem., 266: 892; Rosenblad et al., 2000, Mol. Cell. Neurosci., 15 (2): 199). El ARNm de la neublastina se expresa predominantemente en el riñón y pulmón embrionarios y, en adultos, se expresa sobre todo en la glándula pituitaria, tráquea y placenta (Baudet et al., 2000, Development, 127: 4335).

10 La neublastina es un miembro de la familia de ligandos del factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF). Los ligandos GDNF activan las rutas de transducción de la señal de Ras y fosfatidilinositol-3-quinasa uniéndose al receptor con tirosina quinasa c-RET unido a membrana. Esta señal mediada por c-RET requiere un co-receptor adicional, una proteína receptora alfa de la familia GDNF (GFR $\alpha$ ) anclada por glicosilfosfatidilinositol (GPI), que confiere especificidad de ligando a c-RET. Se han identificado cuatro proteínas co-receptoras GFR $\alpha$  (GFR $\alpha$ 1-4). La neublastina muestra la mayor afinidad para GFR $\alpha$ 3 *in vitro*, sin embargo en estudios usando fibroblastos humanos, la neublastina puede estimular la señalización dependiente de c-RET a través de GFR $\alpha$ 3 o GFR $\alpha$ 1 (Baudet et al., 2000, Development, 127: 4335; Masure et al., 1999, Eur. J. Biochem. 266: 892; Rosenblad et al., 2000, Mol. Cell. Neurosci., 15 (2): 199).

20 La neublastina y los demás miembros de la familia GDNF son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF beta) y así se caracterizan por la presencia de siete residuos conservados de cisteína con espaciamiento similar que forman la estructura de un nudo de cisteína (Saarma, 1999, Microsc. Res. Tech., 45: 292). Cada monómero contiene dos enlaces disulfuro que forman una estructura de bucle cerrado que rodea el tercer disulfuro para formar una estructura de nudo firme. La séptima cisteína contenida en cada monómero forma un enlace disulfuro intermolecular, uniendo covalentemente los monómeros para forman el producto dimérico final (Rattenholl et al 2000, J. Mol. Biol., 305: 523).

25 Gardell et al. (Nat. Med., 2003, 9 (11): 1383-9) reportan las acciones de artemina sistémica en un modelo de neuropatía en rata. Abrams et al. (Restor. Neurol. Neurosci., 2005, 23 (5-6): 367-82) revisan estrategias experimentales usadas para mejorar el resultado funcional después de lesión nerviosa periférica. Sah et al. (Curr. Top. Med. Chem., 2005, 5 (6): 577-83) revisan la familia GDNF de factores neurotróficos como una nueva clase potencial de terapéuticos para dolor neuropático. WO 02/078730 se refiere a tratamientos de dolor neuropático que implican el uso de polipéptidos de neublastina.

**Resumen**

35 La lesión en las raíces dorsales da como resultado una pérdida significativa y frecuentemente irreversible de las funciones sensoriales debido a la capacidad regenerativa aparentemente limitada de los axones sensoriales así como a las barreras inhibitoras que evitan la entrada axonal en la médula espinal. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento sorprendente de que la administración sistémica de neublastina restaura las funciones sensoriomotoras en animales que han experimentado aplastamiento de la raíz dorsal. Conjuntamente con esta recuperación funcional, se encontró que la administración sistémica de neublastina estimula la reentrada de múltiples clases de fibras aferentes primarias a través de la zona de entrada de la raíz dorsal (DREZ) en la médula espinal y a núcleos del tronco encefálico, lo que da como resultado una función sináptica reestablecida. Además de estimular la recuperación de la lesión por aplastamiento de la raíz dorsal, también se encontró que la administración sistémica de neublastina estimula la regeneración de los nervios periféricos y la recuperación de hipersensibilidad mecánica y térmica en animales que han experimentado aplastamiento de nervios distal de los ganglios de la raíz dorsal.

45 En un aspecto, la invención presenta un polipéptido para uso como un medicamento para tratar propiocepción deteriorada en un sujeto que presenta propiocepción deteriorada, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1, en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET. También se describe el uso del polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para mejorar la propiocepción en un sujeto que presenta propiocepción deteriorada.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, "propiocepción" se refiere a la capacidad de sentir, independientemente de la visión, la localización, orientación y movimiento del cuerpo y sus partes.

5 En otro aspecto, la invención presenta un polipéptido para uso como un medicamento para regenerar fibras nerviosas (por ejemplo, fibras nerviosas de la raíz dorsal o fibras nerviosas distales de los ganglios de la raíz dorsal) en un sujeto que ha sufrido daño o pérdida de fibras nerviosas, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1 y en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET. También se describe el uso del polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para regenerar fibras nerviosas en un sujeto que ha sufrido daño o pérdida de fibras nerviosas.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, "regenerar fibras nerviosas" se refiere al recrecimiento de fibras nerviosas perdidas o dañadas. Las fibras nerviosas pueden ser fibras nerviosas grandes o pequeñas. Por ejemplo, las fibras nerviosas pueden ser fibras nerviosas de la piel (en la que la administración del polipéptido al sujeto da como resultado reinervación de la piel). El daño o la pérdida de fibras nerviosas puede ser el resultado, por ejemplo, de una lesión por aplastamiento de nervios o una lesión por corte de nervios.

15 En otro aspecto, la invención presenta un polipéptido para uso como un medicamento para regenerar fibras nerviosas en un sujeto que presenta una respuesta neural sensorial deteriorada, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1 y en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET. También se describe el uso del polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para regenerar fibras nerviosas en un sujeto que presenta una respuesta neural sensorial deteriorada.

20 La respuesta neural sensorial deteriorada puede caracterizarse, por ejemplo, por una pérdida de sensibilidad a estímulos mecánicos o térmicos nocivos. La respuesta neural sensorial deteriorada puede ser un resultado de daño o pérdida de fibras nerviosas de la raíz dorsal o fibras nerviosas distales de los ganglios de la raíz dorsal.

25 En otro aspecto, la invención presenta un polipéptido para uso como un medicamento para regenerar fibras nerviosas en un sujeto que ha sufrido una lesión en el plexo braquial, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1, en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET. También se describe el uso del polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para regenerar fibras nerviosas en un sujeto con una lesión en el plexo braquial.

30 En otro aspecto, la invención presenta un polipéptido para uso como un medicamento para tratar una lesión en los nervios de la raíz dorsal en un sujeto que ha sufrido pérdida de la función sináptica como resultado de una lesión en los nervios de la raíz dorsal con el fin de estimular la reentrada de las fibras nerviosas a través de la zona de entrada de la raíz dorsal en la médula espinal, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1 y en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET. También se describe el uso del polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para tratar a un sujeto que ha sufrido una lesión en los nervios de la raíz dorsal.

35 En algunas realizaciones de los usos descritos en la presente memoria, el polipéptido se administra al sujeto, por ejemplo, en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42, 49 ó 56 días después de la alteración de la propiocepción, el daño o la pérdida de fibras nerviosas, la alteración de una respuesta neural sensorial, la lesión en el plexo braquial o la lesión en los nervios de la raíz dorsal. Se puede administrar al sujeto una única dosis o múltiples dosis (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más dosis) del polipéptido. El polipéptido puede administrarse opcionalmente al sujeto intermitentemente (por ejemplo, una dosis por día, una dosis cada 2 ó 3 días o una dosis por semana) durante un periodo, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4 o más semanas después de la alteración de la propiocepción, el daño o la pérdida de fibras nerviosas, la alteración de una respuesta neural sensorial, la lesión en el plexo braquial o la lesión en los nervios de la raíz dorsal. Una "cantidad eficaz" de un polipéptido puede comprender administrar el polipéptido al sujeto mediante múltiples dosis (por ejemplo, dos o más dosis) durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, días o semanas).

45 El polipéptido puede administrarse opcionalmente al sujeto durante un periodo de tiempo limitado y/o en un número limitado de dosis después de la alteración de la propiocepción, el daño o la pérdida de fibras nerviosas, la alteración de una respuesta neural sensorial, la lesión en el plexo braquial o la lesión en los nervios de la raíz dorsal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración del polipéptido al sujeto puede terminarse (es decir, no se proporcionan administraciones adicionales), por ejemplo, en un año, seis meses, un mes o dos semanas después de la alteración de la propiocepción, el daño o la pérdida de fibras nerviosas, la alteración de una respuesta neural sensorial, la lesión en el plexo braquial o la lesión en los nervios de la raíz dorsal. En algunas realizaciones, el tratamiento del sujeto conlleva la administración de 50 o menos dosis totales del polipéptido (por ejemplo, 40 o menos dosis, 30 o menos dosis, 20 o menos dosis, 15 o menos dosis, 10 o menos dosis, 9 o menos dosis, 8 o menos dosis, 7 o menos dosis, 6 o menos dosis, 5 o menos dosis, 4 o menos dosis, 3 o menos dosis ó 2 o menos dosis).

En algunas realizaciones de los usos descritos en la presente memoria, el polipéptido se administra al sujeto mediante administración sistémica (por ejemplo, mediante administración subcutánea o intravenosa).

En algunas realizaciones de los usos descritos en la presente memoria, el polipéptido se administra localmente en el tejido neural dañado.

- 5 El sujeto tratado según los usos descritos en la presente memoria puede ser un ser humano u otro mamífero tal como un ratón, rata, vaca, cerdo, perro, gato o mono.

10 También se describe un polipéptido para uso en la regeneración de fibras nerviosas mediante la puesta en contacto del tejido neural (por ejemplo, ganglios de la raíz dorsal o fibras nerviosas distales de los ganglios de la raíz dorsal) que ha sufrido daño o pérdida de fibras nerviosas con una cantidad de un polipéptido eficaz para regenerar fibras nerviosas, en el que el polipéptido contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1 y en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET. Las fibras nerviosas pueden ser fibras nerviosas grandes o pequeñas. Las fibras nerviosas pueden ser fibras nerviosas de la piel.

15 El daño o la pérdida de fibras nerviosas puede ser el resultado de una lesión por aplastamiento de nervios. El daño o la pérdida de fibras nerviosas puede ser el resultado de una lesión por corte de nervios.

20 El tejido neural puede ponerse en contacto con el polipéptido, por ejemplo, en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42, 49 ó 56 días después del daño o de la pérdida de fibras nerviosas. El tejido neural puede ponerse en contacto con una única dosis o múltiples dosis (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más dosis) del polipéptido. El tejido neural puede ponerse en contacto con el polipéptido intermitentemente (por ejemplo, una dosis por día, una dosis cada 2 ó 3 días o una dosis por semana) durante un periodo, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4 o más semanas después del daño o de la pérdida de fibras nerviosas.

En algunas realizaciones de los usos descritos en la presente memoria, el polipéptido contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 % ó 98 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1.

25 En algunas realizaciones de los usos descritos en la presente memoria, el polipéptido contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 % ó 98 % idéntica a SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones de los usos descritos en la presente memoria, el polipéptido contiene los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1, aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 2, aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 3, aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 4, aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 5, aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 8 o aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 9.

30 En algunas realizaciones de los usos descritos en la presente memoria, el polipéptido contiene los aminoácidos 10-113 de SEQ ID NO: 1.

35 En algunas realizaciones de los usos descritos en la presente memoria, el polipéptido contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

Una ventaja de determinados usos en el tratamiento descrito en la presente memoria es la producción de regeneración axonal persistente y restauración de la función sensorial después de un número limitado de inyecciones sistémicas de neublastina, obviando de esta manera el requerimiento de un régimen de tratamiento a largo plazo (con una duración posiblemente indefinida) y/o de infusiones espinales (y sus riesgos asociados).

40 A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse usos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para poner en práctica o ensayar la presente invención, los usos y materiales a modo de ejemplo se describen a continuación. Los materiales, usos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

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

#### **Descripción breve de los dibujos**

La Fig. 1 es una alineación de los polipéptidos de pre pro neublastina de tipo salvaje humano (SEQ ID NO: 10), de ratón (SEQ ID NO: 11) y de rata (SEQ ID NO: 12). Las líneas verticales izquierda y derecha indican, respectivamente, el

comienzo de las formas maduras de 113 aminoácidos y 104 aminoácidos. El resto de unión de heparina RRXR está recuadrado.

5 La Fig. 2 es un gráfico que representa el efecto de la administración sistémica de neublastina (artemina) en la densidad axonal en la zona de entrada de la raíz dorsal después de aplastamiento de la raíz dorsal (DRC). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las ratas tratadas con vehículo con DRC.

10 Las Fig. 3A y 3B son gráficos que representan el efecto de la administración sistémica de neublastina (artemina) en la respuesta a la exposición de la pata delantera a agua caliente (Fig. 3A) y a estímulos mecánicos nocivos (Fig. 3B) después de DRC. Las flechas indican el tiempo en el se hizo cada inyección de neublastina o vehículo. Los asteriscos indican respuestas comportamentales significativamente ( $p \leq 0,05$ ) diferentes de los valores de la línea base obtenidos antes de DRC.

La Fig. 3C es un gráfico que representa el efecto de la administración sistémica de neublastina (artemina) en respuestas de lamido, indicadas por un tiempo acumulativo dedicado a lamido de una pata delantera inyectada con formalina, después de DRC. El asterisco indica una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) en la respuesta de lamido respecto al grupo con DRC y tratamiento con vehículo (DRC/vehículo).

15 La Fig. 3D es un gráfico que representa el efecto de la administración sistémica de neublastina (artemina) en la expresión de FOS en el día 14 en asta dorsal ipsilateral en respuesta a inyección de formalina en la pata delantera después de DRC. El grupo con operación simulada y el grupo que recibió DRC y tratamiento con neublastina (artemina) demostraron incrementos significativos ( $p \leq 0,05$ ) en la expresión de FOS inducida por formalina, como se indica por los asteriscos.

20 La FIG. 3E es un gráfico que representa el efecto de la administración sistémica de neublastina (artemina) en la internalización de los receptores NK1 después de un pellizco mecánico nocivo aplicado a ratas con inflamación inducida por carragenina que habían experimentado DRC. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los grupos no inflamados (tratados con disolución salina).

25 La Fig. 3F es un gráfico que representa el efecto de la administración sistémica de neublastina (artemina) en la internalización del receptor NK1 en la lámina I/II de asta dorsal después de DRC. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al grupo no inflamado al que se inyectó disolución salina.

30 La Fig. 4 (superior) son gráficos que representan trazas de potenciales de campo registrados extracelularmente en la médula espinal ventral en respuesta a estimulación eléctrica de los nervios medianos o radiales en la extremidad delantera ipsilateral. En el lado no lesionado de los animales experimentales (raíces intactas), las respuestas sinápticas empezaron 1,0 a 1,5 ms después del estímulo, con tiempos de elevación de 1,0 a 1,5 ms, tanto en los animales tratados con vehículo como tratados con artemina. En las ratas tratadas con artemina, hubo una recuperación sustancial de estas entradas sinápticas a 1,4 y 7,5 meses después de DRC. No hubo una recuperación significativa de la función sináptica después de DRC en las ratas tratadas con vehículo, incluso a los 7,5 meses.

35 La Fig. 4 (inferior) es un gráfico de dispersión de la respuesta sináptica máxima a estimulación del nervio mediano o radial registrada en animales experimentales. Cada símbolo representa los resultados de un animal, bien después de DRC o para las raíces no lesionadas (intactas) del lado contralateral del mismo animal. La respuesta máxima media para cada grupo se muestra con un círculo abierto y línea vertical (media  $\pm$  1 S.E.). Los grupos ensayados a - 1 mes incluyeron los tiempos postoperatorios de 0,7 a 1,4 meses. Todos los 9 animales tratados con artemina mostraron una regeneración sustancial después de DRC, con una amplitud media 1/4 a 1/3 de las respuestas normales. Ninguna de las 40 ratas tratadas con vehículo mostró ninguna regeneración apreciable después de DRC:

45 Las Figs. 5A-5D son gráficos que representan el efecto de la administración sistémica de neublastina (artemina) en la recuperación de las siguientes funciones sensoriomotoras durante un periodo de observación de 42 días posterior a DRC: ubicación/estabilización (Fig. 5A); capacidad de andar a lo largo de una barra de equilibrio en un área abierta (Fig. 5B); número de resbalones cuando anda a través de una escalera horizontal (Fig. 5C); y agarre provocado por contacto (Fig. 5D). Las flechas indican cada inyección de neublastina (artemina) o vehículo. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en los parámetros comportamentales respecto a la primera medida tomada después de DRC o cirugía simulada.

50 Las Figs. 6A-6G son gráficos que representan la recuperación funcional persistente seis meses después de DRC en ratas tratadas con neublastina (artemina) sistémica: respuestas a estímulos térmicos, mecánicos y químicos nocivos (Figs. 6A-6C, respectivamente); y comportamiento en ubicación estabilización, andar en barra de equilibrio, escalera horizontal y agarre provocado por contacto (Figs. 6D-6G, respectivamente). Los asteriscos indican diferencias

significativas en las respuestas comportamentales del grupo DRC tratado con neublastina cuando se compara con el grupo DRC tratado con vehículo.

La Fig. 6H es un gráfico que representa la recuperación persistente de la expresión FOS postsináptica en el asta dorsal ipsilateral seis meses después de DRC en ratas tratadas con neublastina (artemina) sistémica. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al grupo al que se inyectó disolución salina.

Las Figs. 7A y 7B son gráficos que representan el efecto de la administración sistémica de neublastina (artemina) en los perfiles neuronales de los ganglios de la raíz dorsal que expresan N52, CGRP o P2X<sub>3</sub> y co-expresan bien GFR $\alpha$ 3 (Fig. 7A) o RET (Fig. 7B) 14 días después de DRC.

Las Figs. 8A-8D son gráficos que representan el efecto de la administración sistémica de neublastina (artemina) en las repuestas de dolor táctil después de cirugía simulada del nervio espinal L5 (Fig. 8A), sección del nervio espinal L5 (Fig. 8B), ligadura del nervio espinal L5 (Fig. 8C) y aplastamiento del nervio espinal L5 (Fig. 8D). Las flechas indican el tiempo en el que se hizo cada inyección de neublastina o vehículo.

Las Figs. 9A-9D son gráficos que representan el efecto de la administración sistémica de neublastina (artemina) en las respuestas de dolor térmico después de cirugía simulada del nervio espinal L5 (Fig. 9A), sección del nervio espinal L5 (Fig. 9B), ligadura del nervio espinal L5 (Fig. 9C) y aplastamiento del nervio espinal L5 (Fig. 9D). Las flechas indican el tiempo en el que se hizo cada inyección de neublastina o vehículo.

### Descripción detallada

La presente invención proporciona polipéptidos para uso como medicamentos para regenerar fibras nerviosas, que comprenden mejorar la propiocepción deteriorada, tratar lesiones en el plexo braquial, regenerar fibras nerviosas grandes y pequeñas, tratar lesiones de los nervios de la raíz dorsal y mejorar respuestas neurales sensoriales en un sujeto por la administración de un polipéptido de neublastina. Como se describe en los Ejemplos adjuntos, se encontró que la administración sistémica de Neublastina restaura la función sensorial en animales que han experimentado aplastamiento de la raíz dorsal, estimula la reentrada de fibras nerviosas a través del DREZ en la médula espinal de los animales lesionados y estimula la regeneración de los nervios periféricos y la recuperación de hipersensibilidad mecánica y térmica en animales que han experimentado aplastamiento de nervios distal a los ganglios de la raíz dorsal.

### Polipéptidos de neublastina

La neublastina madura humana de tipo salvaje tiene una longitud de 113 aminoácidos y tiene la secuencia de aminoácidos siguiente: AGGPGSRARAAGARGCRLRSQVLVPRALGLGHR SDELVRFRCGSGCRRARSPHDLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAV SFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG (SEQ ID NO: 1). Los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o las variantes biológicamente activas de éstos pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria. Un polipéptido de neublastina variante puede contener una o más adiciones, sustituciones y/o deleciones, como se detalla en las secciones siguientes. Los polipéptidos de neublastina de tipo salvaje y las variantes biológicamente activas de éstos se refieren colectivamente en la presente memoria como "polipéptidos de neublastina".

Un polipéptido de neublastina variante puede variar en longitud respecto al polipéptido de tipo salvaje correspondiente. Aunque el polipéptido de neublastina maduro humano (SEQ ID NO: 1) consiste en los 113 aminoácidos carboxi terminales de la pre pro neublastina (SEQ ID NO: 10), no todos los 113 aminoácidos se requieren para conseguir la actividad biológica útil de la neublastina. Es permisible el truncamiento amino terminal. Así, un polipéptido de neublastina variante puede contener, por ejemplo, los 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 ó 113 aminoácidos carboxi terminales de SEQ ID NO: 1 (es decir, su longitud puede ser 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 ó 113 aminoácidos).

Un polipéptido de neublastina variante también puede variar en secuencia respecto al polipéptido de tipo salvaje correspondiente. En particular, pueden introducirse determinadas sustituciones de aminoácidos en la secuencia de la neublastina sin una pérdida apreciable de una actividad biológica de la neublastina. En realizaciones a modo de ejemplo, un polipéptido de neublastina variante (i) contiene una o más sustituciones de aminoácidos y (ii) es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ó 99 % idéntico a SEQ ID NO: 1 (ó 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ó 99 % idéntico a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1). Un polipéptido de neublastina variante que se diferencia en la secuencia de SEQ ID NO: 1 (o que se diferencia en la secuencia de los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1) puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos (conservativas o no conservativas), una o más deleciones y/o una o más inserciones.

La Fig. 1 es una alineación de los polipéptidos de pre pro neublastina de tipo salvaje humano, de ratón y de rata. Las líneas verticales en la Fig. 1 indican el comienzo de la forma madura de 113 aminoácidos (línea vertical izquierda) y de 104 aminoácidos (línea vertical derecha) de la neublastina. El resto de unión de heparina RPRXR está encuadrado. Esta

alineación de formas naturales, bioactivas de la neublastina indica residuos a modo de ejemplo específicos (es decir, aquellos que no están conservados entre las formas humana, de ratón y de rata) que pueden sustituirse sin eliminar la bioactividad.

5 El porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el programa BLAST 2.0. La comparación entre secuencias puede realizarse usando una alineación sin huecos y usando los parámetros por defecto (matriz Blossom 62, coste de la existencia de huecos 11, coste de hueco por residuo 1 y una proporción lambda de 0,85). El algoritmo matemático usado en los programas BLAST se describe en Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.

10 Una sustitución conservativa es la sustitución de un aminoácido por otro con características similares. Las sustituciones conservativas incluyen sustituciones en los grupos siguientes: valina, alanina y glicina; leucina, valina e isoleucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina, cisteína y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Los aminoácidos hidrofóbicos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. 15 Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier sustitución de un miembro de los grupos mencionados anteriormente polar, básico o ácido por otro miembro del mismo grupo puede considerarse una sustitución conservativa.

20 Las sustituciones no conservativas incluyen aquellas en las que (i) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva (por ejemplo, Arg, His o Lys) se sustituye por, o con, un residuo electronegativo (por ejemplo, Glu o Asp), (ii) un residuo hidrofílico (por ejemplo, Ser o Thr) se sustituye por, o con, un residuo hidrofóbico (por ejemplo, Ala, Leu, Ile, Phe o Val), (iii) una cisteína o prolina se sustituye por, o con, cualquier otro residuo, o (iv) un residuo que tiene una cadena lateral hidrofóbica o aromática voluminosa (por ejemplo, Val, Ile, Phe o Trp) se sustituye por, o con, uno que tiene una cadena lateral más pequeña (por ejemplo, Ala, Ser) o no tiene cadena lateral (por ejemplo, Gly).

25 Un polipéptido de neublastina variante biológicamente activo, cuando se dimeriza, se une a un complejo ternario que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET. Puede usarse cualquier método para detectar la unión a este complejo para evaluar la actividad biológica de un polipéptido de neublastina variante. Los ensayos a modo de ejemplo para detectar la capacidad de unión al complejo ternario de un polipéptido de neublastina variante se describen en WO00/01815.

30 Un polipéptido de neublastina variante también puede evaluarse para evaluar su capacidad de desencadenar la cascada de señalización de la neublastina. Por ejemplo, el ensayo de la Activación de la Quinasa de Receptor (KIRA) puede usarse para evaluar la capacidad de un polipéptido de neublastina variante para inducir la autofosforilación de RET (Véase también, Sadick et al., 1996, *Anal. Biochem.*, 235 (2): 207).

35 Se espera que las sustituciones en uno o más de los residuos de aminoácidos siguientes resulte en un polipéptido de neublastina variante que tiene una capacidad de unión a heparina reducida o ausente comparado con la neublastina de tipo salvaje: Arg 48, Arg 49, Arg 51, Ser 46, Ser 73, Gly 72, Arg 39, Gln 21, Ser 20, Arg 68, Arg 33, His 32, Val 94, Arg 7, Arg 9 o Arg 14. La referencia a un residuo de aminoácido de la neublastina por número de posición se refiere a la numeración de los residuos respecto a la SEQ ID NO: 1. Un residuo de aminoácido de neublastina designado para sustitución (por ejemplo, un residuo de arginina en la posición 48, 49 y/o 51) puede sustituirse con un residuo de aminoácido no conservativo (por ejemplo, ácido glutámico) o un residuo de aminoácido conservativo. Los aminoácidos a modo de ejemplo que pueden sustituirse en un residuo identificado en la presente memoria (por ejemplo, posición 48, 49 40 y/o 51) incluyen ácido glutámico, ácido aspártico y alanina.

45 Los ejemplos de polipéptidos de neublastina variantes que presentan una unión a heparina reducida o ausente se describen en la Tabla 1. Los residuos de aminoácidos de los polipéptidos de neublastina variantes que están mutados comparados con la posición de tipo salvaje correspondiente están en negrita y subrayados. Además, el polipéptido de neublastina (113, 99 ó 104 aminoácidos de longitud) usado como el referente para la sustitución se representa en la Tabla 1.

50

Tabla 1: Polipéptidos de Neublastina Variantes

| SEQ ID NO | Posición Sustituida | Longitud del Polipéptido | Secuencia de Aminoácidos  |
|-----------|---------------------|--------------------------|---|
| 2         | Arg 48              | 113                      | AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRA<br>LGLGHRSD <del>EL</del> VRFRFCSGSC <u>E</u> ARARSPHD<br>LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT<br>RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGC<br>LG  |
| 3         | Arg 49              | 113                      | AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRA<br>LGLGHRSD <del>EL</del> VRFRFCSGSC <u>R</u> EARSPHD<br>LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT<br>RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGC<br>LG   |
| 4         | Arg 51              | 113                      | AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRA<br>LGLGHRSD <del>EL</del> VRFRFCSGSC <u>RRAE</u> SPHD<br>LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT<br>RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGC<br>LG   |
| 5         | Arg 48 y Arg 49     | 113                      | AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRA<br>LGLGHRSD <del>EL</del> VRFRFCSGSC <u>EE</u> ARARSPHD<br>LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT<br>RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGC<br>LG |
| 6         | Arg 48 y Arg 49     | 99                       | G <u>CRLRSQ LVPVRA</u> LGLGHRSD <del>EL</del> VRFRF<br>CSGSC <u>EE</u> ARARSPHDLSLASLLGAGALRPP<br>GSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTW<br>RTVDRLSATAACGCLG           |
| 7         | Arg 48 y Arg 49     | 104                      | AAGARGCRLRSQ LVPVRA <u>LGLGHRSD</u><br>LVRFRFCSGSC <u>EE</u> ARARSPHDLSLASLLGA<br>GALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFM<br>D <del>VN</del> STWRTVDRLSATAACGCLG       |
| 8         | Arg 49 y Arg 51     | 113                      | AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRA<br>LGLGHRSD <del>EL</del> VRFRFCSGSC <u>REA</u> ESPHD<br>LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT<br>RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGC<br>LG   |
| 9         | Arg 48 y Arg 51     | 113                      | AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRA<br>LGLGHRSD <del>EL</del> VRFRFCSGSC <u>ERA</u> ESPHD<br>LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT<br>RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGC<br>LG   |

Un polipéptido de neublastina puede acoplarse opcionalmente a un polímero (por ejemplo, un resto polialquilen glicol tal como un resto de polietilen glicol). En algunas realizaciones, el polímero se acopla al polipéptido en un sitio en el polipéptido de neublastina que es un extremo N. En algunas realizaciones, un polipéptido de neublastina variante incluye al menos una sustitución de aminoácidos respecto a SEQ ID NO: 1 (o respecto a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1), lo que proporciona un sitio interno de conjugación del polímero en el que puede conjugarse un polímero. En

5

algunas realizaciones, el polímero se acopla a un polipéptido de neublastina variante en un residuo (numerado según la secuencia de SEQ ID NO: 1) seleccionado del grupo que consiste en la posición 14, posición 39, posición 68 y posición 95. Las variantes de neublastina a modo de ejemplo que proporcionan sitios internos de conjugación de polímero se describen en WO 02/060929 y WO 04/069176.

- 5 Un polipéptido puede contener opcionalmente secuencias de aminoácidos heterólogas además de un polipéptido de neublastina. "Heteróloga", como se usa cuando se hace referencia a una secuencia de aminoácidos, se refiere a una secuencia que se origina a partir de una fuente extraña a la célula huésped particular, o, si es de la misma célula huésped, está modificada respecto a su forma original. Las secuencias heterólogas a modo de ejemplo incluyen una secuencia señal heteróloga (por ejemplo, secuencia señal de albúmina de rata nativa, una secuencia señal de rata modificada o una secuencia señal de hormona de crecimiento humana) o una secuencia usada para la purificación de un polipéptido de neublastina (por ejemplo, una etiqueta de histidina).

10 Los polipéptidos de neublastina pueden aislarse usando métodos conocidos en la técnica. Los polipéptidos de neublastina naturales o producidos recombinantemente pueden aislarse de fuentes celulares o tisulares usando técnicas estándar de purificación de proteínas. Alternativamente, pueden sintetizarse químicamente polipéptidos de neublastina mutados usando técnicas estándar de síntesis de péptidos. La síntesis de secuencias cortas de aminoácidos está bien establecida en la técnica de péptidos. Véase, por ejemplo, Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis (2ª ed., 1984).

15 En algunas realizaciones, los polipéptidos de neublastina se producen por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina puede insertarse en un vector, por ejemplo, un vector de expresión, y el ácido nucleico puede introducirse en una célula. Las células adecuadas incluyen, por ejemplo, células de mamífero (tales como células humanas o células CHO), células fúngicas, células de levadura, células de insecto y células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*). Cuando se expresa en una célula recombinante, la célula se cultiva preferiblemente en condiciones que permitan la expresión de un polipéptido de neublastina. El polipéptido de neublastina puede recuperarse de una suspensión celular si se desea. Tal y como se usa en la presente memoria, "recuperarse" significa que del polipéptido mutado se eliminan aquellos componentes de una célula o medio de cultivo en el que está presente antes del proceso de recuperación. El proceso de recuperación puede incluir una o más etapas de replegamiento o purificación. Los tampones y métodos para inducir el plegamiento de un polipéptido de neublastina desnaturalizado se describen, por ejemplo, en WO2006/023782.

20 Los polipéptidos de neublastina variantes pueden construirse usando cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Uno de dichos métodos es mutagénesis dirigida a sitio, en la que un nucleótido específico (o, si se desea, un pequeño número de nucleótidos específicos) se cambia con el fin de cambiar un único aminoácido (o, si se desea, un pequeño número de residuos de aminoácidos predeterminados) en el polipéptido de neublastina variante codificado. Hay muchos kits de mutagénesis dirigida a sitio disponibles comercialmente. Uno de dichos kits es el "Transformer Site Directed Mutagenesis Kit" vendido por Clontech Laboratories (Palo Alto, CA).

### Composiciones farmacéuticas

35 Un polipéptido de neublastina puede incorporarse en una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido y uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos y/o diluyentes. Los diluyentes, vehículos y excipientes aceptables normalmente no afectan adversamente la homeostasis de un receptor (por ejemplo, equilibrio de electrolitos). Los vehículos aceptables incluyen sales, agentes tamponadores, oligo o polisacáridos, polímeros, agentes para mejorar la viscosidad, conservantes y semejantes biocompatibles, inertes o bioabsorbibles. Un vehículo a modo de ejemplo es disolución salina fisiológica (0,15 M NaCl, pH 7,0 a 7,4). Otro vehículo a modo de ejemplo es 50 mM fosfato de sodio, 100 mM cloruro de sodio. Los detalles adicionales sobre técnicas para la formulación y administración de composiciones farmacéuticas pueden encontrarse, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa).

40 La administración de una composición farmacéutica que contiene un polipéptido de neublastina puede ser sistémica o local. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera tal que sean adecuadas para administración parenteral y/o no parenteral. Las modalidades específicas de administración incluyen administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, intratecal, oral, rectal, bucal, tópica, nasal, oftálmica, intra-articular, intra-arterial, sub-aracnoide, bronquial, linfática, vaginal e intra-uterina. La administración puede ser en el sistema nervioso periférico y/o el sistema nervioso central (SNC).

50 La administración puede ser por inyecciones periódicas de un bolo de la composición farmacéutica o puede hacerse más continua por la administración intravenosa o intraperitoneal desde un reservorio que es externo (por ejemplo, una bolsa IV) o interno (por ejemplo, un implante bioerosionable, un órgano bioartificial o una colonia de células productoras de neublastina implantada). Véanse, por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 4.407.957, 5.798.113 y 5.800.828.

- En particular, la administración de una composición farmacéutica puede conseguirse usando medios de administración adecuados tales como: una bomba (véase, por ejemplo, *Annals of Pharmacotherapy*, 27: 912 (1993); *Cancer*, 41: 1270 (1993); *Cancer Research*, 44: 1698 (1984); microencapsulación (véanse, por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 4.352.883; 4.353.888; y 5.084.350); implantes de polímero de liberación continua (véase, por ejemplo, Sabel, Pat. U.S. No. 4.883.666); macroencapsulación (véanse, por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 5.284.761, 5.158.881, 4.976.859 y 4.968.733 y las solicitudes de patente PCT publicadas WO92/19195, WO 95/05452); injertos celulares desnudos o no encapsulados en el SNC (véanse, por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 5.082.670 y 5.618.531); inyección, bien subcutáneamente, intravenosamente, intra-arterialmente, intramuscularmente, o en otro sitio adecuado; o administración oral, en cápsula, líquido, comprimido, pastilla o formulación de liberación prolongada.
- 5 En una realización, una composición farmacéutica se administra directamente en el SNC (por ejemplo, los ventrículos cerebrales, parénquima cerebral, o el espacio intratecal). La composición farmacéutica puede administrarse intratecalmente.
- Los ejemplos de sistemas de administración parenterales incluyen partículas de copolímero etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, administración por bomba, administración de células encapsuladas, administración por liposomas, inyección administrada por aguja, inyección sin aguja, nebulizador, aerosol, electroporación y parche transdérmico.
- 15 Una composición farmacéutica que contiene un polipéptido de neublastina puede administrarse opcionalmente a un sujeto en un periodo de tiempo específico después de daño o lesión en el tejido nervioso (por ejemplo, un aplastamiento de la raíz dorsal o un aplastamiento de un nervio distal de los ganglios de la raíz dorsal). Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse al sujeto, por ejemplo, en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42, 49 ó 56 días después del daño o lesión. Se puede administrar al sujeto una única dosis o múltiples dosis (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más dosis) de la composición farmacéutica. Las administraciones de múltiples dosis pueden estar separadas por intervalos de horas, días, semanas o meses.
- 20 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral contienen convenientemente una preparación acuosa estéril del polipéptido de neublastina, que preferiblemente es isotónica con la sangre del receptor (por ejemplo, disolución salina fisiológica). Las formulaciones pueden presentarse en forma de dosis única o de múltiples dosis.
- 25 Una formulación a modo de ejemplo contiene un polipéptido de neublastina descrito en la presente memoria y los componentes de tampón siguientes: succinato de sodio (por ejemplo, 10 mM); NaCl (por ejemplo, 75 mM); y L-arginina (por ejemplo, 100 mM).
- 30 Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos, comprimidos o pastillas, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del polipéptido de neublastina; o una suspensión en un licor acuoso o un líquido no acuoso, tal como un jarabe, un elixir, una emulsión o una pócima.
- 35 Las cantidades terapéuticamente eficaces de una composición farmacéutica pueden administrarse a un sujeto que lo necesita en un régimen de dosificación verificable por un experto en la técnica. Por ejemplo, una composición puede administrarse al sujeto, por ejemplo, sistémicamente a una dosificación de 0,01 µg/kg a 1.000 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis. En otro ejemplo, la dosificación es de 1 µg/kg a 100 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis. En otro ejemplo, la dosificación es de 1 µg/kg a 30 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis, por ejemplo, de 3 µg/kg a 10 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis.
- 40 Con el fin de optimizar la eficacia terapéutica, se administra en primer lugar un polipéptido de neublastina a regímenes de dosificación diferentes. La dosis unitaria y el régimen dependen de factores que incluyen, por ejemplo, la especie de mamífero, su estado inmune, el peso corporal del mamífero. Normalmente, se monitorizan los niveles de proteína en el tejido usando ensayos de cribado apropiados como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado.
- 45 La frecuencia de la dosificación para un polipéptido de neublastina está dentro de las capacidades y criterio clínico de los médicos. Normalmente, el régimen de administración se establece por ensayos clínicos que pueden establecer los parámetros óptimos de la administración. Sin embargo, el médico puede variar dichos regímenes de administración según la edad, salud, peso, sexo y estado médico del sujeto. La frecuencia de la dosificación puede variarse dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

#### 50 Usos en tratamiento

Los polipéptidos de neublastina descritos en la presente memoria pueden usarse para regenerar fibras nerviosas para tratar propiocepción deteriorada, tratar lesiones en el plexo braquial, regenerar fibras nerviosas grandes y pequeñas,

estimular la reentrada de fibras nerviosas a través del DREZ en la médula espinal y/o mejorar las respuestas neurales sensoriales.

1. Tratamiento de propiocepción deteriorada

5 Los polipéptidos de neublastina descritos en la presente memoria (y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) pueden usarse para regenerar fibras nerviosas para tratar propiocepción deteriorada.

10 La propiocepción deteriorada inhibe el esfuerzo muscular coordinado apropiadamente y da como resultado una percepción deteriorada de la relación cuerpo-espacio. En los seres humanos, la pérdida de propiocepción ocurre frecuentemente como resultado de trauma o daño nervioso (por ejemplo, daño que resulta de una lesión). Las lesiones que pueden estar asociadas con la pérdida o alteración posterior de la propiocepción incluyen, por ejemplo, daño nervioso relacionado con ictus u otra lesión neural relacionada con isquemia, cirugía, traumatismo cervical, conmoción cerebral, mielopatía cervical (por ejemplo, debida a estenosis cervical) y lesiones relacionadas con escoliosis (por ejemplo, escoliosis idiopática). La alteración también puede resultar de complicaciones debidas a la diabetes o el cáncer (por ejemplo, inflamación o lesión debido a un tumor invasivo) o puede resultar de lesión tisular que resulta de la exposición a factores citotóxicos tales como quimioterapia. La propiocepción homeostática puede alterarse después del uso de bloqueantes nerviosos periféricos o centrales, por ejemplo, durante un procedimiento quirúrgico.

15 La pérdida o alteración de la propiocepción también puede ocurrir a partir de afecciones que no implican un daño o lesión tisular directo. Los pacientes que padecen, por ejemplo, hipermovilidad articular o Síndrome de Ehlers-Danlos (una afección genética que da como resulta un tejido conectivo débil a lo largo del cuerpo) pueden presentar propiocepción deteriorada. La propiocepción también puede alterarse temporalmente o permanentemente a partir de determinadas infecciones virales. En algunos casos, la pérdida o alteración temporal de la propiocepción puede suceder periódicamente durante el crecimiento tal como el crecimiento durante la adolescencia. Otros tipos de crecimiento que podrían afectar la propiocepción en un paciente incluyen, por ejemplo, grandes ganancias o reducciones en el peso/tamaño corporal debido a fluctuaciones de grasa y contenido muscular. La pérdida propioceptiva también puede estar presente en sujetos que ganan nuevos niveles de flexibilidad, estiramiento y contorsión, por ejemplo, una extremidad que experimenta un nuevo rango de movimiento después de una inmovilización prolongada. En casos raros, también se ha mostrado que la alteración temporal de la propiocepción ocurre después de una sobredosis de vitamina B6 (piridoxina y piridoxamina).

20 La pérdida o alteración de la propiocepción puede afectar las extremidades superiores, extremidades inferiores, o ambas, dependiendo de la localización y/o naturaleza de la lesión o afección causante. Por ejemplo, una lesión en la parte inferior de la médula puede afectar sólo la propiocepción desde el torso hacia abajo, mientras que una lesión en las partes superiores de la médula puede resultar en propiocepción deteriorada tanto en las extremidades superiores como inferiores.

25 Después de la administración de neublastina a un sujeto (por ejemplo, un ser humano), la eficacia (mejora) del tratamiento en la propiocepción deteriorada puede evaluarse comparando la propiocepción del sujeto antes y después del tratamiento. La evaluación posterior al tratamiento puede ocurrir inmediatamente o poco después del tratamiento (por ejemplo, 6, 12, 18 ó 24 horas después del tratamiento) y/o puede ocurrir días, semanas o meses después del tratamiento. Cuando se quiere evaluar la progresión de la mejora de la propiocepción deteriorada después de uno o más tratamientos con neublastina, puede evaluarse o medirse la propiocepción de un sujeto en múltiples puntos de tiempo después del tratamiento con neublastina (por ejemplo, evaluación en un día, dos días y una semana; evaluación en una semana, un mes y seis meses; evaluación en un mes, seis meses y un año).

30 Los métodos adecuados para evaluar o medir la propiocepción en un sujeto son conocidos en la técnica. Cuando se evalúa la propiocepción de las extremidades superiores, los ejemplos de dichos métodos de evaluación incluyen la detección de la movilidad articular (por ejemplo, Cook et al., (1986) Clin. Orthop. Relat. Res. 231: 118-24) y ensayos de concordancia de posición pasiva usando dispositivos descritos, por ejemplo, en Swanik et al. (1996) J Athl Train. 31 (2): 119-24 y Ulkar et al. (2004) Br. J. Sports Med. 38: 549-52. Además, los déficits en la propiocepción en las extremidades superiores pueden ensayarse en los seres humanos usando, por ejemplo, el ensayo de sobriedad de campo, en el que un sujeto intenta tocarse la nariz con los ojos cerrados. Los sujetos con una propiocepción normal generalmente cometen errores de no más de 2 cm. Los sujetos con propiocepción gravemente deteriorada no pueden percibir la localización de sus manos (o narices) sin mirar.

35 Cuando se evalúa la propiocepción de las extremidades inferiores (por ejemplo, propiocepción de cadera o rodilla), la propiocepción puede evaluarse según un ensayo para el sentido de posición de la articulación del paciente (Takayama et al. (2005) Spine 30 (1): 83-86) o medirse usando un transportador manual o electrogoniómetro (Mendelsohn et al. (2004) Am. J. Phys. Med. Rehabil. 83 (8): 624-32). Los déficits en la propiocepción de las extremidades inferiores también pueden determinarse midiendo el equilibrio estático y dinámico. También puede medirse la propiocepción de la

médula. Los ejemplos de dichos métodos y dispositivos se describen en Christensen (1999) *J Manipulative Physiol. Ther.* 22 (1): 10-14 y Patente U.S. No. 6.969.360.

5 La medida o evaluación de la propiocepción en un paciente puede ser cuantitativa o generalmente cualitativa, por ejemplo, una encuesta proporcionada a un paciente en la que el o ella puntúa la gravedad o grado de una percepción deteriorada como se describe en Klein et al. (2003) *Reg. Anesth. Pain Med.* 28 (5): 433-38. Los ensayos adicionales de propiocepción se describen, por ejemplo, en Lee et al. (2003) *Clin. Biomech.* 18 (9): 843-47 y al-Othman et al. (1998) *Orthopedics* 21 (6): 677-79.

10 Los Ejemplos contenidos en la presente memoria describen varios ensayos útiles para medir la propiocepción en sistemas de modelos no humanos. Los modelos animales de propiocepción deteriorada son generalmente modelos de propiocepción deteriorada relacionada con lesión. Las lesiones pueden incluir, por ejemplo, aplastamiento de raíz dorsal C4-T2 unilateral (Ramer et al. (2000) *Nature* 403: 312-316). Los modelos animales adecuados adicionales de propiocepción se describen, por ejemplo, en Gaviria et al. (2002) *J. Neurotrauma* 19 (2): 205-221.

## 2. Tratamiento de lesiones en el plexo braquial

15 Como se describe en los Ejemplos, la administración de neublastina a un mamífero puede resultar en la restauración de la función sensoriomotora después de lesiones en los nervios en el plexo braquial. Las lesiones en el plexo braquial están causadas por daño (lesión) en el plexo braquial, una red de nervios periféricos (los nervios C5, C6, C7, C8 y T1 en los seres humanos) que viajan desde la médula al hombro, brazo y mano. Los síntomas de lesiones en el plexo braquial pueden incluir un brazo flácido o paralizado, ausencia de control muscular en el brazo, mano o muñeca y ausencia de sensibilidad o sensación en el brazo o mano. Los polipéptidos de neublastina descritos en la presente memoria (y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos) pueden usarse para regenerar las fibras nerviosas para tratar lesiones en el plexo braquial en un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

20 Los nervios del plexo braquial pueden estirarse, extirparse o romperse debido a grandes cantidades de tensión aplicadas en el cuello. Los adultos pueden sufrir lesiones en el plexo braquial a través de trauma físico grave tal como un accidente de automóvil o de motocicleta (por ejemplo, después de una lesión con trauma cervical). Muchas lesiones en el plexo braquial ocurren en el útero o en el nacimiento cuando los hombros de un bebé sufren un impacto causando que los nervios del plexo braquial se estiren o desgarran.

30 Existen cuatro tipos de lesiones en el plexo braquial: (i) neuropraxia (estiramiento), en la que el nervio se ha dañado pero no desgarrado; (ii) avulsión, en la que el nervio se desgarran desde la médula; (iii) rotura, en la que el nervio se desgarran pero no en el punto de unión espinal; y (iv) neuroma, en la que el nervio ha intentado cicatrizar por sí mismo pero ha crecido tejido de cicatrización alrededor de la lesión, presionando el nervio lesionado y evitando que el nervio conduzca señales a los músculos. La neuropraxia es el tipo más común de lesión en el plexo braquial y puede resultar en la alteración permanente y grave de la función sensorial en el hombro, brazo y mano.

35 Después de la administración de neublastina a un sujeto (por ejemplo, un ser humano), la eficacia (mejora) del tratamiento en la lesión en el plexo braquial puede evaluarse comparando el grado o gravedad de la lesión de un sujeto antes y después del tratamiento. La eficacia del tratamiento con neublastina en una lesión en el plexo braquial puede evaluarse como una mono terapia o como parte de un régimen multi-terapéutico. Por ejemplo, la neublastina puede administrarse conjuntamente con otros tratamientos clínicamente relevantes para la lesión en el plexo braquial incluyendo, neurolisis (para eliminar tejido de cicatrización), transferencia muscular, injertos nerviosos o cirugía reconstructiva nerviosa.

40 Pueden usarse múltiples modalidades para evaluar el grado o gravedad de una lesión en el plexo braquial, incluyendo examen clínico, estudios de electrodiagnóstico (por ejemplo, electromiografía (EMG), velocidad de conducción nerviosa (NCV), potencial de acción de los nervios sensoriales (SNAP) y potencial provocado somatosensorial (SSEP) y estudios de imagen (por ejemplo, Escaneo de Imágenes por Tomografía Computerizada (CT), Imagen por Resonancia Magnética (MRI) (Harper (2005) *Hand. Clin.* 21 (1): 39-46). Estas modalidades pueden usarse solas o en combinación, definiendo la combinación frecuentemente elementos específicos del plexo braquial que se han lesionado e información más detallada acerca de la gravedad de la lesión. El examen clínico puede incluir, pero no está limitado a, evaluaciones cualitativas de la función motora que puntúan tanto grupos musculares individuales (usando el Sistema de Clasificación de cinco puntos del British Research Council) y métodos semi-cuantitativos o cuantitativos tales como actividades funcionales de grupo muscular, incluyendo abducción, rotación externa y movimientos mano a cabeza, mano a espalda y mano a boca así como exámenes sensoriales y de reflejos. Los ejemplos de exámenes sensoriales incluyen, por ejemplo, El Thermal Threshold Testing System (Somedic, Estocolmo, Suecia) descrito en Anand et al. (2002) *Brain* 125: 113-22.

El aplastamiento de la raíz dorsal C4-T2 unilateral (como se describe en Ramer et al. (2000) *Nature* 403:312-16) daña los nervios del plexo braquial y es un sistema de modelo en rata útil para estudiar la lesión en el plexo braquial. Los modelos animales adicionales adecuados de lesión en el plexo braquial también se describen, por ejemplo, en Quintao

et al. (2006) *Neuropharmacology* 50 (5): 624-20; Rodrigues-Filho et al. (2003) *Brain Res.* 982 (2): 186-94; y Rodrigues-Filho et al. (2004) *Brain Res.* 1018 (2): 159-70. Los métodos usados para evaluar la eficacia de un tratamiento (por ejemplo, administrar a un sujeto un polipéptido de neublastina) en una lesión en el plexo braquial son similares a los descritos para los pacientes humanos e incluyen, por ejemplo, evaluar los cambios en el umbral de temperatura o cambios en el potencial nervioso.

### 3. Regeneración de fibras nerviosas grandes y pequeñas y estimulación de la reentrada de las fibras nerviosas a través del DREZ en la médula espinal

Como se detalla en los Ejemplos, se encontró que la administración sistémica de neublastina estimula la regeneración de las fibras nerviosas, incluyendo regeneración axonal cruzando el DREZ en la médula espinal así como la regeneración de fibras nerviosas lesionadas distales de los ganglios de la raíz dorsal (DRG). Así, los polipéptidos de neublastina descritos en la presente memoria (y las composiciones farmacéuticas que contienen los mismos) pueden ser útiles para regenerar fibras nerviosas grandes (por ejemplo, mielinizadas o no mielinizadas grandes) y/o pequeñas (por ejemplo, mielinizadas o no mielinizadas pequeñas) del sistema nervioso perdidas, dañadas o lesionadas. La administración de un polipéptido de neublastina puede ser útil para regenerar fibras grandes y pequeñas del sistema nervioso central (por ejemplo, cerebro o médula espinal) así como del sistema nervioso periférico (por ejemplo, nervios de las extremidades, falanges, cara, piel o lengua).

Los tipos de daño nervioso que pueden beneficiarse de la regeneración de fibras nerviosas grandes y/o pequeñas y que pueden tratarse por la administración de un polipéptido de neublastina incluyen generalmente casos en los que uno o más nervios están lesionados (por ejemplo, aplastados) o escindidos. El daño nervioso puede ocurrir como resultado de una infección que daña los nervios (por ejemplo, una meningitis bacteriana o viral, encefalitis bacteriana, viral o por protozoos, o polio) o enfermedades (por ejemplo, enfermedades hereditarias, esporádicas o idiopáticas) tales como esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barre, diabetes, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, ataxia de Friedrich, parálisis de Baly o espina bífida. Las lesiones nerviosas que pueden beneficiarse de la administración de neublastina también incluyen las que resultan de fracturas, distensión, o roturas de huesos (o tendones o ligamentos), choque eléctrico, exposición a determinados químicos tóxicos (por ejemplo, disolventes, metales pesados u óxido nítrico), determinados tipos de quemaduras, injerto de piel u otro tejido, compresión aguda (por ejemplo, atrapamiento de nervios tal como atrapamiento del nervio ulnar o síndrome del túnel carpiano) o daño nervioso que resulta de cirugía otros procedimientos médicos (por ejemplo, lesión en el nervio lingual después de la extracción de dientes). El daño nervioso adicional que puede tratarse usando cualquiera de las composiciones de neublastina descritas en la presente memoria incluye daño que ocurre como resultado, por ejemplo, de la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o lesión dañina para los nervios o inflamación asociada con la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías, panencefalitis esclerosante subaguda, leucoencefalopatía multifocal progresiva o cualquiera de las encefalopatías espongiiformes de tipo prión.

Después de la administración de neublastina a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) la eficacia del tratamiento en la estimulación de la regeneración nerviosa puede evaluarse comparando el estado o función del o de los nervios del sujeto antes y después del tratamiento. La eficacia del tratamiento con neublastina en la regeneración nerviosa puede evaluarse como una monoterapia o como parte de un régimen multi-terapéutico. Por ejemplo, la neublastina puede administrarse conjuntamente con otros tratamientos clínicamente relevantes para la regeneración nerviosa, incluyendo, pero no limitado a, terapia física, tratamientos hiperbáricos, regeneración nerviosa activada por la luz (láser o diodo emisor de luz) o medicamentos tales como metilprednisolona.

La regeneración de las fibras nerviosas grandes o pequeñas en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) puede evaluarse por análisis directo de uno o más nervios usando, por ejemplo, registros de la velocidad de la conducción nerviosa, el Pressure-Specified Sensory Device™ (Sensory Management Services, LLC, Baltimore MD) o técnicas de imagen tales como las descritas anteriormente. En algunos casos, por ejemplo cuando la regeneración es del sistema nervioso central, la regeneración nerviosa puede evaluarse como un incremento en el volumen de materia blanca (por ejemplo, masa nerviosa de la médula o cerebro), particularmente cuando el daño o trastorno ha resultado en atrofia nerviosa, usando, por ejemplo, escaneos de espectroscopía de resonancia magnética. La regeneración de nervios periféricos puede evaluarse directamente por biopsia y/o técnicas electrofisiológicas ex vivo como se describe, por ejemplo, en Polydefkis et al. (2004) *Brain* 127 (7): 1606-15.

Cuando los nervios de la piel han sido dañados (por ejemplo, daño por una quemadura cutánea o nervios escindidos de piel injertada), puede evaluarse la regeneración de los nervios de la piel (por ejemplo, reinervación nerviosa) después de la administración de un polipéptido de neublastina usando varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede medirse una o más funciones sensoriales (por ejemplo, sensibilidad de la piel) usando medidas del potencial de acción de los nervios sensoriales (SNAP) o ensayos de la respuesta simpática de la piel (SSR) como se describe, por ejemplo, en Beneke et al. (1980) *J Neurol.* 223 (4): 231-39, Jazayeri et al. (2003) *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.* 43 (5): 277-79, Huang et al. (2004) *Chin. Med. J (Ingl)* 117 (9): 1317-20 o Pan et al. (2006) *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 87 (9): 1201-06. La

reinervación de la piel después de la administración de neublastina también puede evaluarse en un paciente monitorizando un cambio en la capacidad de respuesta a estímulos mecánicos o térmicos o a ensayos de provocación de reflejo simpático, tales como los descritos en Schmelz et al. (1998) *J Neurophysiol.* 79 (4): 1653-1660.

5 Alternativamente (o además), la regeneración nerviosa puede medirse "funcionalmente", por ejemplo, midiendo una mejora de la propiocepción deteriorada mediante la regeneración del nervio lesionado. Las metodologías de evaluación para la regeneración nerviosa también pueden incluir cualquiera de los métodos de evaluación para cualquiera de las lesiones relacionadas con nervios descritas en la presente memoria.

10 Los Ejemplos describen modelos animales útiles para estudiar el efecto de un tratamiento con neublastina en la regeneración nerviosa. La eficacia de dicho tratamiento en modelos animales puede evaluarse por análisis directo de los nervios, por ejemplo, por técnicas de inmunohistoquímica en una biopsia o sección de tejido. Alternativamente, la regeneración nerviosa puede detectarse como restauración de la actividad sensorial o motora después de la regeneración de los nervios. Los modelos animales adicionales para estudiar los efectos de un tratamiento en la regeneración nerviosa incluyen, por ejemplo, los descritos en Oudega et al. (1996) 140 (2): 218-29, Frykman et al. (1998) *Orthop. Clin. North. Am.* 19 (1): 209-19, Zhang et al. (2005) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 94: 67-89 y Pan et al. (2003) *J. Neurosci.* 23 (36): 11479-88.

#### 4. Mejora de las respuestas neurales sensoriales

20 Como se describe en los Ejemplos, la administración de neublastina a un mamífero con una lesión nerviosa da como resulta la restauración de las respuestas neurales sensoriales y funciones sensoriomotoras perdidas. Así, la administración a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) de un polipéptido de neublastina descrito en la presente memoria puede ser útil para restaurar la sensación y/o funciones sensoriomotoras en el sujeto. Dichas respuestas neurales sensoriales pueden incluir, por ejemplo, respuesta a la sensación de presión, temperatura y vibración (véase Toibana et al. (2000) *Industrial Health* 38: 366-371). Las funciones sensoriomotoras controlan, por ejemplo, el balance, equilibrio, y coordinación (por ejemplo, coordinación del movimiento de las extremidades).

25 La pérdida de las respuestas neurales sensoriales/función sensoriomotora puede resultar de daño o trauma en uno o más nervios, incluyendo las causas del daño o trauma nervioso cualquiera de las descritas en la presente memoria. Por ejemplo, la pérdida o alteración de una respuesta sensorial puede resultar de complicaciones debidas a la diabetes o de la desensibilización después de la exposición a calor extremo (por ejemplo, una quemadura). Después de la administración de neublastina a un sujeto, la eficacia del tratamiento en la mejora de las respuestas neurales sensoriales puede evaluarse comparando la o las respuestas nerviosas sensoriales del sujeto antes y después del tratamiento. La eficacia del tratamiento con neublastina en la mejora de las respuestas neurales sensoriales puede evaluarse como una monoterapia o como parte de un régimen multi-terapéutico como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, la neublastina puede administrarse conjuntamente con otros tratamientos clínicamente relevantes para mejorar las respuestas neurales sensoriales o conjuntamente con cualquier otra modalidad de tratamiento descrita en la presente memoria (por ejemplo, un tratamiento para el daño o lesión nerviosa).

35 Los métodos para evaluar una respuesta neural sensorial mejorada en un sujeto humano después de tratamiento son numerosos e incluyen, por ejemplo, ensayos de conducción electromiográficos (EMG-NCV) y ensayo del umbral de percepción nerviosa sensorial (también referido como ensayo del umbral de percepción de corriente), que implica la cuantificación de un umbral sensorial a estimulación eléctrica transcutánea (la cantidad mínima de estimulación eléctrica transcutánea requerida para provocar una sensación en un sujeto). Los métodos adicionales para evaluar la función sensoriomotora en un sujeto humano incluyen, por ejemplo, pellizco y fuerza de agarre (Dellon et al. (1997) *Ann Plat. Surg.* 38 (5): 493-502), ensayos de reproducción de ángulo (véase anteriormente), ensayos de umbral a movimiento, ensayo de fuerza isométrica, ensayo de Romberg, reflejos de flexión (Hornby et al. (2003) *J Neurophysiol.* 89 (1): 416-26) y ensayos para la coordinación mano-ojo.

45 La sensación de tacto puede evaluarse, por ejemplo, frotando suavemente una bola de algodón en la superficie de la piel de la región ensayada o aplicando suavemente presión en varias localizaciones de la región. Estos tipos de evaluaciones del umbral de percepción nerviosa sensorial son útiles para evaluar un amplio rango de afecciones clínicas incluyendo neuropatías centrales y periféricas y detección del síndrome del túnel carpiano, y pueden implicar el uso de dispositivos tales como el Neurometer Current Perception Threshold (Neurotron, Inc., Baltimore, MD) o el Medi-Dx 7000 (Vax-D Medical Group, Tucson, AZ). Las descripciones adicionales de ensayos clínicos y dispositivos útiles para evaluar las respuestas neurales sensoriales pueden encontrarse, por ejemplo, en Shy et al. (2003) *Neurol.* 60: 898-904 y Siao et al. (2003) *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 14 (2): 261-86. Los métodos para evaluar las respuestas neurales sensoriales o sensación al tacto también incluyen medidas de potencial de acción de nervios sensoriales (SNAP), ensayos de la respuesta simpática de la piel (SSR) y ensayos de capacidad de respuesta a estímulos mecánicos o térmicos o a provocación de reflejo simpático, tales como los descritos anteriormente.

Los Ejemplos describen modelos animales para estudiar el efecto de un tratamiento sobre la mejora de respuestas neurales sensoriales/función sensoriomotora. Por ejemplo, después de una lesión nerviosa (por ejemplo, un aplastamiento de la raíz dorsal o un aplastamiento de un nervio distal de los ganglios de la raíz dorsal), la función sensoriomotora en un animal puede evaluarse con y sin tratamiento (es decir, el tratamiento con un polipéptido de neublastina) evaluando el comportamiento de un animal en la maniobra de estabilización. Los modelos animales adicionales útiles para medir las respuestas neurales sensoriales y/o función sensoriomotora se describen, por ejemplo, en Diamond et al. (1992) *J. Neurosci.* 12 (4): 1467-76, Brown et al. (2005) *J. Neurotrauma* 22 (5): 559-74 y Magnuson et al. (2005) *J. Neurotrauma* 22 (5): 529-43.

Los siguientes son ejemplos de la práctica de la invención. No debe considerarse que limitan el alcance de la invención de ninguna forma.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Materiales y métodos

#### Cirugía animal, administración de neublastina y estudios de rastreo

Se realizó un aplastamiento de la raíz dorsal C4-T2 unilateral (Ramer et al. (2000) *Nature* 403: 312-16) en ratas macho Sprague-Dawley (Harlan, Indianapolis, IN), que pesaban 175-250 gramos. Se procesó una cirugía simulada con los mismos procedimientos sin lesión en la raíz. Se proporcionó neublastina de rata (Gardell et al. (2003) *Nat Med* 9: 1383-89) o disolución salina como vehículo subcutáneamente en un esquema de lunes, miércoles y viernes inmediatamente después de la cirugía con un total de 6 inyecciones durante 2 semanas. Para la localización transganglionar, la rama del nervio mediano del plexo braquial se expuso en condiciones estériles y se inyectaron por presión 5 µl de disolución de 0,5 % CTB (subunidad B de la toxina del cólera, baja sal; List Labs) en el nervio con múltiples sitios de inyección en los 5-7 días antes del sacrificio.

#### Observaciones comportamentales

Los ensayos comportamentales para la cuantificación de la restauración de las funciones nociceptiva, sensoriomotora y propioceptiva se realizaron según los protocolos comportamentales descritos en Ramer et al. (2002) *Mol Cell Neurosci* 19: 239-49 y Ramer et al. (2000) *Nature* 403: 312-16. La latencia de retirada de la pata a estimulación térmica nociva se midió con un baño de agua a 49 °C, esto es, la pata delantera ipsilateral a la lesión se sumergió en un baño de agua a 49 °C hasta que la rata retiró su pata o hasta que se alcanzó el tiempo de corte de 20 segundos. La retirada de la pata delantera ipsilateral a estimulación mecánica nociva se ensayó con un dispositivo de pellizco nocivo Randall-Selitto (Ugo-Basil) con el punto de corte ajustado a 250 gramos. La puntuación del comportamiento de las ratas en agarre provocado por contacto, andar en barra de equilibrio, escalera horizontal y ubicación estabilización se hizo como se ha descrito previamente (Ramer et al. (2002) *Mol Cell Neurosci* 19: 239-49; y Ramer et al. (2000) *Nature* 403: 312-16).

#### Inmunohistoquímica

Las ratas se perfundieron transcardialmente con 10 % formalina tamponada (Sigma) y se extirparon la médula espinal cervical; DRG y troncos encefálicos, se crioprotegieron (en 20 % sacarosa), se congelaron y se seccionaron (10 µm para DRG, 20 µm para médula espinal) en un criostato. Las secciones se incubaron con anticuerpos primarios frente a CGRP (conejo huésped/cobaya, 1:10.000, Peninsula), P2X<sub>3</sub> (conejo huésped/cobaya, 1:10.000, Neuromics), NF200 (ratón huésped, 1:5.000, N52, Sigma), GFRα3 (R11, 2 µg/ml; Orozco wt et al. (2001) *Eur J Neurosci* 13: 2177-82), Ret (2 µg/ml; Orozco wt et al. (2001) *Eur J Neurosci* 13: 2177-82), GFAP (ratón huésped, 1:5.000, Sigma), ED1 (ratón huésped, 1:2.000, Serotec), FOS (conejo huésped, 1:5.000, Calbiochem), CTB (cabra huésped, 1:5.000, List Labs), y frente a NK1R (conejo huésped, 1:5.000; Honore et al. (1999) *J. Neurosci.* 19: 7670-78). Los anticuerpos secundarios fueron anticuerpo de cabra conjugado con Cy3 frente a IgG de conejo (1:1.000, Jackson), anticuerpos de cabra conjugados con Alex fluor 488/594 frente a IgG de conejo, ratón o cobaya (1:1.000, Molecular Probes) y anticuerpo de burro conjugado con Alex fluor 594 frente a IgG de cabra (1:1.000, Molecular Probes). Las células inmunoreactivas y las células totales (visualizadas con DAPI o bromuro de etidio; Guo et al. (1999) *Eur. J. Neurosci.* 11: 946-58) se contaron en secciones seleccionadas al azar. El análisis cuantitativo de la densidad axonal en la raíz dorsal a lo largo del lado central de DREZ, así como la densidad de inmunoreactividad en el asta dorsal espinal, se realizó como se ha descrito previamente (Ramer et al. (2000) *Nature* 403: 312-16; y Wang et al. (2003) *Neuroscience* 121: 815-24).

#### Reacción nociceptiva y expresión de FOS en inflamación inducida por formalina

Los experimentos se realizaron en ratas despiertas, con movimiento libre como se ha descrito previamente (Presley et al. (1990) *J Neurosci* 10: 323-35). Se inyectaron en la superficie plantar de la pata delantera ipsilateral de la rata que recibió el aplastamiento de la raíz dorsal y el tratamiento con neublastina/vehículo 100 µl de 10 % formalina subcutáneamente y el tiempo de lamido en el sitio de la inyección se registró como se ha descrito previamente (Abbadie et al. (1992) *Brain*

Res 578: 17-25). Tres horas después de las inyecciones, las ratas se perfundieron y la médula espinal C4-T2 se recogió para inmunohistoquímica para examinar la expresión de FOS inducida por formalina en el asta dorsal espinal. Las ratas control recibieron la misma cantidad de inyecciones de disolución salina.

Estimulación mecánica e internalización de NK1R en inflamación inducida por carragenina

5 El experimento se realizó por el método modificado descrito por Mantyh y colegas (Honore et al. J. Neurosci. 19: 7670-78). Se administró una inyección subcutánea de 100  $\mu$ l de una suspensión de 2 %  $\gamma$ -carragenina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en disolución salina (pH 6,8) en la superficie plantar de la pata delantera de la rata. Después de 3 horas, las ratas se sometieron a estimulación mecánica no nociva por toques suaves de la pata delantera dorsal cada segundo durante 5 minutos con el mango de madera de un cepillo o a una estimulación mecánica nociva aplicada como un pellizco de 30 segundos con un hemostato aplicado en la parte distal de la pata delantera. Las ratas anestesiadas se perfundieron durante 15 minutos con disolución salina tamponada con fosfato seguido de fijador glutaraldehído para la preparación para la visualización inmunohistoquímica de la internalización del receptor NK1 en el asta dorsal espinal.

Métodos electrofisiológicos

15 Los animales se mantuvieron en niveles quirúrgicos de anestesia de isoflurano durante la duración de todos los experimentos de electrofisiología terminal. Los experimentadores estaban ciegos respecto al tratamiento hasta que todos los experimentos en el conjunto se hubieron completado. La médula cervical se expuso de C4 a C8 y se estabilizó con abrazaderas espinales en C2 y T2. Los nervios radial, mediano y/o ulnar se expusieron justo por debajo del plexo braquial en ambas extremidades anteriores y se suspendieron en ganchos de plata para la estimulación. Se aplicó aceite mineral para evitar que los nervios y la médula se secaran. Se posicionó verticalmente un microelectrodo de metal con baja impedancia con una exposición de punta grande de 1 mm (A-M Systems #563410) 1 mm lateral a la línea media de la médula y manualmente se avanzó hasta una profundidad de aproximadamente 0,5 mm desde el límite ventral (es decir, en el asta ventral). Se posicionó un segundo electrodo en los músculos cercanos que rodean la médula y se hicieron registros diferencialmente. Un panel de adquisición de datos (National Instruments, PCI-6036E) desencadenó un estimulador de pulso eléctrico (A-M Systems Modelo 2100), que administró pulsos monofásicos de onda cuadrada únicos de 50 ms de 0-8V de amplitud a frecuencias de 1-11 Hz a los nervios periféricos. A no ser que se indique otra cosa, el nervio radial se estimuló usando pulsos con una amplitud de 4V administrados a una frecuencia media de 2 Hz. Las respuestas individuales se filtraron (0,1 Hz-3 Hz), digitalizaron (16 bits, velocidad de muestreo 20 kHz), se promediaron (normalmente, 50 trazas) y se almacenaron para análisis off-line. La preparación espinal produjo habitualmente potenciales neuronales estables, replicables durante varias horas. Los registros se hicieron desde el asta ventral en cada nivel de segmento (C4-C8) en ambos lados de la médula en respuesta a estimulación ipsilateral de nervios braquiales individuales. Los potenciales de raíz ventral cervical promedio en ratas normales, no lesionadas variaron normalmente de 100-300  $\mu$ V en amplitud máxima (nivel de ruido normalmente  $\sim$  10  $\mu$ V), dependiendo del animal individual, el nervio estimulado y la localización rostrocaudal del electrodo que registra. La magnitud del pico del potencial de campo del asta ventral a 2-6 ms de latencia se adoptó como una medida fisiológica robusta de la respuesta monosináptica de latencia corta añadida en la médula en una localización dada. Un refinamiento adicional de la estimación de respuesta monosináptica se ajusta a una traza modelo estándar para una curva de respuesta dada (Mears et al. (1994) Exp. Neurol. 130: 115-19). La traza modelo tiene características de latencia y de desactivación exponencial típicas de corrientes post-sinápticas excitadoras generadas por sinapsis motoneuronales. El valor del pico de la curva ajustada, habitualmente muy cerca de la magnitud del pico bruto, se adoptó como la estimación de la población sumada de respuesta monosináptica para estimulación de ese nivel segmental y nervio periférico. La respuesta máxima observada entre todos los sitios de registro se tomó como la estimación global de la función sináptica. Esta respuesta máxima se consideró significativamente mayor que cero si su valor era mayor de 3 veces el nivel de ruido, normalmente  $\sim$ 30  $\mu$ V. Para descartar posibles respuestas falsas negativas debido a la disminución en el estado fisiológico de la médula espinal, los registros se hicieron en primer lugar en el lado lesionado de la médula y después en el lado no lesionado, donde la existencia de respuestas normales aseguraba que la médula espinal estaba todavía sin comprometer funcionalmente.

Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas entre los grupos de tratamiento se hicieron usando ANOVA seguido del ensayo de Diferencia Menos Significativa de Fisher. Las comparaciones por parejas se hicieron con el ensayo de la t de Student. La significancia se ajustó a  $P=0,05$ .

Ejemplo 2: la neublastina estimula la regeneración axonal en la médula espinal

Se empleó inmunomarcaje de N52, CGRP y P2X<sub>3</sub> para visualizar las fibras mielinizadas, no mielinizadas peptidérgicas y no mielinizadas "pobres en péptido", respectivamente (Ramer et al. (2000) Nature 403: 312-16). Conjuntamente, estos marcadores marcan casi todas las neuronas DRG (Bradbury et al. (1998) Mol. Cell. Neurosci. 12: 256-68; Averill et al.

(1995) Eur. J. Neurosci. 7: 1484-94; y Bennett et al. (1998) J. Neurosci. 18: 3059-72). La neublastina (1 mg/kg, administración subcutánea) proporcionada en un esquema de lunes-miércoles-viernes durante dos semanas consecutivas empezando en el día de la lesión por aplastamiento de la raíz dorsal (DRC) del plexo braquial (el esquema usado para los Ejemplos 2-8) incitó re-crecimiento tanto de los axones mielinizados como no mielinizados a través de DREZ. Las secciones de animales con operación simulada mostraron marcaje inmunofluorescente ininterrumpido para N52, CGRP y P2X<sub>3</sub> en axones de la periferia a través de DREZ. El marcaje para estos marcadores terminó abruptamente en el DREZ en las ratas DRC tratadas con vehículo. Por el contrario, las secciones de las ratas DRC tratadas con neublastina mostraron todos los marcadores inmunohistoquímicos centrales al DREZ. La neublastina normalizó las reducciones inducidas por DRC en densidades axonales inmunomarcadas (Fig. 2; Ramer et al. (2000) Nature 403: 312-16). Además, en los tejidos DRC con neublastina, la inmunofluorescencia para CGRP y P2X<sub>3</sub> se encontró principalmente en la lámina externa del asta dorsal mientras que para CTB estaba distribuida a lo largo de la lámina externa e intermedia, lo que corresponde a los patrones de terminación normales de estas fibras. La neublastina no tuvo efectos detectables en los animales con operación simulada.

#### Ejemplo 3: la neublastina sistémica restaura las funciones nociceptivas

Se registró la respuesta de retirada frente a la inmersión de la pata delantera ipsilateral a DRC o cirugía simulada en un baño de agua de 49 °C o frente a presión nociva. Los animales con lesión DRC y tratados con vehículo mostraron una insensibilidad marcada frente a calor o presión nocivo con un cambio pequeño en respuestas a lo largo de la evaluación de 6 semanas (Figs. 3A y 3B) y a los 6 meses después de DRC (Figs. 6A y 6B). La neublastina causó una recuperación progresiva y rápida tanto del umbral térmico como mecánico en ratas DRC. Las respuestas a estímulos nocivos estaban presentes en los 4 días y se aproximaron a niveles normales en los 7 días de DRC (Figs. 3A y 3B). La terminación del tratamiento con neublastina en el día 11 no afectó la restauración de las repuestas nociceptivas ya que permanecieron completamente normalizadas durante el periodo de observación completo de 42 días y también en el punto de tiempo de 6 meses (Figs. 6A y 6B). La neublastina no alteró los umbrales de respuesta en los grupos con operación simulada en ningún punto de tiempo (Figs. 3A y 3B y Figs. 6A y 6B).

#### Ejemplo 4: la neublastina sistémica restaura las funciones post-sinápticas

La expresión inducida por estímulos nocivos del producto del proto-oncogén FOS en el asta dorsal espinal es indicativa de excitación neuronal de células post-sinápticas (Presley et al. (1990) J Neurosci 10: 323-35; Hunt et al. (1987) Nature 328: 632-34; y Harris (1998) Brain Res Bull 45: 1-8). La inyección de formalina en la pata delantera produjo comportamientos de lamido esterotípicos junto con números incrementados de perfiles de células de la médula espinal positivos para FOS (Figs. 3C y 3D). La lesión DRC con el tratamiento con vehículo suprimió tanto el lamido inducido por formalina como FOS espinal provocado (Figs. 3C y 3D). Por el contrario, la neublastina preservó tanto el comportamiento provocado por formalina como las respuestas de FOS en el día 14 (Figs. 3C y 3D) y en los puntos de tiempo de 6 meses (Fig. 6C).

La internalización del receptor NK1 provocada en el asta dorsal espinal por estímulos mecánicos nocivos o por estímulos táctiles inocuos en animales lesionados es indicativa de capacidad de respuesta post-sináptica de neuronas de asta dorsal a sustancia P liberada de fibras aferentes primarias (Honore et al. J. Neurosci. 19: 7670-78). El pellizco nocivo incitó la internalización del receptor NK1 en  $96 \pm 2,6$  % de perfiles de asta dorsal positivos para NK1-R (Fig. 3E) y el cepillado suave después de inyección de carragenina causó la internalización en  $62 \pm 4,7$  % de los perfiles positivos para NK1R (Fig. 3F) en la lámina externa de los animales con operación simulada. La lesión DRC redujo la internalización provocada por pellizco (Fig. 3E) y provocada por tacto (Fig. 3F) hasta  $16 \pm 3,0$  % y  $11 \pm 2,5$  % de los perfiles que expresaban NK1R, respectivamente. El tratamiento con neublastina después de DRC preservó las respuestas de neuronas de asta dorsal post-sinápticas; la estimulación mecánica nociva resultó en la internalización del receptor NK1 en  $85 \pm 3,7$  % (Fig. 3E) y el cepillado suave causó la internalización en  $57 \pm 3,1$  % (Fig. 3F) de las neuronas de asta dorsal que expresaban NK1, indicando así una restauración significativa de las respuestas sinápticas de receptor SP-NK-1. El tratamiento con neublastina no alteró las respuestas de los animales con operación simulada en estos estudios.

La estimulación del nervio mediano ipsilateral a DRC u operación simulada resultó en potenciales de campo de médula espinal en 1 ms de estimulación (Fig. 4, panel superior). Estos potenciales de campo se generan por ráfagas de potenciales de acción en axones grandes mielinizados cutáneos y propioceptivos en raíces dorsales mientras que los que aparecen 2 a 10 ms después representan potenciales post-sinápticos excitadores monosinápticos (EPSP) provocados por la estimulación nerviosa (Fig. 4, panel inferior). Los EPSP se suprimieron después de DRC y tratamiento con vehículo. Cinco de 6 ratas tratadas con neublastina mostraron EPSP claros en el lado del aplastamiento, lo que indica que los axones en las raíces lesionadas se habían regenerado y formaron sinapsis funcionales. Por el contrario, ninguna de las 8 ratas a las que se había inyectado vehículo mostró una recuperación apreciable de potenciales sinápticos en el lado aplastado. No se observaron diferencias significativas entre las respuestas máximas registradas en el lado intacto de animales tratados con neublastina frente a tratados con vehículo.

## Ejemplo 5: la neublastina sistémica restaura las funciones sensoriomotoras

La función sensoriomotora se evaluó por la maniobra de estabilización (Ramer et al. (2000) Mol. Cell. Neurosci. 19: 239-49) en la que la rata se empuja desde detrás y responde poniendo las extremidades delanteras en la posición extendida, palmas planas y dedos desplegados. Las ratas tratadas con vehículo con DRC fallaron consistentemente en responder con la maniobra de estabilización (Fig. 5A). Por el contrario, las ratas tratadas con neublastina mostraron una recuperación progresiva de la maniobra de estabilización en 7 días, logrando respuestas casi normales sobre el día 14 y recuperándose completamente, aunque más gradualmente, sobre las 6 semanas (Fig. 5A) y permaneciendo en niveles normales en el punto de observación de 6 meses (Fig. 6D).

La alteración de la función sensorial, indicada por movimiento anormal de las extremidades delanteras, detección de un objetivo deteriorada o inapropiada, fracaso para portar peso o fracaso en el uso de la pata delantera completamente cuando anda en una barra de equilibrio con una estrechez de 3 cm (Ramer et al. (2002) Mol. Cell. Neurosci. 19: 239-49) se puntuó de 0 (sin uso de extremidades) a 5 (normal) por un observador ciego a los tratamientos. Los animales con lesión DRC mostraron una disrupción completa del uso de las extremidades y las puntuaciones fueron consistentemente menores de 1 durante el periodo completo de ensayo de 42 días (Fig. 5B). La neublastina produjo una mejora gradual, progresiva en la capacidad de andar en una barra de equilibrio durante los primeros 14 días y se observó una mejora continuada más allá de la finalización de las inyecciones de neublastina (día 11), progresando a una velocidad menor durante el periodo de observación restante de 42 días (Fig. 5B) y normal 6 meses después (Fig. 6E). El déficit sensorial de la extremidad delantera se ensayó adicionalmente permitiendo que las ratas atravesaran una escalera orientada horizontalmente y contando la incidencia de resbalón de una pata delantera de la escalera (Ramer et al. (2002) Mol. Cell. Neurosci. 19: 239-49). Los animales con operación simulada registraron "resbalones" mientras atravesaban la escalera mientras las ratas con lesión DRC demostraron una media de 14 incidentes por ensayo (Fig. 5C). El tratamiento con neublastina resultó en una mejora gradual, progresiva en la capacidad de las ratas de andar a través de la escalera (Fig. 5C).

La mejora en la función sensoriomotora mostró un patrón bifásico aparente, con una mejora rápida y muy sustancial durante el primer periodo de 14 días seguido de una mejora continuada pero más lenta de la función durante los 42 días restantes (Figs. 5A-5C), alcanzando niveles normales en el punto de observación de 6 meses (Figs. 6D-6F). El tratamiento con neublastina no produjo ningún cambio en el comportamiento de las ratas con operación simulada (Figs. 5A-5C y Figs. 6D-6F).

El agarre provocado por contacto se usó como una medida de una respuesta sensoriomotora altamente compleja que se organiza a niveles supraespinales (Ramer et al. (2002) Mol. Cell. Neurosci. 19: 239-49). Las ratas con operación simulada que se movieron hacia abajo en una jaula agarraron consistentemente la tapa. Esta respuesta se suprimió completamente por lesión DRC (Fig. 5D) y estas ratas harían movimientos dirigidos hacia delante, ondulantes de la extremidad delantera pero el agarre no se logró nunca (Ramer et al. (2002) Mol. Cell. Neurosci. 19: 239-49). El tratamiento con neublastina sistémica produjo una restauración gradual pero consistentemente progresiva del agarre provocado por contacto (Fig. 5D) que fue monofásica durante el periodo completo de observación de 42 días. El agarre provocado por contacto alcanzó niveles normales en el punto de observación de 6 meses (Fig. 6G).

## Ejemplo 6: la neublastina sistémica produce una recuperación funcional duradera de lesión de la raíz dorsal

Las respuestas a los estímulos nociceptivos descritas anteriormente se suprimieron en gran medida por DRC y permanecieron ausentes 6 meses después de la lesión (Figs. 6A-6C) en los animales tratados con vehículo. La restauración esencialmente completa de las respuestas a estímulos térmicos, mecánicos y químicos nocivos producida por el tratamiento con neublastina estaba todavía presente 6 meses después de DRC (Figs. 6A-6C) indicando así la restauración persistente de la función nociceptiva normal por el tratamiento con neublastina. Como se ha descrito anteriormente, la restauración de las funciones sensoriomotoras inducida por la neublastina evaluada por ubicación/estabilización, andar en una barra de equilibrio, escalera horizontal y ensayos de agarre se mantuvo 6 meses después de DRC (Figs. 6D-6G). La neublastina no cambió las respuestas comportamentales de las ratas con operación simulada durante el mismo periodo de tiempo. Estos datos sugieren que un esquema limitado de tratamiento con neublastina produce una restauración persistente de la función sensoriomotora así como respuestas a estímulos nocivos.

Consistente con la mejora persistente en la función comportamental sensoriomotora, la función sináptica también se mantuvo en estos momentos tardíos como se muestra por la recuperación de la expresión de FOS provocada por formalina en el asta dorsal espinal (Fig. 6H). Además, se evaluaron tres ratas tratadas con neublastina electrofisiológicamente a los 7-8 meses después de la lesión, y las 3 mostraron una evidencia clara de EPSP provocada sensorial en la médula espinal. Por el contrario, ninguna de las 3 ratas tratadas con vehículo ensayadas en este punto de tiempo tenía entradas sinápticas mensurables (Fig. 4).

Los índices neuroquímicos de regeneración de axones a través del DREZ fueron consistentes con el comportamiento observado 6 meses después de la lesión. La restauración del marcaje inmunofluorescente para CGRP, P2X<sub>3</sub> y CTB en el asta dorsal espinal todavía era evidente 6 meses después de DRC en los animales tratados con neublastina pero estaba completamente ausente en las secciones espinales de las ratas tratadas con vehículo con DRC. Fue más llamativa la aparición de marcaje para CTB en el n. cuneatus 6 meses después de DRC en las ratas tratadas con neublastina pero no en las tratadas con vehículo. Este marcador no estaba presente en el n. cuneatus 14 días después de la lesión, lo que sugiere que la regeneración de las fibras aferentes mielinizadas en este núcleo supraespinal ocurre durante un curso de tiempo prolongado después de la lesión y después del tratamiento con neublastina, consistente con la velocidad lenta de restauración del comportamiento sensoriomotor complejo indicado por el agarre provocado por contacto.

Ejemplo 7: la expresión diferencial de GFR $\alpha$ 3 en nervios periféricos se correlaciona con la recuperación de modalidades sensoriales

Como la neublastina actúa a través del receptor GFR $\alpha$ 3 acoplado con la proteína de señalización RET, los cambios inducidos por DRC en la expresión de GFR $\alpha$ 3 o RET entre los diferentes tipos de nervios periféricos puede afectar su regeneración. El tratamiento con neublastina no alteró la expresión de GFR $\alpha$ 3 o RET en ningún tipo de fibra de los animales con operación simulada. Cuando se midió 14 días después de la cirugía simulada, el porcentaje de perfiles DRG que expresaban GFR $\alpha$ 3 fueron  $34 \pm 1,9$  y  $33 \pm 3,1$  para los grupos tratados con vehículo y tratados con neublastina, respectivamente y el porcentaje que expresaba RET fue  $59 \pm 2,8$  y  $61 \pm 1,5$  (Fig. 7A). El porcentaje de perfiles de la DRG de ratas con DRC y tratamiento con vehículo que expresaban GFR $\alpha$ 3 se incrementó significativamente hasta  $52 \pm 1,8$  mientras las que expresan RET disminuyó hasta  $40 \pm 1,23$  (Fig. 7B). El tratamiento con neublastina normalizó en gran medida estos cambios y los porcentajes correspondientes de perfiles de DRG que expresaban GFR $\alpha$ 3 fueron  $47 \pm 6,14$  y los que expresaban RET fue  $49 \pm 2,72$ . Se examinó el co-marcaje para GFR $\alpha$ 3 o para RET y para N52, CGRP o P2X<sub>3</sub> con el fin de identificar cambios en los nervios periféricos mielinizados (N52) y nociceptores no mielinizados peptidérgicos (CGRP) y no peptidérgicos (P2X<sub>3</sub>).  $14 \pm 0,5$  % de los perfiles DRG de las ratas con operación simulada, tratadas con vehículo se co-marcaron con GFR $\alpha$ 3 y N52 y  $22 \pm 0,85$  % de los perfiles DRG co-expresaban RET y N52, lo que indica que una proporción significativa de los nervios periféricos mielinizados están sometidos a la modulación por neublastina. El tratamiento con neublastina no cambió estas proporciones en las ratas con operación simulada (Figs. 7A y 7B). La proporción de los perfiles DRG que se marcaron tanto con GFR $\alpha$ 3 como N52 se redujo hasta  $5 \pm 1,2$  % y los que expresaban N52 y RET se redujeron hasta  $5 \pm 0,9$  % (Figs. 7A y 7B). Por el contrario, casi se duplicaron los perfiles de DRG inmunoreactivos para CGRP o P2X<sub>3</sub> y para GFR $\alpha$ 3 mientras que los que también marcaban RET permanecieron sin cambios (Figs. 7A y 7B). El tratamiento con neublastina resultó en una normalización de las proporciones de poblaciones neuronales DRG que expresaban estos marcadores (Figs. 7A y 7B) y previno en gran medida la pérdida de co-marcaje para N52 y bien GFR $\alpha$ 3 o RET causado por DRC.

Ejemplo 8: la neublastina no altera las características del DREZ

La inmunoreactividad frente a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que identifica a los astrocitos, y frente a ED1, que marca la microglía activada, se incrementó de forma importante por DRC. El tratamiento con neublastina no produjo ningún cambio en el marcaje para GFAP o ED1 después de lesión DRC. Por lo tanto, es probable que la regeneración de axones y la recuperación funcional de las modalidades sensoriales inducidas por neublastina se deba a una supervivencia aumentada de los conos de crecimiento de los axones y a la estimulación de la regeneración en lugar de a una degradación de las barreras inhibitorias en el DREZ.

Ejemplo 9: la administración de neublastina basada en un esquema de tiempo posterior a la lesión de la raíz dorsal facilita la recuperación funcional

Clínicamente, el tratamiento inmediato de una lesión en la raíz dorsal no está siempre disponible. Para mimetizar las condiciones clínicas y para examinar la ventana de oportunidades para el tratamiento con neublastina de una lesión en la raíz dorsal eficazmente, la neublastina se administró en cursos de tiempo retardados.

Cuando se proporciona subcutáneamente en el día 2 posterior a la lesión de la raíz dorsal, la neublastina restauró la función térmica y mecánica casi completamente, alcanzó la recuperación máxima en el día 10 posterior a la lesión y permaneció en un nivel similar hasta el fin del experimento en el día 28 posterior a la lesión de la raíz. Cuando se inyectó subcutáneamente empezando en el día 4 posterior a rizotomía dorsal, la neublastina recuperó la función térmica completamente y recuperó la función mecánica parcialmente. El tratamiento con neublastina restauró significativamente la respuesta mecánica en el día 9 posterior a la cirugía después de 3 inyecciones, comparado con el tratamiento con vehículo. Cuando se proporcionó en el día 7 posterior a la lesión de la raíz, la neublastina presentó la capacidad de restaurar la función frente a los estímulos térmicos significativamente pero perdió la capacidad de responder a los estímulos mecánicos.

En línea con los desplazamientos de la recuperación funcional en el tratamiento retardado con neublastina, el marcaje de tres tipos de aferentes en el asta dorsal espinal también cambió con el tiempo del tratamiento retardado con neublastina. Los cambios dramáticos se observaron en el marcaje de CTB, aunque el marcaje de CGRP y P2X3 también presentó algunos cambios. Cuando la neublastina se proporcionó empezando en el día 2 posterior a la lesión de la raíz, la densidad espinal de marcaje de CTB fue aproximadamente 50 % del nivel normal en el día 28 posterior a la lesión de la raíz dorsal. Cuando la neublastina se proporcionó en el día 4 posterior a la lesión de la raíz, el número fue aproximadamente 25 %, cuando la neublastina se inyectó empezando en el día 7 posterior al aplastamiento de la raíz dorsal, el número fue aproximadamente 5 por ciento. Sin embargo, el marcaje de CGRP y P2X3 se mantuvo en 35 % o por encima del nivel normal en el día 28 posterior a la lesión de la raíz para los tratamientos retardados con neublastina. El tratamiento retardado con vehículo no cambió la densidad del marcaje de los tres tipos de axones sensoriales en el asta dorsal espinal.

Ejemplo 10: la neublastina sistémica estimula la regeneración de los nervios periféricos y la recuperación de hipersensibilidad mecánica y térmica en animales que han experimentado aplastamiento de nervios distal a los ganglios de la raíz dorsal

Se expuso el nervio espinal L5 de ratas anestesiadas y (i) se ligó firmemente con suturas según el procedimiento de Kim y Chung (Kim et al. (1992) Pain 50: 355-63) ("ligadura de nervios"), (ii) se aplastó como se describe en el Ejemplo 1 ("aplastamiento de nervios"), o (iii) se cortó ("sección de nervios"). La cirugía simulada se procesó bajo los mismos procedimientos sin lesión nerviosa. Se proporcionaron subcutáneamente neublastina de rata o disolución salina como vehículo en un esquema de lunes, miércoles y viernes después de la cirugía con un total de 6 inyecciones durante 20 semanas.

Se usaron los ensayos comportamentales de Von Frey (Chaplan et al. (1994) J. Neurosci. Meth. 53: 55-63) y Hargreaves (Hargreaves et al. (1988) Pain 32: 77-88) para monitorizar las respuestas al dolor táctil y térmico, respectivamente. Cinco semanas después de la cirugía, los trazadores neuronales CTB y Dextrano se inyectaron en el nervio ciático a medio muslo (distal de la lesión nerviosa). Seis semanas después de la cirugía, las ratas se perfundieron para estudio histológico.

Las medidas de alodinia táctil e hiperalgia térmica se registraron en animales lesionados y con lesión simulada tratados con neublastina o vehículo. Los animales con lesión nerviosa y tratados con vehículo no mostraron mejora en las respuestas de dolor, con un cambio pequeño en las respuestas a lo largo de la evaluación de seis semanas (Figs. 8A-8D y 9A-9D). La administración sistémica aguda de neublastina causó una mejora en los umbrales tanto en alodinia táctil (Figs. 8A-8D) como en hiperalgia térmica (Figs. 9A-9D) después de la sección de nervios, ligadura de nervios y aplastamiento de nervios. En las ratas con aplastamiento de nervios, la recuperación de la alodinia táctil persistió después de terminar la administración de neublastina y se observó a lo largo del periodo de evaluación completo de seis semanas (Fig. 8D).

Se inyectó dextrano, un trazador neuronal para marcar fibras sensoriales de pequeño diámetro en el sistema nervioso periférico normal, en el nervio ciático (medio muslo, distal de la lesión nerviosa) y las neuronas marcadas en el DRG L5 se examinaron posteriormente. Se encontró que la administración sistémica de neublastina estimula la regeneración de fibras sensoriales marcadas con dextrano en las ratas con aplastamiento del nervio L5.

Se inyectó CTB, un trazador neuronal para marcar fibras sensoriales mielinizadas en el sistema nervioso periférico normal, en el nervio ciático (medio muslo, distal de la lesión nerviosa) y las neuronas marcadas en el DRG L5 se examinaron posteriormente. Se encontró que la administración sistémica de neublastina estimula la regeneración de fibras sensoriales marcadas con CTB en las ratas con aplastamiento del nervio L5.

Se empleó inmunomarcaje IB4, CGRP y N52 para visualizar, respectivamente, las fibras sensoriales no peptidérgicas, fibras sensoriales peptidérgicas y fibras sensoriales mielinizadas (estos tres biomarcadores marcan colectivamente todas las poblaciones de biomarcadores sensoriales). Se encontró que la administración sistémica de neublastina estimula la regeneración de los tres tipos de fibras sensoriales en el nervio espinal L5 (distal al sitio de aplastamiento).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido para uso como un medicamento para tratar propiocepción deteriorada en un sujeto que presenta propiocepción deteriorada, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1 y en donde el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET.
2. Un polipéptido para uso como un medicamento para regenerar fibras nerviosas en un sujeto que ha sufrido daño o pérdida de fibras nerviosas, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1 y en donde el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET.
- 10 3. El polipéptido para uso como en la reivindicación 2, en donde las fibras nerviosas son fibras nerviosas grandes o fibras nerviosas pequeñas.
4. El polipéptido para uso como en las reivindicaciones 2 ó 3, en donde el sujeto ha sufrido daño o pérdida de fibras nerviosas de la raíz dorsal.
- 15 5. El polipéptido para uso como en las reivindicaciones 2 ó 3, en donde el sujeto ha sufrido daño o pérdida de fibras nerviosas distales de los ganglios de la raíz dorsal.
6. El polipéptido para uso como en las reivindicaciones 2 ó 3, en donde las fibras nerviosas son fibras nerviosas de la piel y la administración del polipéptido da como resultado la reinervación de la piel.
7. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en las 48 horas siguientes al daño o la pérdida de fibras nerviosas.
- 20 8. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en los siete días siguientes al daño o la pérdida de fibras nerviosas.
9. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en el mes siguiente al daño o la pérdida de fibras nerviosas.
- 25 10. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en dos o más dosis después del daño o de la pérdida de fibras nerviosas.
11. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en donde la administración del polipéptido al sujeto se termina en los seis meses siguientes al daño o la pérdida de fibras nerviosas.
12. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en donde la administración del polipéptido al sujeto se termina en el mes siguiente del daño o la pérdida de fibras nerviosas.
- 30 13. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en donde la administración del polipéptido al sujeto se termina en las dos semanas siguientes al daño o la pérdida de fibras nerviosas.
14. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 2-13, en donde el daño o la pérdida de fibras nerviosas es un resultado de una lesión por aplastamiento de nervios o de una lesión por corte de nervios.
- 35 15. Un polipéptido para uso como un medicamento para regenerar fibras nerviosas en un sujeto que presenta una respuesta neural sensorial deteriorada, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1 y en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET.
16. El polipéptido para uso como en la reivindicación 15, en donde la respuesta neural sensorial deteriorada es un resultado de daño o pérdida de fibras nerviosas de la raíz dorsal.
- 40 17. El polipéptido para uso como en la reivindicación 15, en donde la respuesta neural sensorial deteriorada es un resultado de daño o pérdida de fibras nerviosas distales de los ganglios de la raíz dorsal.
18. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en donde la respuesta neural sensorial deteriorada se caracteriza por una pérdida de sensibilidad a estímulos mecánicos o térmicos nocivos.
- 45 19. Un polipéptido para uso como un medicamento para regenerar fibras nerviosas en un sujeto que ha sufrido una lesión en el plexo braquial, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %

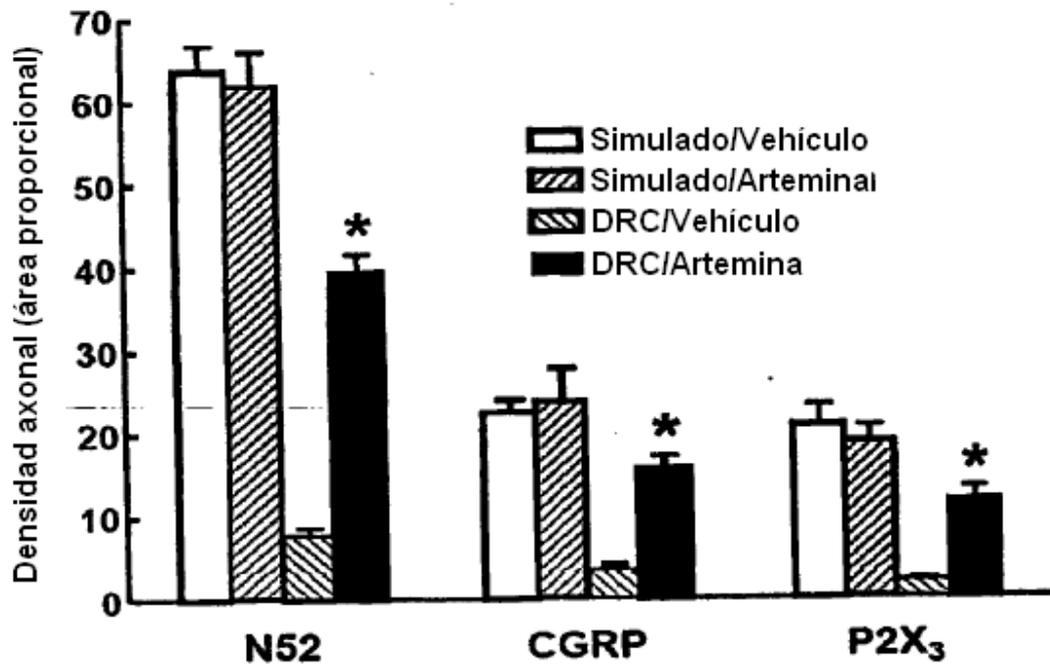
idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1 y en donde el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET.

20. El polipéptido para uso como en la reivindicación 19, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en las 48 horas siguientes a la lesión en el plexo braquial.
- 5 21. El polipéptido para uso como en la reivindicación 19, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en los siete días siguientes a la lesión en el plexo braquial.
22. El polipéptido para uso como en la reivindicación 19, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en el mes siguiente a la lesión en el plexo braquial.
- 10 23. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 19-22, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en dos o más dosis después de la lesión en el plexo braquial.
24. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en donde la administración del polipéptido al sujeto se termina en los seis meses siguientes a la lesión en el plexo braquial.
25. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en donde la administración del polipéptido al sujeto se termina en el mes siguiente a la lesión en el plexo braquial.
- 15 26. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en donde la administración del polipéptido al sujeto se termina en las dos semanas siguientes a la lesión en el plexo braquial.
- 20 27. Un polipéptido para uso como un medicamento para tratar una lesión en el nervio de la raíz dorsal en un sujeto que ha sufrido pérdida de función sináptica como resultado de una lesión en el nervio de la raíz dorsal con el fin de estimular la reentrada de fibras nerviosas a través de la zona de entrada de la raíz dorsal en la médula espinal, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1 y en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFR $\alpha$ 3 y RET.
28. El polipéptido para uso como en la reivindicación 27, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en las 48 horas siguientes a la lesión en el nervio de la raíz dorsal.
- 25 29. El polipéptido para uso como en la reivindicación 27, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en los siete días siguientes a la lesión en el nervio de la raíz dorsal.
30. El polipéptido para uso como en la reivindicación 27, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en el mes siguiente a la lesión en el nervio de la raíz dorsal.
31. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 27-30, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto en dos o más dosis después de la lesión en el nervio de la raíz dorsal.
- 30 32. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 27-31, en donde la administración del polipéptido al sujeto se termina en los seis meses siguientes a la lesión en el nervio de la raíz dorsal.
33. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 27-31, en donde la administración del polipéptido al sujeto se termina en el mes siguiente a la lesión en el nervio de la raíz dorsal.
- 35 34. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 27-31, en donde la administración del polipéptido al sujeto se termina en las dos semanas siguientes a la lesión en el nervio de la raíz dorsal.
35. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto mediante administración sistémica.
36. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto mediante administración subcutánea.
- 40 37. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto mediante administración intravenosa.
38. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido es para administrarse al sujeto localmente en el tejido neural dañado.
- 45 39. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto es un ser humano.

40. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de aminoácidos es al menos un 90 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1.
41. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de aminoácidos es al menos un 95 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1.
- 5 42. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de aminoácidos es al menos un 98 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1.
43. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-39, en donde el polipéptido comprende los aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 1, aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 2, aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 3, aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 4, aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 5, aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 8 o aminoácidos 15-113 de SEQ ID NO: 9.
- 10 44. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-39, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.
- 15 45. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-39, en donde el polipéptido comprende los aminoácidos 10-113 de SEQ ID NO: 1.

|                      |     | 10         | 20         | 30         | 40         | 50          |
|----------------------|-----|------------|------------|------------|------------|-------------|
| Neublastina humana   | 1   | MELGLGGLST | LSHQPWPRRQ | PALWPTLAAL | ALLSSVAEAS | LGSAPRSPAP  |
| Neublastina de ratón | 1   | MELGLAEPTA | LSHCLRPRWQ | SAWPTLAVL  | ALLSCVTEAS | LDPMRSRSPA  |
| Neublastina de rata  | 1   | MELGLGEPTA | ESHGLRERWQ | PALWPTLAAL | ALLSSVTEAS | LDPMRSRSPAS |
| Neublastina humana   | 51  | REGPPVVLAS | PAGHLPGGRT | ARWCSCRARR | PPPQSRPAP  | PPPAP----   |
| Neublastina de ratón | 51  | RDGPPPYLAP | PTDHLPGGHT | AHLCSERTLR | PPPQSPQAP  | PPPGPALQSP  |
| Neublastina de rata  | 51  | RDVPSRVEAP | PTDYLPGGHT | AHLCSERALR | PPPQSPQAP  | PPPGPALQSP  |
| Neublastina humana   | 97  | SALPRGGRAA | PAGGPCSRAR | AAGARGCRLR | SQLYPVRALG | LCHRSDDELIR |
| Neublastina de ratón | 101 | PAALRGARAA | PAGTRSSRAR | TTDARGCRLR | SQLVPVSALG | LGHSSDELIR  |
| Neublastina de rata  | 101 | PAALRGARAA | PAGTRSSRAR | ATDARGCRLR | SQLVPVSALG | LGHSSDELIR  |
| Neublastina humana   | 147 | FRFCSGSRRR | ARSPHDLSLA | SLLGAGALRP | PPGSRPVSQP | CCRPTRYEAV  |
| Neublastina de ratón | 151 | FRFCSGSRRR | ARSQHDLSLA | SLLGAGALRS | PPGSRPISQP | CCRPTRYEAV  |
| Neublastina de rata  | 151 | FRFCSGSRRR | ARSPHDLSEA | SLLGAGALRS | PPGSRPISQP | CCRPTRYEAV  |
| Neublastina humana   | 197 | SFMDVNSTWR | TVDRLSATAC | GCLG       |            |             |
| Neublastina de ratón | 201 | SFMDVNSTWR | TVDHLSATAC | GCLG       |            |             |
| Neublastina de rata  | 201 | SFMDVNSTWR | TVDHLSATAC | GCLG       |            |             |

FIG. 1



**FIG. 2**

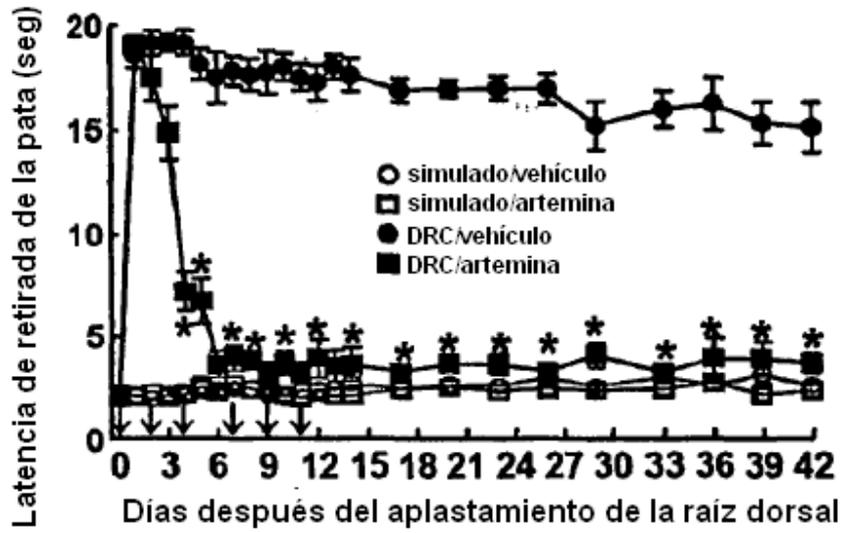


FIG. 3A

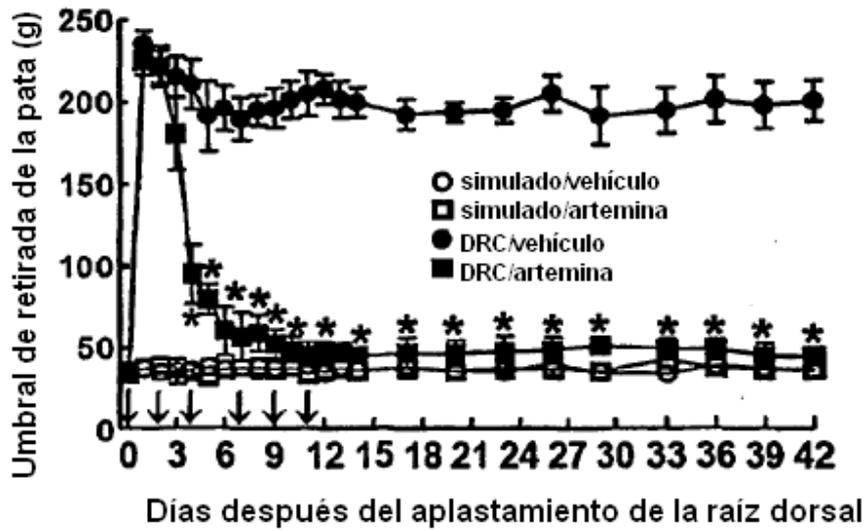
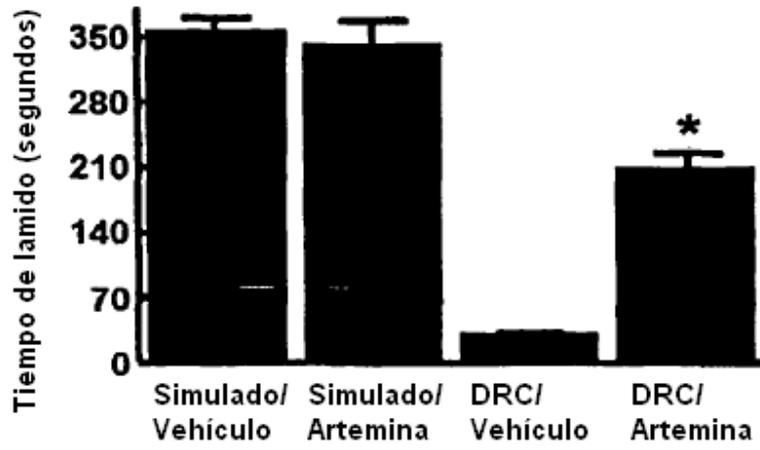
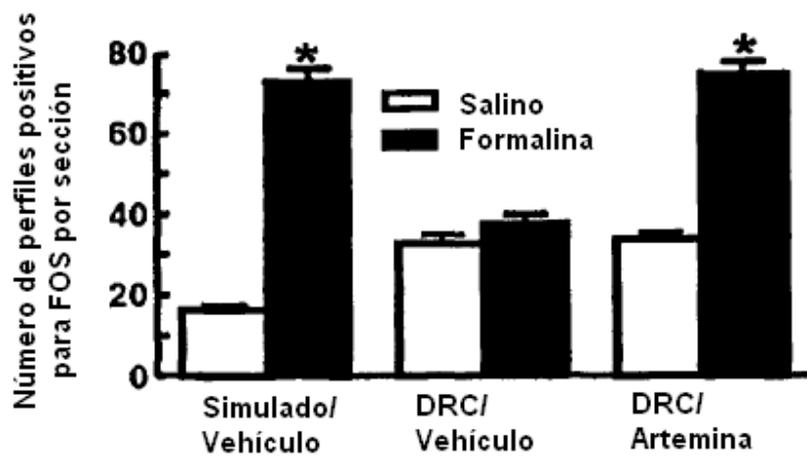


FIG. 3B



**FIG. 3C**



**FIG. 3D**

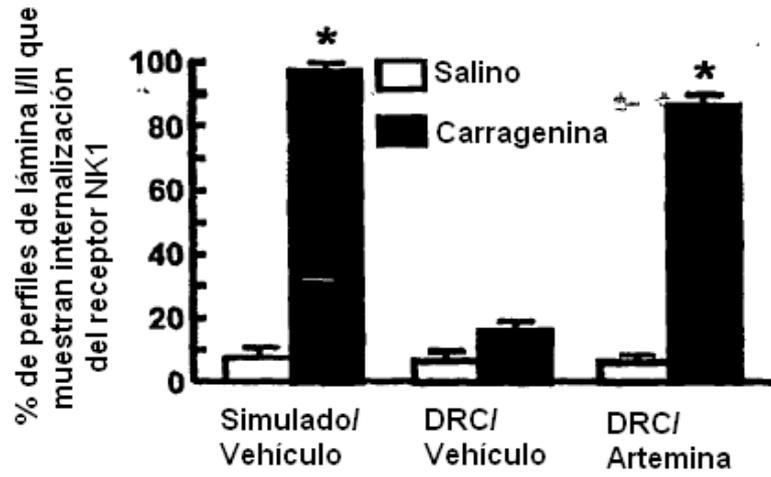


FIG. 3E

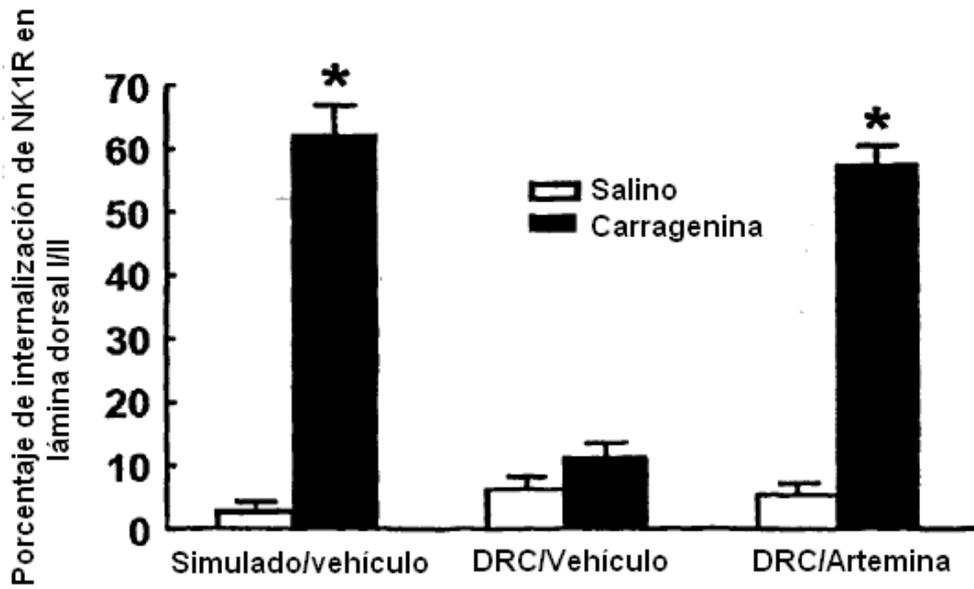


FIG. 3F

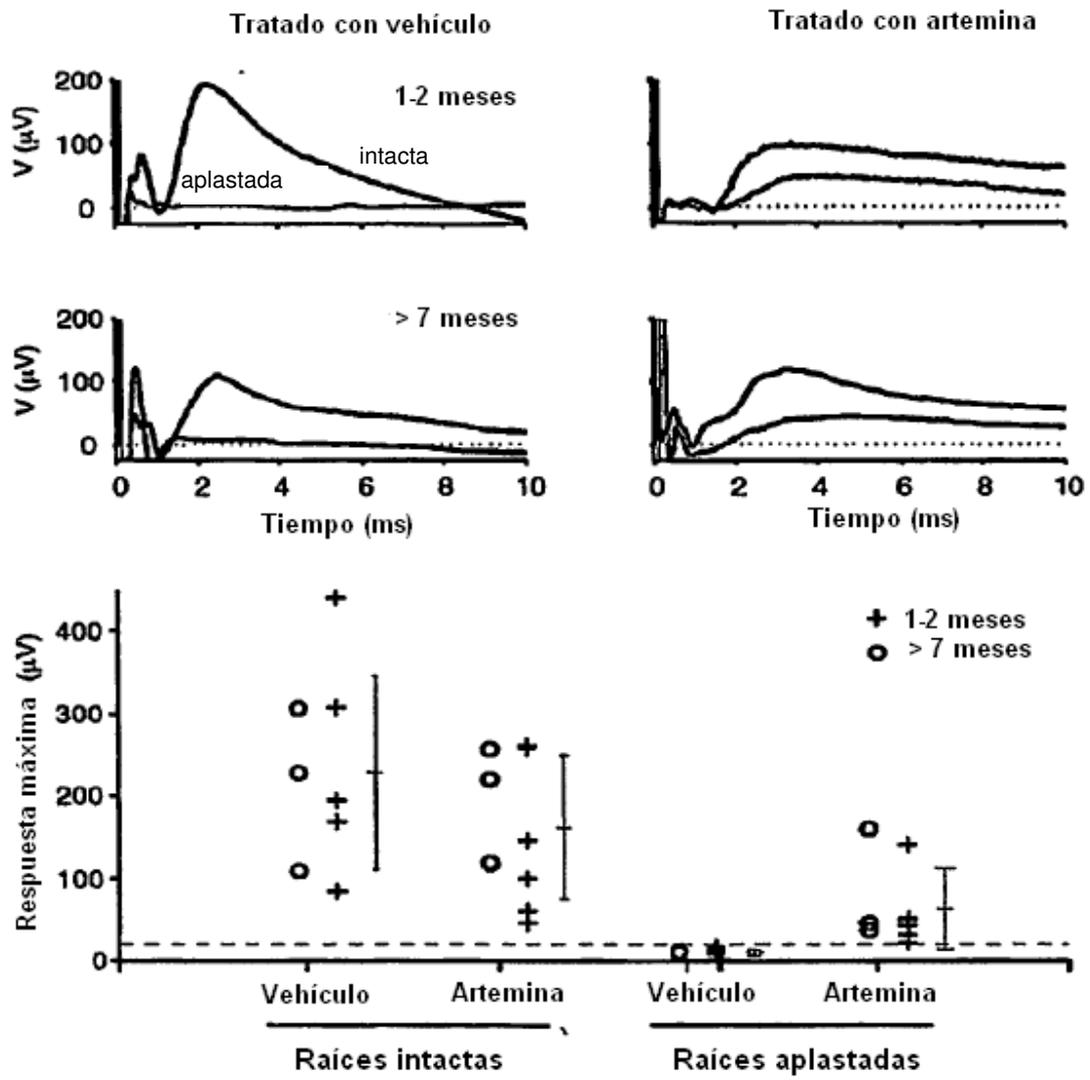


FIG. 4

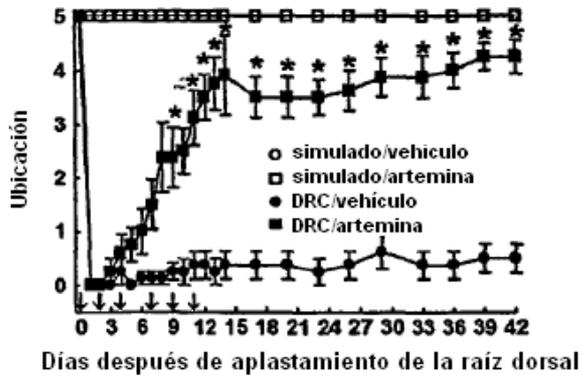


FIG. 5A

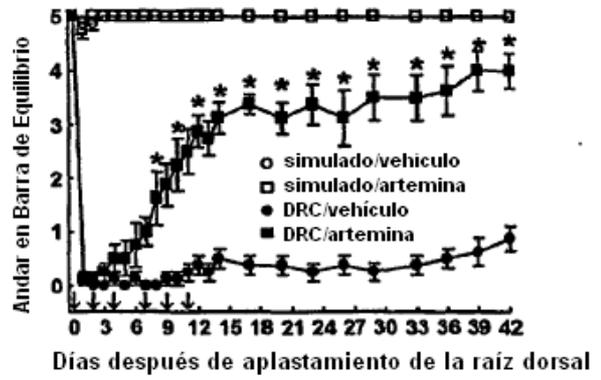


FIG. 5B

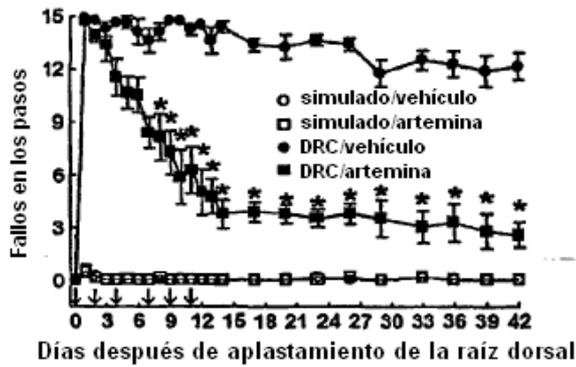


FIG. 5C

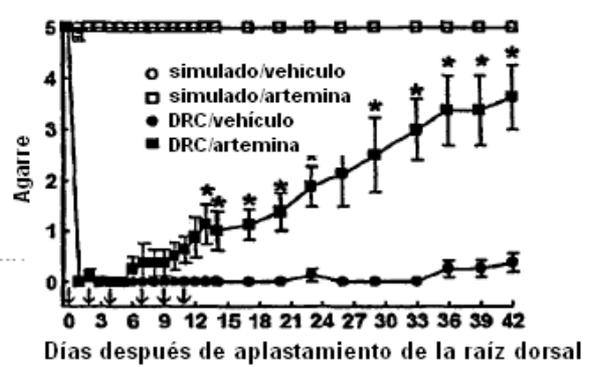
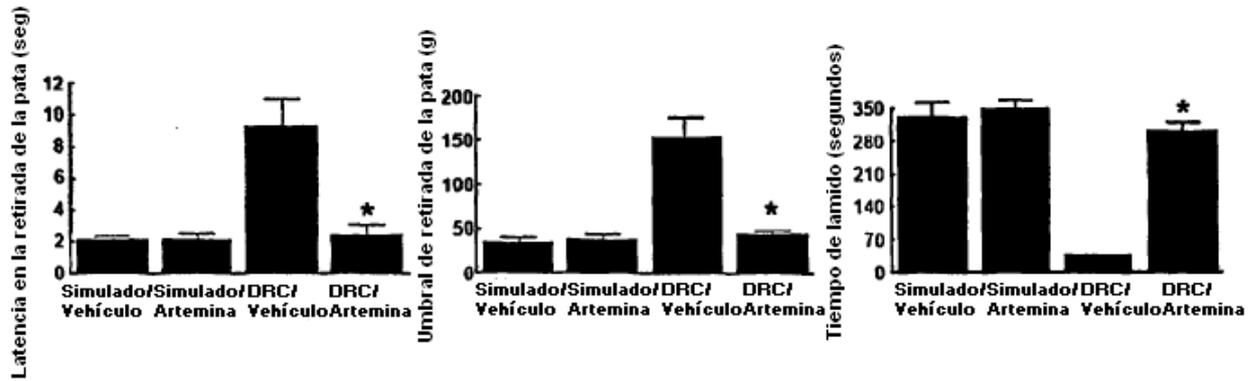


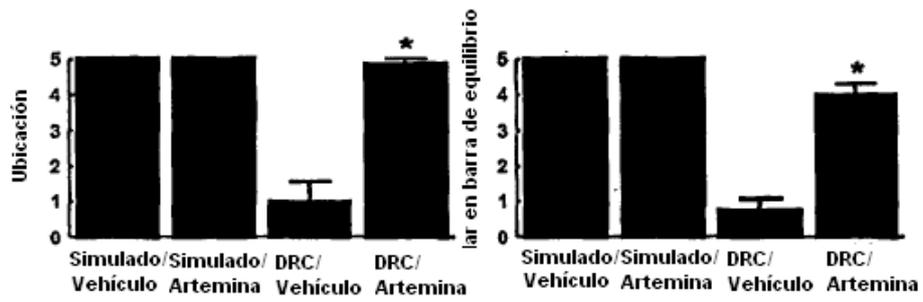
FIG. 5D



**FIG. 6A**

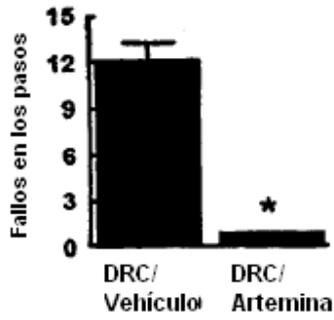
**FIG. 6B**

**FIG. 6C**

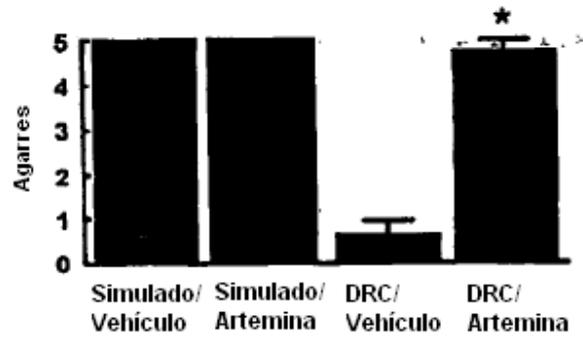


**FIG. 6D**

**FIG. 6E**

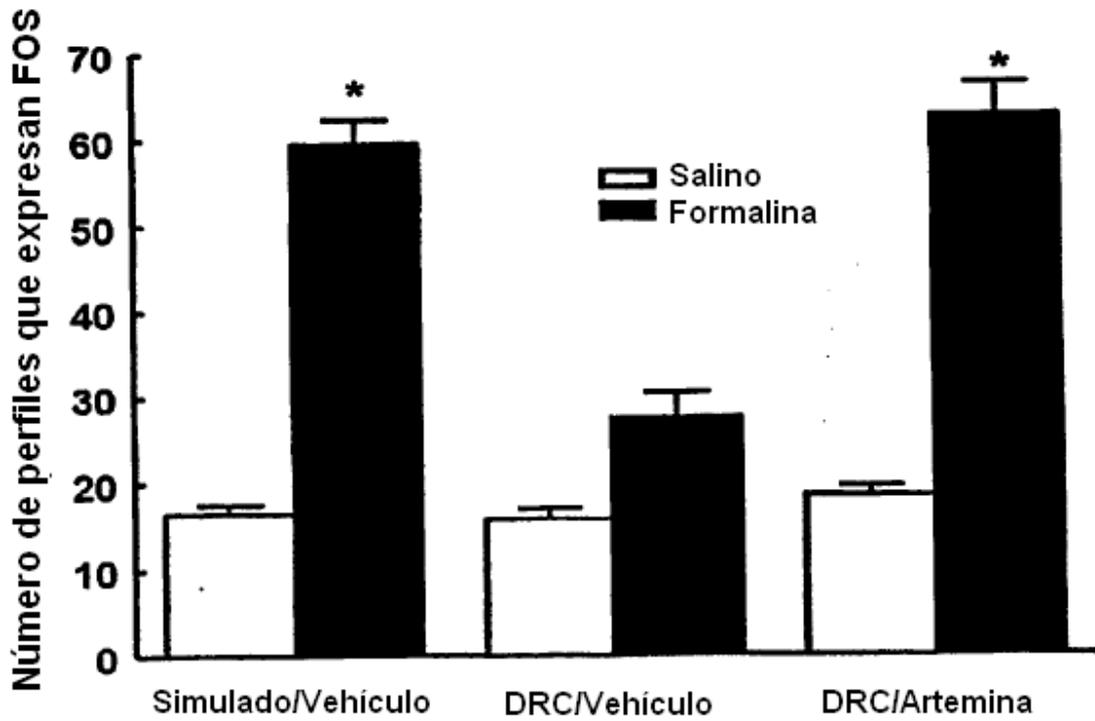


**FIG. 6F**



**FIG. 6G**

6 meses después de DRC



**FIG. 6H**

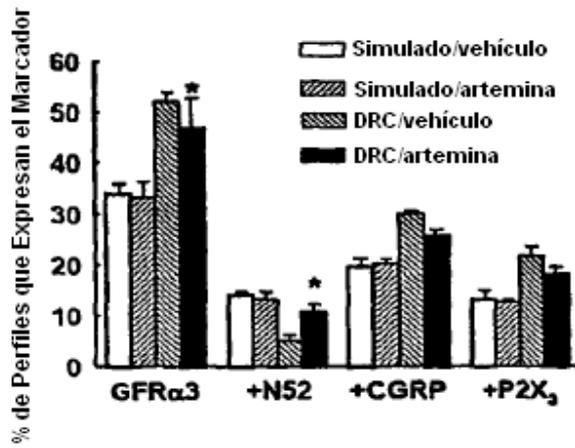


FIG. 7A

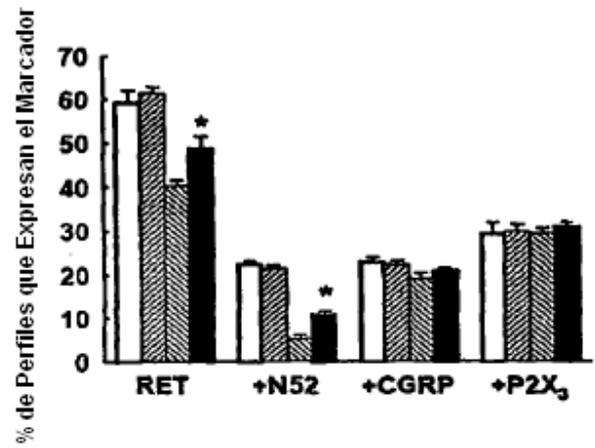


FIG. 7B

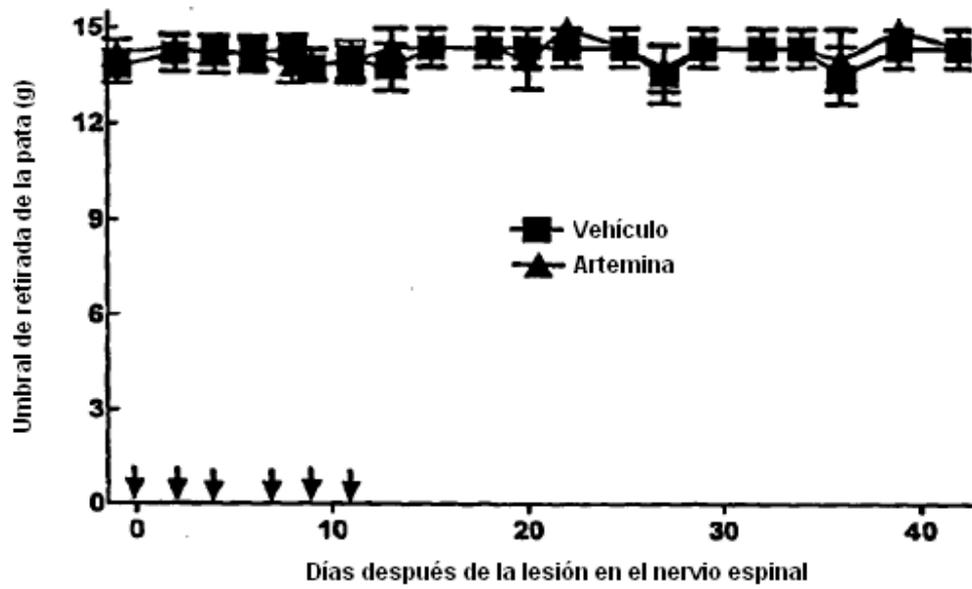


FIG. 8A

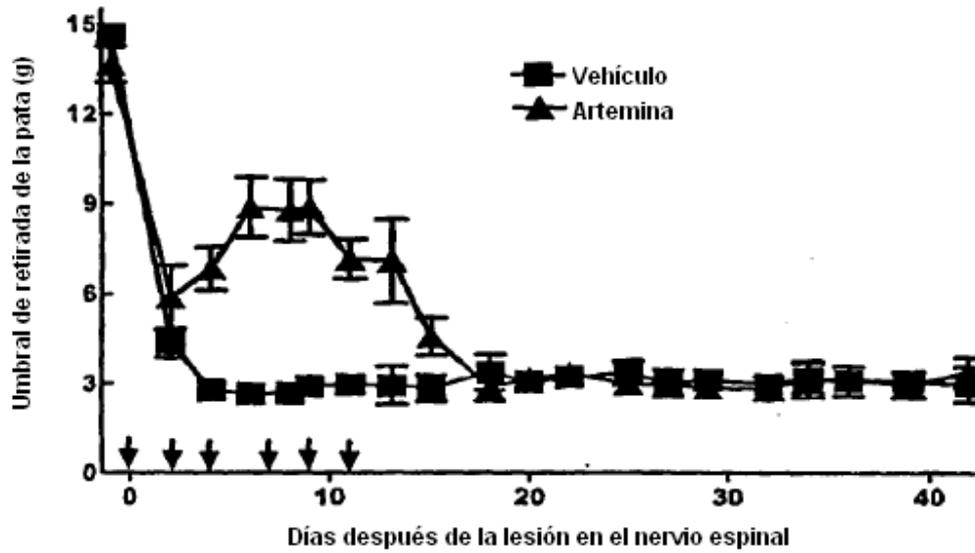


FIG. 8B

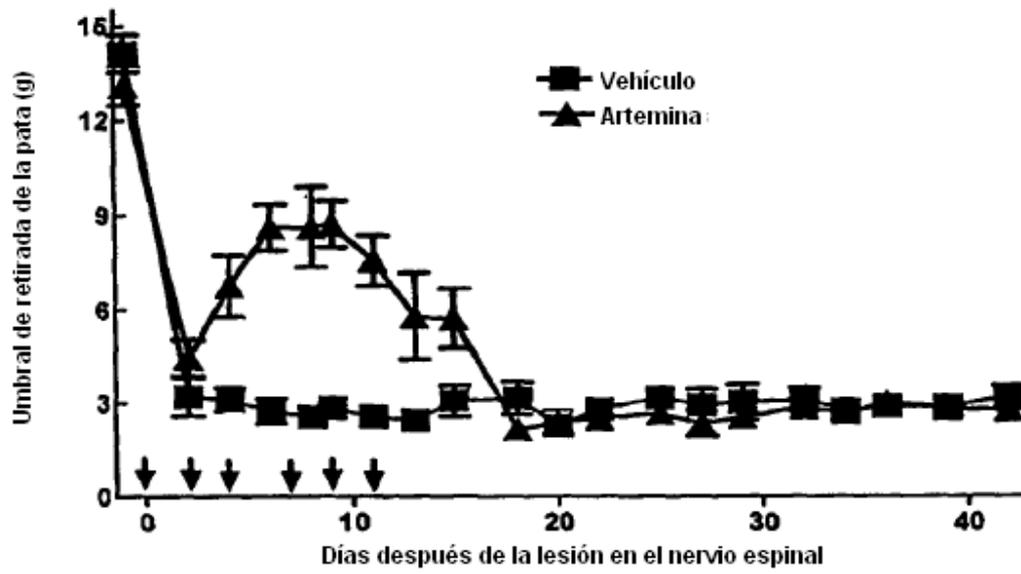


FIG. 8C

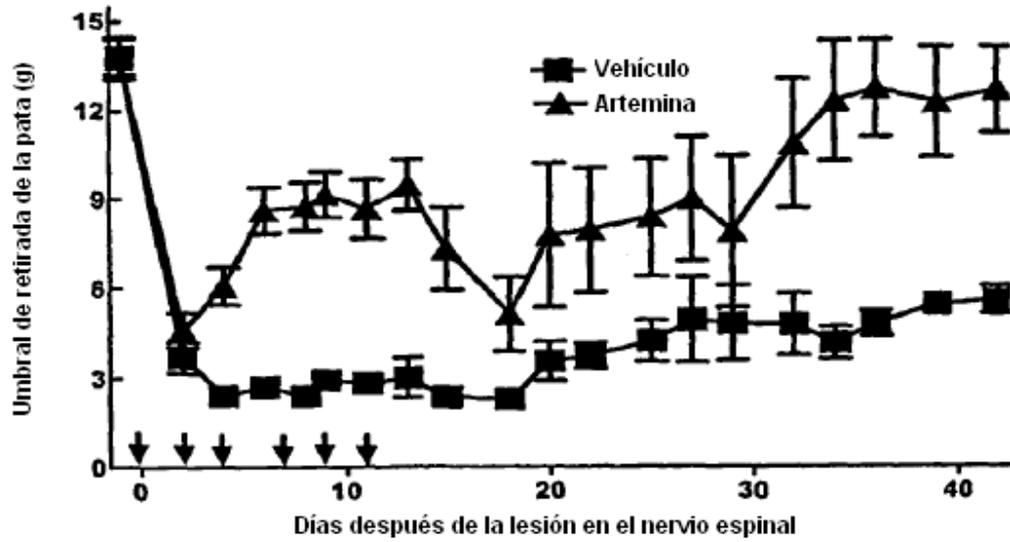


FIG. 8D

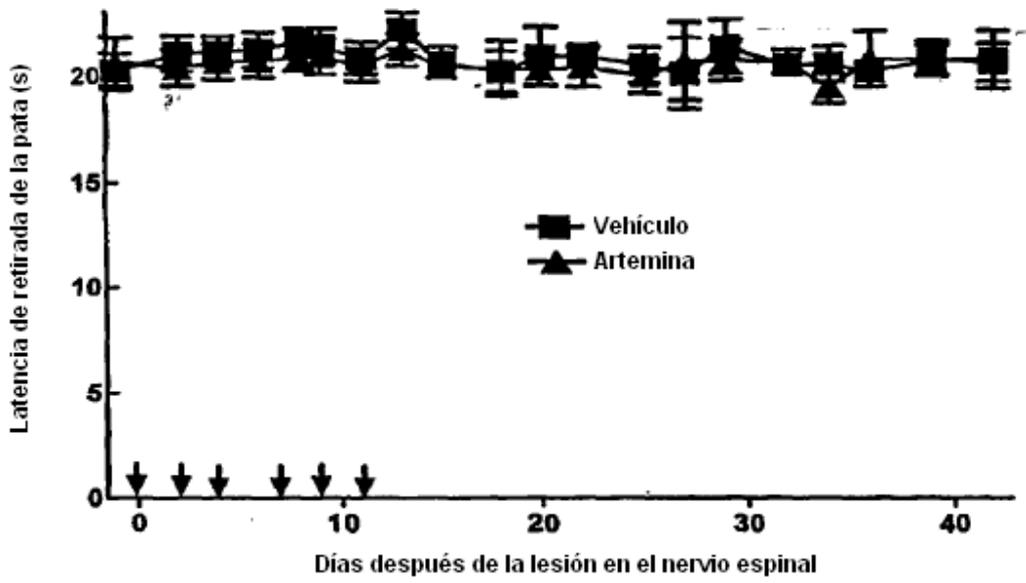


FIG. 9A

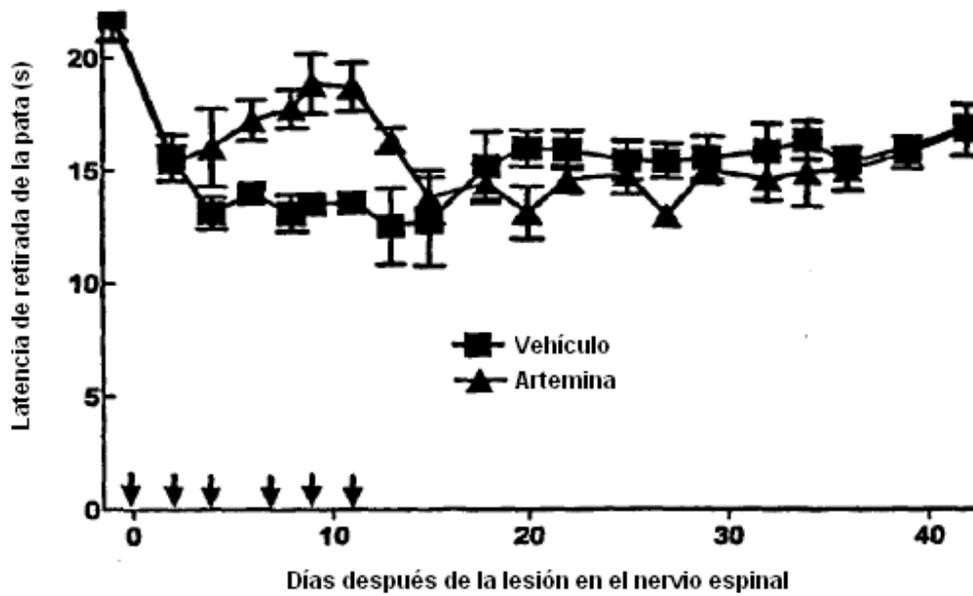


FIG. 9B

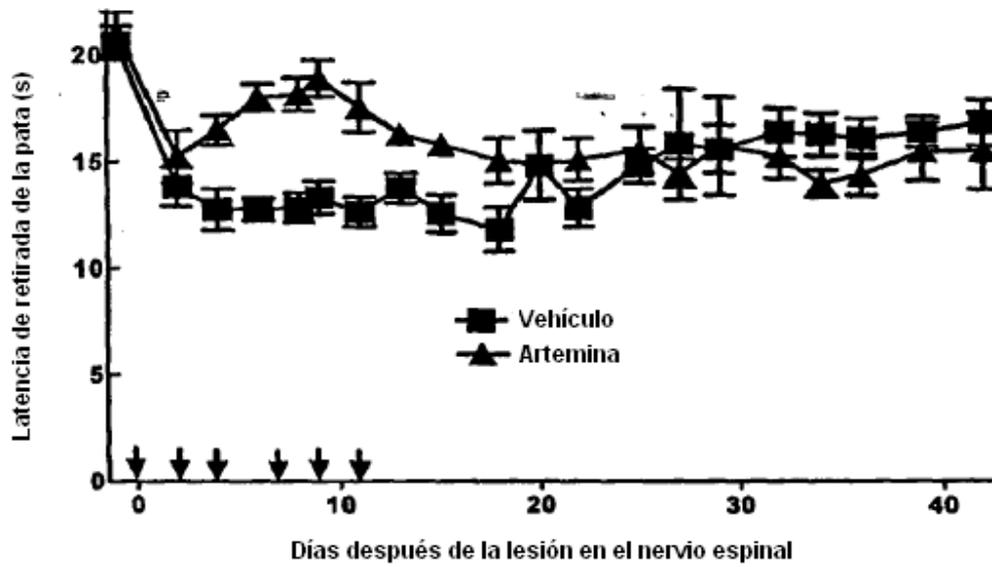


FIG. 9C

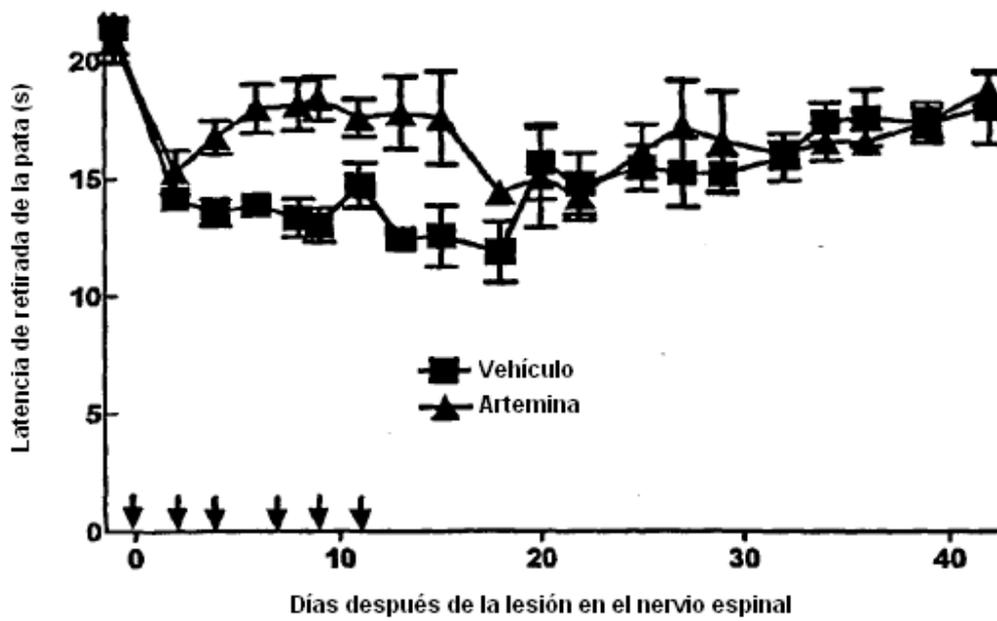


FIG. 9D