

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 253**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2008 E 08747382 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2142205**

54 Título: **Péptidos de neublastina para su uso en el aumento de la vascularización en tejido con flujo sanguíneo deteriorado**

30 Prioridad:

01.05.2007 US 915293 P

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

14.07.2014

73 Titular/es:

BIOPEN IDEC MA INC. (50.0%)

14 Cambridge Center

Cambridge, Massachusetts 02142, US y

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)

72 Inventor/es:

ROSSOMANDO, ANTHONY;

SILVESTRE, JEAN-SÉBASTIEN y

TAMARAT, RADIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 476 253 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

Péptidos de neublastina para su uso en el aumento de la vascularización en tejido con flujo sanguíneo deteriorado

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a química proteica, biología molecular y biología vascular.

10 **Antecedentes**

10 La neublastina, también conocida como artemina y enovina, es una proteína secretada, homodimérica de 24 kDa que promueve la extensión y supervivencia de neuronas en el sistema nervioso central y periférico (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 neublastina se expresa predominantemente en riñón y pulmón embrionario, y en adultos se expresa más en la glándula hipófisis, tráquea y placenta (Baudet *et al.*, 2000, *Development*, 127: 4335).

15 La neublastina es un miembro de la familia de ligandos del factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF). Los ligandos GDNF activan tanto Ras como las vías de transducción de señal de fosfatidilinositol-3-quinasa interaccionando con la tirosina quinasa receptora c-RET unida a membrana. Esta señalización mediada por c-RET requiere un co-receptor adicional, una proteína de receptor alfa de la familia GDNF (GFR α) anclado a glicosilfosfatidilinositol (GPI), que confiere especificidad al ligando a c-RET. Se han identificado cuatro proteínas de co-receptores GFR α (GFR α 1-4). La neublastina muestra la mayor afinidad por GFR α 3 *in vitro*, sin embargo en estudios que usan fibroblastos humanos, la neublastina puede estimular la señalización dependiente de c-RET mediante GFR α 3 o GRF α 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 otros miembros de la familia GDNF son miembros de la súper familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF beta) y por lo tanto se caracterizan por la presencia de siete restos de cisteína conservados con separación 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 en bucle cerrado que rodea el tercer disulfuro para formar una estructura de nudo estrecho. La séptima cisteína contenida dentro de cada monómero forma un enlace disulfuro intermolecular, que une covalentemente los monómeros para formar el producto dimerico final (Rattenholl *et al* 2000, *J. Mol. Biol.*, 305: 523).

35 **Sumario**

La presente invención, se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la administración de neublastina a un mamífero promueve la neovascularización y aumento de flujo sanguíneo a tejido muscular isquémico después de oclusión arterial.

40 En un aspecto, la invención presenta un método para aumentar la vascularización en un tejido, incluyendo dicho método las siguientes etapas: seleccionar un mamífero que muestra flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado en un tejido (por ejemplo, un tejido isquémico tal como un tejido muscular isquémico); y administrar al mamífero una cantidad de un polipéptido eficaz para aumentar la vascularización en el tejido, en el que el polipéptido contiene una secuencia de aminoácidos que es el al menos el 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1, y en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une con un complejo que contiene GFR α 3 y RET. También se desvela el uso de un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1, en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une con un complejo que contiene GFR α 3 y RET para la preparación de una composición farmacéutica para aumentar la vascularización en un tejido de un mamífero que muestra flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado.

50 La secuencia de aminoácidos contenida en el polipéptido de los métodos y usos descritos en el presente documento puede ser opcionalmente al menos 90 % idéntica (por ejemplo, al menos 95 % o 98% idéntica) a los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1. El polipéptido contiene o consiste en los aminoácidos 10-113 de SEC ID N°: 1, los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1, los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 2, los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 3, los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 4, los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 5, los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 8 o los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 9. Por ejemplo, el polipéptido puede contener o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9.

El polipéptido puede administrarse al mamífero, por ejemplo, mediante administración sistémica (por ejemplo, administración subcutánea o intravenosa) o administración local.

65 El tejido que tiene flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado puede localizarse opcionalmente en una extremidad (por ejemplo, manos o pies) del mamífero. El tejido que tiene flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado contiene una

lesión cutánea (por ejemplo, una lesión cutánea asociada con una úlcera diabética, tal como una úlcera diabética del pie).

5 El mamífero tratado de acuerdo con los métodos y usos descritos en el presente documento puede ser, por ejemplo, un ser humano, un ratón, una rata, una vaca, un cerdo, un perro, un gato o un mono.

10 En algunos aspectos de los métodos y usos descritos en el presente documento, el corazón del mamífero muestra flujo sanguíneo deteriorado y la administración del polipéptido aumenta la vascularización del corazón, el mamífero ha padecido un ictus y muestra flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado en el tejido como resultado del ictus, el mamífero ha padecido un infarto de miocardio y muestra flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado en el tejido como resultado del infarto de miocardio, el mamífero tiene una enfermedad de las arterias coronarias y muestra flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado en el tejido como resultado de la enfermedad de las arterias coronarias, y/o el mamífero ha recibido un órgano trasplantado (por ejemplo, un corazón o dermis) y la administración del polipéptido aumenta la vascularización en el órgano trasplantado.

15 Un mamífero tratado de acuerdo con los métodos y usos descritos en el presente documento puede tener una enfermedad o trastorno tal como una enfermedad isquémica, una enfermedad cardiovascular y/o diabetes.

20 Los métodos y usos descritos en el presente documento pueden incluir además administrar al mamífero uno o más de un agente antitrombótico, un factor distinto de neublastina que aumenta la vascularización, un agente reductor del colesterol, un beta bloqueador, un agente anti-hipertensor o un agente inmunosupresor.

25 Los métodos y usos descritos en el presente documento pueden incluir además determinar si se ha producido vascularización aumentada después de la administración del polipéptido.

En algunos aspectos de los métodos y usos descritos en el presente documento, no se ha diagnosticado al mamífero un trastorno neurológico y/o no se le ha diagnosticado un trastorno ocular.

30 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo, los métodos y materiales ejemplares se describen posteriormente.

35 Otras características y ventajas resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 es un alineamiento de polipéptidos de pre pro neublastina de tipo silvestre humana (SEC ID N°: 10), de ratón (SEC ID N°: 11) y de rata (SEC ID N°: 12). Las líneas verticales izquierda y derecha indican, respectivamente, el inicio de las formas maduras de 113 aminoácidos y 104 aminoácidos. El motivo de unión a heparina RRXR está encuadrado.

45 La Figura 2 es una gráfica de barras que representa el efecto de la administración de neublastina en vascularización post-isquémica en las extremidades posteriores del ratón. El eje Y corresponde a la densidad capilar, que se mide como la relación del número de capilares en la pierna isquémica en comparación con una pierna no isquémica normal. "SEM" se refiere al error típico de la media. Los P valores menores de 0,05 (en comparación con el control de vehículo) se indican por "**".

50 La Figura 3 es una gráfica de barras que representa el efecto de la administración de neublastina en flujo sanguíneo cutáneo post-isquémico. El eje Y indica el flujo sanguíneo como se mide por la relación de perfusión en la pierna isquémica en comparación con una pierna no isquémica normal. "SEM" se refiere al error típico de la media. Los P valores menores de 0,01 se indican por "***" y los P valores menores de 0,001 se indican por "****".

Descripción detallada

55 La presente invención proporciona composiciones para su uso en el aumento de la vascularización en tejidos que muestran flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado. Como se desvela en los ejemplos adjuntos, se descubrió que la administración de neublastina promovía la neovascularización y aumentaba el flujo sanguíneo a tejido muscular isquémico en un mamífero.

Polipéptidos de neublastina

60 La neublastina humana de tipo silvestre madura es de 113 aminoácidos de longitud y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
 65 AGGPGSRARAAGARGCRLRSQVLPVVRALGLGHRSDLV
 RFRFCSGSCRARRSPHDLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTW RTVDRLSATACGLG
 (SEC ID N°: 1). Los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 o variantes

biológicamente activas de la misma pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento. Un polipéptido de neublastina variante puede contener una o más adicciones, sustituciones y/o deleciones, como se detalla en las siguientes secciones. Los polipéptidos de neublastina de tipo silvestre y variantes biológicamente activas de los mismos se denominan colectivamente en el presente documento "polipéptidos de neublastina".

Un polipéptido de neublastina variante puede variar de longitud con respecto al polipéptido de tipo silvestre correspondiente. Aunque el polipéptido de neublastina humana madura (SEC ID N°: 1) consiste en los 113 aminoácidos carboxilo terminales de pre pro neublastina (SEC ID N°: 10), no todos de los 113 aminoácidos son necesarios para conseguir actividad biológica de neublastina útil. Es permisible un truncamiento amino terminal. Por lo tanto, un polipéptido de neublastina variante puede contener, por ejemplo, los 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 o 113 aminoácidos carboxilo terminales de SEC ID N°: 1 (es decir, su longitud puede ser de 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 o 113 aminoácidos).

Un polipéptido de neublastina variante también puede variar de secuencia con respecto al polipéptido de tipo silvestre correspondiente. En particular, ciertas sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en las secuencias de neublastina sin pérdida apreciable de una actividad biológica de neublastina. En realizaciones ejemplares, un polipéptido de neublastina variante (i) contiene una o más sustituciones de aminoácidos y (ii) es al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntico a SEC ID N°: 1 (o 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntico a los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1). Un polipéptido de neublastina variante que difiere en secuencia con respecto a SEC ID N°: 1 (o difiere en secuencia con respecto a los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1) puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos (conservativas o no conservativas), una o más deleciones y/o una o más inserciones.

La Figura 1 es un alineamiento de los polipéptidos de pre pro neublastina de tipo silvestre humana, de ratón y de rata. Las líneas verticales en la Figura 1 indican el inicio de la forma de 113 aminoácidos madura (línea vertical izquierda) y forma de 104 aminoácidos (línea vertical derecha) de neublastina. El motivo de unión a heparina RRXR está encuadrado. Este alineamiento de formas bioactivas, de origen natural, de neublastina indica restos ejemplares específicos (es decir, los que no se conservan entre las formas humana, de ratón y de rata) que pueden sustituirse sin eliminar la bioactividad.

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

Una sustitución conservativa es la sustitución de un aminoácido por otro con características similares. Las sustituciones conservativas incluye sustituciones dentro de los siguientes grupos: 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 hidrófobos 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. Los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier sustitución de un miembro de los grupos anteriormente mencionados polar, básico o ácido por otro miembro del mismo grupo puede considerarse una sustitución conservativa.

Las sustituciones no conservativas incluyen en las que (i) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva (por ejemplo, Arg, His o Lys) sustituye a, o se sustituye por, un resto electronegativo (por ejemplo, Glu o Asp), (ii) un resto hidrófilo (por ejemplo, Ser o Thr) sustituye a, o se sustituye por, un resto hidrófobo (por ejemplo, Ala, Leu, Ile, Phe o Val), (iii) una cisteína o prolina sustituye a, o se sustituye por, cualquier otro resto, o (iv) un resto que tiene una cadena lateral hidrófoba o aromática voluminosa (por ejemplo, Val, Ile, Phe o Trp) sustituye a, o se sustituye por, uno que tenga una cadena lateral más pequeña (por ejemplo, Ala, Ser) o ninguna cadena lateral (por ejemplo, Gly).

Un polipéptido de neublastina variante biológicamente activo, cuando se dimeriza, se une con un complejo ternario que contiene GFR α 3 y RET. Puede usarse cualquier método para detectar la unión con este complejo para evaluar la actividad biológica de un polipéptido de neublastina variante. Se describen ensayos ejemplares para detectar la capacidad de unión con el complejo ternario de un polipéptido de neublastina variante en el documento WO00/01815.

Un polipéptido de neublastina variante también puede valorarse para evaluar su capacidad para desencadenar la cascada de señalización de neublastina. Por ejemplo, puede usarse el ensayo de Activación de Receptor Quinasa (KIRA) 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).

Se espera que las sustituciones en uno o más de los siguientes restos de aminoácidos den como resultado un polipéptido de neublastina variante que tenga capacidad de unión a heparina reducida o ausente en comparación

con neublastina de tipo silvestre: 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 resto de aminoácido de neublastina por el número de posición se refiere a la numeración de los restos en relación con SEC ID N°: 1. Un resto de aminoácido de neublastina designado para sustitución (por ejemplo, un resto de arginina en la posición 48, 49 y/o 51) puede sustituirse con un resto de aminoácido no conservativo (por ejemplo, ácido glutámico) o un resto de aminoácido conservativo. Los aminoácidos ejemplares que pueden sustituirse en un resto identificado en el presente documento (por ejemplo, posición 48, 49 y/o 51) incluyen ácido glutámico, ácido aspártico y alanina.

Se desvelan ejemplos de polipéptidos de neublastina variantes que muestran unión con heparina reducida o ausente en la Tabla 1 y en el documento WO 2006/023781. Los restos de aminoácidos de los polipéptidos de neublastina variantes que están mutados en comparación con la posición de tipo silvestre correspondiente están en negrita y subrayados en la Tabla 1. Además, el polipéptido de neublastina (por ejemplo, de 113, 99 o 104 aminoácidos de longitud) usado como el fondo para la sustitución se representa en la Tabla 1.

Tabla 1: Polipéptidos de neublastina variantes

SEC ID N°	Posición sustituida	Longitud del polipéptido	Secuencia de aminoácidos
2	Arg 48	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQLVPVRA LGLGHRSEDELVRFRFCSGSC <u>E</u> RARSPHD LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGC LG
3	Arg 49	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQLVPVRA LGLGHRSEDELVRFRFCSGSC <u>R</u> EARS PHD LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGC LG
4	Arg 51	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQLVPVRA LGLGHRSEDELVRFRFCSGSC <u>RRA</u> E SPHD LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGC LG
5	Arg 48 y Arg 49	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQLVPVRA LGLGHRSEDELVRFRFCSGSC <u>EE</u> ARS PHD LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGC LG
6	Arg 48 y Arg 49	99	GRLRSQLVPVRA <u>L</u> GGLGHRSEDELVRFRF CSGSC <u>EE</u> ARS PHD LSLASLLGAGALRPPP GSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTW RTVDRLSATACGCLG
7	Arg 48 y Arg 49	104	AAGARGCRLRSQLVPVRA <u>L</u> GGLGHRSE LVRFRFCSGSC <u>EE</u> ARS PHD LSLASLLGA GALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFM DYNSTWRTVDRLSATACGCLG
8	Arg 49 y Arg 51	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQLVPVRA LGLGHRSEDELVRFRFCSGSC <u>REA</u> E SPHD LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGC LG

SEC ID N°	Posición sustituida	Longitud del polipéptido	Secuencia de aminoácidos
9	Arg 48 y Arg 51	113	AGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRA LGLGHRSD ELVRFRC SGSCERAESP HD LSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPT RYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGC LG

Un polipéptido de neublastina puede acoplarse opcionalmente con un polímero (por ejemplo, un resto de polialquilenglicol tal como un resto de polietilenglicol). En algunos aspectos, el polímero se acopla con el polipéptido en un sitio en el polipéptido de neublastina que es un extremo N terminal. Un polipéptido de neublastina variante incluye al menos una sustitución de aminoácidos con respecto a SEC ID N°:1 (o con respecto a los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1), lo que proporciona un sitio de conjugación de polímero interno con el que puede conjugarse un polímero. En algunos aspectos, el polímero se acopla con un polipéptido de neublastina variante en un resto (numerado de acuerdo con la secuencia de SEC ID N°: 1) seleccionado del grupo que consiste en la posición 14, la posición 39, la posición 68 y la posición 95. Se describen variantes de neublastina ejemplares que proporcionan sitios de conjugación con polímeros internos en los documentos WO 02/060929 y WO 04/069176.

Un polipéptido puede contener opcionalmente secuencias de aminoácidos heterólogas además de un polipéptido de neublastina. "Heterólogo", como se usa cuando se hace referencia a una secuencia de aminoácidos, se refiere a una secuencia que se origina de una fuente ajena a la célula hospedadora particular, o, si es de la misma célula hospedadora, se modifica con respecto a su forma original. Las secuencias heterólogas ejemplares 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 del crecimiento humana) o una secuencia usada para purificación de un polipéptido de neublastina (por ejemplo, un marcador de histidina).

Los polipéptidos de neublastina pueden aislarse usando métodos conocidos en la técnica. Pueden aislarse polipéptidos de neublastina producidos de forma recombinante o de origen natural de células o fuentes tisulares usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. Como alternativa, pueden sintetizarse químicamente polipéptidos de neublastina mutada usando técnicas de síntesis peptídica convencionales. La síntesis de secuencias de aminoácidos cortas está bien establecida en la técnica de péptidos. Véase, por ejemplo, Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis (2ª ed., 1984).

En algunos aspectos, se producen polipéptidos de neublastina por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, puede insertarse una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina 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 preferentemente en condiciones que permitan la expresión de un polipéptido de neublastina. El polipéptido de neublastina puede recuperarse de una suspensión celular si se desea. Como se usa en el presente documento "recuperarse" significa que el polipéptido mutado se retira de los componentes de una célula o medio de cultivo en los que está presente antes del proceso de recuperación. El proceso de recuperación puede incluir una o más etapas de replegamiento o purificación. Se describen tampones y métodos para inducir el plegamiento de un polipéptido de neublastina desnaturalizado en, por ejemplo, el documento WO 2006/023782.

Pueden construirse polipéptidos de neublastina variantes usando cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Uno de dichos métodos es la mutagénesis dirigida, en la que se cambia un nucleótido específico (o, si se desea, un número pequeño de nucleótidos específicos) para cambiar un único aminoácido (o, si se desea, un número pequeño de restos de aminoácidos predeterminados) en el polipéptido de neublastina variante codificado. Muchos kits de mutagénesis dirigida están disponibles en el mercado. Uno de dichos kits es el "kit de mutagénesis dirigida de sitio transformador" vendido por Clontech Laboratories (Palo Alto, CA).

Composiciones farmacéuticas

Puede incorporarse un polipéptido de neublastina 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 típicamente no afectan de forma adversa a la homeostasis de un receptor (por ejemplo, equilibrio de electrolitos). Los vehículos aceptables incluyen sales biocompatibles, inertes o bioabsorbibles, agentes tamponantes, oligo- o polisacáridos, polímeros, agentes que mejoran la viscosidad, conservantes y similares. Un vehículo ejemplar es solución salina fisiológica (NaCl 0,15 M, pH 7,0 a 7,4). Otro vehículo ejemplar es fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 100 mM. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre técnicas para formulación y administración de composiciones farmacéuticas en, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

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

La administración puede ser por inyecciones periódicas de una embolada de la composición farmacéutica o puede hacerse más continua por administración intravenosa o intraperitoneal a partir de un depósito que es externo (por ejemplo, una bolsa de IV) o interno (por ejemplo, un implante bioerosionable, un órgano bioartificial o una colonia de células de producción de neublastina implantadas). Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.407.957, 5.798.113 y 5.800.828. Puede conseguirse administración de una composición farmacéutica usando medios de suministro adecuados tales como: una bomba (véase, por ejemplo, *Annals of Pharmacotherapy*, 27: 912 (1993); *Cancer*, 41: 1270 (1993); *Cancer Research*, 44: 1698 (1984)); microencapsulación (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.352.883; 4.353.888; y 5.084.350; implantes de polímeros de liberación continua (véase, por ejemplo, Sabel, Patente de Estados Unidos N° 4.883.666); macroencapsulación (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.284.761, 5.158.881, 4.976.859 y 4.968.733 y solicitudes de Patente de PCT Publicadas WO92/19195, WO 95/05452), inyección, bien por vía subcutánea, intravenosa, intra-arterial, intramuscular o en otro sitio adecuado; o administración oral, en cápsula, líquido, comprimido, píldora o formulación de liberación prolongada.

Los ejemplos de sistemas de suministro parenteral incluyen partículas de copolímero de etilen-vinil acetato, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, suministro por bomba, suministro en células encapsuladas, suministro liposómico, inyección suministrada por aguja, inyección sin aguja, nebulizador, aerosolizador, electroporación y parche transdérmico.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral convenientemente contienen una preparación acuosa estéril del polipéptido de neublastina, que preferentemente es isotónica con la sangre del receptor (por ejemplo, solución salina fisiológica). Pueden presentarse formulaciones en formas de dosis unitaria o multidosis.

Una formulación ejemplar contiene un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento y los siguientes componentes del tampón: succinato sódico (por ejemplo, 10 mM); NaCl (por ejemplo, 75 mM); y L-arginina (por ejemplo, 100 mM).

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, obleas, comprimidos o grageas, 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 corriente.

Un polipéptido de neublastina adecuado para administración tópica pueda administrarse a un mamífero (por ejemplo, paciente humano) como, por ejemplo, una crema, una pulverización, una espuma, un gel, un ungüento, una pomada o una aplicación seca. Una aplicación seca puede rehidratarse en el sitio de administración. Los polipéptidos de neublastina también pueden infundirse directamente en (por ejemplo, empaparse en y secarse) una venda, gasa o parche, que después puede aplicarse por vía tópica. Los polipéptidos de neublastina también pueden mantenerse en un estado semilíquido, gelificado o completamente líquido en una venda, gasa o parche para administración tópica (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.307.717).

Pueden administrarse cantidades terapéuticamente eficaces de una composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite en un régimen de dosificación determinable por un experto en la materia. Por ejemplo, puede administrarse una composición a un sujeto, por ejemplo, por vía sistémica a una dosificación de 0,01 µg/kg a 1000 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.

Para optimizar la eficacia terapéutica, puede administrarse en primer lugar un polipéptido de neublastina en diferentes regímenes de dosificación. La dosis unitaria y el régimen dependen de factores que incluyen, por ejemplo, la especie de mamífero, su estado inmunitario, el peso corporal del mamífero. Típicamente, los niveles de proteína en tejido se controlan usando ensayos de exploración apropiados como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado.

La frecuencia de dosificación para un polipéptido de neublastina está dentro de la experiencia y el criterio clínico de los médicos. Típicamente, el régimen de administración se establece por ensayos clínicos que pueden establecer parámetros de administración óptimos. Sin embargo, el practicante puede variar dichos regímenes de administración de acuerdo con la edad, salud, peso, sexo y estado médico del sujeto. La frecuencia de dosificación puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

Métodos de tratamiento

Los polipéptidos de neublastina descritos en el presente documento pueden usarse para aumentar la vascularización en un mamífero que muestre flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado en un tejido. Por ejemplo, un polipéptido de neublastina puede usarse para tratar un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que tenga, se sospeche que tenga, o esté en riesgo de desarrollar, un trastorno isquémico tal como isquemia muscular, corazón isquémico (por ejemplo, resultante de infarto de miocardio), una úlcera de decúbito, isquemia resultante de venas varicosas, complicaciones isquémicas de la diabetes (por ejemplo, una lesión cutánea tal como lesión del pie), riñón isquémico, cerebro isquémico (por ejemplo, resultante de un ictus) o hígado isquémico. Además, puede usarse un polipéptido de neublastina para aumentar la vascularización en un mamífero que ha recibido un órgano trasplantado y que necesita vascularización del órgano. Se revisan ejemplos de afecciones médicas específicas que pueden tratarse o prevenirse por la administración de un polipéptido de neublastina en las siguientes secciones.

(i) Ictus

El ictus (por ejemplo, ictus isquémico, ictus trombótico, ictus embólico, ictus de hipoperfusión sistémica, ictus hemorrágico, ictus hemorrágico intracerebral o ictus hemorrágico subaracnoideo) es un trastorno caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado a una o más regiones del cerebro. La alteración de la perfusión puede ser venosa, pero es más frecuentemente arterial. La pérdida o reducción del flujo sanguíneo al cerebro da como resultado daño a las áreas isquémicas, que puede deteriorar gravemente la función cerebral local o global. Puede administrarse un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intranasal o por suministro local intracraneal) a un sujeto para aumentar el flujo sanguíneo a una o más regiones del cerebro para prevenir o reducir de este modo el daño provocado por un ictus. Cuando el sujeto está en riesgo de tener un ictus (por ejemplo, un sujeto al que se ha diagnosticado que tiene una oclusión parcial de una arteria en el cerebro), puede administrarse neublastina al sujeto para evitar la aparición, o reducir la gravedad, de un ictus.

Los factores de riesgo para desarrollar un ictus incluyen, por ejemplo, un historial familiar de ictus, mayor edad, raza, hipertensión, niveles de colesterol elevados (particularmente LDL elevado), tabaquismo, diabetes y obesidad.

El ictus puede diagnosticarse o evaluarse, por ejemplo, por la gravedad y/o número de síntomas presentados por un sujeto. Los síntomas de ictus pueden variar dependiendo de la región específica del cerebro que se vea afectada. Los síntomas de ictus incluyen, por ejemplo, debilidad (hemiplejía), entumecimiento, reducción de la sensación sensorial o vibratoria, sentidos alterados (por ejemplo, olfato, gusto, oído o vista (total o parcial)), caída de un párpado (ptosis), reflejos reducidos (por ejemplo, náuseas, deglución), sensación reducida y debilidad muscular de la cara, problemas de equilibrio, respiración alterada, ritmo cardíaco alterado, afasia (incapacidad de hablar o entender el lenguaje), apraxia (movimientos voluntarios alterados), vértigo y/o desequilibrio.

El ictus también puede diagnosticarse y evaluarse (por ejemplo, la gravedad del ictus o el alcance del cerebro afectado) usando una diversidad de técnicas cuantitativas incluyendo tomografía axial computarizada (CAT) tomografía computarizada (CT) o exploraciones de imágenes de resonancia magnética (MRI). Un profesional médico también puede usar diagnósticos más cualitativos para diagnosticar o evaluar a un sujeto que tiene un ictus, por ejemplo, evaluando la capacidad de un sujeto para sonreír, elevar una o ambas extremidades, decir frases sencillas y/o complejas de forma coherente, capacidad para andar o mantener el equilibrio o cualquier otro síntoma del ictus descrito en el presente documento.

Además de la administración de un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento, el ictus también puede tratarse por una diversidad de técnicas dependiendo del sujeto y la naturaleza de la afección. Los tratamientos habituales incluyen tromboectomía mecánica o administración de activador de plasminógeno tisular (tPA) u otros métodos de trombolisis.

(ii) Enfermedad cardíaca isquémica

La enfermedad cardíaca isquémica se caracteriza por flujo sanguíneo deteriorado o insuficiente al músculo cardíaco y puede estar causada por, por ejemplo, aterosclerosis en una o más arterias coronarias (enfermedad de las arterias coronarias), arritmias cardíacas, infarto de miocardio agudo, pérdida de la actividad del músculo cardíaco, o válvulas cardíacas defectuosas. La pérdida o reducción de flujo sanguíneo al corazón da como resultado daño al tejido muscular cardíaco isquémico, lo que puede provocar daño permanente al corazón y/o muerte del sujeto aquejado. Puede administrarse un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea, o localmente por inyección miocárdica o epicárdica) a un sujeto para aumentar el flujo sanguíneo a una o más regiones isquémicas del corazón para de este modo evitar o reducir el daño provocado por la isquemia. Cuando el sujeto sea uno en riesgo de desarrollar enfermedad cardíaca isquémica, puede administrarse neublastina para evitar la aparición, o reducir la gravedad, de isquemia cardíaca.

Los factores de riesgo para desarrollar enfermedad cardíaca isquémica incluyen, por ejemplo, mala dieta, obesidad, tabaquismo, periodos de tensión elevados y/o prolongados, historial familiar (por ejemplo, una predisposición

genética), estilo de vida sedentario, niveles de colesterol elevados y/o diabetes.

La enfermedad cardiaca isquémica puede diagnosticarse y/o evaluarse, por ejemplo, la gravedad y/o el número de síntomas de enfermedad cardiaca isquémica presentados por el sujeto. Los síntomas de enfermedad cardiaca isquémica varían y se distribuyen en gravedad e incluyen, pero sin limitación, uno o más de: dolor en el pecho, dolor del brazo izquierdo, dolor de la mandíbula, dolor del cuello, dolor de la espalda, sensación similar a ardor de estómago, apnea, piel pálida, sudoración profusa, debilidad, mareo, náuseas, vómitos, palpitaciones y/o fatiga. La enfermedad cardiaca isquémica puede diagnosticarse o evaluarse usando varias técnicas conocidas en este campo, incluyendo electrocardiograma (ECG), angiograma coronario, radiografía del pecho, ecocardiograma, y/o exploración de adquisición seleccionada múltiple (MUGA). La enfermedad cardiaca isquémica también puede diagnosticarse o evaluarse usando biomarcadores tales como el nivel de una o más enzimas cardiacas (por ejemplo, creatina quinasa, troponina I e isozimas de lactato deshidrogenasa) en la sangre de un sujeto. Los métodos adicionales para diagnosticar o evaluar a un sujeto que tiene enfermedad cardiaca isquémica incluyen ensayo de tensión en ejercicio, en el que se controla el corazón de un sujeto mientras que el sujeto se está ejercitando. Puede controlarse el ritmo cardiaco del sujeto, la respiración y la presión sanguínea. También puede realizarse un ECG (mencionado anteriormente).

Además de la administración de un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento, el tratamiento para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad cardiaca isquémica puede incluir la administración de oxígeno, ácido acetilsalicílico (aspirina), gliceril trinitrato y analgésicos. Se puede administrar a los pacientes en riesgo de desarrollar enfermedad cardiaca isquémica uno o más de agentes reductores de colesterol (por ejemplo, estatinas), bloqueadores beta o anti-hipertensores (por ejemplo, diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, vasodilatadores o bloqueadores alfa).

(iii) Úlceras

Las úlceras son lesiones cutáneas que resultan de flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado al área afectada (por ejemplo, un pie). Dichas úlceras pueden ser el resultado de complicaciones vasculares de diabetes (por ejemplo, úlceras diabéticas del pie), insuficiencia venosa (úlceras crurales), o presión excesiva (por ejemplo, úlceras de decúbito o llagas de decúbito). La pérdida o reducción de flujo sanguíneo a un área de la piel da como resultado daño y/o muerte de esa área de la piel y de tejido circundante. Puede administrarse un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento (por ejemplo, administrado por vía tópica a la úlcera de un sujeto) a un sujeto para aumentar el flujo sanguíneo en el sitio de la úlcera o tejido circundante, reduciendo de este modo la gravedad o duración de la úlcera. Cuando el sujeto está en riesgo de desarrollar una úlcera (por ejemplo, un sujeto paralizado en una posición prona o supina prolongada o un sujeto que tiene complicaciones cardiovasculares debido a la diabetes), puede administrarse neublastina al sujeto (por ejemplo, por administración tópica a las piernas y pies de pacientes diabéticos) para evitar la aparición, o reducir la gravedad, de una úlcera.

Los factores de riesgo para desarrollar úlceras cutáneas incluyen, por ejemplo, periodos prolongados de estar sentado o tumbado (por ejemplo, posiciones supina o prona), diabetes, venas varicosas (véase posteriormente), infección y/o escasa higiene.

Los métodos para diagnosticar y/o evaluar una úlcera en un sujeto incluyen inspección visual, por ejemplo, la aparición de la úlcera en sí misma, enrojecimiento, molestias o dolor. La inspección visual también puede usarse para comprobar con respecto a síntomas indicativos del desarrollo de úlceras incluyendo, por ejemplo, reducción del sudor, piel seca y formación de fisuras, y propensión a desarrollar infecciones en el área afectada. Los síntomas de flujo sanguíneo reducido al pie (y riesgo de desarrollar úlceras del pie, por ejemplo, resultantes con frecuencia de complicaciones de la diabetes) incluyen uñas frágiles, callos y dedos en martillo. La inspección visual también puede incluir evaluar el tamaño de la úlcera y/o si la úlcera está infectada o no. Un profesional médico puede administrar uno o más ensayos para determinar el nivel de flujo sanguíneo en un área que se sospecha que tiene flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado incluyendo medición de oxígeno transcutáneo (TCOM) y un ensayo de monofilamento de nailon. La TCOM requiere la colocación de electrodos directamente en el área sospechosa de la piel. Generalmente una presión de oxígeno medida de menos de 40 mm de Hg es un indicio de que el área es deficiente en un flujo sanguíneo. El ensayo de monofilamento de nailon es un ensayo de sensación que implica el uso de un monofilamento de nailon de calibre 10 para pinchar suavemente la piel afectada. El ensayo es anómalo si el sujeto no puede sentir el tacto del monofilamento cuando se presiona contra el pie con la presión justa suficiente para doblar el filamento.

Además de la administración de un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento, los tratamientos para úlceras cutáneas pueden implicar cirugía para retirar tejido muerto o infectado y la administración de antibióticos, cuando se requiera.

(iv) Venas varicosas

Las venas varicosas (insuficiencia venosa) es un trastorno caracterizado por una incapacidad de las venas (generalmente de las piernas) para transportar oxígeno desoxigenado de vuelta al corazón. La insuficiencia venosa

5 puede resultar de un trombo (coágulo sanguíneo) o daño a, o pérdida de elasticidad de, válvulas venosas. Puede administrarse un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento (por ejemplo, por vía tópica a las piernas del sujeto, por vía subcutánea o por vía intravenosa a las venas afectadas) a un sujeto para aumentar el flujo sanguíneo en las piernas de vuelta al corazón, reduciendo de este modo la gravedad de, o complicaciones debidas a, venas varicosas. Cuando el sujeto está en riesgo de desarrollar venas varicosas (por ejemplo, un sujeto que tiene uno o más factores de riesgo para venas varicosas), puede administrarse neublastina al sujeto para evitar la aparición, o reducir la gravedad, de las venas varicosas.

10 Los factores de riesgo para desarrollar venas varicosas incluyen, por ejemplo, edad avanzada, sexo del sujeto (las mujeres tienen más probabilidades que los hombres de desarrollar venas varicosas), historial familiar (por ejemplo, una predisposición genética), obesidad y/o profesiones que impliquen estar de pie durante periodos prolongados de tiempo.

15 La insuficiencia venosa puede diagnosticarse y/o evaluarse en un sujeto, por ejemplo, por la gravedad y/o número de síntomas presentados por el sujeto incluyendo, por ejemplo, dolor o pesadez en la pierna, pies y tobillos, hinchazón, úlceras de la piel o hemorragia grave si se daña la vena. Puede diagnosticarse o evaluarse VI en un sujeto usando una diversidad de técnicas incluyendo Ultrasonido doble o de Doppler, una técnica no invasiva que usa ultrasonidos para visualizar coágulos u otras anomalías en los vasos sanguíneos. Otros métodos para diagnosticar/evaluar la insuficiencia venosa incluyen exploración de CT, venografía, angiografía tal como rayos X o angiografía por resonancia magnética (MRA).

20 Además de la administración de un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento, los tratamientos para insuficiencia venosa pueden incluir, por ejemplo, cirugía con láser, scleroterapia/microescleroterapia, separación quirúrgica de las venas, flebectomía ambulatoria y cirugía venosa endoscópica. Las terapias no quirúrgicas incluyen, cuando se produce insuficiencia venosa en las piernas, elevación de las piernas, terapia de compresión (calcetines o medias de compresión), ejercicio, pérdida de peso y cuidado de la piel.

(v) Órganos trasplantados

30 Un trasplante de órganos es un proceso en el que un órgano completo o parcial se transfiere de un sujeto a otro sujeto. Los órganos trasplantados incluyen, por ejemplo, corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, páncreas, mano, dedo (del pie o de la mano), o piel (por ejemplo, un injerto cutáneo tal como un trasplante de cara; véase posteriormente). Para que un trasplante de órgano sea exitoso, debe producirse vascularización entre el órgano trasplantado y el hospedador. Por lo tanto, puede administrarse un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento a un sujeto para promover la vascularización entre el órgano trasplantado y el hospedador y un aumento del flujo sanguíneo al órgano trasplantado, evitando de este modo el fallo del injerto.

40 Un trasplante de órgano común es un injerto cutáneo, en el que se retira quirúrgicamente una región de la dermis de un área del cuerpo y se trasplanta a otra. Los injertos cutáneos pueden ser autólogos (del mismo sujeto) o pueden ser heterólogos (de un sujeto diferente). En algunos casos, el tejido cutáneo puede obtenerse de un animal de una especie diferente del sujeto receptor (por ejemplo, xenotrasplante). Pueden realizarse injertos cutáneos en un sujeto que haya, por ejemplo, padecido quemaduras extensivas o tenga infecciones cutáneas con áreas de pérdida de piel. En estos casos, se usan con frecuencia injertos cutáneos para minimizar la concentración bacteriana en el sitio de pérdida de piel y/o evitar la pérdida de fluidos. También se usan injertos cutáneos en cirugía cosmética, tal como cirugías electivas o las que acompañan procedimientos quirúrgicos tales como una mastectomía o reconstrucción de la pared torácica. Los injertos cutáneos pueden ser extensivos tales como un trasplante de cara completo o parcial. Como se ha analizado anteriormente, para que un injerto cutáneo sea exitoso, debe producirse vascularización entre el sitio de injerto y el tejido injertado. Por lo tanto, un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento puede administrarse a un sujeto para promover la vascularización entre la piel injertada y el hospedador para aumentar el flujo sanguíneo a la piel injertada, evitando de este modo el fallo del injerto.

50 El control del éxito de un injerto cutáneo puede realizarse de una diversidad de maneras incluyendo inspección visual, por ejemplo, comprobando el color de la piel injertada, controlando con respecto a un retorno de las sensaciones al área injertada, o controlando la temperatura de la piel injertada. El flujo sanguíneo en una región o regiones de la piel injertada puede medirse directamente, por ejemplo, usando control de perfusión de láser Doppler (véase posteriormente).

60 Un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado, como se usa en el presente documento, es un sujeto que tiene uno o más síntomas para un trastorno particular caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado (tal como cualquiera de los descritos en el presente documento). Por ejemplo, un sujeto que se sospecha que tiene un ictus puede ser uno que tenga uno o más síntomas de un ictus tales como, pero sin limitación: debilidad, entumecimiento, caída de un párpado (ptosis), reflejos reducidos (por ejemplo, náuseas, deglución), sensación reducida y debilidad muscular de la cara, afasia, apraxia o cualquier otro síntoma descrito en el presente documento.

65

Un sujeto en riesgo de desarrollar un trastorno caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado, como se usa en el presente documento, es un sujeto que tiene uno o más factores de riesgo de un trastorno particular caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado. Por ejemplo, un sujeto en riesgo de desarrollar enfermedad cardiaca isquémica puede ser un sujeto con uno o más factores de riesgo para desarrollar enfermedad cardiaca isquémica incluyendo, por ejemplo, mala dieta, obesidad, tabaquismo, periodos de tensión prolongados y/o elevados, estilo de vida sedentaria, niveles de colesterol elevados, diabetes o cualquier otro factor de riesgo descrito en el presente documento.

Puede administrarse un polipéptido de neublastina a un sujeto de diversas maneras dependiendo, al menos en parte, del tipo de trastorno que se trate y la localización en el cuerpo del flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado. Es decir, en realizaciones en las que un trastorno es de naturaleza cutánea, tal como una lesión cutánea, una úlcera de decúbito o una úlcera diabética (por ejemplo, úlcera de pie diabético), puede administrarse por vía tópica un polipéptido de neublastina. Por ejemplo, puede administrarse un polipéptido de neublastina a un sujeto en una crema, pomada o ungüento. Las composiciones de neublastina descritas en el presente documento también pueden infundirse en una venda, gasa o parche (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.307.717). En realizaciones en las que un trastorno caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado en un sujeto es interno (por ejemplo, un ictus, enfermedad cardiaca isquémica o trasplante de órganos), puede administrarse neublastina al sujeto por vía intravenosa, por vía subcutánea o localmente en el sitio en el que se necesita vascularización aumentada. Por ejemplo, puede administrarse neublastina a un riñón o corazón trasplantado y/o el tejido hospedador circundante durante una operación de trasplante.

Terapia de combinación

Puede administrarse un polipéptido de neublastina descrito en el presente documento a un sujeto como una monoterapia o como parte de un régimen multiterapéutico junto con uno o más agentes adicionales que proporcionan un beneficio terapéutico a un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado. Por ejemplo, puede coadministrarse un polipéptido de neublastina con un factor angiogénico adicional tal como Angiogenina, Angiopoyetina-1, Del-1, un factor de crecimiento de fibroblastos (por ejemplo, aFGF, bFGF o FGF2), Folistatina, Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), Interleucina-8 (IL-8), Leptina Midkina, Factor de Crecimiento Placentario, Factor de Crecimiento de Células Endoteliales Derivado de Plaquetas (PD-ECGF), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas BB (PDGF-BB), Pleiotropina (PTN), Progranulina, Proliferina, Factor de Crecimiento Transformante Alfa (TGF-alfa), Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF-beta), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNFalfa), y/o Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF). Además puede administrarse un polipéptido de neublastina en combinación con uno o más agentes terapéuticos que no aumentan la vascularización pero son de otro modo beneficiosos para un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado. Por ejemplo, puede coadministrarse un polipéptido de neublastina con uno cualquiera de un agente antitrombótico (por ejemplo, aspirina, estreptoquinasa, uroquinasa, activador de plasminógeno tisular, heparina o hirudina), un analgésico, un antibiótico, un agente reductor del colesterol (por ejemplo, una estatina), un beta bloqueador y/o un antihipertensor (por ejemplo, un diurético, un inhibidor de enzima convertidora de angiotensina, un vasodilatador o un alfa bloqueador). Cuando se usa un polipéptido de neublastina para aumentar la vascularización de un órgano que se ha trasplantado a un receptor (por ejemplo, un corazón, hígado, riñón, pulmón, extremidad tal como un dedo, o dermis trasplantado), el polipéptido de neublastina puede coadministrarse opcionalmente con uno o más agentes inmunosupresores.

El polipéptido de neublastina y el o los agentes adicionales pueden administrarse al mismo tiempo, el polipéptido de neublastina puede administrarse en primer lugar y el o los agentes adicionales administrarse en segundo lugar, o el o los agentes adicionales pueden administrarse en primer lugar y el polipéptido de neublastina administrarse en segundo lugar.

La neublastina puede opcionalmente reemplazar o aumentar una terapia administrada previamente o simultáneamente. Por ejemplo, tras tratar con un polipéptido de neublastina, la administración del o los agentes adicionales puede cesar o reducirse (por ejemplo, administrarse a menores niveles). En algunos casos, puede mantenerse una terapia previa hasta que el nivel de neublastina (por ejemplo, la dosificación o programa) alcance un nivel suficiente para proporcionar un efecto terapéutico al sujeto. En casos en los que una terapia previa es particularmente tóxica o se tolera escasamente por un sujeto, puede usarse la administración de un polipéptido de neublastina para compensar y/o reducir la cantidad de la terapia previa (por ejemplo, una terapia angiogénica) hasta un nivel suficiente para proporcionar el mismo beneficio terapéutico o uno mejorado, pero sin la toxicidad.

En algunos casos en los que un sujeto no responde a una primera terapia, puede administrarse a un sujeto neublastina. Por ejemplo, si el sujeto (por ejemplo, un paciente humano) no responde a un primer tratamiento tal como VEGF (u otro factor angiogénico descrito en el presente documento), puede administrarse al sujeto un polipéptido de neublastina. Como se usa en el presente documento, un "sujeto no sensible a un tratamiento" se refiere a un paciente en el que el tratamiento con una o más terapias angiogénicas por sí solas (es decir, no combinadas con neublastina) no da como resultado mejora clínica significativa, más particularmente no da como resultado una mejora significativa (y preferentemente a largo plazo) de los parámetros usados para medir la eficacia

angiogénica (tales como, pero sin limitación ensayo de ejercicio de cinta de correr (ETT o ensayo de tensión de ejercicio), tiempo de angina y frecuencia de angina) (véase, por ejemplo, Fam *et al.* (2003) *Circulation* 108: 2613). Un ejemplo de dicho grupo de sujetos que no responden a una terapia angiogénica de VEGF se describe en Henry *et al.* (2003) *Circulation* 107: 1359-1365.

5

Evaluación de la eficacia de los tratamientos

La eficacia de un tratamiento de neublastina puede evaluarse por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, controlando directamente el nivel de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos o evaluando una característica o síntoma particular de un trastorno caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado). Por ejemplo, la cantidad o densidad de vasculatura en el cerebro de un sujeto puede medirse (por ejemplo, antes y después del tratamiento) usando MRI (véase, por ejemplo, Dunn *et al.* (2004) *Magn Reson. Med.* 51(1): 55-61) o técnicas de ultrasonido tales como adaptaciones de las descritas en Fosberg *et al.* (2004) *Ultrasonics* 42(1): 325-330. El efecto del tratamiento con neublastina en la promoción de la neovascularización también puede evaluarse controlando un aumento en el flujo sanguíneo usando, por ejemplo, técnicas de láser Doppler como se describen en, por ejemplo, Freccero *et al.* (2003) *Microvasc Res.* 66(3): 183-9; y Rendell *et al.* (1989) *Diabetes* 38(7): 819-824. Un dispositivo ejemplar útil para medir el flujo sanguíneo cutáneo por técnica de láser Doppler es el DRT4 (Moor Instruments, Devon, Reino Unido). Además, la eficacia de la neublastina para promover la vascularización de un órgano trasplantado (por ejemplo, un riñón, corazón o piel trasplantado) puede medirse por un aumento en la función del órgano trasplantado o un aumento en la salud del órgano (por ejemplo, por biopsia) después del tratamiento.

10

15

20

25

La eficacia de un tratamiento puede valorarse evaluando al sujeto antes y después del tratamiento (por ejemplo, comparando la tensión de oxígeno en un área afectada antes o después del tratamiento). Cuando va a evaluarse la progresión de mejora en un trastorno después de uno o más tratamientos con neublastina, un sujeto puede evaluarse en múltiples puntos temporales después del tratamiento con neublastina (por ejemplo, una evaluación de un día, dos días y una semana; una evaluación de una semana, un mes y seis meses; una evaluación de un mes, seis meses y un año).

30

35

40

Cuando la administración de neublastina se usa para prevenir la aparición de un trastorno caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado (por ejemplo, una lesión tal como una úlcera del pie debida a complicaciones vasculares de la diabetes), la eficacia puede evaluarse como un retardo en la presentación de, o una incapacidad para presentar, uno o más síntomas del trastorno. La eficacia de un tratamiento a lo largo del tiempo para aliviar uno o más síntomas de un trastorno puede determinarse evaluando, por ejemplo, el número o gravedad de uno o más síntomas en múltiples puntos temporales después del tratamiento. Por ejemplo, un sujeto puede tener una evaluación inicial de la gravedad de su trastorno, administrarse un tratamiento y después evaluarse dos o más veces después del tratamiento (por ejemplo, a una semana y un mes; a un mes y dos meses; a dos semanas, un mes y seis meses; o seis semanas, seis meses y un año). Cuando se administran uno o más tratamientos de neublastina a un sujeto durante un periodo de tiempo limitado (por ejemplo, una duración predeterminada) o número de administraciones, el efecto del tratamiento en el alivio de uno o más síntomas de un trastorno caracterizado por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado puede evaluarse en diversos puntos temporales después del tratamiento final. Por ejemplo, después de la última administración de una dosis de neublastina, el número o gravedad de los síntomas de un paciente puede evaluarse en 1 mes (por ejemplo, en 2 meses, en 6 meses, en un año, en dos años, en 5 años o más) después del tratamiento final.

45

Modelos animales de trastornos caracterizados por flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado

Los Ejemplos posteriores describen un sistema de modelo animal *in vivo* útil para estudiar el efecto del tratamiento con neublastina en un trastorno isquémico. La eficacia de dicho tratamiento puede evaluarse por análisis directo del tejido isquémico, por ejemplo, midiendo la necesidad capilar en un músculo isquémico usando técnicas de inmunohistoquímica y/o midiendo el flujo sanguíneo en un músculo isquémico. Para evaluar la prevención o aparición retardada de un trastorno caracterizado por el flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado, también puede administrarse un polipéptido de neublastina a un animal antes de inducir el trastorno. Los modelos animales adicionales (por ejemplo, modelos de ratón) útiles para evaluar la eficacia de los tratamientos de neublastina para aumentar la vascularización incluyen los descritos en, por ejemplo, Couffinhal *et al.* (1988) *Am J. Pathol.* 152(6): 1667-1679; Cao *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(24): 14389-14394; y Salven *et al.* (2002) *FASEB J.* 16: 1471-1473. Se describe un modelo animal para curación de heridas deteriorada en diabetes en, por ejemplo, Tsuboi *et al.* (1992) *J. Dermatol.* 19(11): 673-75.

50

55

60

Ejemplos

Ejemplo 1: La neublastina promueve la neovascularización post-isquémica

Se usó un modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores para determinar si la administración de neublastina aumenta la vascularización en mamíferos. Se ligaron quirúrgicamente las arterias femorales derechas de las extremidades posteriores de ratones. Se administró neublastina por vía subcutánea tres veces por semana a una dosificación de 1 miligramo por kilogramo (mg/kg) o 0,1 mg/kg. Como alternativa, se administró a un conjunto de

65

ratones solamente vehículo (sin neublastina) como un control. Se evaluaron diez ratones en cada grupo. Veintiún días (3 semanas) después, los ratones se sacrificaron y se retiraron los músculos gastrocnemio.

5 Se evaluó la densidad de vasos por microangiografía de alta definición al final del periodo de tratamiento, como se describe en Silvestre *et al.* (2005) Nat. Med. 11(5): 499-506. Brevemente, se anestesió a los ratones (inhalación de isoflurano) y se inyectó un medio de contraste (sulfato de bario, 1 g/ml) a través de un catéter introducido en la aorta abdominal. Se ensamblaron imágenes (dos por animal) adquiridas por un transductor de rayos X digital para obtener una vista completa de las extremidades posteriores. La densidad de vasos se expresó como un porcentaje de
10 píxeles por imagen ocupada por vasos en el área de cuantificación. La zona de cuantificación se delineó por el lugar de la ligadura en la arteria femoral, la rodilla, el extremo del fémur, y el límite externo de la pierna. Ambas dosificaciones de neublastina aumentaron la puntuación angiográfica en músculos de extremidades posteriores isquémicas en comparación con el control solamente con vehículo (Fig. 2). Estos resultados indican que la administración de neublastina induce vascularización en tejido isquémico.

15 Ejemplo 2: La neublastina promueve el flujo sanguíneo cutáneo post-isquémico

Para determinar si el tratamiento con neublastina aumenta el flujo sanguíneo en tejido isquémico (por ejemplo, piel), se ligaron arterias femorales de ratón como se ha descrito anteriormente. Se administró neublastina de rata (la forma de 113 aminoácidos madura de la proteína) por vía subcutánea tres veces por semana durante tres semanas a un 1
20 mg/kg o 0,1 mg/kg. Como control, se trató un conjunto de ratones solamente con vehículo.

A los 7, 14 y 21 días, se retiró el pelo de un superficie pequeña de la piel de las extremidades posteriores isquémicas, y se evaluó el tejido expuesto para flujo sanguíneo usando control por perfusión de láser Doppler como se describe en, por ejemplo, Hisaka *et al.* (2004) J. Am. Coll. Cardiol. 43(10): 1915-22. Se realizaron mediciones
25 solamente en la pata. Se detectó un aumento de la perfusión de sangre cutánea de las extremidades isquémicas tratadas con neublastina a los 14 y 21 días (Fig. 3). Estos resultados indican que la administración de neublastina da como resultado aumento del flujo sanguíneo en tejido isquémico.

LISTA DE SECUENCIAS

30 <110> Biogen Idec MA Inc.
<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA AUMENTAR LA VASCULARIZACIÓN
35 <130> BIO13463PCTEP
<140> EP08747382.3
<141> 01-05-2008
40 <150> PCT/US2008/062265
<151> 01-05-2008
<150> 60/915,293
<151> 01-05-2007
45 <160> 12
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
50 <210> 1
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens
55 <400> 1

ES 2 476 253 T3

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

- 5 <210> 2
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Péptido generado sintéticamente
- <400> 2

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

- 15 <210> 3
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Péptido generado sintéticamente
- <400> 3

ES 2 476 253 T3

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

5 <210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 4

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

15 <210> 5
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 5

ES 2 476 253 T3

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

5 <210> 6
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 6

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

15 <210> 7
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 7

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

25

ES 2 476 253 T3

5 <210> 8
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

10 <400> 8

```

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

15 <210> 9
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20 <400> 9

```

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

25 <210> 10
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 10

ES 2 476 253 T3

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

<210> 11
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 11

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

10

ES 2 476 253 T3

<210> 12
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

5

<400> 12

```

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1, y en el que el polipéptido, cuando se dimeriza, se une con un complejo que contiene GFRalfa3 y RET, para su uso en el aumento de la vascularización en un tejido en un mamífero que muestra flujo sanguíneo deteriorado o inadecuado en el tejido, en el que:
- 10 a) el mamífero tiene una enfermedad isquémica;
b) el mamífero tiene una enfermedad cardiovascular;
c) el mamífero ha recibido un órgano trasplantado;
d) el tejido se localiza en una extremidad del mamífero y el mamífero tiene diabetes; o
e) el tejido comprende una lesión cutánea asociada con una úlcera diabética.
- 15 2. El polipéptido para uso como en la reivindicación 1, en el que el tejido es un tejido isquémico.
3. El polipéptido para uso como en la reivindicación 2, en el que el tejido isquémico es un tejido muscular isquémico.
4. El polipéptido para uso como en la reivindicación 1, en el que el mamífero ha padecido un ictus.
- 20 5. El polipéptido para uso como en la reivindicación 1, en el que el mamífero tiene una enfermedad cardíaca isquémica.
6. El polipéptido para uso como en la reivindicación 1, en el que el mamífero tiene isquemia resultante de venas varicosas.
- 25 7. El polipéptido para uso como en la reivindicación 1, en el que el mamífero tiene complicaciones isquémicas de diabetes.
8. El polipéptido para uso como en la reivindicación 1, en el que el mamífero ha padecido un infarto de miocardio.
- 30 9. El polipéptido para uso como en la reivindicación 1, en el que el mamífero tiene una enfermedad de las arterias coronarias.
10. El polipéptido para uso como en la reivindicación 1(c), en el que el órgano trasplantado es un corazón o dermis.
- 35 11. El polipéptido para uso como en la reivindicación 1(e), en el que la úlcera diabética es una úlcera de pie diabético.
12. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que uno o más de un agente antitrombótico, un agente reductor del colesterol, un beta bloqueador, un agente antihipertensor o un agente inmunosupresor van a administrarse al mamífero.
- 40 13. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que después de la administración del polipéptido, se determina si se ha producido vascularización aumentada.
- 45 14. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el polipéptido va a administrarse al mamífero mediante administración sistémica, subcutánea o local.
- 50 15. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que
- 55 a) la secuencia de aminoácidos es al menos 90 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1;
b) la secuencia de aminoácidos es al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1;
c) la secuencia de aminoácidos es al menos 98 % idéntica a los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1;
d) el polipéptido comprende los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 1, los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 2, los aminoácidos de 15-113 de SEC ID N°: 3, los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 4, los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 5, los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 8 o los aminoácidos 15-113 de SEC ID N°: 9; o
e) el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8 o la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9.
- 60 16. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el polipéptido comprende los aminoácidos 10-113 de SEC ID N°: 1.
- 65 17. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que no se ha diagnosticado al mamífero un trastorno neurológico.

18. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que no se ha diagnosticado al mamífero un trastorno ocular.

5 19. El polipéptido para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que el mamífero es un ser humano.

		10	20	30	40	50
Neublastina humana	1	MELGLGGLST	LSHCWPRRQ	PALWPTLAAL	ALLSSVAEAS	LGSAPRSPAP
Neublastina de ratón	1	MELGLAEPTA	LSHCLRPRWQ	SAWPTLAVL	ALLSCVTEAS	LDPMSRSPAA
Neublastina de rata	1	MELGLGEPTA	LSHCLRPRWQ	PALWPTLAAL	ALLSSVTEAS	LDPMSRSPAS
Neublastina humana	51	REGPPPVLAS	PACHLEGGRT	ARWESCRARR	PPPQSRPAP	PPPAP...P
Neublastina de ratón	51	RDGPPSVLAP	PTDHLPGGHT	AHLCSERTLK	PPPQSPQAP	PPPGPALQSP
Neublastina de rata	51	RDVPSVLAP	PTDYLPGGHT	AHLCSEKALR	PPPQSPQAP	PPPGPALQSP
Neublastina humana	97	SALPRGCRRA	RAGGPCSRAR	AACARGCRLR	SQVVPVRLG	LQHRSDDELVR
Neublastina de ratón	101	PAALRGARAA	RAGTRSSRAR	ITDARGCRLR	SQVVPVSALG	LGHSSDELIR
Neublastina de rata	101	PAALRGARAA	RAGTRSSRAR	ATDARGCRLR	SQVVPVSALG	LGHSSDELIR
Neublastina humana	147	FRFCSGSCRR	ARSPHDLSLA	SLLGAGALRP	PPGSRPVSQP	CCRPTRYEAV
Neublastina de ratón	151	FRFCSGSCRR	ARSQHDLSLA	SLLGAGALRS	PPGSRPISQP	CCRPTRYEAV
Neublastina de rata	151	FRFCSGSCRR	ARSPHDLSLA	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

+/- ETM * p < 0,05 frente a Veh

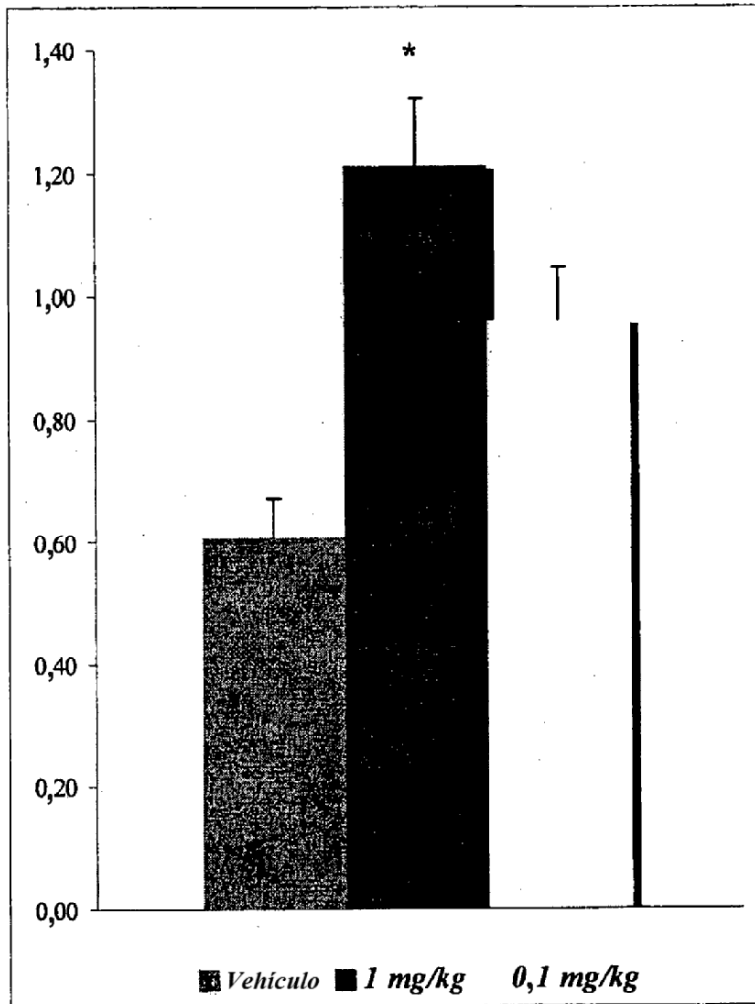


Fig. 2

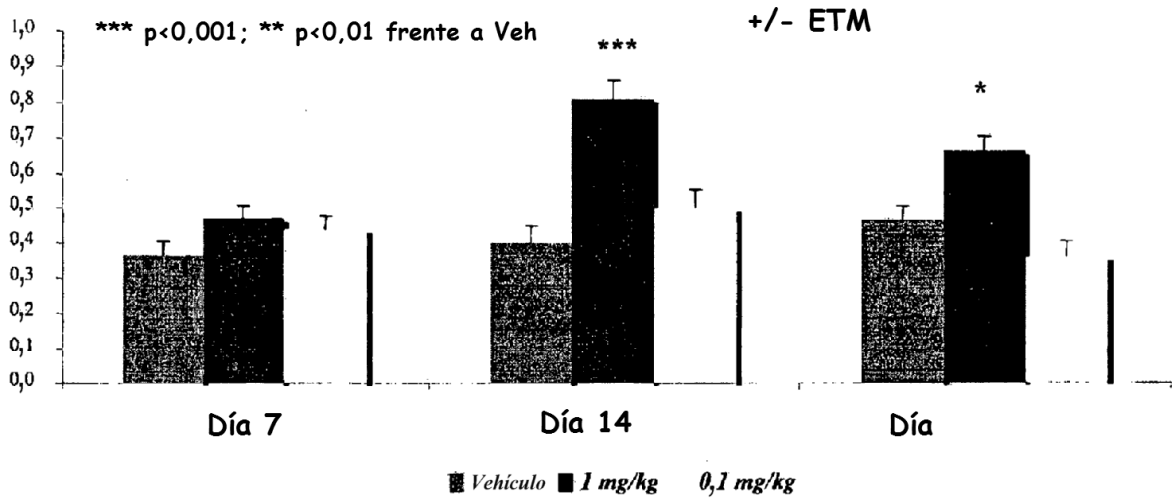


Fig. 3