

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 180**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2007 PCT/DK2007/000567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2008 WO08074329**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 07846437 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2120997**

54 Título: **Modulación de la actividad de proneurotrofinas**

30 Prioridad:

21.12.2006 DK 200601692
16.01.2007 US 880771 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2017

73 Titular/es:

H. LUNDBECK A/S (100.0%)
OTTILIAVEJ 9
2500 VALBY, DK

72 Inventor/es:

ANDERSEN, OLAV MICHAEL y
NYKJÆR, ANDERS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 624 180 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

Modulación de la actividad de proneurotrofinas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra una parte extracelular de la sortilina y capaz de inhibir la unión de una proneurotrofina a un sitio de unión de un receptor sortilina, en donde el anticuerpo se une al motivo de unión para proneurotrofina de acuerdo con SEQ ID NO: 25, 26, 27 o 28 o a un fragmento del mismo. Además, en el presente documento se describen composiciones que son útiles en la inhibición de la actividad de proneurotrofinas, así como métodos para la preparación y el uso de las mismas. También se proporcionan métodos para el escrutinio de agentes para uso en dichas composiciones.

10 Antecedentes de la invención*La familia de las neurotrofinas*

15 Las neurotrofinas son hormonas peptídicas dímeras. El primer miembro de la familia de las neurotrofinas que se descubrió fue el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés "nerve growth factor"), que desempeña un papel importante en procesos tales como el desarrollo de neuronas sensoriales y simpáticas del sistema nervioso periférico (Levi-Montalcini, R. y Angeleeti, P.U., *Physiol. Rev.* 48, 534-569 (1968)). El siguiente miembro de la familia de las neurotrofinas que se aisló fue el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés "brain-derived neurotrophic factor"), también conocido como neurotrofina-2 (NT-2), cuya secuencia fue publicada por Leibrock, J. et al. en 1989 (*Nature* 341, 149-152). En 1990, varios grupos identificaron un factor neurotrófico originalmente denominado factor neuronal (NF, del inglés "neuronal factor"), que ahora se conoce como neurotrofina-3 (NT-3) (Ernfors et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5454-5458 (1990); Hohn et al., *Nature* 344, 339; Mai-sonpierre et al., *Science* 247, 1446; Rosenthal et al., *Neuron* 4, 767; Jones y Reichardt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8060-8064; Kaisho et al., *FEBS Lett.* 266, 187). Las neurotrofinas 4 y 5 se añadieron después a la familia (*Neuron* 6, 845-858 (1991); Berkmeier, L. R. et al., *Neuron* 7, 857-866 (1991); Ip et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3060-3064 (1992)). Los efectos de las neurotrofinas dependen de sus niveles de disponibilidad, la afinidad de su unión a receptores transmembranales y las cascadas de señalización aguas abajo que se estimulan después de la activación del receptor.

Receptores de la familia de las neurotrofinas

30 De una manera similar a otros factores de crecimiento polipeptídicos, las neurotrofinas influyen en sus células diana a través de interacciones con receptores de la superficie celular. Según los conocimientos actuales, las neurotrofinas se unen a dos tipos de receptores discretos que se pueden distinguir farmacológicamente: los receptores de neurotrofinas Trk y p75^{NTR}. p75^{NTR} es un miembro de la familia de receptores Fas/factor de necrosis tumoral (TNF), y puede interactuar con todos los miembros mamíferos de la familia de neurotrofinas con afinidades iguales (Rodríguez-Tebar et al. 1990, *Neuron* 4:487-492; Barker y Murphy, 1992, *Mol. Cell. Biochem.* 100:1-15). Las células que expresan TrkA, un receptor de tirosina cinasa identificado originalmente como un oncogén humano (Mltin-Zanca et al., *Nature* 319:743-748) se unen únicamente a NGF y muestran una cinética de disociación significativamente más lenta (Jing et al. 1992, *Neurol.* 9:1067-1079; Loeb y Greene, 1993, *Neuroscience* 13: 2919-2929). El BDNF se une solamente al receptor TrkB, pero NT-3 se puede unir a los tres receptores Trk (A, B y C), con preferencia a TrkC. NT-4/5 se puede unir tanto a TrkA como a TrkB (Ip et al. *PNAS* 89: 3060-3064; Klein et al. *Neuron* 9:947-956). NT-7 no interactúa con TrkB o TrkC, pero sin embargo puede inducir la fosforilación de tirosina de TrkA, indicando una especificidad de receptor similar a la de NGF (Nilsson et al., *FEBS Lett* (1998) Mar 13; 424(3):285-90). La NT-6 recombinante purificada también tiene un espectro de acciones similares a NGF pero con una potencia inferior (Gotz et al., *Nature* (1994) Nov 17; 372(6503):266-9).

La familia de las neurotrofinas: proteínas precursoras

45 La biología de la familia de las neurotrofinas es compleja: las neurotrofinas se sintetizan intracelularmente como proteínas precursoras de 30-35 kDa, que contienen un péptido señal, un prodominio y sitios de glicosilación. Durante el procesamiento, las proteínas precursoras también se escinden en un sitio de escisión dibásico a través de la furina, una proteasa de serina dependiente de calcio y otros miembros de la familia de convertasas de prohormonas, dentro del aparato de Golgi. El producto C-terminal de esta escisión de 12-14 kDa es la neurotrofina madura, biológicamente activa (Seidah et al., *Biochem. J.* (1996) 314:951-960).

Funciones clínicamente relevantes de la familia de las neurotrofinas

50 Las neurotrofinas tienen un interés clínico ya que desempeñan un papel importante en la supervivencia y la diferenciación de las células neuronales (Thoenen 1991, *Trends Neurosci.* 14: 165-170; Raffioni et al. 1991, *Ann. Rev. Biochem.* 62:823-850; Chao, 1992, *Neuron* 9:583-593; Barbacid 1993, *Oncogene* 8:2033-2042). Los receptores Trk transmiten señales que favorecen la supervivencia neuronal, mientras que p75^{NTR} puede inducir la apoptosis neuronal, así como la supervivencia neuronal en función de la coexpresión de Trk (Miller et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 58:1045-1053 (2001)). Ciertamente, se ha demostrado que la activación de los receptores TrkA puede neutralizar el efecto proapoptótico de p75^{NTR} en algunos tejidos pero no en todos (Yoon et al., *J. Neurosci.* (1998) 18:3273-3281; Volosin

et al., J. Neurosci. (2006) 26:7756-7766).

Se ha demostrado que los propéptidos de las neurotrofinas tienen funciones biológicas importantes: al menos tres proteínas precursoras de neurotrofinas, proNGF, proBDNF y proNT-3 y sus productos homólogos proteolíticamente procesados y maduros, NGF, BDNF, NT-3, activan de forma diferencial respuestas celulares pro- y anti-apoptóticas, a través de una activación preferencial de los receptores p75^{NTR} y Trk, respectivamente - teniendo pro-NGF una afinidad incrementada hacia los receptores p75^{NTR} y una afinidad reducida hacia los receptores Trk, en relación con las formas maduras de NGF. De hecho, se ha demostrado que pro-NGF induce la apoptosis dependiente de p75^{NTR} en neuronas cultivadas con una activación mínima de la diferenciación o la supervivencia mediada por TrkA (Lee et al., Science (2001), 294:1945-1948).

Además, las neurotrofinas tienen un interés clínico, ya que se sabe que tanto la regulación al alza de las neurotrofinas como el aumento de la expresión de p75^{NTR} tienen lugar en condiciones patológicas e inflamatorias, especialmente después de una lesión nerviosa y daño en el sistema vascular. De hecho, Soilu-Hanninen et al. han demostrado que las funciones proapoptóticas de p75^{NTR} están directamente implicadas en la apoptosis inducida por lesión (Soilu-Hanninen et al., J. Neurosci. 19:4824-4838 (1999)). Recientemente, también se ha demostrado que proNGF induce la muerte mediada por p75 de oligodendrocitos y neuronas corticoespinales, después de una lesión de la médula espinal (Beatty et al., Neuron (2002), vol. 36, págs. 375-386; Giehl et al., Proc. Acad. Sci. USA (2004), vol. 101, págs. 6226-30) y la muerte de neuronas del proencéfalo basal como respuesta a convulsiones inducidas por ácido caínico (Volosin et al., J. Neuroscience (2006), vol. 26, págs. 7756- 7766).

Se ha presentado la hipótesis de que un desequilibrio entre el precursor y la forma madura de los factores neurotróficos es responsable de la degeneración de poblaciones neuronales selectivas, como ocurre en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica, y que la aplicación de un factor neurotrófico correspondiente podría evitar la degeneración neuronal [Appel, S. H., "A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism, and Alzheimer's disease", Ann. Neurol. 10:499-505 (1981), Cunello C y Bruno M.A., Neurochem. Res. (2007) 32:1041-45].

Otra razón para el interés en dirigirse a las vías de las neurotrofinas para una terapia, es que los estudios han proporcionado evidencias consistentes de la participación de las neurotrofinas en la depresión y la acción antidepresiva (Duman et al. Arch Gen Psychiatry (1997) 54: 597-606); por ejemplo, la infusión de BDNF en el hipocampo ha producido un efecto antidepresivo en dos modelos de comportamiento de la depresión (Shirayama et al. (2002), J Neurosci 22(8):3251-3261). Además, se ha encontrado que un solo polimorfismo de nucleótidos en el gen *bdnf* que conduce a una sustitución de valina (Val) por metionina (Met) en el codón 66 en el prodominio (BDNF_{Met}), estaba asociado con una mayor susceptibilidad en los seres humanos heterocigotos hacia el polimorfismo, trastornos neurosiquiátricos incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la depresión y el trastorno bipolar (Chen et al., J. Neuroscience (2005), vol. 25:6156-6166; Kuipers y Bramham Curr. Opin. Drug Discov. Devel. (2006) 9(5):580-6; Bath y Lee, Cogn. Affect. Behav. Neurosci. (2006) 1:79-85). Además, los seres humanos heterocigotos para BDNF_{Met} han mostrado tener alteraciones de la memoria (Egan et al., Cell (2003) 1 vol. 112, págs. 257-269).

La familia de receptores con dominio Vps10p

La sortilina (o NTR-3 o GP95), (SEQ ID NO. 1) es un receptor de membrana de tipo I que se expresa en una serie de tejidos, incluyendo el cerebro, la espina dorsal, los testículos y el músculo esquelético (Petersen et al., J. Biol. Chem., 272: 3599-3605 (1997); Herman-Borgmeyer et al., Mol. Brain Res., 65: 216-219 (1999)). La sortilina pertenece a una familia de receptores que comprenden sortilina, SorLA (Jacobsen et al., J. Biol. Chem., 271: 31379-31383 (1996)), SorCS1, SorCS2 y SorCS3. Todos los receptores de esta familia comparten la característica estructural de un dominio N-terminal de aproximadamente 600 aminoácidos con una fuerte semejanza a cada uno de los dos dominios que constituyen la porción luminal del receptor de clasificación de levadura Vps10p (Marcusson, E.G. et al., Cell, 77: 579-586 (1994)). El dominio Vps10p comprende un segmento C-terminal que contiene 10 cisteínas conservadas y un pro-péptido N-terminal de 40-80 aminoácidos.

En la sortilina, el propéptido muestra una elevada afinidad de la unión con el receptor totalmente procesado. La prevención de una escisión del propéptido inhibe esencialmente la unión del ligando a la sortilina, lo que indica que el propéptido impide estéricamente que los ligandos tengan acceso a sus sitios de unión sobre el receptor (Petersen et al., EMBO J., 18: 595-604, 1999).

Se han conseguido algunos progresos en el entendimiento de la función de esta familia: existen evidencias que sugieren que la sortilina contiene al menos motivos YXXΦ y de dileucina, que conforman señales potentes para la clasificación en endosomas y Golgi (Nielsen et al., EMBO 20(9):2180-2190). Es probable que los otros miembros de la familia también puedan ser útiles en una función de "clasificación" similar, no inferior porque todos muestran homología con Vps10p, el receptor de clasificación para la carboxipeptidasa Y (CPY) en levaduras. Solo una pequeña proporción de los receptores sortilina están presentes sobre la superficie celular (Mazella et al., J. Biol. Chem. (1998) 273, 26273-26276; Morris et al. J. Biol. Chem. (1998) 273: 3582-3587), aunque la expresión sobre la membrana superficial se puede regular al alza mediante estímulos que incluyen insulina en adipocitos 3T3-L1 (Morris et al. J. Biol. Chem. (1998) 273:3582-3587) y neurotensina en neuronas embrionarias (Chabry et al., J. Biol. Chem. (1993), 286: 17138-17144).

Inhibición de la actividad proneurotrofina: el estado actual de la técnica

Ciertamente, el entendimiento actual de las funciones biológicas de las neurotrofinas hace que la familia de las neurotrofinas sea una diana atractiva para la intervención terapéutica, y se conocen algunos métodos para la modulación de la actividad de las neurotrofinas:

- 5 Mehar M et al., Eur. J. Neurosci. (2006) 24:1575-1580 y Massa S.M. et al., J. Neurosci. (2006), 26:5288-5300, describen cómo p75 se puede utilizar como una diana de fármaco para interferir con la inducción de la muerte después de la unión del ligando (por ejemplo, proNGF) a p75.

El documento WO 2004/056385 describe métodos generales para inhibir la unión entre los receptores con dominio Vps10-P y neurotrofinas/proneurotrofinas, pero no describe el sitio de unión específico.

10 **Compendio de la invención**

Los presentes inventores han identificado ahora el sitio de unión de las proneurotrofinas sobre el receptor sortilina.

- 15 La presente descripción proporciona al menos un agente capaz de inhibir la unión de una proneurotrofina a un sitio de unión de un receptor sortilina, en donde dicha proneurotrofina se une a un sitio de unión en la sortilina que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO. 25, y en donde dicho agente, o bien se une a dicho sitio de unión, o comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO. 25 o a un fragmento de la misma, en la preparación de un medicamento, para tratar y/o prevenir y/o mejorar enfermedades, trastornos y degeneración neurológicos, de neuropsiquiatría y/u oculares, obesidad, diabetes, dolor y/o nocicepción en un animal.

- 20 En un aspecto adicional, en la presente descripción, el al menos un agente se une a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 26 y/o SEQ ID NO. 27 y/o SEQ ID NO. 28, inhibiendo de este modo la unión de una proneurotrofina a un receptor sortilina.

En un aspecto adicional, el al menos un agente se une a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el prodominio de una proneurotrofina, inhibiendo de este modo la unión de dicha proneurotrofina a un receptor sortilina.

- 25 En aún otro aspecto, la presente descripción proporciona al menos un agente capaz de inhibir la unión de una proneurotrofina a un receptor sortilina, teniendo dicho al menos un agente al menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 33, SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 36, SEQ ID NO. 37, SEQ ID NO. 38, SEQ ID NO. 39, SEQ ID NO. 40, SEQ ID NO. 41 y SEQ ID NO. 42, en la preparación de un medicamento, para tratar y/o prevenir y/o mejorar enfermedades, trastornos y degeneración neurológicos, de neuropsiquiatría y/u oculares, obesidad, diabetes, dolor y/o nocicepción en un animal.

- 30 En otro aspecto, los agentes de la presente descripción son capaces de inhibir la actividad de una o varias proneurotrofinas en un animal y métodos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un individuo mediante la inhibición de la actividad de la neurotrofina. Por consiguiente, en un aspecto la presente descripción se refiere a un método para inhibir la actividad de al menos una proneurotrofina en un animal, que comprende administrar a dicho animal una cantidad suficiente de un agente capaz de

- (i) unirse a un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p y/o
- (ii) interferir en la unión entre un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p y una proneurotrofina y/o
- 40 (iii) disminuir la expresión de un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p.

En un aspecto adicional, los agentes de la presente descripción proporcionan agentes que impiden la interacción física entre p75^{NTR} y sortilina.

- 45 Otro aspecto de la presente descripción se refiere a un método o uso de al menos un agente capaz de disminuir la actividad de los receptores con dominio Vps10p en la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir y/o mejorar enfermedades, trastornos y degeneración neurológicos, de neuropsiquiatría y/u oculares, obesidad, diabetes, dolor y/o nocicepción en un animal.

- 50 También se describen métodos para el escrutinio de agentes capaces de modular la actividad proneurotrofina y agentes seleccionados que emplean estos métodos de escrutinio, ya que son métodos para determinar el efecto de un agente sobre una o varias proneurotrofinas en las células. La presente descripción también se refiere a métodos para modular el transporte de una o varias proneurotrofinas.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes de la descripción y su uso para

prevenir, tratar y/o aliviar enfermedades relacionadas con la proneurotrofina.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

5 El término inhibición, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a la prevención de la unión entre dos o más componentes. En la presente invención, se proporcionan anticuerpos capaces de inhibir la unión entre un receptor con dominio Vps10p y una proneurotrofina.

10 El término "unión", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a la atracción o unión temporal o de mayor duración entre dos o más restos entre sí, mediada por fuerzas físicas tales como, por ejemplo, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, interacciones dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno. La expresión "interacción hidrofóbica", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier interacción que se produce entre componentes esencialmente no polares (hidrofóbicos) localizados dentro de sus respectivos alcances de atracción en un entorno polar (por ejemplo, agua). Tal como se usa en la presente memoria, el alcance de la atracción está en una escala de aproximadamente 100 nm. Un tipo particular de interacción hidrofóbica es la ejercida por las "fuerzas de Van der Waals", es decir, las fuerzas de atracción entre moléculas no polares que se contabilizan por mecánica cuántica. Las fuerzas de Van der Waals generalmente se asocian con momentos dipolares puntuales, inducidos por moléculas colindantes y que implican cambios en la distribución electrónica. La expresión "enlace de hidrógeno", tal como se usa en esta memoria, se refiere a una fuerza de atracción, o un puente, que puede producirse entre un átomo de hidrógeno que está enlazado covalentemente con un átomo electronegativo, por ejemplo, oxígeno, azufre o nitrógeno, y otro átomo electronegativo. El enlace de hidrógeno puede tener lugar entre un átomo de hidrógeno de una primera molécula y un átomo electronegativo de una segunda molécula (enlace de hidrógeno intermolecular). También el enlace de hidrógeno se puede producir entre un átomo de hidrógeno y un átomo electronegativo, en donde ambos están contenidos en una sola molécula (enlace de hidrógeno intramolecular). La expresión "interacción electrostática", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier interacción que se produce entre componentes cargados, moléculas o iones, debida a fuerzas de atracción que aparecen cuando los componentes con carga eléctrica opuesta se ven atraídos entre sí. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación: interacciones iónicas, interacciones covalentes, interacciones entre un ion y un dipolo (ion y molécula polar), interacciones entre dos dipolos (cargas parciales de moléculas polares), enlaces de hidrógeno y enlaces de dispersión de London (dipolos inducidos de moléculas polarizables). Por tanto, por ejemplo, una "interacción iónica" o una "interacción electrostática" se refiere a la atracción entre una primera molécula cargada positivamente y una segunda molécula cargada negativamente. Las interacciones iónicas o electrostáticas incluyen, por ejemplo, la atracción entre un agente bioactivo cargado negativamente (ejemplos relevantes en esta invención). La expresión "interacción dipolo-dipolo", tal como se usa en esta memoria, se refiere a la atracción que se puede producir entre dos o más moléculas polares. Por tanto, "interacción dipolo-dipolo" se refiere a la atracción del extremo no cargado parcialmente positivo de una primera molécula polar con el extremo no cargado parcialmente negativo de una segunda molécula polar. Las "interacciones dipolo-dipolo" también se refieren a enlaces de hidrógeno intermoleculares.

40 Equivalentes funcionales y variantes de polinucleótidos que codifican un modulador de la actividad de proneurotrofina y polipéptidos que comprenden un modulador de la actividad de proneurotrofina de este tipo: en la presente memoria "equivalentes funcionales" y "variantes" se usan indistintamente en esta memoria. En un aspecto preferido de la descripción, también se proporcionan variantes de un modulador de la actividad de proneurotrofina y variantes de fragmentos del mismo. Cuando son polipéptidos, las variantes se determinan en base a su grado de identidad o a su homología con una secuencia de aminoácidos predeterminada, siendo dicha secuencia de aminoácidos predeterminada una de SEQ ID NO: modulador de la actividad de proneurotrofina o, cuando la variante es un fragmento, un fragmento de cualquiera de las secuencias de aminoácido mencionadas anteriormente, respectivamente.

45 El término inhibición de la unión entre una proneurotrofina y un receptor sortilina, tal y como se emplea en este documento, se refiere a un método para proporcionar un agente capaz de evitar la unión de una proneurotrofina con un receptor sortilina y, en particular, la unión a una parte del receptor sortilina que comprende cualquiera de las SEQ ID NO. 25 a 28 o cualquier fragmento o variante de las mismas, o la unión de dicho agente a dicha proneurotrofina, evitando de este modo la unión de dicha proneurotrofina a SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 27 o SEQ ID NO. 28 o a cualquier fragmento o variante de las mismas.

50 Por consiguiente, las variantes preferiblemente presentan al menos un 70% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 72% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 75% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80% de identidad de secuencia, tal como al menos un 85% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 90% de identidad de secuencia, tal como al menos un 91% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 91% de identidad de secuencia, tal como al menos un 92% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 93% de identidad de secuencia, tal como al menos un 94% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 95% de identidad de secuencia, tal como al menos un 96% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 97% de identidad de secuencia, tal como al menos un 98% de identidad de secuencia, por ejemplo, un 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias predeterminadas.

La identidad de secuencia se determina en una realización utilizando fragmentos de péptidos de modulador de la

actividad de proneurotrofina que comprenden al menos 25 aminoácidos contiguos y que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 80%, tal como un 85%, por ejemplo, un 90%, tal como un 95%, por ejemplo, un 99%, a la secuencia de aminoácidos de cualquiera entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, respectivamente, en donde el porcentaje de identidad se determina mediante los algoritmos GAP, BESTFIT o FASTA en el paquete de programas informáticos Wisconsin Genetics versión 7.0, usando los pesos de huecos por defecto.

Las siguientes expresiones se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia predeterminada", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial".

Una "secuencia predeterminada" es una secuencia definida, usada como base para una comparación de secuencias; una secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia de mayor tamaño, por ejemplo, como un segmento de una secuencia de ADN de longitud completa o de un gen, dada en un listado de secuencias, tal como una secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 1, o puede comprender una secuencia completa de ADN o génica. Generalmente, una secuencia predeterminada tiene al menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente al menos 25 nucleótidos de longitud y de ordinario al menos 50 nucleótidos de longitud.

Puesto que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótido completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se llevan a cabo típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos, en donde una secuencia de polinucleótido se puede comparar con una secuencia predeterminada de al menos 20 nucleótidos contiguos y en donde la porción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, en comparación con la secuencia predeterminada (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

Un alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de programas informáticos de Wisconsin Genetics versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis) o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, el que produce el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generado por los diversos métodos.

La expresión "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos son idénticas (es decir, en una base nucleótido a nucleótido) en la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las se da una base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias, para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. La expresión "identidad sustancial" tal como se usa en la presente memoria, indica una característica de una secuencia de polinucleótido, en donde el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos del 90 al 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia predeterminada en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, frecuentemente en una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia predeterminada con la secuencia de polinucleótido que puede incluir deleciones o adiciones con un total del 20 por ciento o menos de la secuencia predeterminada en la ventana de comparación. La secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia de mayor tamaño, como un segmento de la secuencia del polinucleótido de longitud completa SEQ ID NO: 1 presentada en la presente memoria.

Tal y como se aplica a los polipéptidos, un grado de identidad de secuencias de aminoácido es una función del número de aminoácidos idénticos en posiciones compartidas por las secuencias de aminoácido. Un grado de homología o de similitud de secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos, es decir, está relacionado con la estructura, en posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos.

Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40% de identidad, aunque preferiblemente menos del 25% de identidad, con una de las secuencias de polipéptido de modulador de la actividad de proneurotrofina de la presente descripción. La expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias de péptidos, cuando están alineadas de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos un 80% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 90 por ciento de iden-

idad de secuencia, más preferiblemente al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos.

5 Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la posibilidad de intercambiar residuos que tiene cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas de hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amidas es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos preferidos de sustitución conservadora de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

15 Adicionalmente, también se determinan variantes en base a un número predeterminado de sustituciones conservadoras de aminoácidos, tal como se define en la presente memoria más adelante. Tal como se usa en esta memoria, una sustitución conservadora de aminoácidos se refiere a la sustitución de un aminoácido (dentro de un grupo de aminoácidos predeterminado) por otro aminoácido (dentro del mismo grupo), en donde los aminoácidos muestran características similares o sustancialmente similares.

20 Dentro del significado de la expresión "sustitución conservadora de aminoácidos", tal como se aplica en esta memoria, un aminoácido puede estar sustituido por otro dentro de los grupos de aminoácidos indicados en esta memoria a continuación:

- i) Aminoácidos que tienen cadenas laterales polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr y Cys).
- ii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro y Met).
- iii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala, Val, Leu, Ile).
- iv) Aminoácidos que tienen cadenas laterales cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro).
- 25 v) Aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp).
- vi) Aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas (Asp, Glu).
- vii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His).
- viii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida (Asn, Gln).
- ix) Aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxilo (Ser, Thr).
- 30 x) Aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre (Cys, Met).
- xi) Aminoácidos neutros ligeramente hidrofóbicos (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr).
- xii) Aminoácidos ácidos hidrofílicos (Gln, Asn, Glu, Asp), y
- xiii) Aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Ile, Val).

35 Por consiguiente, una variante o un fragmento de la misma de acuerdo con la descripción puede comprender, dentro de la misma variante de la secuencia o fragmentos de la misma, o entre diferentes variantes de la secuencia o fragmentos de la misma, al menos una sustitución, tal como una pluralidad de sustituciones introducidas independientemente unas respecto a las otras.

40 Es evidente a partir de lo descrito anteriormente que la misma variante o un fragmento de la misma puede comprender más de una sustitución conservadora de aminoácido entre más de un grupo de aminoácidos conservadores tal como se han definido en esta memoria anteriormente.

45 La adición o delección de al menos un aminoácido puede ser una adición o delección desde preferiblemente 2 a 250 aminoácidos, tal como de 10 a 20 aminoácidos, por ejemplo, de 20 a 30 aminoácidos, tal como de 40 a 50 aminoácidos. Sin embargo, dentro de la presente descripción también se contemplan adiciones o delecciones de más de 50 aminoácidos, tal como adiciones de 50 a 100 aminoácidos, la adición de 100 a 150 aminoácidos, la adición de 150-250 aminoácidos. La delección y/o la adición pueden ser - independientemente una de la otra - una delección y/o una adición dentro de una secuencia y/o al final de una secuencia.

50 Los fragmentos de polipéptido de acuerdo con la presente descripción, incluyendo cualquier equivalente funcional de los mismos, pueden comprender en un aspecto menos de 250 residuos de aminoácido, tal como menos de 240 residuos de aminoácido, por ejemplo, menos de 225 residuos de aminoácido, tal como menos de 200 residuos de aminoácido, por ejemplo, menos de 180 residuos de aminoácidos, tal como menos de 160 residuos de aminoácido,

- por ejemplo, menos de 150 residuos de aminoácido, tal como menos de 140 residuos de aminoácido, por ejemplo, menos de 130 residuos de aminoácido, tal como menos de 120 residuos de aminoácido, por ejemplo, menos de 110 residuos de aminoácido, tal como menos de 100 residuos de aminoácido, por ejemplo, menos de 90 residuos de aminoácido, tal como menos de 85 residuos de aminoácido, por ejemplo, menos de 80 residuos de aminoácido, tal como menos de 75 residuos de aminoácido, por ejemplo, menos de 70 residuos de aminoácido, tal como menos de 65 residuos de aminoácido, por ejemplo, menos de 60 residuos de aminoácido, tal como menos de 55 residuos de aminoácido, por ejemplo, menos de 50 residuos de aminoácido.
- "Equivalencia funcional", tal como se usa en la presente descripción, se establece de acuerdo con una realización preferida mediante una referencia a la funcionalidad correspondiente de un fragmento predeterminado de la secuencia.
- Debe entenderse que los equivalentes o variantes funcionales de un modulador de la actividad de proneurotrofina presentan secuencias de aminoácidos que difieren gradualmente de la secuencia de modulador de la actividad de proneurotrofina predeterminada preferida, así como el número y el alcance de las inserciones, deleciones y sustituciones que incluyen un aumento de las sustituciones conservadoras. Esta diferencia se mide como una reducción de la homología entre la secuencia predeterminada preferida y el fragmento o el equivalente funcional.
- Todos los fragmentos o equivalentes funcionales de SEQ ID NO: modulador de la actividad de proneurotrofina se incluyen dentro del alcance de esta descripción, independientemente del grado de homología que muestren con respecto a las respectivas secuencias de modulador de la actividad de proneurotrofina predeterminadas, descritas en esta memoria. La razón de esto es que algunas regiones del modulador de la actividad de proneurotrofina tienen mayor probabilidad de ser fácilmente mutables, o capaces de estar completamente delecionadas, sin ningún efecto significativo sobre la actividad de unión del fragmento resultante.
- Una variante funcional obtenida mediante sustitución puede presentar claramente alguna forma o grado de actividad de modulador de la actividad de proneurotrofina natural, y aun así ser menos homóloga, si se sustituyen los residuos que contienen cadenas laterales de aminoácido funcionalmente similares. En este sentido, funcionalmente similar se refiere a características dominantes de las cadenas laterales, tal como ser hidrofóbicas, básicas, neutras o ácidas, o la presencia o ausencia de masa estérica. Por consiguiente, en una realización de la descripción, el grado de identidad no es una medida principal de que un fragmento sea una variante o un equivalente funcional de un fragmento predeterminado preferido de acuerdo con la presente descripción.
- La homología entre secuencias de aminoácidos se puede calcular usando matrices de puntuación bien conocidas, tales como una cualquiera entre BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85 y BLOSUM 90.
- Los fragmentos que comparten homología con fragmentos de SEQ ID NO: 1 a 42, respectivamente, deben considerarse dentro del alcance de la presente descripción cuando tienen preferiblemente al menos aproximadamente un 90 por ciento de homología, por ejemplo, al menos un 92 por ciento de homología, tal como al menos un 94 por ciento de homología, por ejemplo, al menos un 95 por ciento de homología, tal como al menos un 96 por ciento de homología, por ejemplo, al menos un 97 por ciento de homología, tal como al menos un 98 por ciento de homología, por ejemplo, al menos un 99 por ciento de homología con dichas secuencias de fragmentos predeterminadas, respectivamente. De acuerdo con una realización de la descripción, los porcentajes de homología se refieren a porcentajes de identidad.
- Otros factores adicionales que se pueden tomar en consideración cuando se determina una equivalencia funcional según el significado empleado en la presente memoria son: i) la capacidad de antisueros para detectar un fragmento de modulador de la actividad de proneurotrofina o ii) la capacidad del fragmento de modulador de la actividad de proneurotrofina funcionalmente equivalente para competir con el correspondiente modulador de la actividad de proneurotrofina en un ensayo. Un método para determinar una secuencia de aminoácidos inmunogénicamente activos dentro de una secuencia de aminoácidos conocida, ha sido descrito por Geysen en el documento de Patente de EE.UU. n° 5.595.915.
- Un método adicional adecuadamente adaptable para determinar la estructura y las relaciones funcionales de fragmentos peptídicos se describe en el documento de Patente de EE.UU. n° 6.013.478. Asimismo, los expertos en la técnica también conocen métodos para evaluar la unión de una secuencia de aminoácidos a un resto receptor.
- Además de las sustituciones conservadoras introducidas en cualquier posición de un modulador de la actividad de proneurotrofina predeterminado preferido, o de un fragmento del mismo, también puede ser deseable introducir sustituciones no conservadoras en una posición cualquiera, o en varias de dicho modulador de la actividad de proneurotrofina.
- Una sustitución no conservadora que conduce a la formación de un fragmento funcionalmente equivalente de un modulador de la actividad de proneurotrofina, por ejemplo, i) diferiría sustancialmente en la polaridad, por ejemplo, un residuo con una cadena lateral no polar (Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Leu, Phe o Met) sustituido por un residuo con una cadena lateral polar tal como Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn o Gln, o por un aminoácido cargado tal como Asp, Glu, Arg o Lys, o sustituyendo un residuo cargado o polar por uno no polar; y/o ii) diferiría sustancialmente en su efecto

sobre la orientación de la cadena principal del polipéptido, tal como una sustitución de o por Pro o Gly por otro residuo; y/o iii) diferiría sustancialmente en la carga eléctrica, por ejemplo, una sustitución de un residuo cargado negativamente tal como Glu o Asp por un residuo cargado positivamente tal como Lys, His o Arg (y viceversa); y/o iv) diferiría sustancialmente en la masa estérica, por ejemplo, una sustitución de un residuo voluminosos tal como His, Trp, Phe o Tyr por uno que tenga una cadena lateral menor, por ejemplo, Ala, Gly o Ser (y viceversa).

Las variantes obtenidas mediante sustitución de aminoácidos pueden prepararse, en una realización preferida, en base a los valores de hidrofobicidad e hidrofiliidad y a la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de los aminoácidos, que incluyen la carga, el tamaño y similares. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos que toman en consideración varias de las anteriores características, son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Además de las variantes descritas en la presente memoria, se pueden formular variantes estéricamente similares para imitar las porciones clave de la estructura de la variante y así dichos compuestos también pueden usarse de la misma manera que las variantes de la descripción. Esto puede lograrse mediante técnicas de modelización y diseño químico, conocidas por los expertos en la técnica. Se debe entender que todas las estructuras artificiales estéricamente similares están abarcadas por el alcance de la presente descripción.

En una realización adicional, la presente descripción se refiere a variantes funcionales que comprenden aminoácidos sustituidos que presentan valores hidrofílicos o índices hidropáticos que están en el intervalo de +/-4,9, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-4,7, tal como dentro del intervalo de +/-4,5, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-4,3, tal como dentro del intervalo de +/-4,1, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-3,9, tal como dentro del intervalo de +/-3,7, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-3,5, tal como dentro del intervalo de +/-3,3, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-3,1, tal como dentro del intervalo de +/-2,9, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-2,7, tal como dentro del intervalo de +/-2,5, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-2,3, tal como dentro del intervalo de +/-2,1, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-2,0, tal como dentro del intervalo de +/-1,8, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-1,6, tal como dentro del intervalo de +/-1,5, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-1,4, tal como dentro del intervalo de +/-1,3, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-1,2, tal como dentro del intervalo de +/-1,1, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-1,0, tal como dentro del intervalo de +/-0,9, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-0,8, tal como dentro del intervalo de +/-0,7, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-0,6, tal como dentro del intervalo de +/-0,5, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-0,4, tal como dentro del intervalo de +/-0,3, por ejemplo, dentro del intervalo de +/-0,25, tal como dentro del intervalo de +/-0,2 del valor del aminoácido que ha sustituido.

La importancia de los índices hidrofílico e hidropático de los aminoácidos a la hora de conferir una función biológica interactiva a una proteína, es bien conocida en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982, y Hopp, documento de Patente de EE.UU. nº 4.554.101).

Los valores de índice hidropático de los aminoácidos tal como se usan en la presente memoria son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9) y arginina (-4,5) (Kyte y Doolittle, 1982).

Los valores de hidrofiliidad de aminoácidos son: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 +/-1); glutamato (+3,0 +/-1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 +/-0,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4) (documento de Patente de EE.UU. nº 4.554.101).

Además de los compuestos de peptidilo descritos en esta memoria, se pueden formular compuestos estéricamente similares para imitar las porciones clave de la estructura peptídica y tales compuestos también se pueden emplear de la misma manera que los péptidos descritos de la descripción. Esto se puede lograr empleando técnicas de modelización y de diseño químico, conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede emplear la esterificación y otras alquilaciones para modificar el extremo amino de, por ejemplo, una cadena peptídica principal de diarginina, para imitar una estructura de tetrapéptido. Se entenderá que todas esas estructuras artificiales estéricamente similares, también están contempladas dentro del alcance de la presente descripción. Los péptidos con alquilaciones N-terminales y esterificaciones C-terminales también se incluyen dentro de la presente descripción. Los equivalentes funcionales también comprenden conjugados glicosilados y covalentes o agregados, formados con los mismos, o con otros, fragmentos de modulador de la actividad de proneurotrofina y/o moléculas de modulador de la actividad de proneurotrofina, incluyendo dímeros o restos químicos funcionales no relacionados. Tales equivalentes funcionales se preparan mediante la unión de funcionalidades a grupos presentes en el fragmento, que incluyen uno o ambos extremos N y C, empleando medios conocidos en la técnica.

Por tanto, los equivalentes funcionales pueden comprender fragmentos conjugados con ésteres o amidas alifáticas o de acilo de los extremos carboxilo, alquilaminas o residuos que contengan cadenas laterales de carboxilo, por ejemplo, conjugadas con alquilaminas en residuos de ácido aspártico; derivados de O-acilo de residuos que contengan grupos hidroxilo y derivados de N-acilo de los aminoácidos amino-terminales o de residuos que contengan grupos amino, por ejemplo, conjugados con fMet-Leu-Phe o proteínas inmunogénicas. Los derivados de los grupos acilo se

seleccionan a partir del grupo de restos alquilo (que incluyen alquilos C3 a C10 normales), formando de este modo especies de alcanilo, y compuestos carbocíclicos o heterocíclicos, formando de este modo especies de aroilo. Los grupos reactivos preferiblemente son compuestos difuncionales conocidos de por sí para uso en la reticulación de proteínas en matrices insolubles a través de grupos laterales reactivos.

5 Los equivalentes funcionales covalentes o agregativos y los derivados de los mismos son útiles como reactivos en inmunoensayos o para procedimientos de purificación por afinidad. Por ejemplo, un fragmento de modulador de la actividad de proneurotrofina de acuerdo con la presente descripción, se puede insolubilizar mediante un enlace covalente a Sefarosa activada con bromuro de cianógeno, empleando métodos conocidos de por sí, o adsorberse a superficies de poliolefinas, con reticulación de glutaraldehído o no, para uso en un ensayo o en una purificación de anticuerpos de modulador de la actividad anti-neurotrofina o en receptores de la superficie celular. Los fragmentos también se pueden marcar con un grupo detectable, por ejemplo, pueden estar radioyodados mediante el procedimiento de cloramina T, ligados covalentemente a quelatos de tierras raras o conjugados con otro resto fluorescente para uso, por ejemplo, en ensayos diagnósticos.

10 La mutagénesis de un fragmento predeterminado preferido de modulador de la actividad de proneurotrofina se puede llevar a cabo realizando inserciones de aminoácidos, normalmente en el orden de aproximadamente 1 a 10 residuos de aminoácidos, preferiblemente desde aproximadamente 1 a 5 residuos de aminoácidos, o deleciones desde aproximadamente 1 a 10 residuos, tal como desde aproximadamente 2 a 5 residuos.

15 En una realización, el fragmento de modulador de la actividad de proneurotrofina se sintetiza mediante síntesis automatizada. Se puede emplear cualquiera de las técnicas en fase sólida disponibles comercialmente, tal como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, en el que los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena de aminoácidos en crecimiento (véase Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963).

20 El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos está disponible comercialmente a partir de suministradores tales como Applied Biosystems, Inc. de Foster City, California, y se puede manejar de forma general según las instrucciones del fabricante. La síntesis en fase sólida permitirá la incorporación de sustituciones de aminoácidos deseables en cualquier fragmento de modulador de la actividad de proneurotrofina de acuerdo con la presente descripción. Debe entenderse que las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier subcombinación de las mismas se pueden combinar para alcanzar una secuencia final de un equivalente funcional. Debe entenderse que las inserciones incluyen fusiones amino-terminales y/o carboxi-terminales, por ejemplo, con una proteína o un vehículo hidrofóbico o inmunogénico, tal como cualquier polipéptido o estructura de soporte capaz de actuar como vehículo.

25 También se proporcionan oligómeros que incluyen dímeros que incluyen homodímeros y heterodímeros de fragmentos de modulador de la actividad de proneurotrofina de acuerdo con la descripción. Los equivalentes funcionales y las variantes de modulador de la actividad de proneurotrofina se pueden producir como homodímeros o heterodímeros con otras secuencias de aminoácido o con secuencias naturales de modulador de la actividad de proneurotrofina. Los heterodímeros incluyen dímeros que contienen fragmentos de modulador de la actividad de proneurotrofina inmunorreactivos, así como fragmentos de modulador de la actividad de proneurotrofina que no necesitan tener o ejercer ninguna actividad biológica.

30 Los fragmentos de modulador de la actividad de proneurotrofina de acuerdo con la descripción se pueden sintetizar tanto *in vitro* como *in vivo*. El método para la síntesis *in vitro* es bien conocido, y los métodos que son adecuados o adecuadamente adaptables a la síntesis *in vivo* de modulador de la actividad de proneurotrofina también se describen en la técnica anterior. Cuando se sintetizan *in vivo*, una célula hospedadora se transforma con vectores que contienen ADN que codifica modulador de la actividad de proneurotrofina o un fragmento del mismo. Un vector se define como una estructura artificial de ácido nucleico replicable. Los vectores se usan para mediar en la expresión del modulador de la actividad de proneurotrofina. Un vector de expresión es una estructura artificial de ADN replicable en la que una secuencia de ácido nucleico que codifica el fragmento predeterminado de modulador de la actividad de proneurotrofina, o cualquier equivalente funcional del mismo que pueda expresarse *in vivo*, se liga funcionalmente a secuencias de control adecuadas, capaces de efectuar la expresión del fragmento o del equivalente en un hospedador adecuado. Tales secuencias de control son bien conocidas en la técnica.

35 Los cultivos de células obtenidas a partir de organismos multicelulares representan células hospedadoras preferidas. En principio, cualquier cultivo de células eucarióticas superiores es factible, tanto de cultivos de vertebrados como de invertebrados. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras útiles son células VERO y HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) y líneas celulares WI38, BHK, COS-7, 293 y MDCK. Las células hospedadoras preferidas son células eucarióticas que se sabe que sintetizan modulador de la actividad de proneurotrofina endógeno. Los cultivos de tales células hospedadoras se pueden aislar y emplear como una fuente del fragmento, o usar en métodos terapéuticos de tratamiento, que incluyen métodos terapéuticos dirigidos a promocionar o inhibir un estado de crecimiento, o a métodos diagnósticos llevados a cabo en un organismo humano o animal.

40 Agente farmacéutico: las expresiones "agente farmacéutico" o "fármaco" o "medicamento" se refieren a cualquier agente terapéutico o profiláctico que se puede usar en el tratamiento (que incluye la prevención, el diagnóstico, el alivio o la cura) de un malestar, aflicción, afección, enfermedad o lesión en un paciente. Los determinantes genéticos, péptidos, polipéptidos y polinucleótidos útiles terapéuticamente se pueden incluir dentro del significado de la

expresión producto farmacéutico o fármaco. Tal como se define en esta memoria, un "agente terapéutico", "agente farmacéutico" o "fármaco" o "medicamento" es un tipo de agente bioactivo.

5 La expresión "agente bioactivo" tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier sustancia que se pueda usar en relación con una aplicación que sea terapéutica o de diagnóstico, tal como por ejemplo, en métodos para diagnosticar la presencia o ausencia de una enfermedad en un paciente y/o métodos para el tratamiento de una enfermedad en un paciente. "Agente bioactivo" se refiere a sustancias que son capaces de ejercer un efecto biológico *in vitro* y/o *in vivo*. Los agentes bioactivos pueden ser neutros, cargados negativa o positivamente. Los agentes bioactivos adecuados incluyen, por ejemplo, profármacos, agentes de diagnóstico, agentes terapéuticos, agentes farmacéuticos, fármacos, agentes de aporte de oxígeno, sustitutos sanguíneos, moléculas orgánicas sintéticas, polipéptidos, péptidos, vitaminas, esteroides, análogos de esteroides y determinantes genéticos, que incluyen nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos.

10 Tratamiento: el término "tratamiento" tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un método que implica una terapia que incluye la cirugía de una afección clínica en un individuo que incluye un organismo humano o animal. La terapia puede ser profiláctica, paliativa o curativa, es decir, que reduce el riesgo de adquirir una enfermedad.

15 ARN antisentido: una molécula de ARN capaz de causar el silenciamiento de un gen mediante la unión específica a una molécula de ARNm de interés.

ADN antisentido: una molécula de ADN capaz de causar el silenciamiento de un gen mediante la unión específica a una molécula de ARNm de interés.

20 siARN: "ARN de interferencia pequeño" (del inglés "small interfering RNA") es una molécula de ARN de cadena doble, corta (frecuentemente, aunque sin restricción, de menos de 30 nucleótidos de longitud) capaz de causar el silenciamiento específico de un gen en células de mamífero.

"Silenciamiento" de un gen: un proceso que conduce a una expresión reducida de genes endógenos. El silenciamiento génico preferiblemente es el resultado de una reducción post-transcripcional de la expresión génica.

25 Regulación al alza de la expresión: un proceso que conduce a un aumento de la expresión de genes, preferiblemente de genes endógenos.

In vitro/in vivo: los términos se usan con su significado normal.

30 Polipéptido: el término "polipéptido" tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula que comprende al menos dos aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos. "Oligopéptidos" se define en la presente memoria como polipéptidos que tienen una longitud no superior a 100 aminoácidos. El término "polipéptido" también se entiende que incluye proteínas, es decir, biomoléculas funcionales que comprenden al menos un polipéptido; cuando comprenden al menos dos polipéptidos, éstos pueden formar complejos, estar unidos covalentemente o pueden estar unidos no covalentemente. Los polipéptidos en una proteína pueden estar glicosilados y/o lipidados y/o comprender grupos prostéticos.

35 "Polinucleótido", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula que comprende al menos dos ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden existir de forma natural o pueden estar modificados, tal como ácidos nucleicos cerrados (LNA, del inglés "locked nucleic acids"), o ácidos nucleicos peptídicos (PNA, del inglés "peptide nucleic acids"). Polinucleótido, tal como se usa en la presente memoria, generalmente pertenece a:

i) un polinucleótido que comprende una secuencia codificante predeterminada, o

ii) un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos predeterminada, o

40 iii) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por polinucleótidos (i) o (ii), en donde dicho fragmento tiene al menos una actividad predeterminada como la especificada en la presente memoria; y

45 iv) un polinucleótido cuya cadena complementaria se hibrida en condiciones restrictivas con un polinucleótido como el definido en una cualquiera de (i), (ii) y (iii), y que codifica un polipéptido, o un fragmento del mismo, que tiene al menos una actividad predeterminada como la especificada en la presente memoria; y

v) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que está degenerada respecto a la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos (iii) o (iv); o la cadena complementaria de un polinucleótido de este tipo.

50 Un "anticuerpo purificado" es un anticuerpo en el que al menos el 60 por ciento en peso está exento de polipéptidos y moléculas orgánicas naturales con las que se asocia de forma natural. Preferiblemente, la preparación comprende un anticuerpo en una cantidad de al menos el 75 por ciento en peso, más preferiblemente de al menos el 90 por ciento en peso, y aún más preferiblemente de al menos el 99 por ciento en peso.

Descripción detallada

Los presentes inventores han identificado que las proneurotrofinas se unen al receptor sortilina de la familia de receptores con dominio Vps10p, lo que da como resultado una apoptosis cuando se forma un complejo ternario con la unión conjunta de p75^{NTR}.

5 Por consiguiente, la presente descripción se refiere a la modulación de la actividad de al menos una proneurotrofina.

Sin pretender establecer una teoría, se cree que la familia de receptores con dominio Vps10p está implicada en uno o varios de los siguientes mecanismos relativos a las proneurotrofinas:

- Transporte retrógrado, que incluye la captación de proneurotrofina y p75^{NTR}.

10 - Transporte dentro de rutas biosintéticas, que incluye la clasificación de proneurotrofina y el transporte desde la red de Golgi.

- Liberación de proneurotrofinas.

- Señalización, que incluye la modulación del transporte celular y la señalización mediante formación de complejos ternarios con p75 y proneurotrofina.

15 Por lo tanto, un aspecto de la presente descripción es un método para modular la actividad de al menos una proneurotrofina en una única célula o un organismo, incluyendo un animal, que comprende administrar a dicho animal una cantidad suficiente de un agente capaz de unirse a un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p o capaz de interferir en la unión entre un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p y una proneurotrofina.

Receptores de la familia de receptores con dominio Vps10p

20 La expresión "receptor de la familia Vps10p" se refiere a una familia de receptores que se caracteriza por tener un dominio Vps10p N-terminal; dicha familia con dominio Vps10p comprende SorLA, sortilina, SorCS1, SorCS2 o SorCS3, véase la Figura 1. En una realización de la presente descripción, se puede usar cualquiera de los receptores de la familia con dominio Vps10p; más preferiblemente, el receptor comprende el dominio Vps10p, el módulo 10CC, un segmento transmembranal, así como un segmento citoplásmico que media en la clasificación celular y en la internalización, así como en la unión de adaptadores citoplásmicos que afectan a la señalización celular. En particular, el receptor usado es sortilina.

Neurotrofinas/proneurotrofinas

30 El término "neurotrofina", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier miembro de la familia de las neurotrofinas, comprendiendo dicha familia de neurotrofinas el factor de crecimiento neural (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4/5 (NT-4/5). En una realización de la presente descripción, se puede usar cualquier miembro de la familia de las neurotrofinas; sin embargo, se prefiere que la neurotrofina sea NGF o BDNF.

35 El término "proneurotrofina", tal como se usa en la presente memoria, se puede referir a cualquier familia de proneurotrofinas, que comprende un prodominio ligado funcionalmente a la neurotrofina madura correspondiente, en donde dicha familia de proneurotrofinas comprende pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3 y pro-NT-4/5. En una realización de la presente descripción, se puede usar cualquier proneurotrofina, sin embargo se prefiere que la proneurotrofina sea pro-NGF o pro-BDNF.

Inhibición de la actividad de proneurotrofina

40 Las expresiones "actividad mediada por neurotrofina", "actividad de una neurotrofina" o "actividad de proneurotrofina" se refieren a una actividad biológica que normalmente se ve favorecida, tanto directa como indirectamente, en presencia de una neurotrofina o una proneurotrofina. Las actividades de proneurotrofina incluyen, aunque sin restricción, la activación diferencial de respuestas celulares tanto pro-apoptóticas como anti-apoptóticas, a través de la activación preferencial de receptores p75^{NTR} o TrkA, respectivamente. Se ha propuesto la hipótesis de que la carencia de factores neurotróficos es responsable de la degeneración de poblaciones neuronales selectivas, ya que se produce en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica.

En realizaciones preferidas de la presente descripción, una o varias de estas actividades de proneurotrofina(s) están inhibidas directa o indirectamente mediante la administración de un agente a un animal.

50 Los términos "inhibición" o "inhibido" se refieren a cualquier disminución de la actividad biológica de un agente bioactivo, por ejemplo, una proneurotrofina. En una realización de la presente descripción, una inhibición de este tipo se refiere a una disminución de la unión de una proneurotrofina a un receptor con dominio Vps10p, especialmente la unión de un pro-NGF o un pro-BDNF a un receptor sortilina. La eficacia del efecto inhibitorio de agentes de la presente descripción se puede medir mediante experimentos de inhibición competitiva usando BIAcore (resonancia de

plasmón superficial).

Agentes capaces de inhibir la unión de una proneurotrofina a un receptor con dominio Vps10p

En una realización preferida de la presente descripción, se administra un agente al animal, siendo capaz dicho agente de inhibir la unión entre un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p y una proneurotrofina.

- 5 En otra, realización igualmente preferida, el agente es capaz de unirse a un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p y/o proneurotrofina, interfiriendo de ese modo con la actividad de una proneurotrofina, ya sea directa o indirectamente.

10 El agente capaz de mostrar uno o varios de los efectos mencionados anteriormente puede ser cualquier tipo de agente, por ejemplo, el agente se puede seleccionar a partir del grupo que comprende proteínas, péptidos, polipéptidos o moléculas orgánicas. En una realización preferida, el agente es un anticuerpo, un compuesto o un polipéptido, y el agente es lo más preferiblemente un polipéptido o una molécula orgánica. Dichos agentes se pueden unir a cualquiera de las siguientes secuencias:

Sortilina: **RIFRSSDFAKNF**

SorLA: YLWITFDFCNTL

- 15 SorCS1: SLLISSDEGATY

SorCS2: SLFLSADEGATF

SorCS3: SILISSDEGATY

20 Las secuencias mencionadas anteriormente son todas subsecuencias de SEQ ID NO: 1 a 5 respectivamente. Los agentes de la descripción inhiben la unión de una proneurotrofina a las secuencias anteriores, evitando de este modo que el complejo binario proneurotrofina:receptor con dominio Vps10p lleve a cabo una actividad biológica o fisiológicamente relevante, por lo que los agentes de la presente descripción se pueden usar para prevenir enfermedades y trastornos como se especifica en esta memoria a continuación.

25 En un aspecto particularmente preferido, el agente que se administra al animal es capaz de inhibir la unión de una proneurotrofina a un receptor sortilina, inhibiendo de este modo la actividad del receptor, dicha actividad puede ser, pero no se limita a, una o varias de las siguientes:

i) clasificación celular del receptor

ii) unión al receptor directa o indirectamente poniendo en contacto el ligando con otros receptores, tales como los receptores p75 y Trk

iii) señalización del receptor sortilina

30 En un aspecto el agente es capaz de inhibir la unión de una proneurotrofina a un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p. Tal inhibición puede ser debida, por ejemplo, a la unión del agente a la proneurotrofina y/o al receptor con dominio Vps10p, tal como el receptor sortilina.

35 En un aspecto el agente es un fragmento o una variante del dominio Vps10p del receptor sortilina, siendo dicho fragmento o variante capaz de unirse al prodominio de una proneurotrofina o a un fragmento o una variante del mismo. En particular, el agente incluye, pero no se limita a los fragmentos FANKNFV, RIFR y RIFRSSDF como se muestra en la figura 17 que describe el análisis de la longitud del prodominio-BDNF que se une a péptidos de sortilina. Cualquier fragmento o variante capaz de unirse a una proneurotrofina se incluye en el presente documento. En particular, un fragmento es un péptido que comprende una secuencia correspondiente a cualquiera entre SEQ ID NOs: 25 a 28. Este dominio se denomina en esta memoria el motivo que se une a proneurotrofina con dominio Vps10p. Los péptidos que comprenden las SEQ ID NOs: 25 a 28 pueden tener al menos 3 residuos de longitud, tal como 5 residuos de longitud, tal como 7 residuos de longitud, tal como 10 residuos de longitud, tal como 13 residuos de longitud, tal como 15 residuos de longitud, tal como 20 residuos de longitud, tal como 25 residuos de longitud, tal como 30 residuos de longitud, tal como 35 residuos de longitud, tal como 40 residuos de longitud, tal como 50 residuos de longitud, tal como 60 residuos de longitud, tal como 70 residuos de longitud, tal como 80 residuos de longitud, tal como al menos 90 residuos de longitud, tal como 100 residuos de longitud, tal como 125 restos de longitud, tales como 150 residuos de longitud, tal como 175 restos de longitud, tal como 200 residuos de longitud. Las secuencias dentro de un péptido de este tipo idénticas a SEQ ID NO: 25 pueden estar en el comienzo de dicho péptido, al final, el medio o en cualquier lugar entremedias. Dichos péptidos pueden ser además variantes de la secuencia SEQ ID NO: 1 original, variantes como se han definido anteriormente. Preferiblemente, la variante comprende sustituciones conservadoras de aminoácidos u otras alteraciones benignas de la secuencia original. Un péptido preferido comprende SEQ ID NO: 26 y fragmentos y variantes de la misma, tales como las secuencias identificadas en SEQ ID NO: 27 y/o SEQ ID NO: 28 y sus fragmentos y variantes. Ejemplos de variantes también se proporcionan en las figuras 15 y 16, en las que una secuencia que está incluida dentro de SEQ ID NO: 25 es el objeto de un análisis

sis de sustitución. En este documento se confirma que las partes especialmente pertinentes del presente motivo de unión del dominio Vps10p están dentro de la secuencia descrita en SEQ ID NO: 26, y las partes más esenciales del mismo, de nuevo son secuencias identificadas en SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28. En relación con cualquiera entre SEQ ID NO: 1, 25, 26, 27 o 28, las Figuras 15 y 16 indican que, por ejemplo, R196 tal y como se hace el recuento usando pre-prosortilina (se corresponde a R163 para prosortilina) de una manera que conserva la capacidad de unirse a BDNF, puede estar sustituido con cualquiera entre F, G, H, I, L, N, P, Q, T, V, W o Y, y preferiblemente está sustituido con F, H, I, L, V, W o Y. Asimismo, cualquiera de los otros residuos de SEQ ID NO: 1, 25, 26, 27 o 28 pueden estar sustituidos. I197, tal y como se hace el recuento usando pre-prosortilina (se corresponde a I164 para prosortilina) está preferiblemente sustituido, por lo tanto, con A, F, G, H, P, R, S, T, V o Y; F198, tal y como se hace el recuento usando pre-prosortilina (se corresponde a F165 para prosortilina) está preferiblemente sustituido con I, L, R o W; R199, tal y como se hace el recuento usando pre-prosortilina (se corresponde a R166 para proSortilina) está preferiblemente sustituido con A, D, F, G, H, I, L, S, T, V, W o Y; F203, tal y como se hace el recuento usando pre-prosortilina (se corresponde a F170 para prosortilina) está preferiblemente sustituido con L, P o R; A204, tal y como se hace el recuento usando pre-prosortilina (se corresponde a A171 para prosortilina) está preferiblemente sustituido con D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; K205, tal y como se hace el recuento usando pre-prosortilina (se corresponde a K172 para prosortilina) está preferiblemente sustituido con A, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; N206, tal y como se hace el recuento usando pre-prosortilina (se corresponde a N173 para prosortilina) está preferiblemente sustituido con A, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T o V; y F207, tal y como se hace el recuento usando pre-prosortilina (se corresponde a F174 para prosortilina) está preferiblemente sustituido con H, I, K, L, N, P, Q, R o V. Cualquiera de estas sustituciones se puede realizar de forma aislada o en combinación con cualquiera de las otras sustituciones preferidas o cualquiera de los otros métodos para generar variantes, como se han mencionado en el presente documento.

En otra realización, el agente es capaz de unirse al receptor. El agente se puede unir a cualquier parte del receptor relevante para inhibir la unión de la neurotrofina. En consecuencia, el agente puede ser capaz de inhibir la unión de dicha neurotrofina o dicha proneurotrofina a un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p mediante la unión a una parte intracelular del receptor.

Un objeto de la descripción es proporcionar agentes que solos o ayudados por un agente/formulación farmacéutica, son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica.

Un agente de acuerdo con la invención es un anticuerpo dirigido contra una parte extracelular del receptor. En una realización aún más preferida, el anticuerpo está purificado. El anticuerpo dirigido contra una parte extracelular del receptor, se dirige contra un péptido que comprende una secuencia que corresponde al motivo de unión del dominio Vps10p, estando definido dicho motivo por SEQ ID NO: 25, 26, 27 o 28 o un fragmento de las mismas. Dicho fragmento puede comprender entre 3 y 31 residuos de aminoácidos, tal como entre 3 y 29 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 3 y 27 residuos de aminoácidos, tal como entre 3 y 25 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 3 y 23 residuos de aminoácidos, tal como entre 3 y 21 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 3 y 19 residuos de aminoácidos, tal como entre 3 y 17 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 3 y 15 residuos de aminoácidos, tal como entre 3 y 13 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 3 y 11 residuos de aminoácidos, tal como entre 3 y 9 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 3 y 7 residuos de aminoácidos, tal como entre 3 y 5 residuos de aminoácidos, por ejemplo, 4 residuos de aminoácidos, tal como entre 5 y 31 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 7 y 31 residuos de aminoácidos, tal como entre 9 y 31 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 11 y 31 residuos de aminoácidos, tal como entre 13 y 31 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 15 y 31 residuos de aminoácidos, tal como entre 17 y 31 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 19 y 31 residuos de aminoácidos, tal como entre 21 y 31 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 23 y 31 residuos de aminoácidos, tal como entre 25 y 31 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 27 y 31 residuos de aminoácidos, tal como entre 29 y 31 residuos de aminoácidos, por ejemplo, 30 residuos de aminoácidos.

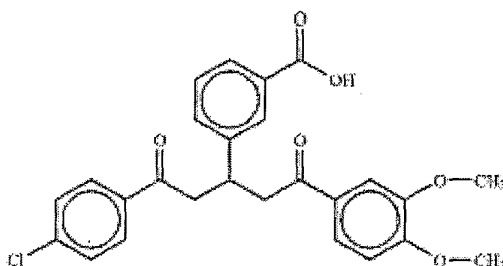
En particular, el anticuerpo se debe dirigir contra una posición en este motivo, de manera que el anticuerpo bloquea estéricamente la unión de la proneurotrofina con el receptor.

En aún otra realización, los compuestos de la presente descripción que son capaces, por lo tanto, de actuar como inhibidores de proneurotrofinas para receptores con dominio Vps10p, comprenden polipéptidos de entre 1 y 500 residuos de aminoácidos que comprenden una o varias entre SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28.

En aún otra realización, el agente es un análogo de neurotensina y/o un modulador del sistema de neurotensina que incluye, pero no se limita a, SEQ ID NO. 24 y SEQ ID NOs. 29 a 42. La neurotensina y los moduladores del sistema de neurotensina se unen a receptores con dominio Vps10-p, por ejemplo, el receptor sortilina o fragmentos de los mismos, tales como y no limitados a las secuencias mostradas en la figura 17, evitando de este modo que cualquier ligando normal y/o natural se una a sortilina, actuando así como antagonistas de las neurotrofinas que, de otra manera, interaccionarían con sortilina y los fragmentos descritos en este documento de la misma. Además, dicha neurotensina y moduladores del sistema de neurotensina se pueden unir a un sitio de unión alternativo del receptor sortilina, induciendo cambios conformacionales que afectan a la afinidad de la unión entre neurotrofinas y sortilina de una manera antagónica. Dicha neurotensina y moduladores del sistema de neurotensina son capaces preferiblemente de cruzar la barrera hematoencefálica, y de los receptores con dominio Vps10p se unen preferiblemente a sortilina. En todavía una realización preferida, la neurotensina y los moduladores del sistema de neurotensina no tienen

ninguna afinidad de unión significativa o efectos adversos después de la unión con otros receptores con dominio Vps10p o de hecho otros receptores distintos de sortilina.

Los receptores con dominio Vps10p, especialmente sortilina, identificada inicialmente como receptor de neurotensina 3 (NTR-3), tienen especificidad de sustrato que se solapa parcialmente con los receptores de neurotensina 1 y 2 (NTR-1 y NTR-2), uniéndose ambos a NT(1-13) con alta afinidad. Además, una serie de moduladores del sistema de neurotensina son ligandos conocidos de NTR-1 y NTR-2. Ejemplos de los mismos son los péptidos NT66L (SEQ ID NO. 15), NT67L (SEQ ID NO. 16), NT69L (SEQ ID NO. 17), Eisai (SEQ ID NO. 18), JMV-449 (SEQ ID NO. 19), PD-149163 (SEQ ID NO. 20), PD-149598 (SEQ ID NO. 21), PD-156425 con la estructura:



10 y PD-156556 (SEQ ID NO. 23), CGX-1160 (SEQ ID NO. 24), PD-147113 (SEQ ID NO. 29), GZR-123 (SEQ ID NO. 30), NT64D (SEQ ID NO. 31), NT64L (SEQ ID NO. 32), NT65L (SEQ ID NO. 33), NT66D (SEQ ID NO. 34), NT69L' (SEQ ID NO. 35), NT71 (SEQ ID NO. 36), NT72 (SEQ ID NO. 37), NT73 (SEQ ID NO. 38), NT74 (SEQ ID NO. 39), NT75 (SEQ ID NO. 40), NT76 (SEQ ID NO. 41), NT77 (SEQ ID NO. 42) y los compuestos SR-142948A, SR-48692, UK-73093 y L-737631. Todos estos compuestos y péptidos son agentes de acuerdo con la presente descripción.

15 Además, los derivados de los compuestos anteriores y variantes o fragmentos o péptidos que comprenden los péptidos mencionados anteriormente, son agentes de acuerdo con la presente descripción. Por derivados se entienden compuestos que conservan una parte sustancial y/o significativa de la estructura de los compuestos mencionados, pero que están sustituidos de manera diferente, es decir, que comprenden otros sustituyentes. Los derivados pueden ser también moléculas que son capaces de interactuar de la misma manera que el compuesto de origen, es decir, interactúan con los mismos residuos sobre el receptor con dominio Vps10p. Ejemplos de tales sustituyentes comprenden y no se limitan a: grupos alicíclicos: la expresión "grupo alicíclico" significa un grupo hidrocarburo cíclico que tiene propiedades parecidas a las de los grupos alifáticos. Grupos alifáticos: en el contexto de la presente descripción, la expresión "grupo alifático" significa un grupo hidrocarburo saturado o insaturado, lineal o ramificado. Esta expresión se usa para incluir grupos alquilo, alqueno y alquino, por ejemplo. Grupos alquilo: la expresión "grupo alquilo" significa un grupo hidrocarburo saturado, lineal o ramificado que incluye, por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, t-butilo, heptilo, dodecilo, octadecilo, amilo, 2-etilhexilo y similares. Grupos alqueno: la expresión "grupo alqueno" significa un grupo hidrocarburo insaturado, lineal o ramificado con uno o varios dobles enlaces carbono-carbono, tal como un grupo vinilo. Grupos alquino: la expresión "grupo alquino" significa un grupo hidrocarburo insaturado, lineal o ramificado con uno o varios triples enlaces carbono-carbono; anfífilos: sustancia que contiene grupos tanto polares y solubles en agua como no polares insolubles en agua. Grupo aromático: la expresión "grupo aromático" o "grupo arilo" significa un grupo hidrocarbonado aromático, monocíclico o policíclico. Grupos cíclicos: la expresión "grupo cíclico" significa un grupo hidrocarburo de anillo cerrado que se clasifica como un grupo alicíclico, grupo aromático o grupo heterocíclico. Cicloalquenos: significa un radical carbocíclico monovalente insaturado que consiste en uno, dos o tres anillos, de tres a ocho carbonos por anillo, que puede estar opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes, seleccionados a partir del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alqueno inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alquenoilitio, halo, haloalqueno, hidroxialqueno, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquenoilamino, alquenoilsulfonilo, arilsulfonilo, alquenoilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquenoilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquenoilcarbonilamino y arilcarbonilamino. Cicloalquilos: significan un radical carbocíclico monovalente saturado, que consiste en uno, dos o tres anillos, de tres a ocho carbonos por anillo, que pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o dos sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alquilitio, halo, haloalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino. Grupos catiónicos: un grupo químico capaz de actuar como un donante de protones cuando un compuesto que comprende el grupo químico se disuelve en un disolvente, preferiblemente cuando se disuelve en agua. En general, un "Grupo" / Resto / sustituto se entiende bien en esta área técnica, y no solo se tolera un alto grado de sustitución, sino que frecuentemente es recomendable. Se prevé una sustitución en los materiales de la presente descripción.

Como un modo de simplificar la exposición y la descripción de cierta terminología utilizada en toda esta solicitud, los términos "grupo" y "resto" se usan para diferenciar entre especies químicas que permiten una sustitución o que pueden estar sustituidas y las que no lo permiten o no se pueden sustituir de ese modo. Por lo tanto, cuando se emplea el término "grupo" para describir un sustituyente químico, el material químico descrito incluye el grupo no sustituido y ese grupo con átomos de O, N o S, por ejemplo, en la cadena, así como grupos carbonilo u otra sustitución convencional. Cuando el término "resto" se utiliza para describir un compuesto químico o un sustituyente, únicamente se

pretende incluir un material químico no sustituido. Por ejemplo, la expresión "grupo alquilo" se entiende que incluye no solo sustituyentes puros de alquilo hidrocarbonado, de cadena abierta, saturados, tales como metilo, etilo, propilo, t-butilo y similares, sino también sustituyentes de alquilo que son portadores de sustituyentes adicionales conocidos en la técnica, tal como hidroxilo, alcoxi, alquilsulfonilo, átomos de halógeno, ciano, nitro, amino, carboxilo, etc. Por lo tanto, "grupo alquilo" incluye grupos éter, haloalquilos, nitroalquilos, carboxialquilos, hidroxialquilos, sulfoalquilos, etc. Por otra parte, la expresión "resto alquilo" se limita a la inclusión de sustituyentes puros de alquilo hidrocarbonado, de cadena abierta saturados, tales como metilo, etilo, propilo, t-butilo y similares. Las mismas definiciones se aplican a "grupo alqueno" y "resto alqueno"; a "grupo alquino" y "resto alquino"; a "grupo cíclico" y "resto cíclico"; a "grupo alicíclico" y "resto alicíclico"; a "grupo aromático" o a "grupo arilo" y a "resto aromático" o "resto arilo", así como a "grupo heterocíclico" y "resto heterocíclico". Grupo heterocíclico: la expresión "grupo heterocíclico" significa un hidrocarburo de anillo cerrado en el que uno o varios de los átomos en el anillo es un elemento distinto de carbono (por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.). Heterociclilo significa un radical cíclico monovalente saturado, que consiste en uno a dos anillos, de tres a ocho átomos por anillo, que incorpora uno o dos heteroátomos en el anillo (seleccionados entre N, O o S(O)0-2, y que pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o dos sustituyentes, seleccionados a partir del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alquiltio, halo, haloalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino o arilcarbonilamino. Heteroarilo significa un radical cíclico aromático monovalente que tiene de uno a tres anillos, de cuatro a ocho átomos por anillo, que incorpora uno o dos heteroátomos (seleccionados entre nitrógeno, oxígeno o azufre) en el anillo que opcionalmente puede estar sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alquiltio, halo, haloalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino. Alquilo inferior sustituido significa un alquilo inferior que tiene de uno a tres sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, amino, amido, carboxilo, acilo, halógeno, ciano, nitro y tiol. Variantes, fragmentos o péptidos que comprenden los péptidos moduladores del sistema de neurotensina se pueden generar mediante sustitución conservadora de aminoácidos, tal y como se ha definido anteriormente o mediante la inclusión y/o sustitución de cualquiera de los residuos por cualquier aminoácido de origen natural L- o D- o cualquier derivado de aminoácido sintético. Además, los enlaces entre los residuos en los aminoácidos mencionados se pueden alterar formando enlaces no amida ligados a péptidos de aminoácidos.

Por tanto, en una realización de la presente descripción, los moduladores del sistema de neurotensina tal y como se definen en cualquiera de SEQ ID NOs. 10-11, 13-24, 29-42 y derivados o variantes de las mismas y los compuestos SR-142948A, SR-48692, UK-73093 y L-737631 y derivados o variantes de los mismos, son agentes de la presente descripción. Además, los fragmentos de los péptidos son también agentes de la presente descripción. Estos fragmentos pueden ser uno o varios aminoácidos más cortos que los péptidos de acuerdo con las SEQ ID Nos, mencionadas anteriormente. Es de importancia que los péptidos que interactúan con sortilina estén retenidos en estos fragmentos. Los agentes preferidos son SR-48692, NT-69L y CGX-1160 y/o variantes de los mismos.

En otra realización preferida de la presente descripción, el agente es capaz de unirse a una parte intracelular del receptor y/o a la parte transmembranal de un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p. En particular, el agente puede ser capaz de unirse a la parte citoplásmica del receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p, tal como a una parte de sortilina correspondiente a SEQ ID NO: 1 o a un fragmento de la misma que comprende cualquiera de SEQ ID NOs: 25 a 28.

En particular, la unión de un agente a las partes intracelulares o transmembranales del receptor puede conducir a una modulación de la actividad de la proneurotrofina a través de una modulación del transporte de al menos una proneurotrofina hacia fuera, hacia dentro o en el interior de células que expresan el receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p, tal como se describe más adelante.

En otra realización preferida, el agente es capaz de modular la expresión de un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p y con ello de interferir en la actividad de al menos una proneurotrofina. La modulación puede ser bien una inhibición o bien una estimulación de la expresión. Los métodos preferidos para modular la expresión del receptor incluyen, aunque sin restricción:

- (i) Bloquear o inhibir la actividad de los productos de traducción de uno o varios genes del receptor con dominio Vps10p y/o uno o varios derivados de los mismos, mediante la inhibición de la traducción de ARNm o la activación transcripcional usando ácidos nucleicos antisentido.
- (ii) Inactivar el ARNm mediante ribozimas dirigidas a los ARNMs que codifican uno o varios genes del receptor con dominio Vps10p y/o uno o varios derivados de los mismos.
- (iii) Inhibición de los productos de traducción presentes intracelularmente de los genes del receptor con dominio Vps10p mediante la administración de moléculas que imitan dianas de los productos de traducción de uno o varios genes del receptor con dominio Vps10p y/o uno o varios derivados de los mismos, compitiendo con ello con sus dianas naturales.

(iv) Estimular la expresión de uno o varios genes del receptor con dominio Vps10p y/o uno o varios derivados de los mismos, por ejemplo, en una realización preferida se administra un agente a las células *in vitro* o *in vivo*. Tal agente puede actuar específicamente o no específicamente. También es posible activar genes responsables de un crecimiento adicional de tejido diferenciado mediante la introducción de uno o varios genes del receptor con dominio Vps10p y/o uno o varios derivados de los mismos en las respectivas células y tejidos mediante terapia génica. Para este fin, las respectivas secuencias de ácido nucleico pueden ponerse bajo el control de un promotor fuerte, que opcionalmente se puede activar y desactivar con la administración de un estímulo a la célula/tejido.

(v) Estimular la expresión de uno o varios genes del receptor con dominio Vps10p y/o uno o varios derivados de los mismos mediante la administración directa a la respectiva célula/tejido de un producto de traducción, bien un péptido o bien una proteína, que se ha obtenido a partir de uno o varios genes de receptor con dominio Vps10p y/o uno o varios derivados de los mismos. Debido al bajo peso molecular de cualquiera de los productos de traducción mencionados anteriormente, estos péptidos/proteínas pueden aplicarse fácilmente a la célula, por ejemplo, usando sistemas de administración mediante encapsulación.

El cambio en el nivel de expresión del receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p puede determinarse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, aunque sin restricción: matrices o micromatrices de ADN (Brazma y Vilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de expresión génica) (Madden et al., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425), READS (amplificación de enzimas de restricción de ADN digeridos) (Prashar y Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72), TOGA (análisis de expresión génica total) (Sutcliffe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 1976-81), sistemas de proteínas y proteómica (Celis et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut et al., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de marcadores de secuencia expresada (EST) (Celis et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huella génica de ARN sustractiva (SuRF) (Fuchs et al., Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson et al., Cytometr y, 2000, 41, 203-208), clonación sustractiva, visualización diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli et al., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96), técnicas FISH (hibridación fluorescente *in situ*) (Going y Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904) y métodos de espectrometría de masas (revisados en To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41).

Métodos para tratar una enfermedad o un trastorno

Esta descripción comprende además un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un individuo. Dicho método comprende administrar a dicho individuo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, una cantidad suficiente de un agente capaz de interferir con la unión entre un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p y una proneurotrofina. Por "cantidad suficiente" en el presente documento se entiende una dosis que produce los efectos terapéuticos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del trastorno a tratar, y será averiguada por un experto en la técnica usando técnicas conocidas. En general, el agente se administra a un animal en una cantidad desde 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg por día. Además, como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la edad, así como el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la interacción con fármacos y la gravedad de la enfermedad, y se determinarán con una experimentación de rutina por los expertos en la técnica.

Los agentes de la presente descripción son considerados útiles para la promoción del desarrollo, el mantenimiento o la regeneración de neuronas *in vitro* e *in vivo*, incluyendo neuronas centrales (cerebro y espina dorsal), periféricas (neuronas simpáticas, parasimpáticas, sensoriales y entéricas) y motoras. Por consiguiente, los agentes de la presente descripción se pueden utilizar en métodos para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y degeneración neurológicos. En una realización preferida, las formulaciones se administran a un paciente para tratar trastornos neurales. Por "trastornos neurales" se entiende en esta memoria trastornos del sistema nervioso central y/o periférico que estén asociados a una degeneración o daño neuronal. Los ejemplos específicos de trastornos neurales incluyen, aunque sin limitación, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington, el ictus, ELA, neuropatías periféricas y otras afecciones que se caracterizan por necrosis o pérdida de neuronas, tanto de neuronas centrales como periféricas o motoras, además de tratar nervios dañados debido a un traumatismo, quemaduras, disfunción o lesión renal, disfunción o lesión pancreática, disfunción o lesión pulmonar, lesión en tejidos adiposos y efectos tóxicos de agentes quimioterapéuticos usados para tratar el cáncer o el SIDA. Por ejemplo, las neuropatías periféricas asociadas a determinadas afecciones, tales como las neuropatías asociadas con la diabetes, el SIDA o la quimioterapia, pueden tratarse usando las formulaciones de la presente descripción.

En diversas realizaciones de la descripción, se administran agentes a pacientes en los que el sistema nervioso ha sido dañado por traumatismo, cirugía, ictus, isquemia, infección, enfermedad metabólica, deficiencia nutricional, cáncer o agentes tóxicos, para favorecer la supervivencia o el crecimiento de las neuronas, o en cualquier afección que es tratable con NGF, NT-3, BDNF o NT4-5. Por ejemplo, los agentes se pueden utilizar para favorecer la supervivencia o el crecimiento de neuronas motoras que están dañadas por traumatismo o cirugía. También, los agentes se pueden utilizar para tratar trastornos de neuronas motoras, tales como esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig), parálisis de Bell y varias afecciones que implican atrofia muscular espinal, o parálisis. Los agentes se pueden utilizar para tratar trastornos neurodegenerativos humanos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la

enfermedad de Parkinson, la epilepsia, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington, el síndrome de Down, la sordera nerviosa y la enfermedad de Meniere. Las neurotrofinas son esenciales para la salud y el bienestar del sistema nervioso. Por ejemplo, NGF (factor de crecimiento nervioso), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), NT-3 (neurotrofina-3) y NT-4 (neurotrofina-4) también median en actividades de orden superior adicionales, tales como el aprendizaje, la memoria y el comportamiento, además de sus funciones establecidas para la supervivencia celular. Por lo tanto, los agentes de la presente descripción se pueden utilizar como potenciadores cognitivos, para mejorar el aprendizaje, especialmente en pacientes que padecen demencias o traumatismos. La enfermedad de Alzheimer, que ha sido identificada por los "National Institutes of Aging" por representar más del 50% de las demencias en los ancianos, es también la cuarta o quinta causa principal de muerte en los estadounidenses mayores de 65 años de edad. Cuatro millones de estadounidenses, el 40% de los estadounidenses mayores de 85 años (el segmento de crecimiento más rápido de la población estadounidense), tienen la enfermedad de Alzheimer. El veinticinco por ciento de todos los pacientes con la enfermedad de Parkinson también padecen una demencia de tipo enfermedad de Alzheimer. Y en aproximadamente el 15% de los pacientes con demencia, la enfermedad de Alzheimer y la demencia multiinfarto coexisten. La tercera causa más común de demencia, tras la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular, es la pérdida cognitiva debida a una enfermedad cerebral orgánica relacionada directamente con el alcoholismo, que se da en aproximadamente el 10% de los alcohólicos. Sin embargo, la anomalía más consistente para la enfermedad de Alzheimer, así como para la demencia vascular y la pérdida cognitiva debida a enfermedad cerebral orgánica relacionada con el alcoholismo, es la degeneración del sistema colinérgico procedente del cerebro anterior basal (BF, del inglés "basal forebrain") y dirigida al códex y al hipocampo (Bigl et al. en Brain Cholinergic Systems, M. Steriade y D. Biesold, compiladores, Oxford University Press, Oxford, pág. 364-386 (1990)). Y existe una serie de otros sistemas neurotransmisores afectados por la enfermedad de Alzheimer (Davies Med. Res. Rev. 3: 221 (1983)). Sin embargo, la pérdida cognitiva, relacionada por ejemplo, con la degeneración del sistema neurotransmisor colinérgico, no está limitada a individuos que padecen demencia. También se ha observado en adultos por lo demás sanos y en ratas. Los estudios que comparan el grado de pérdida de capacidad de aprendizaje con el grado de reducción del flujo sanguíneo cerebral cortical en ratas maduras, muestran una buena correlación (Berman et al. Neurobiol. Aging 9:691 (1988)). En el alcoholismo crónico, la enfermedad cerebral orgánica resultante, como la enfermedad de Alzheimer o el envejecimiento normal, también se caracteriza por reducciones difusas del flujo sanguíneo cerebral cortical en aquellas regiones del cerebro de las que surgen las neuronas colinérgicas (cerebro anterior basal) y en las que se proyectan (córtex cerebral) (Lofti et al., Cerebrovasc. and Brain Metab. Rev 1:2 (1989)). Tales demencias se pueden tratar mediante la administración de agentes de la presente descripción.

Es un objeto de la presente descripción utilizar los agentes de la misma para tratar la esclerosis múltiple. Los agentes de la presente descripción se pueden usar solos o en combinación con otros medicamentos. Ejemplos de tales compuestos incluyen y no se limitan a: interferón beta (por ejemplo, beta-1a y/o beta-1b), acetato de glatiramer (Copaxone, una mezcla de polipéptidos que puede proteger importantes proteínas de la mielina mediante su sustitución como diana del ataque del sistema inmune), mitoxantrona y natalizumab (Tysabri), corticosteroides y anticuerpos monoclonales.

Además, los agentes de la presente descripción se pueden emplear en el tratamiento de lesiones de la médula espinal y/o en combinación con otro tratamiento aplicado después de lesiones de la médula espinal. Ejemplos actuales de tales agentes incluyen y no se limitan al fármaco esteroide metilprednisolona, administrado al cabo de las primeras 8 horas después de la lesión para reducir el daño a las células nerviosas.

Además, los agentes de la presente descripción se pueden usar en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (PD) y o en combinación con otros medicamentos administrados en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; tales agentes incluyen y no se limitan a: levodopa, carbidopa, benserazida, talcopone, entacapona, mucuna pruriens, agonistas de dopamina tales como bromocriptina, pergolida, pramipexol, ropinirol, cabergolina, apomorfina y lisurida, inhibidores de MAO-B tales como selegilina y rasagilina. Además otros tratamientos no farmacológicos, tales como intervenciones quirúrgicas, terapia del habla y ejercicio físico han mostrado ser moderadamente eficaces y el agente de la presente descripción se puede emplear también en combinación con estos métodos de terapia. Además, los agentes de la presente descripción se pueden usar en combinación con métodos que emplean terapia génica y/o celular, tales como la implantación de células modificadas genéticamente para producir dopamina o células madre que se transforman en células productoras de dopamina, o los agentes se pueden utilizar en combinación con una infusión de GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía). Esto implica la infusión de GDNF en los ganglios basales usando catéteres implantados quirúrgicamente. Además, el tratamiento con agentes neuroprotectores tales como fármacos apoptóticos (CEP 1347 y CTCT346), lazaroides, agentes bioenergéticos y/o antiglutamatérgicos, en combinación con los agentes descritos anteriormente en este documento, están dentro del alcance de la presente descripción.

En aún otra realización, los agentes de la descripción actual se pueden usar en el tratamiento del ictus. Además, los agentes de la presente descripción se pueden utilizar en combinación con medicamentos empleados en el tratamiento del ictus, tales como medicamentos antiplaquetarios (por ejemplo, aspirina, clopidogrel y dipiridamol) o una medicación anticoagulante tal como warfarina o el activador del plasminógeno tisular, tPA. El método para despejar un vaso sanguíneo bloqueado mediante una trombectomía mecánica, también se puede usar en combinación con agentes de la presente descripción.

Además, los agentes de la presente descripción se utilizan preferentemente para tratar la neuropatía, y especialmen-

te la neuropatía periférica. "Neuropatía periférica" se refiere a un trastorno que afecta al sistema nervioso periférico, que se manifiesta frecuentemente como una combinación de disfunciones neurales motoras, sensoriales, sensomotoras o autónomas. La amplia variedad de morfologías mostradas por las neuropatías periféricas pueden atribuirse cada una de forma inequívoca a un igualmente amplio número de causas. Por ejemplo, las neuropatías periféricas pueden adquirirse genéticamente, pueden ser el resultado de una enfermedad sistémica o pueden estar inducidas por un agente tóxico. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, neuropatía periférica diabética, neuropatía sensomotora distal o neuropatías autónomas tales como una movilidad reducida del tracto gastrointestinal o atonía de la vejiga urinaria. Los ejemplos de neuropatías asociadas a enfermedades sistémicas incluyen el síndrome post-polio o la neuropatía asociada a SIDA; los ejemplos de neuropatías hereditarias incluyen la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la enfermedad de Refsum, la betalipoproteinemia, la enfermedad de Tangier, la enfermedad de Krabbe, la leucodistrofia metacrómica, el síndrome de Down, la enfermedad de Fabry y el síndrome de Dejerine-Sottas; y los ejemplos de neuropatías causadas por un agente tóxico incluyen aquellas causadas por el tratamiento con un agente quimioterapéutico tal como vincristina, cisplatino, metotrexato o 3'-azido-3'-desoxitimidina.

Además, la degeneración neuronal, tal y como se observa en el envejecimiento o la senescencia, es un objeto de la presente descripción. La senescencia es la combinación de procesos de deterioro que siguen al período de desarrollo de un organismo y se caracteriza generalmente por una capacidad en disminución para responder al estrés, aumento del desequilibrio homeostático y mayor riesgo de enfermedad. El envejecimiento en sí mismo es considerado por algunos gerontólogos como una "enfermedad" que puede ser curable. De acuerdo con este punto de vista, el envejecimiento es una acumulación de daños a macromoléculas, células, tejidos y órganos, por lo tanto, unas tecnologías de reparación bioquímicas y moleculares avanzadas pueden ser capaces de contrarrestar los daños causados por la senescencia. Los agentes de la presente descripción se pueden utilizar en métodos para la protección y/o la prevención del daño inducido por senescencia, especialmente la degeneración neuronal debida a la senescencia. En una realización preferida, las formulaciones de la presente descripción se administran a un paciente para tratar una degeneración neuronal relacionada con la senescencia.

Dentro del alcance de la presente descripción se encuentra el proporcionar un agente para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de trastornos neuropsiquiátricos. Algunas de las afecciones mencionadas a continuación también pueden ser denominadas enfermedades neuronales. Las enfermedades y trastornos neuropsiquiátricos se pueden dividir en tres grupos principales: trastornos del pensamiento/psicóticos (es difícil para la gente separar lo que es real de lo que no es, por ejemplo, esquizofrenia), trastornos del estado de ánimo (afectan a cómo se siente una persona, por ejemplo, muy triste o desesperada. Si un trastorno del estado de ánimo se vuelve grave, puede parecer que sea un trastorno del pensamiento, por ejemplo, un trastorno bipolar y trastornos depresivos), trastornos de ansiedad (hacen que una persona se sienta abrumadoramente ansiosa y temerosa, por ejemplo, trastorno de angustia y trastorno obsesivo-compulsivo (OCD)). Los ejemplos de trastornos neuropsiquiátricos incluyen cualquier enfermedad o trastorno neuropsiquiátrico tal como, pero no limitados a: esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, manía, dependencia y abuso de sustancias (por ejemplo, dependencia del alcohol), depresión, trastorno bipolar, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, trastornos psicóticos, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, trastornos de ansiedad, trastorno de estrés postraumático, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno límite de la personalidad, trastorno esquizotípico de la personalidad, trastorno de la personalidad por evitación y trastorno antisocial de la personalidad. La patogénesis de la esquizofrenia puede atribuirse a una alteración del desarrollo temprano del tejido cerebral. La acumulación de datos preclínicos y clínicos indica que las disfunciones de las neurotrofinas, especialmente el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la neurotrofina-3 (NT-3) pueden contribuir a una alteración del desarrollo cerebral, neuroplasticidad y "desconexión" sináptica que conducen al síndrome esquizofrénico. Además, existen varias líneas de evidencia que apoyan un papel de las neurotrofinas y proneurotrofinas en el tratamiento de la depresión, el estrés crónico y el abuso de sustancias. Una mejora en el apoyo neurotrófico y un aumento asociado de la plasticidad y la función sinápticas puede ser la base de una eficacia antidepressiva. Por tanto, enfermedades neuropsiquiátricas y trastornos tales como la esquizofrenia, la depresión, el estrés crónico y el abuso de sustancias se pueden tratar, prevenir o mejorar mediante la administración de los agentes descritos en este documento.

Otros trastornos, enfermedades y afecciones degenerativas en un mamífero que se pueden tratar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes de la presente descripción, son enfermedades, trastornos y degeneraciones del ojo. Las afecciones de este tipo que son de especial interés, se pueden dividir en cuatro categorías: enfermedades maculares adquiridas (AMD), enfermedades vasculares de la retina, desprendimiento de retina y distrofias hereditarias del fondo de ojo. Preferiblemente, los trastornos son enfermedades maculares adquiridas tales como degeneración macular exodativa y no exodativa relacionada con la edad, enfermedades vasculares de la retina tales como retinoplasia diabética y coágulos de sangre en el ojo, y distrofias hereditarias del fondo de ojo tal como Leber. Otros trastornos se relacionan específicamente con la senescencia del ojo que, de acuerdo con la mayoría de los procesos anatómicos y fisiológicos, se debe a un deterioro gradual. Los agentes de la presente descripción son útiles en la prevención o la mejora de afecciones patológicas del ojo.

Además, el dolor y la nocicepción son indicaciones de relevancia para los agentes de la presente descripción. El dolor es, y la nocicepción puede ser, una sensación desagradable, que varía en intensidad desde leve, pasando por grave hasta indescriptible. Cuando el dolor es una sensación subjetiva, la nocicepción es un acontecimiento fisiológico medible que puede ocurrir sin que se sienta dolor. El dolor fisiológico se puede clasificar de acuerdo con el origen y sus neuronas relacionadas que detectan el dolor (nociceptores) en el dolor cutáneo, dolor somático, dolor

visceral, dolor de miembro fantasma y dolor neuropático. El dolor cutáneo es causado por una lesión en la piel o tejidos superficiales. El dolor somático se origina en los ligamentos, los tendones, los huesos, los vasos sanguíneos e incluso los propios nervios. El dolor visceral se origina en las vísceras del cuerpo, o en los órganos. El dolor del miembro fantasma es la sensación de dolor de una extremidad que se ha perdido o de la cual una persona ya no recibe señales físicas. El dolor neuropático, o "neuralgia", pueden ocurrir como resultado de una lesión o enfermedad en el propio tejido nervioso.

El dolor y/o las nocicepciones pueden surgir debido a diferentes causas, una causa principal es un traumatismo. Un traumatismo se puede producir también en cualquier parte del cuerpo, y cualquier traumatismo que causa dolor o nocicepción está dentro del alcance de la presente descripción. Otros ejemplos de dolor y nocicepciones incluyen pero no se limitan a: Relacionadas con cabeza y cuello: Mandíbula - arteritis temporal (grave); Oído - otitis media (muy común, especialmente en los niños, otitis externa; Ojos - glaucoma; Cabeza - migraña, cefalea de tensión, cefalea en racimos, cáncer, aneurisma cerebral, sinusitis, meningitis, dolor de cuello - IM (atípico); Tórax: Espalda - cáncer; Mama - perimenstrual, cáncer; Pecho - IM (común y fatal), ERGE (muy común), pancreatitis, hernia de hiato, disección aórtica (rara), embolia pulmonar (más frecuentemente asintomática), costochondritis, Hombro - colecistitis (lado derecho), MSK (musculo-esquelético); Abdomen: Abdominal - cuadrante superior derecho e izquierdo - úlcera péptica, gastroenteritis, hepatitis, pancreatitis, colecistitis, IM (atípico), aneurisma aórtico abdominal, cáncer gástrico, cuadrante inferior izquierdo y derecho - apendicitis (grave), embarazo ectópico (grave/solo mujeres), enfermedad inflamatoria pélvica (solo mujeres), diverticulitis (común en ancianos), urolitiasis (cálculos renales), pielonefritis, cáncer (cáncer colorrectal más común); Espalda: Espalda - MSK (tensión muscular), cáncer, hernia de disco espinal, enfermedad degenerativa del disco, coxis (coccidinia); Extremidades: Brazo - IM (clásicamente el izquierdo, a veces bilateral), MSK; Pierna - trombosis venosa profunda, enfermedad vascular periférica (claudicación), MSK, hernia de disco espinal, ciática; Articulaciones: Articulaciones pequeñas de forma clásica - osteoartritis (común en ancianos), artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, gota, pseudogota; Articulaciones grandes de forma clásica (cadera, rodilla) - osteoartritis (común en ancianos), artritis séptica, hemartrosis; Espalda de forma clásica - espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria del intestino; Otros - artritis psoriásica, síndrome de Reiter. Los agentes de la presente descripción se pueden emplear como analgésicos o agentes analgésicos para tratar y/o aliviar cualquiera de los tipos anteriores de dolor y/o nocicepciones.

Por otra parte, la obesidad es una indicación de relevancia para los agentes de la presente descripción. La obesidad es una afección en la que la reserva natural de energía, almacenada en el tejido adiposo de los seres humanos y otros mamíferos, se incrementa hasta un punto en que es un factor de riesgo para ciertas afecciones de la salud o aumento de la mortalidad. Se ha mostrado que un peso corporal excesivo predispone a diversas enfermedades, especialmente enfermedades cardiovasculares, apnea del sueño, osteoartritis y diabetes mellitus no dependiente de insulina. La obesidad es el mayor contribuyente a la diabetes de tipo 2. La diabetes de tipo 2 es un trastorno metabólico que está causado por una resistencia a la insulina y una carencia relativa de insulina e hiperglucemia crónica. Está aumentando rápidamente a nivel mundial y se estima que aumentará de acuerdo con las tendencias epidémicas. Un gen del receptor con dominio Vps10p se ha asociado recientemente con la diabetes de tipo 2 en ratón y rata. Otros tipos de diabetes de tipo 1 y la diabetes gestacional (GDM) que se produce durante el embarazo y otros tipos. El tipo 1 está causado por una destrucción autoinmune de las células productoras de insulina. Es un objeto de la presente descripción proporcionar agentes para el tratamiento de la obesidad, la diabetes de tipo 1, 2, GDM y los trastornos relacionados con la diabetes.

Además de la diabetes, la obesidad también aumenta el riesgo de infarto de miocardio (IM) debido a una aterosclerosis que es un objetivo de los agentes de la presente descripción.

Por consiguiente, se proporciona un método para tratar, prevenir y/o mejorar un trastorno, una enfermedad o una degeneración relacionada con la proneurotrofina en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes de la presente descripción. Estas enfermedades, trastornos o afecciones degenerativas relacionadas con la proneurotrofina, pueden ser cualquiera de las afecciones anteriores, tales como trastornos neuronales, degeneración neuronal, trastornos y enfermedades neuropsiquiátricas, senescencia, dolor y nocicepción, enfermedades, trastornos o degeneración ocular, obesidad y enfermedades relacionadas con la obesidad y diabetes. El dolor tal y como se emplea anteriormente en el presente documento, se refiere al dolor periférico. Las enfermedades oculares tal y como se emplean en el presente documento, se refieren a enfermedades de la retina, trastornos y degeneración de la retina.

Cualquiera de los agentes descritos en esta memoria se pueden emplear solos o combinados entre sí. Los agentes, por lo tanto, se pueden administrar simultáneamente o en sucesión. El agente además se puede emplear solo o en combinación junto con un segundo ingrediente activo. Estos segundos ingredientes activos pueden ser para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades o trastornos mencionados en este documento, o se pueden utilizar para otros fines.

También se describe en el presente documento un kit de partes, en donde el kit incluye al menos un agente o una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento, un medio para la administración de dicha vacuna y las instrucciones sobre cómo hacerlo. El kit puede incluir múltiples dosificaciones del mismo agente y/o composición farmacéutica o varios agentes diferentes y/o composiciones farmacéuticas. En una realización preferida, el kit de partes comprende adicionalmente un segundo ingrediente activo.

Métodos de administración

Los agentes usados en los métodos de la presente descripción se administran generalmente a un animal en forma de una composición farmacéutica adecuada. De acuerdo con ello, la presente descripción se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un agente tal como se define en esta memoria. Tales composiciones contienen típicamente el agente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal y como se usa en este documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende que incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el agente, está contemplado su uso en las composiciones. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos suplementarios.

Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías adecuadas de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis, fabricados en vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que se pueda inyectar fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe estar protegida contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Una prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el agente en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, con uno o una combinación de ingredientes mencionados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el agente en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden incluir en cápsulas de gelatina o comprimir en comprimidos. Para los fines de una administración terapéutica oral, el agente se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el vehículo fluido se aplica oralmente y se agita y se expectora o se traga. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas, los trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se administran en forma de una pulverización en aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por vía transmucosal o transdérmica. Para la administración transmucosal o transdérmica, los agentes penetrantes apropiados para que la barrera sea permeada, se utilizan en la formulación. Tales agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr a través del uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en forma de pomadas, bálsamos, geles o cremas, como se conoce generalmente en la técnica.

El agente también se puede preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

En una realización, el agente se prepara con vehículos que protegerán el compuesto frente a una eliminación rápida desde el organismo cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden emplear polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etileno vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente a partir de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también se pueden utilizar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal y como se describe en el documento de Patente de los Estados Unidos nº 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas, adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitaria está dictada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se va a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de elaboración de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de individuos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los agentes que muestran índices terapéuticos elevados. Aunque se pueden usar agentes que muestran efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija tales agentes al sitio del tejido afectado, con el fin de minimizar el daño potencial a otras células y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos celulares y estudios animales, se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método de la presente descripción, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante en plasma que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del agente del ensayo que logra una inhibición máxima media de los síntomas) como se determina en cultivos celulares. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Con respecto a la inhibición de sortilina, se emplean 10-20 μmol de neurotensina para inhibir la sortilina en un cultivo celular.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, un envase o un dispensador junto con instrucciones para la administración.

Los agentes de la presente descripción se pueden insertar adicionalmente en vectores y usarse en terapia génica. Los vectores de terapia génica se pueden administrar a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase el documento de Patente de Estados Unidos nº 5.328.470) o mediante inyección esteotáctica (véase, por ejemplo, Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está incluido el vehículo de administración de genes. Alternativamente, cuando el vector de administración génica completo se puede producir de forma intacta a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o varias células que producen el sistema de administración génica.

Los vectores adecuados para uso en terapia génica son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los vectores derivados

de adenovirus se pueden utilizar. El genoma de un adenovirus se puede manipular de tal manera que codifique y exprese un producto génico de interés pero que se inactiva en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Véase, por ejemplo, Berkner et al. (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; y Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155. Los vectores adenovíricos adecuados, obtenidos a partir de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias en las que no son capaces de infectar células que no se dividen. Además, la partícula de virus es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y como anteriormente, se puede modificar con el fin de afectar al espectro de infectividad. Además, el ADN adenovírico introducido (y el ADN extraño contenido en el mismo) no está integrado en el genoma de una célula hospedadora sino que permanece episomal, evitando de este modo problemas potenciales que pueden tener lugar como resultado de una mutagénesis por inserción, en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma del hospedador (por ejemplo, ADN retrovívico). Por otra parte, la capacidad portadora del genoma adenovírico para ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases), en relación con otros vectores de administración de genes (Berkner et al. citado anteriormente; Haj-Ahmand y Graham (1986) *J. Virol.* 57:267). En la mayoría de los vectores adenovíricos con una replicación defectuosa que están actualmente en uso y, por lo tanto, están favorecidos por la presente descripción, se delecionan genes completos o partes de los genes virales E1 y E3, pero se conserva tanto como un 80% del material genético adenovírico (véase, por ejemplo, Jones et al. (1979) *Cell* 16:683.; Berkner et al., supra; y Graham et al. en *Methods in Molecular Biology*, E.J. Murray, compilador (Humana, Clifton, NJ, 1991) vol. 7, págs. 109-127). La expresión del gen de interés comprendido en la molécula de ácido nucleico, puede estar bajo el control, por ejemplo, del promotor E1A, el promotor tardío principal (MLP) y secuencias líder asociadas, el promotor E3, o secuencias añadidas de manera exógena.

Aún otro sistema de vector viral útil para la administración de los agentes de la descripción, es el virus adenoasociado (VAA). El virus adenoasociado es un virus defectuoso natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus del herpes, como virus auxiliar para una replicación eficaz y un ciclo de vida productivo. (Para una revisión, véase Muzyczka et al. *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* (1992) 158:97-129). Los virus adenoasociados muestran una alta frecuencia de integración estable (véase, por ejemplo, Flotte et al. (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356; Samulski et al. (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; y McLaughlin et al. (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973). Los vectores que contienen tan solo 300 pares de bases de VAA se pueden empaquetar y se pueden integrar. El espacio para ADN exógeno se limita a aproximadamente 4,5 kb. Un vector VAA tal como el descrito en Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 se puede emplear para introducir ADN en linfocitos T. Una variedad de ácidos nucleicos se han introducido en diferentes tipos de células usando vectores VAA (véase, por ejemplo, Hermonat et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470; Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford et al. (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin et al. (1984) *J. Virol.* 51:611-619; y Flotte et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790). Otros sistemas de vectores virales que pueden ser útiles para la administración de los agentes de la descripción, se obtienen a partir de virus herpes, virus vaccinia y varios virus de ARN.

Debe entenderse que tales tratamientos también pueden comprender la administración de más de un agente, en cuyo caso los agentes se pueden administrar bien de forma concurrente y/o por separado.

Animales

En un aspecto de la presente descripción, los agentes capaces de inhibir la unión entre una proneurotrofina y un receptor con dominio Vps10p se administran a un animal. Dicho animal es preferiblemente cualquier animal que exprese una proteína de la familia de proneurotrofinas, más preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un animal doméstico y lo más preferiblemente un ser humano.

Métodos para el escrutinio de un compuesto que altera la unión de al menos una proneurotrofina con un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p

También se describe en el presente documento un método *in vitro* para el escrutinio de un compuesto que altera la unión de al menos una proneurotrofina con un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p, comprendiendo dicho método preferiblemente las etapas de:

- a) proporcionar un ensayo para medir la unión de una proneurotrofina con el sitio de unión del receptor sortilina que comprende SEQ ID NO. 25 o cualquier variante o fragmento de la misma (incluyendo SEQ ID NOs: 26 a 28),
- b) añadir el compuesto que se va a analizar al ensayo, y
- c) determinar la cantidad de proneurotrofina unida al receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p, y
- d) comparar la cantidad determinada en la etapa c) con una cantidad medida en ausencia del compuesto que se va a someter ensayo,
- e) en donde una diferencia en las dos cantidades identifica un compuesto que altera la unión de las proneurotrofinas con el receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p.

5 En una realización preferida de este método de escrutinio, la proneurotrofina se puede seleccionar a partir de pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3 o pro-NT-4/5. Más preferiblemente, la proneurotrofina es pro-NGF o pro-BDNF. En una realización preferida de este método de escrutinio, el receptor se selecciona a partir de SorLA, sortilina, SorCS1, SorCS3 o SorCS2. Incluso más preferiblemente, el receptor es sortilina. En otra realización del método de escrutinio, la proneurotrofina es capaz de unirse a una parte extracelular del receptor. En una realización, el receptor puede ser un receptor que se expresa en una célula, dentro de la membrana plasmática y/o se presenta sobre una membrana plasmática. La célula usada en el método de escrutinio se puede seleccionar preferiblemente a partir de cultivos primarios de células neuronales, líneas celulares obtenidas a partir de neuronas, células transfectadas capaces de expresar el receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p, neuronas periféricas y neuronas centrales. Preferiblemente, las células son líneas celulares inmortalizadas.

10 Los ensayos que se pueden emplear para medir la unión de una proneurotrofina a un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p, son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, ensayos de dos híbridos de levadura, métodos de unión competitiva, tales como RIAs, ELISAs y otros similares. Otros ensayos son la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), la resonancia de plasmón superficial (Biacore), los ensayos de transferencia Western, la inmunohistoquímica. Los resultados de los estudios de unión pueden analizarse usando cualquier representación gráfica convencional de los datos de la unión, tal como el análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci., 51:660-672 [1949]; Goodwin et al., Cell, 73:447-456 [1993]), y otros similares.

15 Además se proporciona en esta memoria un método para determinar el efecto de un agente sobre la actividad de proneurotrofinas en células que presentan un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p. Dicho método comprende las etapas de:

- 20 b) administrar dicho agente a un mamífero que expresa el receptor,
- c) medir la actividad de las proneurotrofinas en dicho mamífero,
- 25 d) comparar la medición de la etapa b) con una medición obtenida en ausencia del compuesto que está siendo evaluado,
- e) en donde la diferencia entre las dos mediciones identifica el efecto de dicho agente sobre la actividad de las proneurotrofinas sobre células que presentan receptores de la familia de receptores con dominio Vps10p.

El mamífero puede expresar el receptor de forma natural o puede estar transfectado con el gen natural del receptor.

30 La actividad de dichas proneurotrofinas en dicho mamífero puede medirse mediante una o varias de las siguientes mediciones:

- a) medir el nivel de expresión de un gen diana de respuesta a neurotrofina, tal como ARNm o proteína en tejidos del mamífero,
- b) medir el nivel de expresión de un receptor tal como se ha definido en la presente memoria, como ARNm o proteína en tejidos del mamífero,
- 35 c) medir la unión o el transporte mediados por el receptor, de proneurotrofinas unidas al receptor,
- d) medir la captación de proneurotrofinas al interior de las células de dicho mamífero,
- e) medir la transducción de señales desde dicho receptor o un receptor relacionado en células de dicho mamífero.

El receptor relacionado puede ser el receptor p75 o el receptor TrkA.

40 En una realización preferida de dicho método, el método comprende además la administración de dicho agente a un mamífero que carece de la expresión de dicho receptor. Dicho mamífero que carece de la expresión de dicho receptor puede carecer únicamente de la expresión de dicho receptor en uno o varios tejidos seleccionados, y/o puede presentar un nivel reducido de expresión de dicho receptor.

45 Los métodos para medir la expresión de ARNm o proteína del receptor en los tejidos del mamífero son bien conocidos por los expertos en la técnica y se han descrito con anterioridad. Los métodos para medir la unión o el transporte mediados por el receptor, de neurotrofinas y/o proneurotrofinas unidas al receptor, también son conocidos por los expertos en la técnica: dichos métodos incluyen, aunque sin restricción, el escrutinio de dos híbridos de levadura, el escrutinio de RTM de Biacore, la reticulación UV y la inmunoprecipitación.

50 Los métodos para medir la captación de proneurotrofinas en células de un mamífero también son bien conocidos por los expertos en la técnica: dichos métodos incluyen, aunque sin restricción, un método en el que la captación de proneurotrofina se mide en células que presentan el receptor y en células que no presentan el receptor. La proneurotrofina está marcada preferiblemente, por ejemplo, de forma radioactiva o fluorescente.

Además se proporciona un método para modular el transporte de al menos una neurotrofina y/o proneurotrofina fuera de, o hacia el interior de una línea celular o neurona de un animal, comprendiendo dicho método la administración a dicho animal de una cantidad suficiente de un agente capaz de unirse a un receptor de la familia de receptores con dominio Vps10p. Dicha modulación puede comprender un aumento del transporte anterógrado de la neurotrofina y/o la proneurotrofina en la neurona. La modulación puede comprender de forma alternativa un descenso del transporte anterógrado de la neurotrofina y/o la proneurotrofina en la neurona. En otra realización preferida, la modulación comprende un aumento del transporte retrógrado de la neurotrofina y/o la proneurotrofina en la neurona. En otra realización preferida, la modulación comprende un descenso del transporte retrógrado de la neurotrofina y/o la proneurotrofina en la neurona. La modulación puede llevarse a cabo mediante un agente, tal y como se ha descrito anteriormente.

Bancos de agentes

En la presente descripción se pueden emplear bancos de compuestos para escrutar agentes capaces de inhibir la unión entre un receptor con dominio Vps10p y una proneurotrofina.

Tal y como se usa en este documento, el término "banco" se refiere a una colección de entidades moleculares o compuestos de ensayo también denominados en esta memoria "miembros del banco".

En realizaciones preferidas, el banco es un banco combinatorio. Ejemplos no limitantes de bancos combinatorios que se pueden utilizar y métodos para producir tales bancos se proporcionan en: *Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis*: 1998 Roland E. Dolle y Kingsley H. Nelson, Jr. *J. Comb. Chem.*, 1999, págs. 235 - 282; *Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis*: 1999 Roland E. Dolle *J. Comb. Chem.*, 2000, págs. 383 - 433; *Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis*: 2000 Roland E. Dolle *J. Comb. Chem.*, 2001, págs. 477 - 517; *Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis*: 2001 Roland E. Dolle *J. Comb. Chem.*, 2002, págs. 369 - 418 y *Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis*: 2002 Roland E. Dolle *J. Comb. Chem.*, 2003, págs. 693 - 753. La persona experta apreciará que estos protocolos se pueden adaptar fácilmente a las necesidades específicas de una realización particular de la presente descripción.

En una realización, estas entidades moleculares pueden ser oligómeros naturales (oligómeros de elementos básicos que se producen en la naturaleza) tales como péptidos, glicopéptidos, lipopéptidos, ácidos nucleicos (ADN o ARN) u oligosacáridos. A modo de ejemplo, un oligómero natural puede ser cualquier péptido que consiste en un aminoácido de origen natural, incluso si dicho péptido comprende una secuencia que no está presente en la naturaleza. Los bancos pueden comprender diferentes oligómeros naturales o los bancos pueden comprender solo un tipo de oligómero natural, por ejemplo, el banco puede ser un banco de péptidos. En otra realización, pueden ser oligómeros no naturales (oligómeros que comprenden uno o varios elementos básicos que no están presentes en la naturaleza) tales como péptidos, glicopéptidos, ácidos nucleicos (ADN o ARN) u oligosacáridos modificados químicamente, y similares. Dicha modificación química puede ser, por ejemplo, el uso de elementos básicos no naturales conectados por el enlace natural que une las unidades (por ejemplo, un enlace péptido amida), el uso de elementos básicos naturales con unidades enlazantes modificadas (por ejemplo, oligoureas como se describe en Boeijen et al, 2001, *J. Org. Chem.*, 66: 8454-8462; oligosulfonamidas como se describe en Monnee et al, 2000, *Tetrahedron Lett.*, 41: 7991-95), o combinaciones de las mismas (por ejemplo, amidas de estatina como se describe en Dolle et al, 2000, *J. Comb. Chem.*, 2: 716-31). Los oligómeros no naturales preferidos incluyen oligómeros que comprenden elementos básicos no naturales conectados entre sí por una unión con enlaces de origen natural. Dichos oligómeros, por lo tanto, pueden comprender una mezcla de elementos básicos de origen natural y no natural unidos entre sí por enlaces de origen natural. A modo de ejemplo, el oligómero puede comprender aminoácidos de origen natural y elementos básicos no naturales unidos por enlaces peptídicos, p. ej., PNA o LNA. Por tanto, en una realización, los oligómeros preferidos comprenden aminoácidos modificados o miméticos de aminoácidos. Otros oligómeros no naturales preferidos incluyen, por ejemplo, oligoureas, poliazatidas, oligómeros con enlaces C-C aromáticos y oligómeros con enlaces C-N aromáticos. Todavía otros oligómeros preferidos comprenden una mezcla de elementos básicos naturales y no naturales y enlaces de unión naturales y no naturales. Por ejemplo, el oligómero no natural puede ser cualquiera de los oligómeros mencionados en revisiones recientes, véanse: Graven et al., 2001, *J. Comb. Chem.*, 3: 441-52; St. Hilaire et al., 2000, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 39: 1162-79; James, 2001, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1: 540-6; Marcaurelle et al., 2002, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6: 289-96; Breinbauer et al., 2002, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 41: 2879-90. Los bancos también pueden comprender oligómeros cíclicos, por ejemplo, oligómeros naturales cíclicos, tales como péptidos cíclicos u oligómeros no naturales cíclicos. En ciertas realizaciones, puede ser ventajoso usar los bancos de oligómeros cíclicos debido a la estructura rígida. Esto puede dar como resultado una selectividad y afinidad mayores.

En aún otra realización, las entidades moleculares pueden comprender moléculas no oligoméricas tales como peptidomiméticos u otras moléculas orgánicas pequeñas. Los peptidomiméticos son compuestos que imitan la acción de un mensajero peptídico, tales como peptidomiméticos bicíclicos de tiazolidina lactama de L-propil-L-leucil-glicinamida (Khalil et al., 1999, *J. Med. Chem.*, 42: 2977-87). En una realización preferida, el banco comprende o, incluso más preferiblemente, consiste en moléculas orgánicas pequeñas. Las moléculas orgánicas pequeñas son compuestos no oligoméricos de menos de aproximadamente 600 unidades de masa que contienen cualquiera entre una variedad de posibles grupos funcionales y son el producto de una síntesis química, o se aíslan de la naturaleza, o se aíslan de la naturaleza y a continuación se modifican químicamente, e incluyen, por ejemplo, inhibidores de cinasa basados en

urea de Bayer (Smith et al., 2001, Bioorg. Med. Chem. Lett., 11: 2775-78). Los compuestos orgánicos pequeños se pueden seleccionar, por ejemplo, a partir del grupo que consiste en alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ariloxi, aciloxi, tiol, alquiltio, ariltio, heteroariltio, sulfonilo, sulfoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, diacilamino, alcocarbonilamino, amidas, alquilo, alquilo ramificado, arilo, heteroarilo, nitro, ciano, halógeno, sililoxi, ceto, heterociclos, sistemas de anillos fusionados, heterociclos fusionados y mezclas de los mismos, en donde cada uno de los mencionados anteriormente puede estar sustituido independientemente en cada posición, con uno o varios grupos seleccionados a partir del grupo que consiste en -H, -OH, -SH, halógeno, carboxilo, carbonilo, alcoxi, ariloxi, aciloxi, alquiltio, ariltio, heteroariltio, sulfonilo, sulfoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, diacilamino, alcocarbonilamino, amidas, alquilo, arilo, heteroarilo, nitro, ciano, halógeno, sililoxi, ceto, heterociclos, sistemas de anillos fusionados y heterociclos fusionados.

Ejemplos no limitantes de bancos de moléculas orgánicas pequeñas que se pueden utilizar y métodos para producirlos se pueden encontrar, por ejemplo, en las revisiones de Thompson et al., 1996, Chem. Rev., 96: 555-600; Al-Obeidi et al., 1998, Mol. Biotechnol., 9: 205-23; Nefzi et al., 2001, Biopolymers, 60: 212-9; Dolle, 2002, J. Comb. Chem., 4: 369-418.

Los bancos pueden comprender al menos 20, tal como al menos 100, por ejemplo, al menos 1000, tal como al menos 10.000, por ejemplo, al menos 100.000, tal como al menos 1.000.000 de compuestos de ensayo diferentes. Preferiblemente, los bancos comprenden el intervalo de 20 a 10^7 , más preferiblemente de 50 a 7.000.000, aún más preferiblemente de 100 a 5.000.000, aún más preferentemente de 250 a 2.000.000 de compuestos diferentes. En una realización muy preferida, los bancos comprenden el intervalo de 1000 a 20.000, tal como en el intervalo de 20.000 a 200.000 compuestos de ensayo diferentes. En realizaciones preferidas, el banco comprende el intervalo de 10.000 a 1.000.000 compuestos de ensayo diferentes.

La selección de un banco apropiado depende de la realización específica de la descripción. Por ejemplo, un banco totalmente al azar, diseñado para contener diversos compuestos en gran medida, se puede usar para el escrutinio de agentes de la presente descripción. Una ventaja de este enfoque es que el resultado del escrutinio no está pre-dispuesto de ninguna manera específica.

Alternativamente, un banco dirigido más pequeño (de cientos a miles de compuestos) se puede utilizar, por ejemplo, partiendo de un compuesto o compuestos conocidos, y proporcionando numerosas variaciones de estos compuestos conocidos para el escrutinio deseado. Alternativamente, un banco más pequeño dirigido, de compuestos que imitan un compuesto conocido por inhibir la unión entre una proneurotrofina y un receptor con dominio Vps-10p, tal como un receptor sortilina, se puede preparar, por ejemplo, usando un diseño asistido por ordenador, seguido de síntesis química. El banco más pequeño dirigido también puede comprender moléculas aleatorias.

También se describen en este documento métodos de síntesis de bancos de compuestos de ensayo, en donde dichos bancos son en particular útiles para escrutar agentes capaces de inhibir la unión entre una proneurotrofina y un receptor sortilina, especialmente SEQ ID NO: 25 de dicho receptor sortilina o cualquier fragmento o variante de dicha SEQ ID NO. 25, teniendo dicho fragmento al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 25.

Los bancos se pueden emplear según el método de escrutinio general descrito en el ejemplo 5. Mediante la utilización de un robot de pipeteado, el método permite el escrutinio de bancos muy grandes para identificar agentes capaces de inhibir la unión entre proneurotrofinas y sortilina. Los agentes pueden ser cualquier agente de acuerdo con la presente descripción.

40 Descripción de los dibujos

Figura 1: Ejemplos de receptores con dominio Vps10p. Se indica su composición estructural.

Figura 2: Caracterización de la unión de NGF a p75, TrkA y sortilina tal y como se mide por análisis de resonancia de plasmón de superficie (BIAcore). Se midió la unión de NGF 50-500 nM a $91,5 \text{ fmol/mm}^2$ de proteína química p75-IgG-Fc inmovilizada (panel superior), a 66 fmol/mm^2 de TrkA-IgG-Fc inmovilizada (panel del medio) y a 51 fmol/mm^2 de dominio extracelular de sortilina purificada (panel inferior). Se registraron las tasas de arranque (on) y apagado (off) - de 100 a 600 segundos y de 600 a 1000 segundos, respectivamente - y se calcularon los valores Kd de la unión de NGF correspondientes a $\sim 1 \text{ nM}$ para p75, $\sim 2 \text{ nM}$ para TrkA y $\sim 8 \text{ nM}$ para sortilina. El NGF murino maduro procedía de Austral Biologicals (San Ramon, CA), las quimeras de receptor de neurotrofina p75 humano/Fc y de TrkA humano/Fc eran de R&D Systems (Oxon, R.U.). La sortilina humana se produjo en células CHO transfectadas de forma estable y purificadas como se ha descrito previamente (Munck Petersen et al., EMBO J. (1999) 18: 595-604).

Todos los datos proporcionados en esta figura se obtuvieron por medio de mediciones de resonancia de plasmón de superficie (análisis BIAcore).

Figura 3: Caracterización de la unión de proNGF a p75, TrkA y sortilina determinada mediante análisis de plasmón superficial (BIAcore). Se midió la unión de proNGF 25-500 nM a $91,5 \text{ fmol/mm}^2$ de proteína química p75-IgG-Fc inmovilizada (panel superior), a 66 fmol/mm^2 de TrkA-IgG-Fc inmovilizada (panel del medio) y a 51 fmol/mm^2 de dominio extracelular de sortilina purificada (panel inferior). Se registraron las tasas de arranque (on) y apagado (off) -

de 100 a 600 segundos y de 600 a 1000 segundos, respectivamente - y se calcularon los valores Kd correspondientes a unión de pro-NGF a ~ 12 nM para p75, ~ 15 nM para TrkA y ~ 5 nM para sortilina. El proNGF humano recombinante fue producido y purificado en *E. coli* tal como se ha descrito (Rattenholl et al., Eur. J. Biochem. (2001) 268: 3296-3303). El resto de reactivos fueran como se ha descrito en la leyenda de la figura 2. Todos los datos proporcionados en esta figura fueron obtenidos por mediciones de resonancia de plasmones de superficie (análisis Biacore).

Figura 4: Caracterización de la unión del propéptido de proNGF a p75, TrkA y sortilina, determinada mediante análisis de plasmón superficial (BIAcore). Se midió la unión de propéptido 25-500 nM a 91,5 fmol/mm² de proteína química p75-IgG-Fc inmovilizada (panel superior), a 66 fmol/mm² de TrkA-IgG-Fc inmovilizada (panel del medio) y a 51 fmol/mm² de dominio extracelular de sortilina purificada (panel inferior). Se registraron las tasas de arranque (on) y apagado (off) - de 100 a 600 segundos y de 600 a 1000 segundos, respectivamente - y se calcularon los valores Kd correspondiente a propéptido de proNGF correspondientes a ~ 8 nM para sortilina. No se produjo una unión detectable con p75 y TrkA. El propéptido de NGF humano expresado en *E. coli* fue suministrado por Elisabeth Schwarz, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Alemania. El resto de reactivos fueron como se ha descrito en las leyendas de las figuras 2 y 3. Todos los datos proporcionados en esta figura se obtuvieron por medio de mediciones de resonancia de plasmón de superficie (análisis Biacore).

Figura 5: Este ejemplo de referencia que no forma parte de la presente invención, demuestra que es posible inhibir la unión de una proneurotrofina a un receptor con dominio Vps10p. La figura del ejemplo de referencia muestra la inhibición de la unión de proNGF a sortilina inmovilizada mediante neurotensina tal y como se mide por análisis de Biacore. La unión de proNGF 200 nM a 51 fmol/mm² de sortilina inmovilizada es inhibida por ~ 45% después de la coinyección con neurotensina 10 µM. La unión de neurotensina sola se muestra para comparación. La neurotensina se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Todos los demás productos eran como se ha indicado anteriormente. Todos los datos proporcionados en esta figura se obtuvieron por medio de mediciones de resonancia de plasmón de superficie (análisis Biacore).

Figura 6: Este ejemplo de referencia que no forma parte de la presente invención, demuestra que es posible inhibir la unión de una proneurotrofina a un receptor con dominio Vps10p. La figura del ejemplo de referencia muestra la unión de proNGF a sortilina inmovilizada mediante RAP (proteína asociada a receptor), el propéptido de proNGF y el propéptido de sortilina. Los inhibidores se ligaron previamente a sortilina y después se realizó una inyección conjunta con proNGF 200 nM. Se han corregido los valores base correspondientes a las señales obtenidas en presencia de cada uno de los inhibidores. La unión máxima a proNGF se mide sin preincubación con los respectivos inhibidores. La unión de proNGF 200 nM a 51 fmol/mm² de sortilina inmovilizada se inhibe en un ~65% por RAP 10 µM, en un ~85% por 5 µM del propéptido de proNGF y en un ~65% por 5 µM del propéptido de sortilina. Todos los datos proporcionados en esta figura se obtuvieron por medio de mediciones de resonancia de plasmón de superficie (análisis Biacore).

Figura 7: Caracterización de la unión de BDNF y el prodominio de proBDNF a sortilina purificada, determinada mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore). El BDNF humano recombinante maduro procedía de Promega (#G1491) y el prodominio de BDNF humano fusionado a GST (glutación S-transferasa) se produjo en *E. coli* y se purificó mediante cromatografía de afinidad glutatión-sefarosa. La unión, del prodominio de proBDNF (una proteína de fusión con GST, panel del medio) o de BDNF (panel inferior) se midió a 94 fmol/mm² de dominio extracelular de sortilina purificada inmovilizada. El experimento se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito en las figuras 2-4. Se registraron las tasas de arranque (on) y apagado (off) - de 100 a 600 segundos y de 600 a 1000 segundos, respectivamente - y se calcularon los valores Kd para la unión del ligando a ~58 nM para el prodominio de GST de proBDNF y ~40 nM para BDNF maduro. Otras preparaciones de BDNF maduro han mostrado valores Kd para la unión de ligando a 10 nM. Todos los datos proporcionados en esta figura se obtuvieron por medio de mediciones de resonancia de plasmón de superficie (análisis Biacore).

Figura 8: Caracterización funcional de prodominios de neurotrofina recombinante marcada con his-S. A. Tinción de Coomassie de los polipéptidos purificados de pro-dom-NGF (residuos Glu¹- Arg¹⁰²) y pro-dom-BDNF (residuos Ala¹- Arg¹¹⁰) clonados en el vector pET-30 fXa/LIC (Novagen) que añade los dos marcadores N-terminales poli-histidina y S-péptido. B, C. La presencia de ambos marcadores se verifica por transferencia Western y la detección mediante el uso de un anticuerpo primario contra histidina, seguido de incubación con anticuerpo secundario conjugado con HRP (B) o con una versión conjugada directamente con HRP de S-proteína (C). D, E. Análisis de resonancia de plasmón superficial de la unión de los pro-dominios bacterianos de NGF (D) y BDNF (E) con el dominio extracelular inmovilizado de sortilina.

Figura 9: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cuatro neurotrofinas de mamífero. Un alineamiento de las secuencias de NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5, que muestra un alto grado de conservación de la parte madura, y mucha menos conservación de secuencia entre los pro-dominios. Los residuos conservados estrictamente se resaltan sobre un fondo negro, y los residuos conservados en parte sobre un fondo gris.

Figura 10: Análisis de manchas de la unión de pro-dom-NGF/BDNF a receptores con Vps10p incluyendo sortilina y detección con HRP-S-proteína. Las membranas que contienen péptidos solapantes de 16-meros de los cinco receptores humanos que contienen dominio Vps10p (sortilina, SorLA, SorCS1, SorCS2 y SorCS3) se incubaron en pre-

sencia de pro-dom-NGF (20 µg/ml, A) o pro-dom-BDNF (20 µg/ml, B) o en ausencia de ligando (C). El ligando unido se detectó mediante incubación de la membrana con S-proteína conjugada con HRP, que también se une específicamente a péptidos de control presentes en la esquina de la parte superior izquierda y la esquina inferior derecha de cada receptor diseccionado. Un sitio de unión específico para los prodominios de neurotrofina se muestra en el cuadro que consiste en tres péptidos consecutivos que se unen a sortilina (manchas 67-68-69), pero no se observa para la detección utilizando únicamente la HRP-S-proteína.

Figura 11: Análisis de manchas de la unión de pro-dom-BDNF a sortilina utilizando la inmunodetección con anti-histidina. Análisis repetidos de la unión de pro-dom-BDNF al banco de péptidos pero con detección usando un anticuerpo primario contra poli-histidina, seguido por un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP, mostraron un ligero desplazamiento hacia una interacción específica con los péptidos 64-65-66 (B), que no se identifica cuando la membrana no se incubaba con un ligando antes de la detección (A). Las manchas correspondientes a 22-25 representan la unión del sistema de detección independiente sobre pro-dom-BDNF.

Figura 12: Confirmación independiente de la unión de pro-dom-BDNF a las manchas 67-68-69 mediante la detección de HRP-S-proteína. Se sintetizó una nueva membrana y se examinó con un lote recién producido de pro-dom-BDNF que mostraba una unión específica a las manchas 67-68-69 con 1 min de exposición (A) para verificar la unión a residuos alrededor de esta secuencia de sortilina. Después de 5 minutos de exposición, unos pocos péptidos adicionales también muestran interacciones menores.

Figura 13: Secuencia de aminoácidos de las manchas 64-69. Las secuencias de sortilina de 16-meros que se corresponden a las manchas 64-69 son propensas a tener el sitio de unión principal para pro-dominios de neurotrofinas.

Figura 14: Alineamiento del dominio Vps10p de sortilina. La presencia repetida del motivo Asp-box (S/T-X-D-X-G-X-X-W/F) se utilizó para hacer un alineamiento que mostraba una repetición de secuencia interna que se encontraba, por ejemplo, en dominios que tenían un plegamiento en hélice beta, en donde los residuos localizados alrededor de este motivo están presentes en la superficie molecular. Los residuos conservados estrictamente se resaltan sobre un fondo negro, y los residuos conservados parcialmente sobre un fondo gris.

Figura 15: Análisis de la sustitución del péptido RIFRSSDFAKNFVQTD. El análisis de la unión del pro-dom-BDNF a un péptido con la secuencia de sortilina de tipo silvestre RIFRSSDFAKNFVQTD, figura a la izquierda en la membrana. La unión a péptidos mutantes, en donde cada aminoácido se ha sustituido con cada uno de los 20 aminoácidos de origen natural, se usa para la identificación de residuos específicos importantes para la interacción con la parte inmadura de las neurotrofinas. La detección utilizando HRP-S-proteína (A) o el método inmunoespecífico anti-histidina (B) identifica los residuos virtualmente idénticos para este método. C, D. Representación gráfica de barras de la variación de la unión después de la sustitución de aminoácidos. Este método puede ser adecuado para la identificación de péptidos con *super-unión*.

Figura 16: Análisis de sustitución de la unión de pro-dom-BDNF a los péptidos RIFRSSDF y FAKNFVQTD. A, B. La división del péptido mostrado en la Figura 8 proporciona una evidencia de que el péptido más largo contiene dos motivos de unión independientes para la unión a pro-dom-BDNF. El análisis de sustitución identifica claramente las dos secuencias RIFR (A) y FAKNF (B) como sitios de interacción específica para los prodominios de BDNF. C. Confirmación mediante análisis de sustitución de que el motivo FAKNF no se extiende de forma C-terminal.

Figura 17: Análisis de la longitud de la unión de pro-dom-BDNF a péptidos de sortilina. Mediante la delección de residuos de aminoácidos individuales, se determina la longitud de un péptido mínimo de sortilina funcional, lo que confirma que secuencias pequeñas, p. ej., tetraméricas tienen alta afinidad hacia pro-dom-BDNF (en blanco sobre fondo negro).

Figura 18: Análisis de la unión mediante resonancia de plasmón superficial de péptidos de sortilina a pro-dom-NGF y pro-dom-BDNF. La interacción directa entre péptidos de sortilina (como se identifica por análisis de manchas) y los pro-dominios de NGF y BDNF se verificó mediante análisis de resonancia de plasmón superficial, usando pro-dom-NGF y pro-dom-BDNF. Una serie de concentraciones del péptido RSSDFAKNFVQTDLPF (A) (que contiene solo uno de los dos sitios de unión potenciales que residen en esta región) o RIFRSSDFAKNF (B) que confirma el resultado de una unión directa como se observa por un análisis de péptido inmovilizado sobre la membrana de las manchas. Mediante una comparación de curvas de unión (sensogramas) para una sola concentración de péptido para células que fluyen que contienen cantidades idénticas de pro-dom-NGF y pro-dom-BDNF inmovilizados, se pudo observar una mayor afinidad de los péptidos hacia BDNF que hacia NGF, de acuerdo con informes anteriores que describen un patrón similar para la unión de pro-BDNF y pro-NGF a la sortilina de longitud completa, apoyando la idea de que estos péptidos contienen un epítipo de unión principal. La numeración en esta figura se refiere a la parte madura de sortilina.

Figura 19: Análisis mediante resonancia de plasmón superficial de estudios de competición con péptidos de sortilina. La sortilina recombinante se purificó a partir de células 293, y se utilizó para estudios de unión a pro-dom-BDNF inmovilizado (pro-dom-péptido; RSSDFAKNFVQTDLPF), y la unión se inhibió significativamente en presencia de los péptidos de sortilina identificados (+péptido). El recuadro indica un efecto similar del péptido en la competencia de la

unión de sortilina a pro-dom-NGF inmovilizado, y la calidad de la sortilina aplicada se indica a la derecha mediante un análisis SDS-PAGE teñido con plata.

Figura 20: Hipoalgesia térmica en ratones carentes de sortilina, como se determina por el ensayo en placa caliente. Se realizó la prueba de placa caliente del modo siguiente. Ratones de tipo silvestre (sortilina +/+) y con el gen desactivado (sortilina -/-) se colocaron en una placa caliente Plactronic termorregulada, fijada en 55°C. Posteriormente se observó en cada animal si lamía sus extremidades posteriores o si saltaba como respuesta al calor. En cada animal se registró la primera respuesta. Se empleó un valor de corte de 30 s con el fin de evitar un daño tisular.

Figura 21: Sensogramas representativos de la unión de pro-dom-NGF en series de concentración similar de 10, 20, 30, 40 y 50 nM a chips biosensores que contenían sortilina de tipo silvestre inmovilizada o mutaciones de residuos individuales, como se ha indicado. Cada estructura artificial de sortilina se inmovilizó con una densidad de superficie similar lo que permitió una comparación directa entre los diferentes dominios del receptor.

Figura 22: Análisis por resonancia de plasmón superficial de la unión de GST-pro-dom-NGF 50 nM a sortilina de tipo silvestre (TS) inmovilizada o al mutante cuatro de sortilina (que contiene una sustitución cuádruple en R163A, F165A, R166A, F170A) como se ha indicado. La unión está gravemente afectada después de la mutación que elimina todo el motivo *RIFR* y el residuo de fenilalanina proximal del motivo *FAKNF*, como se observa por el nivel de respuesta mucho menor.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Materiales y proteínas

Para obtener formas marcadas de los prodominios de neurotrofina para una detección facilitada en el análisis de manchas, las estructuras artificiales se prepararon para cada proteína permitiendo la adición de marcadores S-péptido y poli-histidina N-terminales. El ADNc molde para NGF y BDNF humano eran clones de ATCC, utilizados para la generación de fragmentos que abarcaban los residuos Glu1-Arg102 de NGF y Ala1-Arg110 de BDNF, utilizando las parejas de cebadores

```
5'GGTATTGAGGGTGC GGAACCCACTCAGAGAGCAATGTCCC3',
3'GGGGGAAGTTGTCCTGAGTGTCTCGTTCCGCCACTCCGAGATTGAGAGGAG
A5' and 5'GGTATTGAGGGTGC GCGCCCCATGAAAGAAGCAAACATCCGAGG3',
3'CACGTTTGTACAGGTACTCCCAGGCCGCGACTCCGAGATTGAGAGGAGA5'
```

con salientes compatibles para la clonación independiente de la ligación en el vector pET-30 Xa/LIC de Novagen (nº de catálogo 70073-3) y la amplificación utilizando ADN polimerasa Phusion y siguiendo el protocolo tal y como lo proporcionaba el fabricante. Las proteínas se expresaron en la cepa BL21/DE3 de *E. coli*, se extrajeron de manera eficaz a partir de los cuerpos de inclusión bacterianos, utilizando el reactivo Bugbuster de Novagen (nº de catálogo 70921) con benzonasa añadida (Novagen, nº de catálogo 70750), y se purificaron mediante cromatografía de afinidad en Ni²⁺-NTA convencional en NaCl 500 mM, imidazol 5 mM y Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. La elución de proteínas se realizó en tampón complementado con EDTA 20 mM. La verificación de las versiones marcadas intactas de prodominio-NGF y prodominio-BDNF se llevó a cabo mediante un análisis de SDS-PAGE, seguido por tinción con Coomassie o transferencia Western, usando un anticuerpo contra el marcador histidina de Sigma (H-1029) y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP de Calbiochem (nº de catálogo 401207) o, alternativamente, mediante la unión directa de S-proteína conjugada con HRP de Novagen (nº de catálogo 69047-3).

Para la producción del ectodominio de sortilina, una estructura artificial que abarcaba la región codificante completa de la parte N-terminal de sortilina humana, incluyendo el péptido señal endógeno y seguida por un marcador de poli-histidina C-terminal insertado en el vector pCEP-Pu, fue amablemente proporcionada por D. Miltz, Berlin. El ADN se transfirió a células EBNA293 que se seleccionaron mediante G418 (Gibco nº de catálogo 10131-027, 300 µg/ml) y puomicina de Sigma (P8833 nº de catálogo, 1 µg/ml) antes de recoger las proteínas desde el medio condicionado durante 48 h, y se utilizó para la purificación mediante la aplicación a Ni²⁺-NTA Sefarosa. La cadena polipeptídica de sortilina recombinante secretada que abarcaba el dominio extracelular completo de sortilina humana, termina de este modo en Ser725 (+AMIEGRGVGHHHHHH que contiene el sitio de fXa y el marcador poli-histidina). La calidad de la proteína se sometió a ensayo mediante tinción con plata del análisis SDS-PAGE. Los péptidos para estudios de unión y competencia se sintetizaron internamente o en Eurogentec.

Ejemplo 2 - Análisis por resonancia de plasmón superficial

La determinación de una unión directa del ligando con la proteína inmovilizada se realizó en un instrumento BIAcore2000 (Biacore, Suecia) usando CaHBS como tampón de desplazamiento estándar (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM y 0,005% de Tween-20). Un chip biosensor de Biacore (CM5, nº de catálogo BR-1000-14) se activó usando el método NHS/EDC como describe el proveedor, seguido por recubrimiento con sortilina hasta una densidad de proteína de 79 fmol/mm², y se utilizó para mediciones de afinidad de los pro-dominios recombinantes de NGF y BDNF. La regeneración de la celda de flujo después de cada ciclo del experimento de unión a

ligando se realizó mediante dos pulsos de 10 uL de tampón de regeneración (glicina-HCl 10 mM, pH 4,0, NaCl 500 mM, EDTA 20 mM y 0,005% de Tween-20) y una sola inyección de 0,001% de SDS. El ajuste de los sensogramas para las estimaciones de afinidad se realizó utilizando la versión 3.1 de Biaevaluation.

5 Siguiendo protocolos similares, la inmovilización de pro-dom-NGF o pro-dom-BDNF también se llevó a cabo sobre un chip biosensor CM5, utilizando el kit de acoplamiento NHS/EDC de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biacore, Suecia), proporcionando densidades superficiales similares de proteína inmovilizada (~300 fmol/mm²). Los péptidos purificados se aplicaron al chip a concentraciones crecientes para verificar la unión directa de los dominios proneurotróficos a péptidos lineales de sortilina. Este chip se utilizó posteriormente para examinar la unión del dominio de sortilina de tipo silvestre 390 nM en tampón CaHBS, con un flujo de 5 uL/min que, en ausencia de cualquier péptido que compite, daba una señal de ~300 UR. Para la competencia que utiliza 300 uM del péptido, solamente se puede unir 1/3 de la sortilina a pro-dom-BDNF inmovilizado (que muestra ~66% de inhibición en el péptido).

Ejemplo 3 - Preparación de la membrana de celulosa

15 Los bancos de péptidos se generaron para todos los miembros de la familia de genes del receptor con dominio Vps10p o variaciones de péptidos específicos, en términos de sustitución o la longitud de los péptidos que se unen a sortilina identificados. Se utilizó un total de 2181 péptidos para la representación de la familia de genes de sortilina, que se correspondían con 273 péptidos para sortilina (código de acceso: CAA66904), 734 péptidos para SorLA (código de acceso: NP_003096), 389 péptidos para SorCS1 (código de acceso: NP_001013049), 382 péptidos para sorCS2 (código de acceso: Q96PQ0) y 403 péptidos para SorCS3 (código de acceso: CAI64579), con un solapamiento de 13 aminoácidos entre los 16 meros.

20 Un soporte de celulosa se prepara como una membrana de éter de amino-hidroxipropil-celulosa modificada en N, y todas las rondas de síntesis comienzan con la definición de la mancha mediante éster de 9-fluorenil-metoxycarbonil-β-alanina-pentafluorofenilo que crea un enlazador de alanina entre el péptido y la membrana. A continuación, siguió una síntesis lineal automatizada de adición gradual de los diferentes aminoácidos protegidos en su extremo amino terminal mediante 9-fluorenil-metoxycarbonilo y una protección adecuada de la cadena lateral para la cadena peptídica en crecimiento. El patrón de desprotección, activación y acoplamiento continuó hasta que se produjeron péptidos de 16 meros, lo que dio como resultado una matriz distribuida de forma equitativa de péptidos anclados covalentemente al soporte de celulosa en su extremo C-terminal y un extremo libre N-terminal. La membrana se bloqueó finalmente en tampón de bloqueo de Sigma (nº de catálogo B6429) diluido en TBS y se complementó con 5% de sacarosa (Merck, nº de catálogo K32055087 422) durante 2 h, antes de que el banco de péptidos predefinido estuviera listo para el análisis de unión a ligando.

Ejemplo 4 - Estudios de unión de los péptidos unidos a celulosa

35 Los bancos unidos a la membrana se incubaron con pro-dominios combinados marcados con S-péptido y polihistidina (10 µg/ml) en tampón de bloqueo durante una noche a 4°C, seguido de una segunda incubación con 1 µg/ml de S-proteína conjugada con HRP de Novagen (nº de catálogo 69047-3) también en tampón de bloqueo pero durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos con TBS antes de que la caracterización cuantitativa de ligando unido se llevara a cabo utilizando el sustrato de quimioluminiscencia UptiLight de Uptima (nº de catálogo UP99619A) y el instrumento Lumil-Mager de Roche Diagnostics, que proporcionaba intensidades de la señal de las manchas en unidades de luz Boehringer (BLUs). Alternativamente, la detección del ligando unido se realizó mediante un ensayo inmunoquímico, en donde un anticuerpo contra el marcador histidina era de Sigma (H-1029) y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP era de Calbiochem (nº de catálogo 401207). Las incubaciones siguieron a procedimientos estándar de transferencia Western y detección de manchas como anteriormente.

45 El método de análisis por sustitución y análisis de la longitud para identificar los residuos de aminoácidos únicos individuales y para determinar la secuencia peptídica mínima, respectivamente, para una unión eficaz de las pro-dominio-neurotrofinas con el péptido de sortilina, seguida de protocolos similares como para el ensayo inicial de unión del ligando a la membrana con manchas.

Ejemplo 5 - Ensayo de radioligando

50 La sortilina recombinante (38 pmol) se marca con [¹²⁵I] usando el reactivo de yodación Iodogen de Pierce (nº de catálogo 28600) hasta una actividad específica de ~5 x 10¹⁸ cpm/mol de sortilina. El pro-dom-NGF (o pro-dom-BDNF) recubre pocillos de microtitulación Maxisorp de Nunc (nº de catálogo 439454) mediante incubación durante 16 horas a 4°C en NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6. Después del bloqueo usando 5% de albúmina de suero bovino (Sigma, nº de catálogo A9647) durante 2 h a temperatura ambiente, los pocillos se lavan tres veces con tampón MB (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2 mM y MgCl₂ 1 mM) antes de la incubación con ¹²⁵I-sortilina, permitiendo una unión total de ~2.000 cpm/pocillo y cantidades variables de concentraciones de péptido competitivo se llevan a cabo durante 16 horas a 4°C en tampón MB complementado con 2% de albúmina de suero bovino. Después de lavados con tampón MB, la radiactividad unida se libera mediante la adición de 10% de SDS. La unión no específica del trazador a los pocillos recubiertos solamente con albúmina de suero bovino, se determina y se resta de los valores determinados en los experimentos de unión. El ajuste de los datos a las ecuaciones de unión utilizando el programa

informático Prism de GraphPad, versión 4, produce la estimación de las constantes Cl_{50} .

Ejemplo 6 - Investigación de las propiedades antagonistas

Investigación de las propiedades del péptido como un antagonista *in vivo* de la unión de proneurotrofina a sortilina en un modelo animal de lesiones nerviosas en el cerebro de rata.

- 5 i) Determinación de los valores de Cl_{50} para el péptido de longitud completa, así como péptidos más pequeños tal y como se identifican a partir de nuestro análisis de la longitud reciente, ilustran que los péptidos de 4-meros (por ejemplo, RIFR) se unen muy fuertemente a los pro-dominios de pro-NGF y pro-BDNF. Esto se realiza ya sea mediante:
- 10 ia) un marcado con ^{125}I de sortilina y ensayos de competencia en estado sólido usando pro-dominio-NGF/BDNF inmovilizado en pocillos de microtitulación de Maxisorb, seguido de estudios de competencia, utilizando un aumento de los niveles de los diversos péptidos con el fin de comparar las propiedades inhibitorias.
- ib) el uso de un análisis de resonancia de plasmón superficial para series de concentraciones de los diversos péptidos similares a los resultados mostrados para una sola concentración de péptido A2.
- 15 ii) Ensayo de la influencia de los residuos esenciales, identificados por el análisis de sustitución por su contribución a la unión a proneurotrofina. Usando el sistema de expresión EBNA293 para la producción recombinante del ectodominio de sortilina (el gel teñido con plata se incluyó en una de las figuras), los mutantes con residuos aislados de alanina del dominio de sortilina se producen actualmente usando mutagénesis dirigida al sitio. Los 7 mutantes siguientes se han sometido a ensayo: R160A, R163A, F165A, R166A, F170A, K172A, F174A
- 20 numerados según se ha especificado para la prosortilina en la descripción de la secuencia. Debido a la presencia indicada de dos sitios de unión dentro de esta región de sortilina, podría ser necesaria la producción de mutantes dobles, triples, etc. para verificar el sitio de unión en el contexto de todo el dominio Vps10p de sortilina.
- iii) Siempre que sea posible identificar los residuos de (ii), esenciales para la interacción entre sortilina y el pro-dominio de pro-NGF/BDNF, se realizará la preparación de vectores de expresión (en pcDNA3.1/Invitrogen) para la proteína de sortilina de longitud completa que es portadora de tales mutaciones. El uso de estas estructuras artificiales (junto con p75^{NTR}) para la transfección de células, debe producir células insensibles a la muerte celular mediada por pro-NGF, en comparación con la sortilina de tipo silvestre, ya que se interrumpe esta vía.
- 25 iv) Aplicación de los péptidos (o derivados de los mismos) al sistema de cultivo de células para la muerte celular neuronal, para verificar que los péptidos funcionan como inhibidores funcionales.
- 30 v) Siempre que se pueda llevar a cabo la identificación de inhibidores con éxito, se podrían utilizar para experimentos de rescate en experimentos de lesiones nerviosas para el cerebro de rata.

Ejemplo 7 - Estudios de unión en mutantes dirigidos al sitio

La mutagénesis dirigida al sitio se realizó para todos los residuos importantes dentro de la secuencia peptídica, tal como se ha identificado mediante el análisis por sustitución en el método de manchas, usando como plantilla el

35 vector de expresión pCepPU para la sortilina. Las estructuras artificiales mutantes generadas de este modo se utilizaron junto con las células HEK293 para producir mutantes de residuos individuales del dominio luminal de sortilina marcado con his, para obtener las proteínas R163A, F165A, R166A, F170A, K172A y F174A, numeradas de acuerdo con prosortilina como se ha especificado en la descripción de la secuencia. Como una proteína de control, el mutante R160A situado en el extremo N-terminal de la secuencia de reconocimiento, se produjo con el fin de tener una

40 proteína con una afinidad inalterada hacia el prodominio de NGF.

Después de la purificación mediante cromatografía Ni^{2+} -NTA convencional, cada mutante de sortilina se inmovilizó con una densidad de superficie similar sobre chips CM5 de Biacore. La unión se sometió a ensayo utilizando una serie de concentraciones de la proteína de fusión con pro-dominio de GST-NGF previamente descrita (Nykjær et al., Nature 2004), que es capaz de producir una mayor respuesta utilizando el sistema de SPR a baja concentración. Por

45 lo tanto, la serie de concentraciones de 10, 20, 30, 40, y 50 nM de GST-prodominio de NGF se aplicó a cada superficie del chip, y los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1 usando el programa informático BIAevaluation estándar. Los sensogramas representativos se presentan en la Fig. 21, y los parámetros de la unión se proporcionan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: R¹⁶³IFRSSDFAKNF¹⁷⁴

50 Los parámetros cinéticos para la reacción de unión de GST-pro-dom-NGF (analizada a concentraciones de 10-50 nM) con mutantes de sortilina, son tal como se presentan en la Figura 21. Las curvas de unión se ajustaron usando el programa informático BIAevaluation 3.1, mostrando que todos los mutantes de residuos individuales producidos muestran una afinidad similar hacia el dominio de proneurotrofina, como lo hace el receptor no mutado, aunque las variantes F170A y F174A se unen con una capacidad inferior como se observa desde la parte inferior de las lecturas

en las curvas en la figura 21. La numeración está de acuerdo con la prosortilina, como se ha especificado en la descripción de la secuencia.

mutantes	clones de PCR dirigida al sitio	serie de sensogramas 10 nM - 50 nM		
		ka	kd	KD
de tipo silvestre	RGGRIFRSSDFAKNF			
R160A	AG GRIFRSSDFAKNF	1,47 x 10 ⁵	2,27 x 10 ⁻⁴	1,89 nM
R163A	RG GA IFRSSDFAKNF	1,85 x 10 ⁵	4,21 x 10 ⁻⁴	2,70 nM
F165A	RGGR IAR SSDFAKNF	1,10 x 10 ⁵	4,22 x 10 ⁻⁴	3,86 nM
R166A	RGGRIF AS SDFAKNF	6,48 x 10 ⁴	2,85 x 10 ⁻⁴	4,38 nM
F170A	RGGRIFRSSD AA KNF	1,30 x 10 ⁵	5,91 x 10 ⁻⁴	5,59 nM*
K172A	RGGRIFRSSD FA ANF	1,01 x 10 ⁵	3,46 x 10 ⁻⁴	3,91 nM
F174A	RGGRIFRSSDFAK NA	2,35 x 10 ⁵	1,03 x 10 ⁻³	4,27 nM*
cuatro	RG GAIA SSD AA KNF			sin unión

* estos dos mutantes muestran una reducción de la capacidad de unión - pero una afinidad similar.

- 5 Como se describe en los experimentos de análisis de la longitud, el péptido parece que es portador de dos motivos de unión independientes, uno formado por RIFR y otro por FAKNF, ya que los péptidos pequeños RIFRSSDF y FAKNFVQTD muestran una unión eficaz del pro-dominio-NGF y el pro-dominio-BDNF en el análisis de manchas. Este modelo se ve apoyado además por los datos anteriores en el análisis por sustitución, en donde se observó un efecto más fuerte después de la mutación, cuando se empleaban péptidos que contenían solo uno de los motivos de unión, en comparación con mutantes que incluían ambos motivos. En consecuencia, se decidió "eliminar" un motivo entero antes de la sustitución dentro del segundo motivo y poder observar cómo influirían en la unión del ligando. Se produjo una variante de sortilina que contenía sustituciones cuádruples (R163A, F165A, R166A y F170A) en un procedimiento similar, usando células HEK293 tal y como se aplicaron para los mutantes de residuos individuales. Se observó que esta proteína se secretaba en el medio de las células HEK293, lo que demuestra que el mutante cuatro todavía era capaz de plegarse en forma de una proteína soluble.
- 10 Para determinar la capacidad de unión del ligando, la proteína cuatro se acopló en paralelo con la sortilina de tipo silvestre en un nuevo chip de Biacore, y la unión de GST-pro-NGF se midió de una manera similar al análisis de mutantes de residuos individuales (Fig. 21). Se encontró una afinidad muy reducida hacia la unión al dominio de proneurotrofina, apoyando la conclusión de que un sitio de unión importante para los ligandos está contenido en el péptido RGGRIFRSSDFAKNF.
- 15 La unión de otros ligandos, tales como neurotensina y el propio pro-péptido de sortilina, se puede someter a ensayo de una manera análoga a cómo se ha descrito anteriormente en el presente documento.
- Ejemplo 8 - Identificación de sitios de unión de proneurotrofina sobre el receptor sortilina
- Para identificar antagonistas del sitio de unión al pro-dominio de neurotrofina en la sortilina (es decir, el péptido RGGRIFRSSDFAKNF), se realizó el siguiente conjunto de experimentos:
- 25 El marcado de pro-NGF y pro-dom-NGF se realiza usando el método de IODOGEN y ¹²⁵I de Amersham Biosciences. Las células HEK293 se transfectan con el vector de expresión de sortilina usando el reactivo de transfección HIFECT para optimizar la eficacia. 24 horas después de la transfección, las células se incuban a 4°C durante 2 horas antes de aplicar un radio-ligando durante 16 horas a 4°C en HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM y MgCl₂ 1 mM, tanto en ausencia como en presencia de antagonistas candidatos. La unión del ligando a sortilina se determina como la radiactividad asociada a las células. En un experimento similar llevado a cabo a 37°C, medimos la cantidad de ligando degradado como cuentas secretadas en los medios celulares en un período de tiempo de 16 horas. La capacidad de los antagonistas candidatos para proteger frente a una apoptosis inducida por pro-NGF, se lleva a cabo como se ha descrito (Jansen et al., Nature Neurosci., 2007).
- 30 La purificación del dominio extracelular de sortilina marcada con His se realiza como se ha descrito en otro lugar, y se acopla a perlas de centelleo con formación de imágenes PS SPA con quelato de níquel (marcador His), de acuerdo con el protocolo del fabricante (GE Healthcare Life Sciences).
- 35 Un ensayo homogéneo individual en pocillos utilizado para la cuantificación directa de la actividad de unión a ¹²⁵I-

pro-NGF o ^{125}I -pro-dom-NGF inducida por el agonista candidato o inducida de forma inversa, para los receptores acoplados a las perlas de centelleo, se lleva a cabo siguiendo las pautas siguientes, como se proporciona en GE Healthcare Life Sciences.

- 5 Las propiedades antagonistas se someten a ensayo en experimentos de competencia utilizando un ensayo de proximidad de centelleo en una configuración inversa. El prodominio de NGF fusionado a GST (descrito en Nykjær, Nature, 2007) está acoplado a perlas de centelleo inmovilizadas con glutatión (GE Healthcare Life Sciences) y la inhibición se determina utilizando un dominio extracelular de sortilina intacta radiomarcada con ^{125}I -RGGRIFRSSDFAKNF o marcada con ^{125}I , que se une a las perlas mediante antagonistas candidatos como se ha descrito anteriormente.
- 10 Los antagonistas que se unen directamente al motivo RGGRIFRSSDFAKNF (como tales moléculas es muy probable que interfieran con la interacción del ligando particular y sortilina intacta) se identifican. El péptido es sintetizado por Eurogentec, Lieja, Bélgica, y se inmoviliza en un chip sensor BIAcore CM5 (nº de catálogo BR-1000-14) utilizando el kit de acoplamiento de NHS/EDC (Biacore, Suecia). Las propiedades de unión de las moléculas candidatas se evalúan mediante el escrutinio de su unión al receptor/péptido con diversas concentraciones en HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM, 0,005% de Tween-20 como tampón de ejecución.
- 15

Descripción general de las secuencias

- SEQ ID NO 1: sortilina
 SEQ ID NO 2: SorLA
 SEQ ID NO 3: SorCS1
 20 SEQ ID NO 4: SorCS2
 SEQ ID NO 5: SorCS3
 SEQ ID NO 6: pre-pro-NGF
 SEQ ID NO 7: pre-pro-BDNF
 SEQ ID NO 8: Neurotrofina-3
 25 SEQ ID NO 9: Neurotrofina-4/5
 SEQ ID NO 10: Neurotensina (1-13)
 SEQ ID NO 11: Neuromedina
 SEQ ID NO 12: Péptido asociado al receptor (RAP)
 SEQ ID NO 13: pro-neurotensina/pro-neuromedina
 30 SEQ ID NO 14: NT(8-13)
 SEQ ID NO 15: NT66L
 SEQ ID NO 16: NT67L
 SEQ ID NO 17: NT69L
 SEQ ID NO 18: Eisai
 35 SEQ ID NO 19: JMV-449
 SEQ ID NO 20: PD-149163
 SEQ ID NO 21: PD-149598
 SEQ ID NO 22: PD-156425
 SEQ ID NO 23: PD-156556
 40 SEQ ID NO 24: CGX-1160
- SEQ ID NO 25: Sortilina madura G113-M143
 pro-sortilina G157-M187
 pre-pro-sortilina G190-M220
- 45 SEQ ID NO 26: Sortilina madura R196-F207
 pro-sortilina G163-M187
 pre-pro-sortilina G196-M220
- SEQ ID NO 27: Sortilina madura G119-M122
 pro-sortilina G163-M166
 pre-pro-sortilina G196-M199
- 50 SEQ ID NO 28: Sortilina madura G126-M130
 pro-sortilina G170-M174
 pre-pro-sortilina G203-M207
- SEQ ID NO 29: PD-47113
 SEQ ID NO 30: GZR-123
 55 SEQ ID NO. 31: NT64D
 SEQ ID NO. 32: NT64L
 SEQ ID NO. 33: NT65L
 SEQ ID NO. 34: NT66D

5 SEQ ID NO. 35: NT69L'
SEQ ID NO. 36: NT71
SEQ ID NO. 37: NT72
SEQ ID NO. 38: NT73
SEQ ID NO. 39: NT74
SEQ ID NO. 40: NT75
SEQ ID NO. 41: NT76
SEQ ID NO. 42: NT77
10 SEQ ID NO. 43: Péptido señal de sortilina

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NeuronIcon ApS

5 <120> Modulación de la actividad de proneurotrofinas

<130> P1481PC00

<150> PA 2006 01692

10 <151> 21-12-2006

<160> 43

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 798

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

20 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (1)..(798)

<223> pro-Sortilina

25 <220>

<221> PROPEP

<222> (1)..(43)

<223> Sortilina

30 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (35)..(712)

<223> Parte extracelular de sortilina

35 <220>

<221> mat_péptido

<222> (44)..(798)

<223> Sortilina

40 <220>

<221> TRANSMEM

<222> (713)..(735)

<223> Sortilina

45 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (736)..(788)

<223> Parte intracelular de sortilina

50 <400> 1

Gln Asp Arg Leu Asp Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Leu Pro Arg

-25

-20

-15

ES 2 624 180 T3

Gly Gly Ala Phe Pro Arg Gly Gly Arg Trp Arg Arg Ser Ala Pro Gly
 -10 -5 -1 1 5

Glu Asp Glu Glu Cys Gly Arg Val Arg Asp Phe Val Ala Lys Leu Ala
 10 15 20

Asn Asn Thr His Gln His Val Phe Asp Asp Leu Arg Gly Ser Val Ser
 25 30 35

Leu Ser Trp Val Gly Asp Ser Thr Gly Val Ile Leu Val Leu Thr Thr
 40 45 50

Phe His Val Pro Leu Val Ile Met Thr Phe Gly Gln Ser Lys Leu Tyr
 55 60 65

Arg Ser Glu Asp Tyr Gly Lys Asn Phe Lys Asp Ile Thr Asp Leu Ile
 70 75 80 85

Asn Asn Thr Phe Ile Arg Thr Glu Phe Gly Met Ala Ile Gly Pro Glu
 90 95 100

Asn Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Ala Glu Val Ser Gly Gly Ser Arg
 105 110 115

Gly Gly Arg Ile Phe Arg Ser Ser Asp Phe Ala Lys Asn Phe Val Gln
 120 125 130

Thr Asp Leu Pro Phe His Pro Leu Thr Gln Met Met Tyr Ser Pro Gln
 135 140 145

Asn Ser Asp Tyr Leu Leu Ala Leu Ser Thr Glu Asn Gly Leu Trp Val
 150 155 160 165

Ser Lys Asn Phe Gly Gly Lys Trp Glu Glu Ile His Lys Ala Val Cys
 170 175 180

Leu Ala Lys Trp Gly Ser Asp Asn Thr Ile Phe Phe Thr Thr Tyr Ala
 185 190 195

Asn Gly Ser Cys Lys Ala Asp Leu Gly Ala Leu Glu Leu Trp Arg Thr
 200 205 210

Ser Asp Leu Gly Lys Ser Phe Lys Thr Ile Gly Val Lys Ile Tyr Ser

ES 2 624 180 T3

215						220										225
Phe	Gly	Leu	Gly	Gly	Arg	Phe	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Met	Ala	Asp	Lys	
230					235					240					245	
Asp	Thr	Thr	Arg	Arg	Ile	His	Val	Ser	Thr	Asp	Gln	Gly	Asp	Thr	Trp	
				250					255					260		
Ser	Met	Ala	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Gly	Gln	Glu	Gln	Phe	Tyr	Ser	Ile	
			265					270					275			
Leu	Ala	Ala	Asn	Asp	Asp	Met	Val	Phe	Met	His	Val	Asp	Glu	Pro	Gly	
		280					285					290				
Asp	Thr	Gly	Phe	Gly	Thr	Ile	Phe	Thr	Ser	Asp	Asp	Arg	Gly	Ile	Val	
	295					300					305					
Tyr	Ser	Lys	Ser	Leu	Asp	Arg	His	Leu	Tyr	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly	Glu	
310					315					320					325	
Thr	Asp	Phe	Thr	Asn	Val	Thr	Ser	Leu	Arg	Gly	Val	Tyr	Ile	Thr	Ser	
				330					335					340		
Val	Leu	Ser	Glu	Asp	Asn	Ser	Ile	Gln	Thr	Met	Ile	Thr	Phe	Asp	Gln	
			345					350					355			
Gly	Gly	Arg	Trp	Thr	His	Leu	Arg	Lys	Pro	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Asp	
		360					365					370				
Ala	Thr	Ala	Lys	Asn	Lys	Asn	Glu	Cys	Ser	Leu	His	Ile	His	Ala	Ser	
	375					380					385					
Tyr	Ser	Ile	Ser	Gln	Lys	Leu	Asn	Val	Pro	Met	Ala	Pro	Leu	Ser	Glu	
390					395					400					405	
Pro	Asn	Ala	Val	Gly	Ile	Val	Ile	Ala	His	Gly	Ser	Val	Gly	Asp	Ala	
				410					415					420		
Ile	Ser	Val	Met	Val	Pro	Asp	Val	Tyr	Ile	Ser	Asp	Asp	Gly	Gly	Tyr	
			425					430					435			
Ser	Trp	Thr	Lys	Met	Leu	Glu	Gly	Pro	His	Tyr	Tyr	Thr	Ile	Leu	Asp	
	440						445					450				

ES 2 624 180 T3

Ser Gly Gly Ile Ile Val Ala Ile Glu His Ser Ser Arg Pro Ile Asn
455 460 465

Val Ile Lys Phe Ser Thr Asp Glu Gly Gln Cys Trp Gln Thr Tyr Thr
470 475 480 485

Phe Thr Arg Asp Pro Ile Tyr Phe Thr Gly Leu Ala Ser Glu Pro Gly
490 495 500

Ala Arg Ser Met Asn Ile Ser Ile Trp Gly Phe Thr Glu Ser Phe Leu
505 510 515

Thr Ser Gln Trp Val Ser Tyr Thr Ile Asp Phe Lys Asp Ile Leu Glu
520 525 530

Arg Asn Cys Glu Glu Lys Asp Tyr Thr Ile Trp Leu Ala His Ser Thr
535 540 545

Asp Pro Glu Asp Tyr Glu Asp Gly Cys Ile Leu Gly Tyr Lys Glu Gln
550 555 560 565

Phe Leu Arg Leu Arg Lys Ser Ser Met Cys Gln Asn Gly Arg Asp Tyr
570 575 580

Val Val Thr Lys Gln Pro Ser Ile Cys Leu Cys Ser Leu Glu Asp Phe
585 590 595

Leu Cys Asp Phe Gly Tyr Tyr Arg Pro Glu Asn Asp Ser Lys Cys Val
600 605 610

Glu Gln Pro Glu Leu Lys Gly His Asp Leu Glu Phe Cys Leu Tyr Gly
615 620 625

Arg Glu Glu His Leu Thr Thr Asn Gly Tyr Arg Lys Ile Pro Gly Asp
630 635 640 645

Lys Cys Gln Gly Gly Val Asn Pro Val Arg Glu Val Lys Asp Leu Lys
650 655 660

Lys Lys Cys Thr Ser Asn Phe Leu Ser Pro Glu Lys Gln Asn Ser Lys
665 670 675

Ser Asn Ser Val Pro Ile Ile Leu Ala Ile Val Gly Leu Met Leu Val
680 685 690

ES 2 624 180 T3

Thr Val Val Ala Gly Val Leu Ile Val Lys Lys Tyr Val Cys Gly Gly
 695 700 705

Arg Phe Leu Val His Arg Tyr Ser Val Leu Gln Gln His Ala Glu Ala
 710 715 720 725

Asn Gly Val Asp Gly Val Asp Ala Leu Asp Thr Ala Ser His Thr Asn
 730 735 740

Lys Ser Gly Tyr His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu Glu
 745 750 755

- 5 <210> 2
 <211> 2214
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
- 10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(28)
 <223> SorLA
- 15 <220>
 <221> PROPEP
 <222> (29)..(81)
 <223> SorLA
- 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (29)..(2214)
 <223> pro-SorLA
- 25 <220>
 <221> mat_péptido
 <222> (82)..(2214)
 <223> SorLA
- 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (82)..(2137)
 <223> Parte extracelular part de SorLA
- 35 <220>
 <221> TRANSMEM
 <222> (2138)..(2158)
 <223> SorLA
- 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2159)..(2214)
 <223> Parte intracelular de SorLA

ES 2 624 180 T3

<400> 2

Met Ala Thr Arg Ser Ser Arg Arg Glu Ser Arg Leu Pro Phe Leu Phe
 -80 -75 -70

Thr Leu Val Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala Leu Cys Glu Val Trp Thr
 -65 -60 -55 -50

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

Leu Val Val Gln Gly Asp Pro Arg Glu Leu Arg Leu Trp Ala Arg Gly
 -30 -25 -20

Asp Ala Arg Gly Ala Ser Arg Ala Asp Glu Lys Pro Leu Arg Arg Lys
 -15 -10 -5

Arg Ser Ala Ala Leu Gln Pro Glu Pro Ile Lys Val Tyr Gly Gln Val
 -1 1 5 10 15

Ser Leu Asn Asp Ser His Asn Gln Met Val Val His Trp Ala Gly Glu
 20 25 30

Lys Ser Asn Val Ile Val Ala Leu Ala Arg Asp Ser Leu Ala Leu Ala
 35 40 45

Arg Pro Lys Ser Ser Asp Val Tyr Val Ser Tyr Asp Tyr Gly Lys Ser
 50 55 60

Phe Lys Lys Ile Ser Asp Lys Leu Asn Phe Gly Leu Gly Asn Arg Ser
 65 70 75

Glu Ala Val Ile Ala Gln Phe Tyr His Ser Pro Ala Asp Asn Lys Arg
 80 85 90 95

Tyr Ile Phe Ala Asp Ala Tyr Ala Gln Tyr Leu Trp Ile Thr Phe Asp
 100 105 110

Phe Cys Asn Thr Leu Gln Gly Phe Ser Ile Pro Phe Arg Ala Ala Asp
 115 120 125

Leu Leu Leu His Ser Lys Ala Ser Asn Leu Leu Leu Gly Phe Asp Arg
 130 135 140

Ser His Pro Asn Lys Gln Leu Trp Lys Ser Asp Asp Phe Gly Gln Thr
 145 150 155

ES 2 624 180 T3

Trp Ile Met Ile Gln Glu His Val Lys Ser Phe Ser Trp Gly Ile Asp
160 165 170 175

Pro Tyr Asp Lys Pro Asn Thr Ile Tyr Ile Glu Arg His Glu Pro Ser
180 185 190

Gly Tyr Ser Thr Val Phe Arg Ser Thr Asp Phe Phe Gln Ser Arg Glu
195 200 205

Asn Gln Glu Val Ile Leu Glu Glu Val Arg Asp Phe Gln Leu Arg Asp
210 215 220

Lys Tyr Met Phe Ala Thr Lys Val Val His Leu Leu Gly Ser Glu Gln
225 230 235

Gln Ser Ser Val Gln Leu Trp Val Ser Phe Gly Arg Lys Pro Met Arg
240 245 250 255

Ala Ala Gln Phe Val Thr Arg His Pro Ile Asn Glu Tyr Tyr Ile Ala
260 265 270

Asp Ala Ser Glu Asp Gln Val Phe Val Cys Val Ser His Ser Asn Asn
275 280 285

Arg Thr Asn Leu Tyr Ile Ser Glu Ala Glu Gly Leu Lys Phe Ser Leu
290 295 300

Ser Leu Glu Asn Val Leu Tyr Tyr Ser Pro Gly Gly Ala Gly Ser Asp
305 310 315

Thr Leu Val Arg Tyr Phe Ala Asn Glu Pro Phe Ala Asp Phe His Arg
320 325 330 335

Val Glu Gly Leu Gln Gly Val Tyr Ile Ala Thr Leu Ile Asn Gly Ser
340 345 350

Met Asn Glu Glu Asn Met Arg Ser Val Ile Thr Phe Asp Lys Gly Gly
355 360 365

Thr Trp Glu Phe Leu Gln Ala Pro Ala Phe Thr Gly Tyr Gly Glu Lys
370 375 380

Ile Asn Cys Glu Leu Ser Gln Gly Cys Ser Leu His Leu Ala Gln Arg

ES 2 624 180 T3

Phe Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Pro Pro Val Pro Cys Pro Val Gly Ser
 625 630 635

Thr Tyr Arg Arg Thr Arg Gly Tyr Arg Lys Ile Ser Gly Asp Thr Cys
 640 645 650 655

Ser Gly Gly Asp Val Glu Ala Arg Leu Glu Gly Glu Leu Val Pro Cys
 660 665 670

Pro Leu Ala Glu Glu Asn Glu Phe Ile Leu Tyr Ala Val Arg Lys Ser
 675 680 685

Ile Tyr Arg Tyr Asp Leu Ala Ser Gly Ala Thr Glu Gln Leu Pro Leu
 690 695 700

Thr Gly Leu Arg Ala Ala Val Ala Leu Asp Phe Asp Tyr Glu His Asn
 705 710 715

Cys Leu Tyr Trp Ser Asp Leu Ala Leu Asp Val Ile Gln Arg Leu Cys
 720 725 730 735

Leu Asn Gly Ser Thr Gly Gln Glu Val Ile Ile Asn Ser Gly Leu Glu
 740 745 750

Thr Val Glu Ala Leu Ala Phe Glu Pro Leu Ser Gln Leu Leu Tyr Trp
 755 760 765

Val Asp Ala Gly Phe Lys Lys Ile Glu Val Ala Asn Pro Asp Gly Asp
 770 775 780

Phe Arg Leu Thr Ile Val Asn Ser Ser Val Leu Asp Arg Pro Arg Ala
 785 790 795

Leu Val Leu Val Pro Gln Glu Gly Val Met Phe Trp Thr Asp Trp Gly
 800 805 810 815

Asp Leu Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Ser Asn Met Asp Gly Ser Ala Ala
 820 825 830

Tyr His Leu Val Ser Glu Asp Val Lys Trp Pro Asn Gly Ile Ser Val
 835 840 845

Asp Asp Gln Trp Ile Tyr Trp Thr Asp Ala Tyr Leu Glu Cys Ile Glu
 850 855 860

ES 2 624 180 T3

Arg Ile Thr Phe Ser Gly Gln Gln Arg Ser Val Ile Leu Asp Asn Leu
 865 870 875

Pro His Pro Tyr Ala Ile Ala Val Phe Lys Asn Glu Ile Tyr Trp Asp
 880 885 890 895

Asp Trp Ser Gln Leu Ser Ile Phe Arg Ala Ser Lys Tyr Ser Gly Ser
 900 905 910

Gln Met Glu Ile Leu Ala Asn Gln Leu Thr Gly Leu Met Asp Met Lys
 915 920 925

Ile Phe Tyr Lys Gly Lys Asn Thr Gly Ser Asn Ala Cys Val Pro Arg
 930 935 940

Pro Cys Ser Leu Leu Cys Leu Pro Lys Ala Asn Asn Ser Arg Ser Cys
 945 950 955

Arg Cys Pro Glu Asp Val Ser Ser Ser Val Leu Pro Ser Gly Asp Leu
 960 965 970 975

Met Cys Asp Cys Pro Gln Gly Tyr Gln Leu Lys Asn Asn Thr Cys Val
 980 985 990

Lys Glu Glu Asn Thr Cys Leu Arg Asn Gln Tyr Arg Cys Ser Asn Gly
 995 1000 1005

Asn Cys Ile Asn Ser Ile Trp Trp Cys Asp Phe Asp Asn Asp Cys
 1010 1015 1020

Gly Asp Met Ser Asp Glu Arg Asn Cys Pro Thr Thr Ile Cys Asp
 1025 1030 1035

Leu Asp Thr Gln Phe Arg Cys Gln Glu Ser Gly Thr Cys Ile Pro
 1040 1045 1050

Leu Ser Tyr Lys Cys Asp Leu Glu Asp Asp Cys Gly Asp Asn Ser
 1055 1060 1065

Asp Glu Ser His Cys Glu Met His Gln Cys Arg Ser Asp Glu Tyr
 1070 1075 1080

Asn Cys Ser Ser Gly Met Cys Ile Arg Ser Ser Trp Val Cys Asp
 1085 1090 1095

ES 2 624 180 T3

Gly Asp Asn Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp Glu Ala Asn Cys Thr
 1100 1105 1110

Ala Ile Tyr His Thr Cys Glu Ala Ser Asn Phe Gln Cys Arg Asn
 1115 1120 1125

Gly His Cys Ile Pro Gln Arg Trp Ala Cys Asp Gly Asp Thr Asp
 1130 1135 1140

Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Asp Pro Val Asn Cys Glu Lys Lys
 1145 1150 1155

Cys Asn Gly Phe Arg Cys Pro Asn Gly Thr Cys Ile Pro Ser Ser
 1160 1165 1170

Lys His Cys Asp Gly Leu Arg Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu
 1175 1180 1185

Gln His Cys Glu Pro Leu Cys Thr His Phe Met Asp Phe Val Cys
 1190 1195 1200

Lys Asn Arg Gln Gln Cys Leu Phe His Ser Met Val Cys Asp Gly
 1205 1210 1215

Ile Ile Gln Cys Arg Asp Gly Ser Asp Glu Asp Ala Ala Phe Ala
 1220 1225 1230

Gly Cys Ser Gln Asp Pro Glu Phe His Lys Val Cys Asp Glu Phe
 1235 1240 1245

Gly Phe Gln Cys Gln Asn Gly Val Cys Ile Ser Leu Ile Trp Lys
 1250 1255 1260

Cys Asp Gly Met Asp Asp Cys Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ala Asn
 1265 1270 1275

Cys Glu Asn Pro Thr Glu Ala Pro Asn Cys Ser Arg Tyr Phe Gln
 1280 1285 1290

Phe Arg Cys Glu Asn Gly His Cys Ile Pro Asn Arg Trp Lys Cys
 1295 1300 1305

Asp Arg Glu Asn Asp Cys Gly Asp Trp Ser Asp Glu Lys Asp Cys

ES 2 624 180 T3

Leu Lys Val Leu Lys Pro Asp Thr Thr Tyr Gln Val Lys Val Gln
 1535 1540 1545

Val Gln Cys Leu Ser Lys Ala His Asn Thr Asn Asp Phe Val Thr
 1550 1555 1560

Leu Arg Thr Pro Glu Gly Leu Pro Asp Ala Pro Arg Asn Leu Gln
 1565 1570 1575

Leu Ser Leu Pro Arg Glu Ala Glu Gly Val Ile Val Gly His Trp
 1580 1585 1590

Ala Pro Pro Ile His Thr His Gly Leu Ile Arg Glu Tyr Ile Val
 1595 1600 1605

Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Lys Met Trp Ala Ser Gln Arg Ala
 1610 1615 1620

Ala Ser Asn Phe Thr Glu Ile Lys Asn Leu Leu Val Asn Thr Leu
 1625 1630 1635

Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Val Thr Ser Arg Gly Ile Gly Asn
 1640 1645 1650

Trp Ser Asp Ser Lys Ser Ile Thr Thr Ile Lys Gly Lys Val Ile
 1655 1660 1665

Pro Pro Pro Asp Ile His Ile Asp Ser Tyr Gly Glu Asn Tyr Leu
 1670 1675 1680

Ser Phe Thr Leu Thr Met Glu Ser Asp Ile Lys Val Asn Gly Tyr
 1685 1690 1695

Val Val Asn Leu Phe Trp Ala Phe Asp Thr His Lys Gln Glu Arg
 1700 1705 1710

Arg Thr Leu Asn Phe Arg Gly Ser Ile Leu Ser His Lys Val Gly
 1715 1720 1725

Asn Leu Thr Ala His Thr Ser Tyr Glu Ile Ser Ala Trp Ala Lys
 1730 1735 1740

Thr Asp Leu Gly Asp Ser Pro Leu Ala Phe Glu His Val Met Thr
 1745 1750 1755

ES 2 624 180 T3

Arg Gly Val Arg Pro Pro Ala Pro Ser Leu Lys Ala Lys Ala Ile
 1760 1765 1770

Asn Gln Thr Ala Val Glu Cys Thr Trp Thr Gly Pro Arg Asn Val
 1775 1780 1785

Val Tyr Gly Ile Phe Tyr Ala Thr Ser Phe Leu Asp Leu Tyr Arg
 1790 1795 1800

Asn Pro Lys Ser Leu Thr Thr Ser Leu His Asn Lys Thr Val Ile
 1805 1810 1815

Val Ser Lys Asp Glu Gln Tyr Leu Phe Leu Val Arg Val Val Val
 1820 1825 1830

Pro Tyr Gln Gly Pro Ser Ser Asp Tyr Val Val Val Lys Met Ile
 1835 1840 1845

Pro Asp Ser Arg Leu Pro Pro Arg His Leu His Val Val His Thr
 1850 1855 1860

Gly Lys Thr Ser Val Val Ile Lys Trp Glu Ser Pro Tyr Asp Ser
 1865 1870 1875

Pro Asp Gln Asp Leu Leu Tyr Ala Ile Ala Val Lys Asp Leu Ile
 1880 1885 1890

Arg Lys Thr Asp Arg Ser Tyr Lys Val Lys Ser Arg Asn Ser Thr
 1895 1900 1905

Val Glu Tyr Thr Leu Asn Lys Leu Glu Pro Gly Gly Lys Tyr His
 1910 1915 1920

Ile Ile Val Gln Leu Gly Asn Met Ser Lys Asp Ser Ser Ile Lys
 1925 1930 1935

Ile Thr Thr Val Ser Leu Ser Ala Pro Asp Ala Leu Lys Ile Ile
 1940 1945 1950

Thr Glu Asn Asp His Val Leu Leu Phe Trp Lys Ser Leu Ala Leu
 1955 1960 1965

ES 2 624 180 T3

Lys Glu Lys His Phe Asn Glu Ser Arg Gly Tyr Glu Ile His Met
 1970 1975 1980

Phe Asp Ser Ala Met Asn Ile Thr Ala Tyr Leu Gly Asn Thr Thr
 1985 1990 1995

Asp Asn Phe Phe Lys Ile Ser Asn Leu Lys Met Gly His Asn Tyr
 2000 2005 2010

Thr Phe Thr Val Gln Ala Arg Cys Leu Phe Gly Asn Gln Ile Cys
 2015 2020 2025

Gly Glu Pro Ala Ile Leu Leu Tyr Asp Glu Leu Gly Ser Gly Ala
 2030 2035 2040

Asp Ala Ser Ala Thr Gln Ala Ala Arg Ser Thr Asp Val Ala Ala
 2045 2050 2055

Val Val Val Pro Ile Leu Phe Leu Ile Leu Leu Ser Leu Gly Val
 2060 2065 2070

Gly Phe Ala Ile Leu Tyr Thr Lys His Arg Arg Leu Gln Ser Ser
 2075 2080 2085

Phe Thr Ala Phe Ala Asn Ser His Tyr Ser Ser Arg Leu Gly Ser
 2090 2095 2100

Ala Ile Phe Ser Ser Gly Asp Asp Leu Gly Glu Asp Asp Glu Asp
 2105 2110 2115

Ala Pro Met Ile Thr Gly Phe Ser Asp Asp Val Pro Met Val Ile
 2120 2125 2130

Ala

<210> 3

<211> 1168

5 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

Met Gly Lys Val Gly Ala Gly Gly Gly Ser Gln Ala Arg Leu Ser Ala

1

5

10

15

10

ES 2 624 180 T3

Leu Leu Ala Gly Ala Gly Leu Leu Ile Leu Cys Ala Pro Gly Val Cys
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ser Cys Cys Pro Ser Pro His Pro Ser Ser Ala Pro Arg
 35 40 45
 Ser Ala Ser Thr Pro Arg Gly Phe Ser His Gln Gly Arg Pro Gly Arg
 50 55 60
 Ala Pro Ala Thr Pro Leu Pro Leu Val Val Arg Pro Leu Phe Ser Val
 65 70 75 80
 Ala Pro Gly Asp Arg Ala Leu Ser Leu Glu Arg Ala Arg Gly Thr Gly
 85 90 95
 Ala Ser Met Ala Val Ala Ala Arg Ser Gly Arg Arg Arg Arg Ser Gly
 100 105 110
 Ala Asp Gln Glu Lys Ala Glu Arg Gly Glu Gly Ala Ser Arg Ser Pro
 115 120 125
 Arg Gly Val Leu Arg Asp Gly Gly Gln Gln Glu Pro Gly Thr Arg Glu
 130 135 140
 Arg Asp Pro Asp Lys Ala Thr Arg Phe Arg Met Glu Glu Leu Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Ser Thr Thr Phe Ala Leu Thr Gly Asp Ser Ala His Asn Gln Ala
 165 170 175
 Met Val His Trp Ser Gly His Asn Ser Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr
 180 185 190
 Lys Leu Tyr Asp Tyr Asn Leu Gly Ser Ile Thr Glu Ser Ser Leu Trp
 195 200 205
 Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Thr Thr Tyr Glu Lys Leu Asn Asp Lys Val
 210 215 220
 Gly Leu Lys Thr Ile Leu Gly Tyr Leu Tyr Val Cys Pro Thr Asn Lys
 225 230 235 240
 Arg Lys Ile Met Leu Leu Thr Asp Pro Glu Ile Glu Ser Ser Leu Leu
 245 250 255

ES 2 624 180 T3

Ile Ser Ser Asp Glu Gly Ala Thr Tyr Gln Lys Tyr Arg Leu Asn Phe
 260 265 270

Tyr Ile Gln Ser Leu Leu Phe His Pro Lys Gln Glu Asp Trp Ile Leu
 275 280 285

Ala Tyr Ser Gln Asp Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Ala Glu Phe Gly Arg
 290 295 300

Arg Trp Gln Leu Ile Gln Glu Gly Val Val Pro Asn Arg Phe Tyr Trp
 305 310 315 320

Ser Val Met Gly Ser Asn Lys Glu Pro Asp Leu Val His Leu Glu Ala
 325 330 335

Arg Thr Val Asp Gly His Ser His Tyr Leu Thr Cys Arg Met Gln Asn
 340 345 350

Cys Thr Glu Ala Asn Arg Asn Gln Pro Phe Pro Gly Tyr Ile Asp Pro
 355 360 365

Asp Ser Leu Ile Val Gln Asp His Tyr Val Phe Val Gln Leu Thr Ser
 370 375 380

Gly Gly Arg Pro His Tyr Tyr Val Ser Tyr Arg Arg Asn Ala Phe Ala
 385 390 395 400

Gln Met Lys Leu Pro Lys Tyr Ala Leu Pro Lys Asp Met His Val Ile
 405 410 415

Ser Thr Asp Glu Asn Gln Val Phe Ala Ala Val Gln Glu Trp Asn Gln
 420 425 430

Asn Asp Thr Tyr Asn Leu Tyr Ile Ser Asp Thr Arg Gly Val Tyr Phe
 435 440 445

Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Gln Ser Ser Arg Gly Pro Glu Gly Asn
 450 455 460

Ile Met Ile Asp Leu Tyr Glu Val Ala Gly Ile Lys Gly Met Phe Leu
 465 470 475 480

Ala Asn Lys Lys Ile Asp Tyr Gln Val Lys Thr Phe Ile Thr Tyr Asn

ES 2 624 180 T3

Cys Val Cys Thr Glu Ala Asp Phe Asp Cys Asp Tyr Gly Tyr Glu Arg
 725 730 735
 His Ser Asn Gly Gln Cys Leu Pro Ala Phe Trp Phe Asn Pro Ser Ser
 740 745 750
 Leu Ser Lys Asp Cys Ser Leu Gly Gln Ser Tyr Leu Asn Ser Thr Gly
 755 760 765
 Tyr Arg Lys Val Val Ser Asn Asn Cys Thr Asp Gly Val Arg Glu Gln
 770 775 780
 Tyr Thr Ala Lys Pro Gln Lys Cys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Gly Leu
 785 790 795 800
 Arg Ile Val Thr Ala Asp Gly Lys Leu Thr Ala Glu Gln Gly His Asn
 805 810 815
 Val Thr Leu Met Val Gln Leu Glu Glu Gly Asp Val Gln Arg Thr Leu
 820 825 830
 Ile Gln Val Asp Phe Gly Asp Gly Ile Ala Val Ser Tyr Val Asn Leu
 835 840 845
 Ser Ser Met Glu Asp Gly Ile Lys His Val Tyr Gln Asn Val Gly Ile
 850 855 860
 Phe Arg Val Thr Val Gln Val Asp Asn Ser Leu Gly Ser Asp Ser Ala
 865 870 875 880
 Val Leu Tyr Leu His Val Thr Cys Pro Leu Glu His Val His Leu Ser
 885 890 895
 Leu Pro Phe Val Thr Thr Lys Asn Lys Glu Val Asn Ala Thr Ala Val
 900 905 910
 Leu Trp Pro Ser Gln Val Gly Thr Leu Thr Tyr Val Trp Trp Tyr Gly
 915 920 925
 Asn Asn Thr Glu Pro Leu Ile Thr Leu Glu Gly Ser Ile Ser Phe Arg
 930 935 940
 Phe Thr Ser Glu Gly Met Asn Thr Ile Thr Val Gln Val Ser Ala Gly
 945 950 955 960

ES 2 624 180 T3

Asn Ala Ile Leu Gln Asp Thr Lys Thr Ile Ala Val Tyr Glu Glu Phe
 965 970 975

Arg Ser Leu Arg Leu Ser Phe Ser Pro Asn Leu Asp Asp Tyr Asn Pro
 980 985 990

Asp Ile Pro Glu Trp Arg Arg Asp Ile Gly Arg Val Ile Lys Lys Ser
 995 1000 1005

Leu Val Glu Ala Thr Gly Val Pro Gly Gln His Ile Leu Val Ala
 1010 1015 1020

Val Leu Pro Gly Leu Pro Thr Thr Ala Glu Leu Phe Val Leu Pro
 1025 1030 1035

Tyr Gln Asp Pro Ala Gly Glu Asn Lys Arg Ser Thr Asp Asp Leu
 1040 1045 1050

Glu Gln Ile Ser Glu Leu Leu Ile His Thr Leu Asn Gln Asn Ser
 1055 1060 1065

Val His Phe Glu Leu Lys Pro Gly Val Arg Val Leu Val His Ala
 1070 1075 1080

Ala His Leu Thr Ala Ala Pro Leu Val Asp Leu Thr Pro Thr His
 1085 1090 1095

Ser Gly Ser Ala Met Leu Met Leu Leu Ser Val Val Phe Val Gly
 1100 1105 1110

Leu Ala Val Phe Val Ile Tyr Lys Phe Lys Arg Arg Val Ala Leu
 1115 1120 1125

Pro Ser Pro Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Gly Asp Ser Ser Leu
 1130 1135 1140

Arg Leu Gln Arg Ala Arg His Ala Thr Pro Pro Ser Thr Pro Lys
 1145 1150 1155

Arg Gly Ser Ala Gly Ala Gln Tyr Ala Ile
 1160 1165

- <210> 4
- <211> 907
- <212> PRT
- <213> Homo Sapiens

5

ES 2 624 180 T3

<400> 4

Leu Ile Phe His Pro Lys Glu Glu Asp Lys Val Leu Ala Tyr Thr Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Leu Tyr Val Ser Ser Asp Leu Gly Lys Lys Trp Thr Leu
20 25 30

Leu Gln Glu Arg Val Thr Lys Asp His Val Phe Trp Ser Val Ser Gly
35 40 45

Val Asp Ala Asp Pro Asp Leu Val His Val Glu Ala Gln Asp Leu Gly
50 55 60

Gly Asp Phe Arg Tyr Val Thr Cys Ala Ile His Asn Cys Ser Glu Lys
65 70 75 80

Met Leu Thr Ala Pro Phe Ala Gly Pro Ile Asp His Gly Ser Leu Thr
85 90 95

Val Gln Asp Asp Tyr Ile Phe Phe Lys Ala Thr Ser Ala Asn Gln Thr
100 105 110

Lys Tyr Tyr Val Ser Tyr Arg Arg Asn Glu Phe Val Leu Met Lys Leu
115 120 125

Pro Lys Tyr Ala Leu Pro Lys Asp Leu Gln Ile Ile Ser Thr Asp Glu
130 135 140

Ser Gln Val Phe Val Ala Val Gln Glu Trp Tyr Gln Met Asp Thr Tyr
145 150 155 160

Asn Leu Tyr Gln Ser Asp Pro Arg Gly Val Arg Tyr Ala Leu Val Leu
165 170 175

Gln Asp Val Arg Ser Ser Arg Gln Ala Glu Glu Ser Val Leu Ile Asp
180 185 190

Ile Leu Glu Val Arg Gly Val Lys Gly Val Phe Leu Ala Asn Gln Lys
195 200 205

ES 2 624 180 T3

Ile Asp Gly Lys Val Met Thr Leu Ile Thr Tyr Asn Lys Gly Arg Asp
 210 215 220

Trp Asp Tyr Leu Arg Pro Pro Ser Met Asp Met Asn Gly Lys Pro Thr
 225 230 235 240

Asn Cys Lys Pro Pro Asp Cys His Leu His Leu His Leu Arg Trp Ala
 245 250 255

Asp Asn Pro Tyr Val Ser Gly Thr Val His Thr Lys Asp Thr Ala Pro
 260 265 270

Gly Leu Ile Met Gly Ala Gly Asn Leu Gly Ser Gln Leu Val Glu Tyr
 275 280 285

Lys Glu Glu Met Tyr Ile Thr Ser Asp Cys Gly His Thr Trp Arg Gln
 290 295 300

Val Phe Glu Glu Glu His His Ile Leu Tyr Leu Asp His Gly Gly Val
 305 310 315 320

Ile Val Ala Ile Lys Asp Thr Ser Ile Pro Leu Lys Ile Leu Lys Phe
 325 330 335

Ser Val Asp Glu Gly Leu Thr Trp Ser Thr His Asn Phe Thr Ser Thr
 340 345 350

Ser Val Phe Val Asp Gly Leu Leu Ser Glu Pro Gly Asp Glu Thr Leu
 355 360 365

Val Met Thr Val Phe Gly His Ile Ser Phe Arg Ser Asp Trp Glu Leu
 370 375 380

Val Lys Val Asp Phe Arg Pro Ser Phe Ser Arg Gln Cys Gly Glu Glu
 385 390 395 400

Asp Tyr Ser Ser Trp Glu Leu Ser Asn Leu Gln Gly Asp Arg Cys Ile
 405 410 415

Met Gly Gln Gln Arg Ser Phe Arg Lys Arg Lys Ser Thr Ser Trp Cys
 420 425 430

Ile Lys Gly Arg Ser Phe Thr Ser Ala Leu Thr Ser Arg Val Cys Glu
 435 440 445

ES 2 624 180 T3

Cys Arg Asp Ser Asp Phe Leu Cys Asp Tyr Gly Phe Glu Arg Ser Pro
 450 455 460

Ser Ser Glu Ser Ser Thr Asn Lys Cys Ser Ala Asn Phe Trp Phe Asn
 465 470 475 480

Pro Leu Ser Pro Pro Asp Asp Cys Ala Leu Gly Gln Thr Tyr Thr Ser
 485 490 495

Ser Leu Gly Tyr Arg Lys Val Val Ser Asn Val Cys Glu Gly Gly Val
 500 505 510

Asp Met Gln Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Cys Pro Leu Thr Pro Pro
 515 520 525

Arg Gly Leu Gln Val Ser Ile Gln Gly Glu Ala Val Ala Val Arg Pro
 530 535 540

Gly Glu Asp Val Leu Phe Val Val Arg Gln Glu Gln Gly Asp Val Leu
 545 550 555 560

Thr Thr Lys Tyr Gln Val Asp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Ala Met Tyr
 565 570 575

Val Asn Leu Thr Leu Thr Gly Glu Pro Ile Arg His Arg Tyr Glu Ser
 580 585 590

Pro Gly Ile Tyr Arg Val Ser Val Arg Ala Glu Asn Thr Ala Gly His
 595 600 605

Asp Glu Ala Val Leu Phe Val Gln Val Asn Ser Pro Leu Gln Ala Leu
 610 615 620

Tyr Leu Glu Val Val Pro Val Ile Gly Leu Asn Gln Glu Val Asn Leu
 625 630 635 640

Thr Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn Pro Asn Leu Thr Val Phe Tyr Trp
 645 650 655

Trp Ile Gly His Ser Leu Gln Pro Leu Leu Ser Leu Asp Asn Ser Val
 660 665 670

Thr Thr Arg Phe Ser Asp Thr Gly Asp Val Arg Val Thr Val Gln Ala
 675 680 685

ES 2 624 180 T3

Ala Cys Gly Asn Ser Val Leu Gln Asp Ser Arg Val Leu Arg Val Leu
690 695 700

Asp Gln Phe Gln Val Met Pro Leu Gln Phe Ser Lys Glu Leu Asp Ala
705 710 715 720

Tyr Asn Pro Asn Thr Pro Glu Trp Arg Glu Asp Val Gly Leu Val Val
725 730 735

Thr Arg Leu Leu Ser Lys Glu Thr Ser Val Pro Gln Glu Leu Leu Val
740 745 750

Thr Val Val Lys Pro Gly Leu Pro Thr Leu Ala Asp Leu Tyr Val Leu
755 760 765

Leu Pro Pro Pro Arg Pro Thr Arg Lys Arg Ser Leu Ser Ser Asp Lys
770 775 780

Arg Leu Ala Ala Ile Gln Gln Val Leu Asn Ala Gln Lys Ile Ser Phe
785 790 795 800

Leu Leu Arg Gly Gly Val Arg Val Leu Val Ala Leu Arg Asp Thr Gly
805 810 815

Thr Gly Ala Glu Gln Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Trp Ala Val Val
820 825 830

Val Leu Phe Val Ile Gly Leu Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ile Leu Tyr
835 840 845

Lys Phe Lys Arg Lys Arg Pro Gly Arg Thr Val Tyr Ala Gln Met His
850 855 860

Asn Glu Lys Glu Gln Glu Met Thr Ser Pro Val Ser His Ser Glu Asp
865 870 875 880

Val Gln Gly Ala Val Gln Gly Asn His Ser Gly Val Val Leu Ser Ile
885 890 895

Asn Ser Arg Glu Met His Ser Tyr Leu Val Ser
900 905

<210> 5

<211> 1222

5 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

ES 2 624 180 T3

<400> 5

Met Glu Ala Ala Arg Thr Glu Arg Pro Ala Gly Arg Pro Gly Ala Pro
 1 5 10 15

Leu Val Arg Thr Gly Leu Leu Leu Leu Ser Thr Trp Val Leu Ala Gly
 20 25 30

Ala Glu Ile Thr Trp Asp Ala Thr Gly Gly Pro Gly Arg Pro Ala Ala
 35 40 45

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

Ala Ser Gln Trp Pro Glu Glu Leu Ala Ser Ala Arg Arg Ala Ala Val
 65 70 75 80

Leu Gly Arg Arg Ala Gly Pro Glu Leu Leu Pro Gln Gln Gly Gly Gly
 85 90 95

Arg Gly Gly Glu Met Gln Val Glu Ala Gly Gly Thr Ser Pro Ala Gly
 100 105 110

Glu Arg Arg Gly Arg Gly Ile Pro Ala Pro Ala Lys Leu Gly Gly Ala
 115 120 125

Arg Arg Ser Arg Arg Ala Gln Pro Pro Ile Thr Gln Glu Arg Gly Asp
 130 135 140

Ala Trp Ala Thr Ala Pro Ala Asp Gly Ser Arg Gly Ser Arg Pro Leu
 145 150 155 160

Ala Lys Gly Ser Arg Glu Glu Val Lys Ala Pro Arg Ala Gly Gly Ser
 165 170 175

Ala Ala Glu Asp Leu Arg Leu Pro Ser Thr Ser Phe Ala Leu Thr Gly
 180 185 190

Asp Ser Ala His Asn Gln Ala Met Val His Trp Ser Gly His Asn Ser
 195 200 205

ES 2 624 180 T3

Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr Lys Leu Tyr Asp Phe Asn Leu Gly Ser
 210 215 220

Val Thr Glu Ser Ser Leu Trp Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Thr Thr Tyr
 225 230 235 240

Glu Lys Leu Asn Asp Lys Val Gly Leu Lys Thr Val Leu Ser Tyr Leu
 245 250 255

Tyr Val Asn Pro Thr Asn Lys Arg Lys Ile Met Leu Leu Ser Asp Pro
 260 265 270

Glu Met Glu Ser Ser Ile Leu Ile Ser Ser Asp Glu Gly Ala Thr Tyr
 275 280 285

Gln Lys Tyr Arg Leu Thr Phe Tyr Ile Gln Ser Leu Leu Phe His Pro
 290 295 300

Lys Gln Glu Asp Trp Val Leu Ala Tyr Ser Leu Asp Gln Lys Leu Tyr
 305 310 315 320

Ser Ser Met Asp Phe Gly Arg Arg Trp Gln Leu Met His Glu Arg Ile
 325 330 335

Thr Pro Asn Arg Phe Tyr Trp Ser Val Ala Gly Leu Asp Lys Glu Ala
 340 345 350

Asp Leu Val His Met Glu Val Arg Thr Thr Asp Gly Tyr Ala His Tyr
 355 360 365

Leu Thr Cys Arg Ile Gln Glu Cys Ala Glu Thr Thr Arg Ser Gly Pro
 370 375 380

Phe Ala Arg Ser Ile Asp Ile Ser Ser Leu Val Val Gln Asp Glu Tyr
 385 390 395 400

Ile Phe Ile Gln Val Thr Thr Ser Gly Arg Ala Ser Tyr Tyr Val Ser
 405 410 415

Tyr Arg Arg Glu Ala Phe Ala Gln Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
 420 425 430

Pro Lys Asp Met His Ile Ile Ser Thr Asp Glu Asn Gln Val Phe Ala
 435 440 445

ES 2 624 180 T3

Ala Val Gln Glu Trp Asn Gln Asn Asp Thr Tyr Asn Leu Tyr Ile Ser
450 455 460

Asp Thr Arg Gly Ile Tyr Phe Thr Leu Ala Met Glu Asn Ile Lys Ser
465 470 475 480

Ser Arg Gly Leu Met Gly Asn Ile Ile Ile Glu Leu Tyr Glu Val Ala
485 490 495

Gly Ile Lys Gly Ile Phe Leu Ala Asn Lys Lys Val Asp Asp Gln Val
500 505 510

Lys Thr Tyr Ile Thr Tyr Asn Lys Gly Arg Asp Trp Arg Leu Leu Gln
515 520 525

Ala Pro Asp Val Asp Leu Arg Gly Ser Pro Val His Cys Leu Leu Pro
530 535 540

Phe Cys Ser Leu His Leu His Leu Gln Leu Ser Glu Asn Pro Tyr Ser
545 550 555 560

Ser Gly Arg Ile Ser Ser Lys Glu Thr Ala Pro Gly Leu Val Val Ala
565 570 575

Thr Gly Asn Ile Gly Pro Glu Leu Ser Tyr Thr Asp Ile Gly Val Phe
580 585 590

Ile Ser Ser Asp Gly Gly Asn Thr Trp Arg Gln Ile Phe Asp Glu Glu
595 600 605

Tyr Asn Val Trp Phe Leu Asp Trp Gly Gly Ala Leu Val Ala Met Lys
610 615 620

His Thr Pro Leu Pro Val Arg His Leu Trp Val Ser Phe Asp Glu Gly
625 630 635 640

His Ser Trp Asp Lys Tyr Gly Phe Thr Ser Val Pro Leu Phe Val Asp
645 650 655

Gly Ala Leu Val Glu Ala Gly Met Glu Thr His Ile Met Thr Val Phe
660 665 670

Gly His Phe Ser Leu Arg Ser Glu Trp Gln Leu Val Lys Val Asp Tyr
675 680 685

ES 2 624 180 T3

Lys Ser Ile Phe Ser Arg His Cys Thr Lys Glu Asp Tyr Gln Thr Trp
 690 695 700

His Leu Leu Asn Gln Gly Glu Pro Cys Val Met Gly Glu Arg Lys Ile
 705 710 715 720

Phe Lys Lys Arg Lys Pro Gly Ala Gln Cys Ala Leu Gly Arg Asp His
 725 730 735

Ser Gly Ser Val Val Ser Glu Pro Cys Val Cys Ala Asn Trp Asp Phe
 740 745 750

Glu Cys Asp Tyr Gly Tyr Glu Arg His Gly Glu Ser Gln Cys Val Pro
 755 760 765

Ala Phe Trp Tyr Asn Pro Ala Ser Pro Ser Lys Asp Cys Ser Leu Gly
 770 775 780

Gln Ser Tyr Leu Asn Ser Thr Gly Tyr Arg Arg Ile Val Ser Asn Asn
 785 790 795 800

Cys Thr Asp Gly Leu Arg Glu Lys Tyr Thr Ala Lys Ala Gln Met Cys
 805 810 815

Pro Gly Lys Ala Pro Arg Gly Leu His Val Val Thr Thr Asp Gly Arg
 820 825 830

Leu Val Ala Glu Gln Gly His Asn Ala Thr Phe Ile Ile Leu Met Glu
 835 840 845

Glu Gly Asp Leu Gln Arg Thr Asn Ile Gln Leu Asp Phe Gly Asp Gly
 850 855 860

Ile Ala Val Ser Tyr Ala Asn Phe Ser Pro Ile Glu Asp Gly Ile Lys
 865 870 875 880

His Val Tyr Lys Ser Ala Gly Ile Phe Gln Val Thr Ala Tyr Ala Glu
 885 890 895

Asn Asn Leu Gly Ser Asp Thr Ala Val Leu Phe Leu His Val Val Cys
 900 905 910

ES 2 624 180 T3

Pro Val Glu His Val His Leu Arg Val Pro Phe Val Ala Ile Arg Asn
 915 920 925

Lys Glu Val Asn Ile Ser Ala Val Val Trp Pro Ser Gln Leu Gly Thr
 930 935 940

Leu Thr Tyr Phe Trp Trp Phe Gly Asn Ser Thr Lys Pro Leu Ile Thr
 945 950 955 960

Leu Asp Ser Ser Ile Ser Phe Thr Phe Leu Ala Glu Gly Thr Asp Thr
 965 970 975

Ile Thr Val Gln Val Ala Ala Gly Asn Ala Leu Ile Gln Asp Thr Lys
 980 985 990

Glu Ile Ala Val His Glu Tyr Phe Gln Ser Gln Leu Leu Ser Phe Ser
 995 1000 1005

Pro Asn Leu Asp Tyr His Asn Pro Asp Ile Pro Glu Trp Arg Lys
 1010 1015 1020

Asp Ile Gly Asn Val Ile Lys Arg Ala Leu Val Lys Val Thr Ser
 1025 1030 1035

Val Pro Glu Asp Gln Ile Leu Ile Ala Val Phe Pro Gly Leu Pro
 1040 1045 1050

Thr Ser Ala Glu Leu Phe Ile Leu Pro Pro Lys Asn Leu Thr Glu
 1055 1060 1065

Arg Arg Lys Gly Asn Glu Gly Asp Leu Glu Gln Ile Val Glu Thr
 1070 1075 1080

Leu Phe Asn Ala Leu Asn Gln Asn Leu Val Gln Phe Glu Leu Lys
 1085 1090 1095

Pro Gly Val Gln Val Ile Val Tyr Val Thr Gln Leu Thr Leu Ala
 1100 1105 1110

Pro Leu Val Asp Ser Ser Ala Gly His Ser Ser Ser Ala Met Leu
 1115 1120 1125

Met Leu Leu Ser Val Val Phe Val Gly Leu Ala Val Phe Leu Ile
 1130 1135 1140

ES 2 624 180 T3

Tyr Lys Phe Lys Arg Lys Ile Pro Trp Ile Asn Ile Tyr Ala Gln
 1145 1150 1155

Val Gln His Asp Lys Glu Gln Glu Met Ile Gly Ser Val Ser Gln
 1160 1165 1170

Ser Glu Asn Ala Pro Lys Ile Thr Leu Ser Asp Phe Thr Glu Pro
 1175 1180 1185

Glu Glu Leu Leu Asp Lys Glu Leu Asp Thr Arg Val Ile Gly Gly
 1190 1195 1200

Ile Ala Thr Ile Ala Asn Ser Glu Ser Thr Lys Glu Ile Pro Asn
 1205 1210 1215

Cys Thr Ser Val
 1220

<210> 6
 <211> 241
 5 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> SIGNAL
 10 <222> (1)..(18)
 <223> NGF

<220>
 <221> PROPEP
 15 <222> (19)..(121)
 <223> NGF

<220>
 <221> mat_péptido
 20 <222> (122)..(241)
 <223> NGF

<400> 6
 Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly
 -120 -115 -110

Ile Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr
 -105 -100 -95

Ile Pro Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala
 -90 -85 -80 -75

ES 2 624 180 T3

Leu Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val
 -70 -65 -60

Ala Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys
 -55 -50 -45

Arg Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg
 -40 -35 -30

Glu Ala Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala
 -25 -20 -15

Pro Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile
 -10 -5 -1 1 5

Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val
 10 15 20

Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val
 25 30 35

Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe
 40 45 50

Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly
 55 60 65 70

Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe
 75 80 85

Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile
 90 95 100

Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg
 105 110 115

Arg Ala
 120

- 5 <210> 7
- <211> 246
- <212> PRT
- <213> Homo Sapiens

- 10 <220>
- <221> SEÑAL
- <222> (1)..(18)
- <223> BDNF

- 15 <220>
- <221> PROPEP
- <222> (19)..(127)

<220>
 <221> mat_péptido

ES 2 624 180 T3

<222> (128)..(246)
 <223> BDNF

<400> 7

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys
 -125 -120 -115

Met Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly
 -110 -105 -100

Gly Leu Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val
 -95 -90 -85

Asn Gly Pro Lys Ala Gly Ser Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe
 -80 -75 -70

Glu His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro
 -65 -60 -55 -50

Asn Glu Glu Asn Asn Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Thr Ser Arg Val Met
 -45 -40 -35

Leu Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu
 -30 -25 -20

Glu Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg
 -15 -10 -5

Arg His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser
 -1 1 5 10 15

Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met
 20 25 30

5

Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly
 35 40 45

Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr
 50 55 60

Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln
 65 70 75

Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys
 80 85 90 95

Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys
 100 105 110

Thr Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg
 115

ES 2 624 180 T3

```

<210> 8
<211> 257
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
5
<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(16)
10
<220>
<221> PROPEP
<222> (17)..(140)
15
<220>
<221> mat_péptido
<222> (141)..(257)
<223> NT3

<400> 8
Met Ser Ile Leu Phe Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly
-140 -135 -130

Ile Gln Gly Asn Asn Met Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser
-125 -120 -115

Leu Asn Ser Leu Ile Ile Lys Leu Ile Gln Ala Asp Ile Leu Lys
-110 -105 -100

Asn Lys Leu Ser Lys Gln Met Val Asp Val Lys Glu Asn Tyr Gln Ser
20 -95 -90 -85 -80

```

ES 2 624 180 T3

Thr Leu Pro Lys Ala Glu Ala Pro Arg Glu Pro Glu Arg Gly Gly Pro
 -75 -70 -65

Ala Lys Ser Ala Phe Gln Pro Val Ile Ala Met Asp Thr Glu Leu Leu
 -60 -55 -50

Arg Gln Gln Arg Arg Tyr Asn Ser Pro Arg Val Leu Leu Ser Asp Ser
 -45 -40 -35

Thr Pro Leu Glu Pro Pro Pro Leu Tyr Leu Met Glu Asp Tyr Val Gly
 -30 -25 -20

Ser Pro Val Val Ala Asn Arg Thr Ser Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Glu
 -15 -10 -5 -1 1

His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu
 5 10 15

Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val
 20 25 30

Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr
 35 40 45

Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys
 50 55 60 65

Arg Gly Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln
 70 75 80

Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp
 85 90 95

Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys
 100 105 110

Ile Gly Arg Thr
 115

5 <210> 9
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

10 <220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(24)

15 <220>
 <221> PROPEP
 <222> (25)..(80)

20 <220>
 <221> mat_péptido
 <222> (81)..(210)

ES 2 624 180 T3

<400> 9

Met Leu Pro Leu Pro Ser Cys Ser Leu Pro Ile Leu Leu Leu Phe Leu
-80 -75 -70 -65

Leu Pro Ser Val Pro Ile Glu Ser Gln Pro Pro Pro Ser Thr Leu Pro
-60 -55 -50

Pro Phe Leu Ala Pro Glu Trp Asp Leu Leu Ser Pro Arg Val Val Leu
-45 -40 -35

Ser Arg Gly Ala Pro Ala Gly Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Ala
-30 -25 -20

Gly Ala Phe Arg Glu Ser Ala Gly Ala Pro Ala Asn Arg Ser Arg Arg
-15 -10 -5 -1

Gly Val Ser Glu Thr Ala Pro Ala Ser Arg Arg Gly Glu Leu Ala Val
1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Ser Gly Trp Val Thr Asp Arg Arg Thr Ala Val Asp
20 25 30

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

Gly Ser Pro Leu Arg Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Arg Cys Lys Ala Asp
50 55 60

Asn Ala Glu Glu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Arg Gly
65 70 75 80

Val Asp Arg Arg His Trp Val Ser Glu Cys Lys Ala Lys Gln Ser Tyr
85 90 95

Val Arg Ala Leu Thr Ala Asp Ala Gln Gly Arg Val Gly Trp Arg Trp
100 105 110

Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Thr Leu Leu Ser Arg Thr Gly
115 120 125

Arg Ala
130

5

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

10

<400> 10
Gln Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
1 5 10

15

<210> 11
<211> 5

ES 2 624 180 T3

<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 11
Ile Pro Tyr Ile Leu
5 1 5

<210> 12
<211> 357
<212> PRT
10 <213> Homo Sapiens

<400> 12
Met Ala Pro Arg Arg Val Arg Ser Phe Leu Arg Gly Leu Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Gly Pro Trp Pro Ala Ala Ser His Gly
20 25 30

Gly Lys Tyr Ser Arg Glu Lys Asn Gln Pro Lys Pro Ser Pro Lys Arg
35 40 45

Glu Ser Gly Glu Glu Phe Arg Met Glu Lys Leu Asn Gln Leu Trp Glu
50 55 60

Lys Ala Gln Arg Leu His Leu Pro Pro Val Arg Leu Ala Glu Leu His
65 70 75 80

ES 2 624 180 T3

Ala Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Asp Glu Leu Ala Trp Lys Lys Leu
85 90 95

Lys Leu Asp Gly Leu Asp Glu Asp Gly Glu Lys Glu Ala Arg Leu Ile
100 105 110

Arg Asn Leu Asn Val Ile Leu Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Gly Lys Lys
115 120 125

Asp Ala Arg Gln Val Thr Ser Asn Ser Leu Ser Gly Thr Gln Glu Asp
130 135 140

Gly Leu Asp Asp Pro Arg Leu Glu Lys Leu Trp His Lys Ala Lys Thr
145 150 155 160

Ser Gly Lys Phe Ser Gly Glu Glu Leu Asp Lys Leu Trp Arg Glu Phe
165 170 175

Leu His His Lys Glu Lys Val His Glu Tyr Asn Val Leu Leu Glu Thr
180 185 190

Leu Ser Arg Thr Glu Glu Ile His Glu Asn Val Ile Ser Pro Ser Asp
195 200 205

Leu Ser Asp Ile Lys Gly Ser Val Leu His Ser Arg His Thr Glu Leu
210 215 220

Lys Glu Lys Leu Arg Ser Ile Asn Gln Gly Leu Asp Arg Leu Arg Arg
225 230 235 240

Val Ser His Gln Gly Tyr Ser Thr Glu Ala Glu Phe Glu Glu Pro Arg
245 250 255

Val Ile Asp Leu Trp Asp Leu Ala Gln Ser Ala Asn Leu Thr Asp Lys
260 265 270

Glu Leu Glu Ala Phe Arg Glu Glu Leu Lys His Phe Glu Ala Lys Ile
275 280 285

Glu Lys His Asn His Tyr Gln Lys Gln Leu Glu Ile Ala His Glu Lys
290 295 300

Leu Arg His Ala Glu Ser Val Gly Asp Gly Glu Arg Val Ser Arg Ser

<400> 14
 Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
 1 5

5 <210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = D-Lys

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = L-neo-Trp

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = tert-Leu

30 <400> 15
 Xaa Arg Pro Xaa Xaa Leu
 1 5

30 <210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = D-Lys

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = L-neo-Trp

50 <400> 16
 Xaa Arg Pro Xaa Ile Leu
 1 5

50 <210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = N-metilo-Arg

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = L-neo-Trp
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = tert-Leu
 10
 <400> 17
 Xaa Lys Pro Xaa Xaa Leu
 1 5
 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = N-metilo-Arg
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = tert-Leu
 30
 <400> 18
 Xaa Lys Pro Trp Xaa Leu
 1 5
 35
 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = H-Lys-psi-(CH₂NH)
 45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa = Leu-OH
 50
 <400> 19
 Xaa Lys Pro Tyr Ile Xaa
 1 5
 55
 <210> 20
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente

ES 2 624 180 T3

<400> 20
000

5 <210> 21
<211> 0
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Péptido creado sintéticamente

<400> 21
000

15 <210> 22
<211> 0
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Péptido creado sintéticamente

<400> 22
000

25 <210> 23
<211> 0
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Péptido creado sintéticamente

<400> 23
000

35 <210> 24
<211> 76
<212> PRT
<213> Conus geographus

<400> 24
Met Gln Thr Ala Tyr Trp Val Met Val Met Met Met Val Trp Ile Ala
1 5 10 15

Ala Pro Leu Ser Glu Gly Gly Lys Leu Asn Asp Val Ile Arg Gly Leu
20 25 30

Val Pro Asp Asp Ile Thr Pro Gln Leu Ile Leu Gly Ser Leu Ile Ser
35 40 45

Arg Arg Gln Ser Glu Glu Gly Gly Ser Asn Ala Thr Lys Lys Pro Tyr
50 55 60

Ile Leu Arg Ala Ser Asp Gln Val Ala Ser Gly Pro
65 70 75

45 <210> 25
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

ES 2 624 180 T3

<400> 25
 Gly Gly Ser Arg Gly Gly Arg Ile Phe Arg Ser Ser Asp Phe Ala Lys
 1 5 10 15

Asn Phe Val Gln Thr Asp Leu Pro Phe His Pro Leu Thr Gln Met
 20 25 30

5 <210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

10 <400> 26
 Arg Ile Phe Arg Ser Ser Asp Phe Ala Lys Asn Phe
 1 5 10

15 <210> 27
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 27
 Arg Ile Phe Arg
 1

20 <210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

25 <400> 28
 Phe Ala Lys Asn Phe
 1 5

30 <210> 29
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Péptido creado sintéticamente

35 <400> 29
 000

40 <210> 30
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Péptido creado sintéticamente

<400> 30
 000

50 <210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente

- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = D-neo-Trp
 5
 <400> 31
 Arg Arg Pro Xaa Ile Leu
 1 5
- <210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente
 15
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = L-neo-Trp
 20
 <400> 32
 Arg Arg Pro Xaa Ile Leu
 1 5
- <210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
- <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente
 30
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 35
 <400> 33
 Arg Arg Pro Xaa Leu Leu
 1 5
- <210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
- <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente
 45
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = D-Lys
 50
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = D-neo-Trp
 55
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = tert-Leu
 60

- <400> 34
 Xaa Arg Pro Xaa Xaa Leu
 1 5
- 5 <210> 35
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente
- 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = N-metilo-Arg
- 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = L-neo-Trp
- 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = tert-Leu
- <400> 35
 Xaa Arg Pro Xaa Xaa Leu
 1 5
- 30 <210> 36
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente
- 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = N-metilo-Arg
- 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Ácido diaminobutírico
- 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = L-neo-Trp
- 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = tert-Leu
- <400> 36
 Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Leu
 1 5
- 60 <210> 37
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Péptido creado sintéticamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 10 <223> Xaa = D-Lys

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 15 <223> Xaa = L-neo-Trp

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 20 <223> Xaa = tert-Leu

 <400> 37
 Xaa Pro Xaa Xaa Leu
 1 5

 25 <210> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa = D-Lys

 <220>
 <221> VARIANTE
 40 <222> (3) .. (3)
 <223> Xaa = L-neo-Trp

 <400> 38
 Xaa Pro Xaa Ile Leu
 1 5

 45 <210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 55 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa = Ácido diaminobutírico

 <220>
 60 <221> VARIANTE
 <222> (3) .. (3)
 <223> Xaa = L-neo-Trp

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4) .. (4)
 <223> Xaa = tert-Leu
 5
 <400> 39
 Xaa Pro Xaa Xaa Leu
 1 5
 <210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Dbu
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3) .. (3)
 <223> Xaa = L-neo-Trp
 25
 <400> 40
 Xaa Pro Xaa Ile Leu
 1 5
 <210> 41
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2) .. (2)
 <223> Orn
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa = D-Orn
 45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = L-neo-Trp
 50
 <400> 41
 Arg Xaa Pro Xaa Ile Leu
 1 5
 <210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido creado sintéticamente
 60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2) .. (2)
 <223> D-Orn
 5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4) .. (4)
 <223> Xaa = L-neo-Trp
 10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5) .. (5)
 <223> Xaa = tert-Leu
 15

<400> 42
 Arg Xaa Pro Xaa Xaa Leu
 1 5

<210> 43
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) .. (33)
 <223> Péptido señal de sortilina
 25

<400> 43
 Met Glu Arg Pro Trp Gly Ala Ala Asp Gly Leu Ser Arg Trp Pro His
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Pro Pro Ser Thr Leu
 20 25 30

30 Ser

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo dirigido contra una parte extracelular de sortilina y capaz de inhibir la unión de una proneurotrofina a un sitio de unión de un receptor sortilina, en donde el anticuerpo se une al motivo de unión de proneurotrofina de acuerdo con SEQ ID NO: 25, 26, 27 o 28 o un fragmento de las mismas.
- 5 2. Un anticuerpo según la reivindicación 1, en donde dicho fragmento comprende entre 3 y 7 residuos de aminoácidos o entre 3 y 5 residuos de aminoácidos.

Fig. 1

Receptores con dominio Vps10p

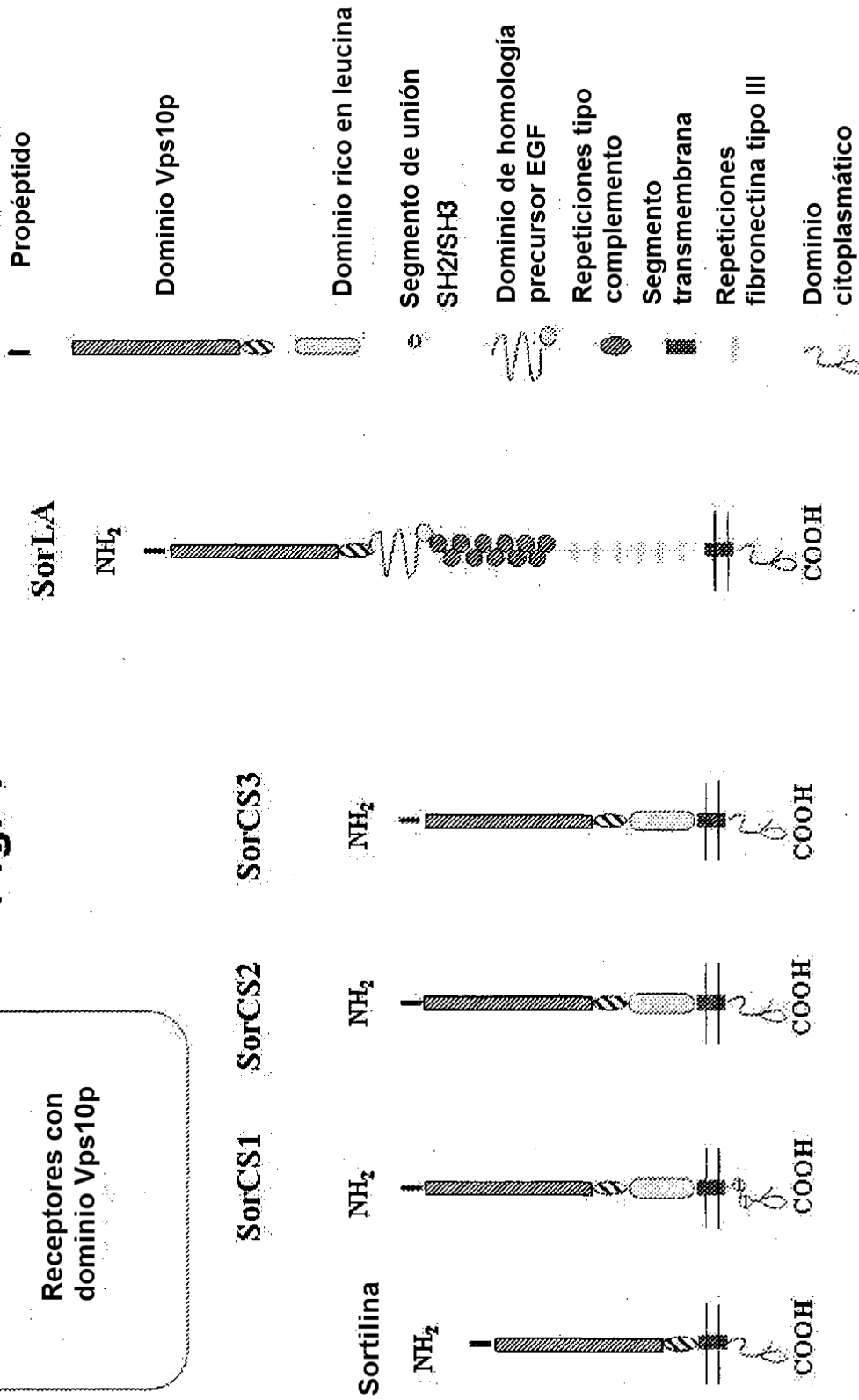


Fig. 2

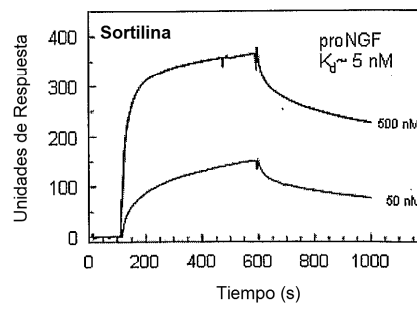
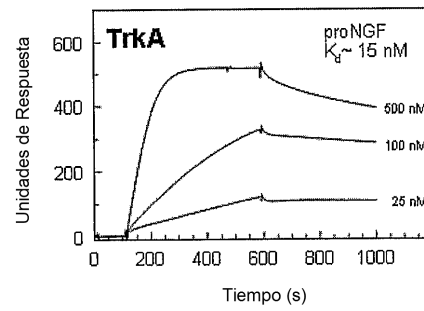
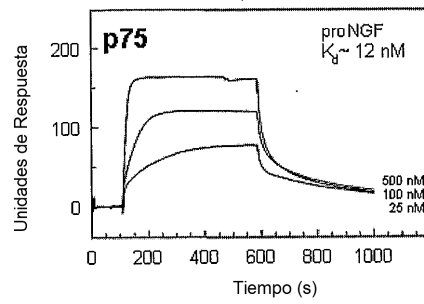


Fig. 3

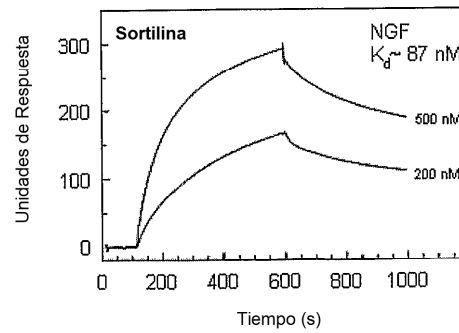
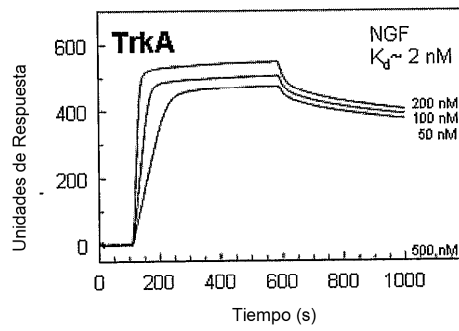
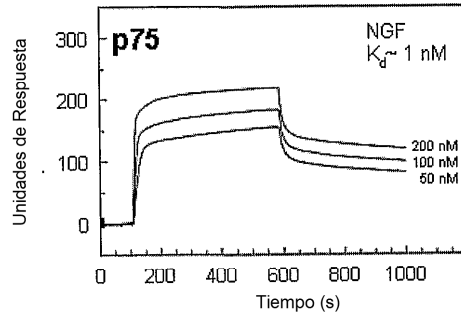


Fig. 4

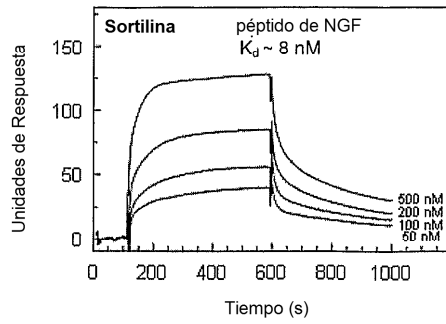
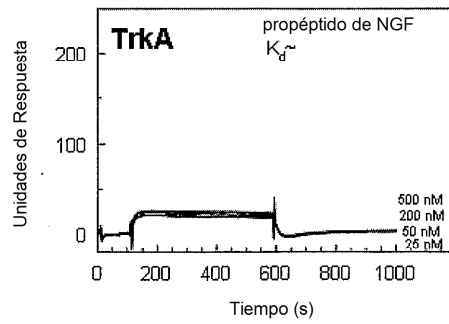
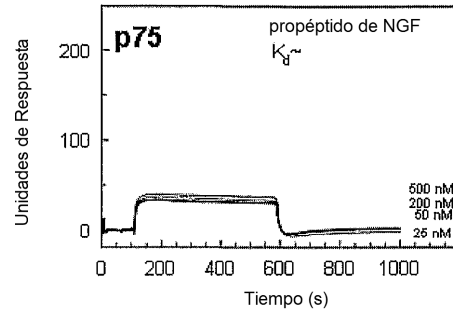


Fig. 5

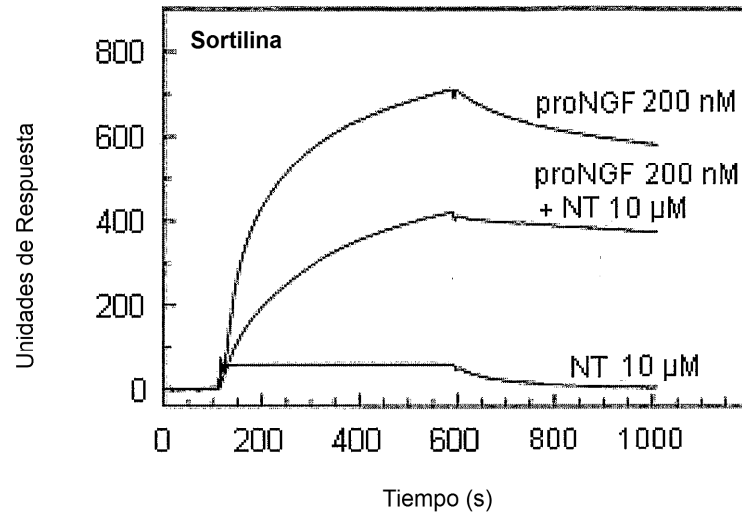


Fig. 6

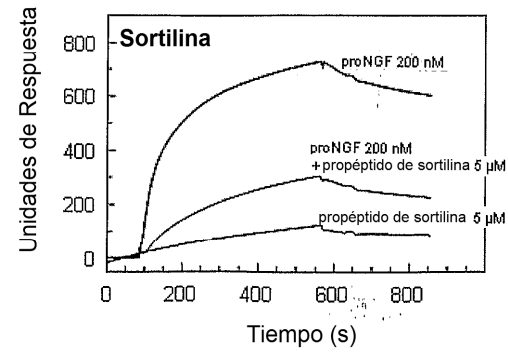
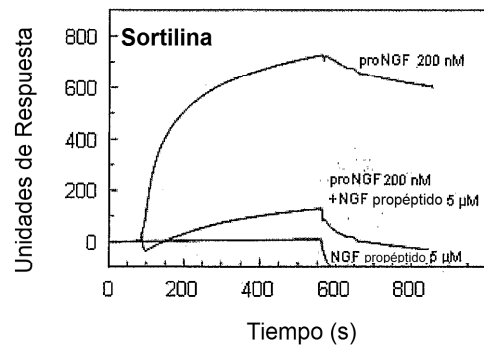
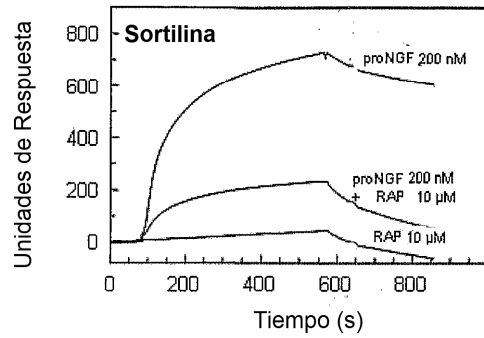


Fig. 7

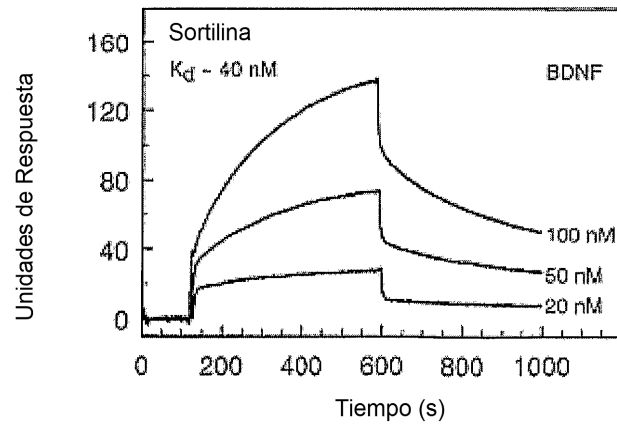
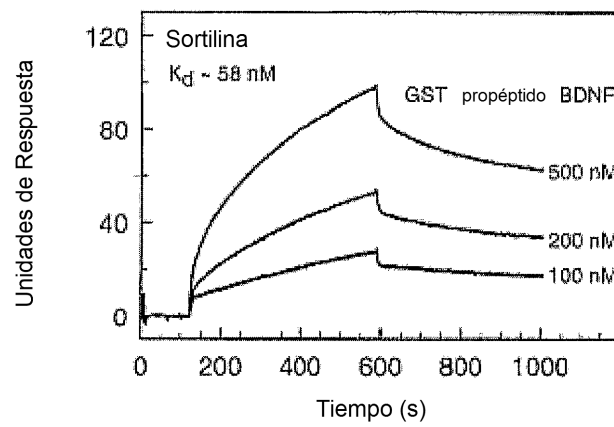


Fig. 8

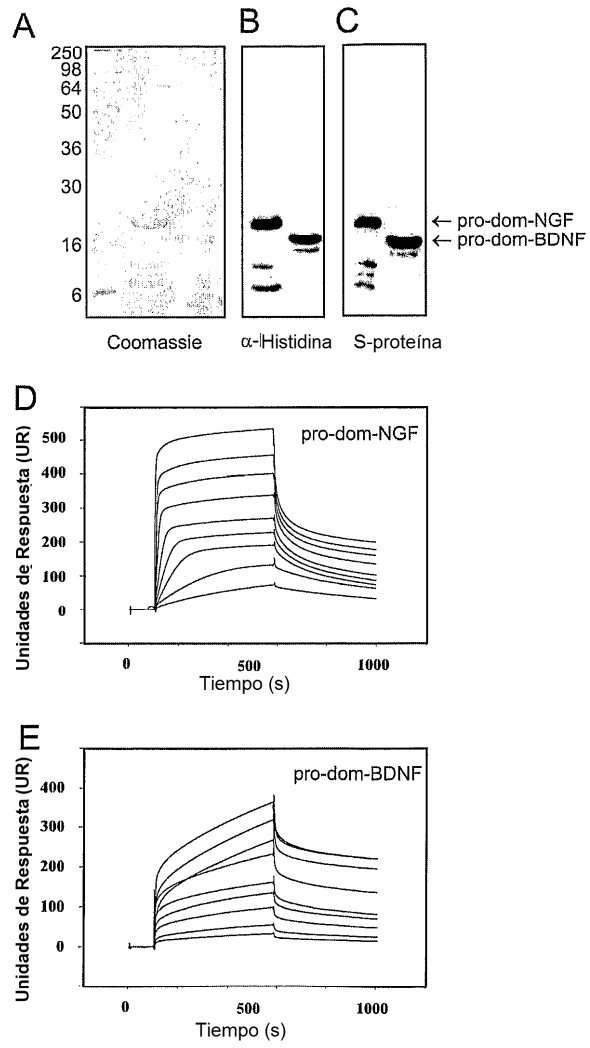


Fig. 9

Pro-dominios / regiones inmaduras	
NGF	1EPHSEN.V PACH.IIPQ AHWKLOHSL DIALRRARSA PANK..... 40
BDNF	1APMKAN.I RGQGLAYPG VRTHGILESV NGPKAGSRGL ISLADIFEHV 48
NT3	1 NMDQRSLPE DSIINSLIKL IQADILKNKL SKQWVDVREN YQSILPKAEA PREFEKGGEA .KSAFQPVIA 69
NT4/5	1Q PP.PSTLPPF 10
NGF	41 IAA..RVAGQ TRNITVDPRL FKRR..... VLFSTQPRE AADTQLDFE VGGAPFRTI ESKR..... 103
BDNF	49 IE.ELL..DE DQKRENEEN NRDADYISR VASQVPLE PELFFIEEY KNYLDANMS MRVRR..... 110
NT3	70 MDTLLRQOR R..... INSR VLESDFLE PPLFYKDY VGSPVANRT ESKR..... 120
NT4/5	11 LAPEND.... LSER VMSRGPAG PELFFLEAG AFRESAGAPA MSRR..... 56
Regiones maduras	
NGF	RSKR...SSSHPIFERGESVCDSESNV...M...T...ID...K...E...W...G...E...Y...N...I...N...M...V...Q...Y...F...E...T...C...R.....
BDNF	RVRR...HSDPARRGEVSVCDSESNV...M...T...ID...K...E...W...G...E...Y...N...I...N...M...V...Q...Y...F...E...T...C...R.....
NT-3	RRKR...YAEHKSRGEVSVCDSESNV...M...T...ID...K...E...W...G...E...Y...N...I...N...M...V...Q...Y...F...E...T...C...K.....
NT-4/5	RSRRGVSETAPASRGEVSVCDSESNV...M...T...ID...K...E...W...G...E...Y...N...I...N...M...V...Q...Y...F...E...T...C...KADNAEEG
NGF	DPNPVDSGCRGDSKHMNSCLITHT...V...R...A...L...M...G...O...A...N...R...I...R...I...D...T...A...C...V...C...M...L...S...R...A...V...R...R...A
BDNF	PMGYKSGCRGDMHNSCLITHT...V...R...A...L...M...G...O...A...N...R...I...R...I...D...T...A...C...V...C...M...L...S...R...A...V...R...R...A
NT-3	EARPVKSGCRGDMHNSCLITHT...V...R...A...L...M...G...O...A...N...R...I...R...I...D...T...A...C...V...C...M...L...S...R...A...V...R...R...A
NT-4/5	GFGAGGCGCRGDMHNSCLITHT...V...R...A...L...M...G...O...A...N...R...I...R...I...D...T...A...C...V...C...M...L...S...R...A...V...R...R...A

Fig. 10

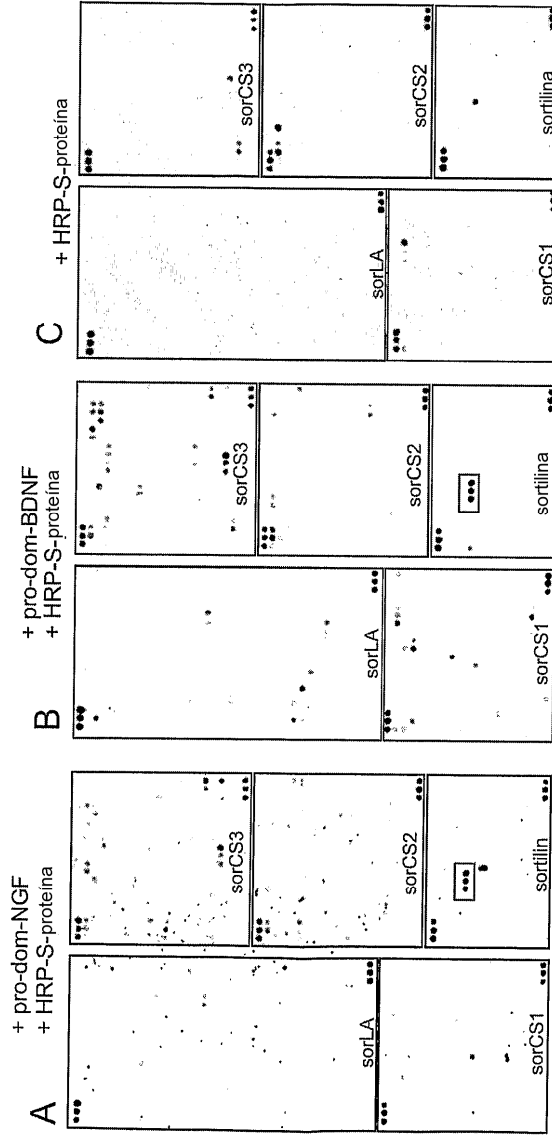


Fig. 11

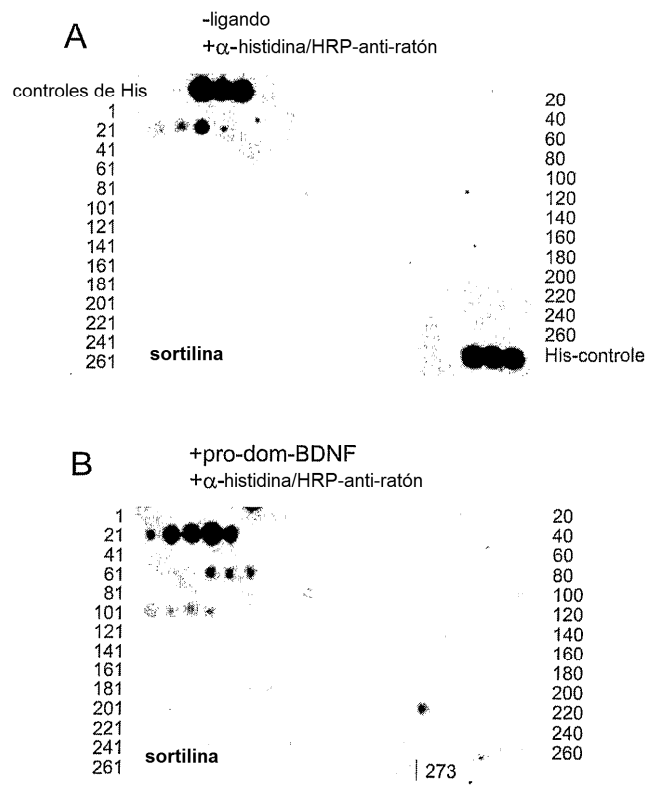


Fig. 12

+pro-dom-BDNF
+HRP-S-proteína

A

1 min de exposición



B

5 min de exposición

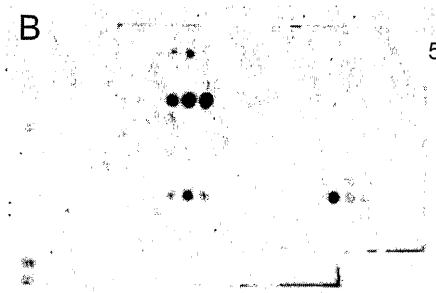


Fig. 13

64. GSRGGRIFRSSDFAK
65. RGGRIFRSSDFAKNFV
66. RIFRSSDFAKNFVQTD
67. RSSDFAKNFVQTDLPF
68. DFAKNFVQTDLPFHPL
69. KNFVQTDLPFHPLTQM

Fig. 14

..PLVWVIFG Q..... .SOMESBY GKMKOLITH NINIFR.....
 TDFGMAEPE NERQWVITAE VSGSRG... .. .CEERSEDE ARNEVOT. DA PFHDIQMMY SPQNL.....
 SIFLILASIE N.C.LAWSKN BECKNEEIHK AVGLAKWSD NIDERTIYAN GSCNA... D. GALELWRTSD LCKSEKTIGV
 KINCFQ... ..GEBWASV MADKUII... .. .REHVBDO GDTWMA. O. PSVCO.....
 EGVSDIIRAN ..DUMWPHV DEPCNCF.. .. .GIBELBOK GIWASK..SV BRHLVITIGG ..
 EIDFENYIER ..G.V. IISV LSE. DNS... .. .ICD. IIFDO GERWHLRKP ENSECDAK NKNECSLHIIH ASYSISQKLVWY
 PMLPLSEPA. V.G. IIRAHG SVG. DALSWWVPDMWBEIDE GYGRWK..M. EG.....
 PHVITIDISG ..G. IIRAHG I. EHSRPI... .. .NINWTSIDE GOCQDTY. I. TRD.....
 PIFETQWSE PGAR

Leyenda:
 Idéntico en el min 6 de 9 - blanco sobre negro
 Similar en el min 6 de 8 - blanco sobre gris
 Similar en el min 4 de 8 - negro sobre gris
 Resto - negro

Fig. 15

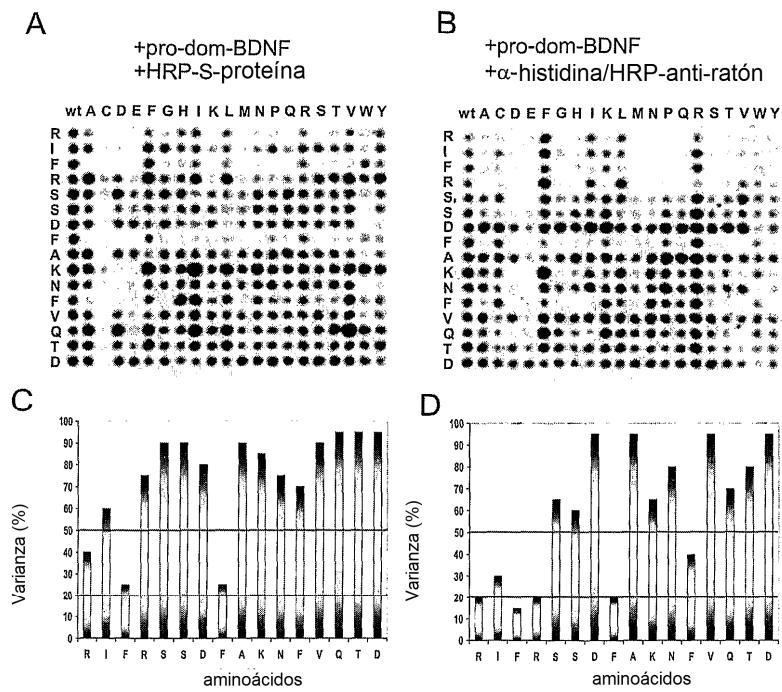


Fig. 16

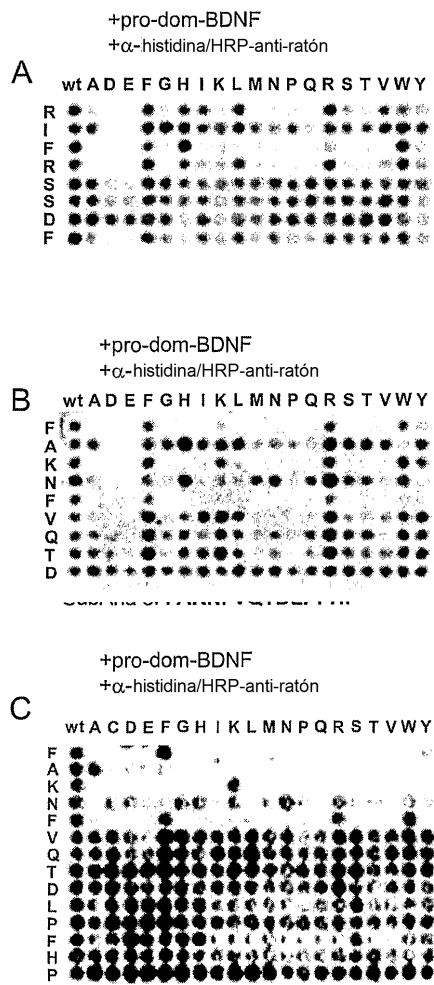


Fig. 17

Manchas	BLU_His	BLU_Sproteina	Secuencias	Manchas	BLU_His	BLU_Sproteina	Secuencias
1	57033	136873	RIFRSSDFAKNFVQTD	46	20203	21469	RIFRSSD
2	112561	205934	RIFRSSDFAKNFVQT	47	24353	27779	IFRSSDF
3	23821	76169	IFRSSDFAKNFVQTD	48	15646	17213	FRSSDFA
4	141157	172483	RIFRSSDFAKNFVQ	49	17289	16419	RSDFAK
5	53378	190127	IFRSSDFAKNFVQT	50	16658	15919	SSDFAKN
6	18834	38091	FRSSDFAKNFVQTD	51	17173	17207	SDFAKNF
7	101606	168124	RIFRSSDFAKNFV	52	17262	17406	DFAKNFV
8	41614	126272	IFRSSDFAKNFVQ	53	69598	20345	FAKNFVQ
9	19707	222616	FRSSDFAKNFVQT	54	17266	16673	AKNFVQT
10	19772	20741	RSDFAKNFVQTD	55	18257	16837	KNFVQTD
11	100124	165691	RIFRSSDFAKNF	56	121674	94377	RIFRSS
12	45056	198864	IFRSSDFAKNFV	57	17878	18126	IFRSSD
13	25753	199846	FRSSDFAKNFVQ	58	17525	16887	FRSSDF
14	24711	24619	RSDFAKNFVQT	59	18259	15871	RSDFAK
15	19170	22399	SSDFAKNFVQTD	60	15095	15909	SSDFAK
16	52985	63638	RIFRSSDFAKN	61	15086	15553	SDFAKN
17	40690	126753	IFRSSDFAKNF	62	15201	15198	DFAKNF
18	19439	447934	FRSSDFAKNFV	83	141914	29596	FAKNFV
19	25985	22395	RSDFAKNFVQ	64	15906	14136	AKNFVQ
20	16700	18447	SSDFAKNFVQT	65	15371	14323	KNFVQT
21	15709	16854	SDFAKNFVQTD	66	15350	14523	NFVQTD
22	45457	60543	RIFRSSDFAK	67	115400	137336	RIFRS
23	19745	29760	IFRSSDFAKN	68	25341	38497	IFRSS
24	20102	70449	FRSSDFAKNF	69	15634	14955	FRSSD
25	22980	25435	RSDFAKNFV	70	16070	15484	RSDF
26	17754	18541	SSDFAKNFVQ	71	15782	14685	SSDFA
27	17465	19075	SDFAKNFVQT	72	15932	14764	SDFAK
28	17435	19018	DFAKNFVQTD	73	17815	15617	DFAKN
29	43394	60918	RIFRSSDFA	74	31948	17524	FAKNF
30	20765	25725	IFRSSDFAK	75	17531	15909	AKNFV
31	20401	20344	FRSSDFAKN	76	18188	15706	KNFVQ
32	21053	19504	RSDFAKNF	77	17263	15555	NFVQT
33	18907	19030	SSDFAKNFV	78	22397	15081	FVQTD
34	18437	18871	SDFAKNFVQ	79	127485	166402	RIFR
35	19065	19535	DFAKNFVQT	80	51082	110577	IFRS
36	30763	18814	FAKNFVQTD	81	20096	36968	FRSS
37	115934	113837	RIFRSSDF	82	15042	14900	RSDD
38	21437	24448	IFRSSDFA	83	14115	13965	SSDF
39	19039	19242	FRSSDFAK	84	14230	13295	SDF
40	18657	17161	RSDFAKN	85	14364	13313	DFAK
41	15462	16281	SSDFAKNF	86	15232	13746	FAKN
42	16309	15539	SDFAKNFV	87	14585	13670	AKNF
43	15508	14653	DFAKNFVQ	88	14866	13825	KNFV
44	80377	23561	FAKNFVQT	89	14735	13447	NFVQ
45	15952	15291	AKNFVQTD	90	15556	13599	FVQT
				91	15081	13820	VQTD

Fig. 18

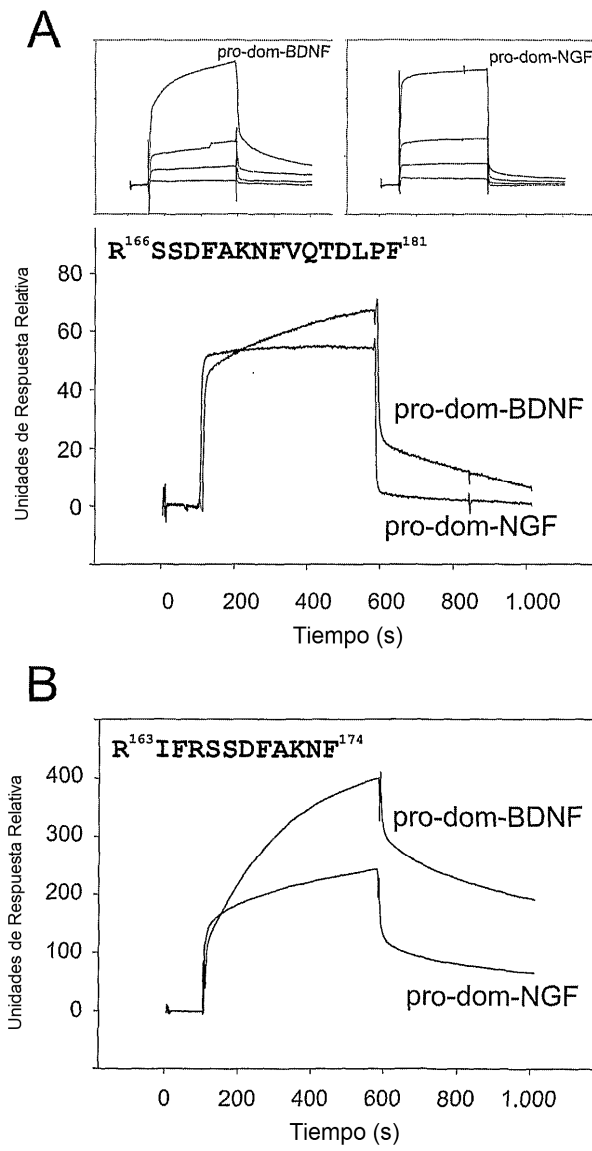


Fig. 19

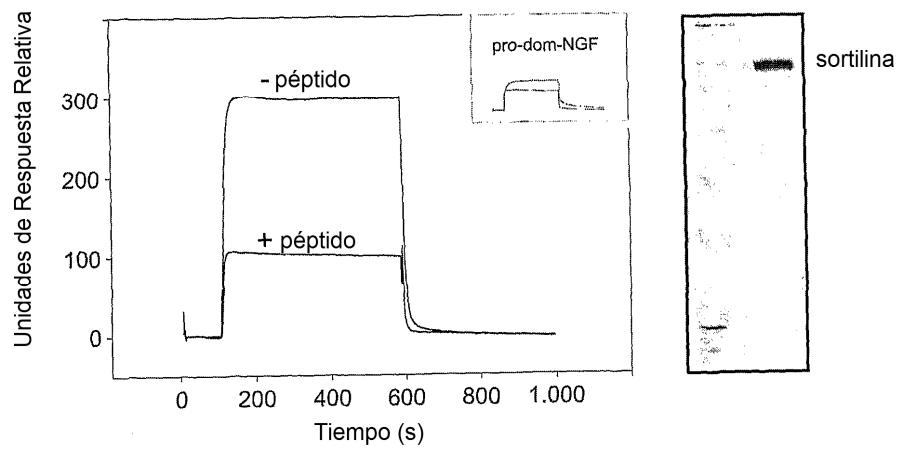
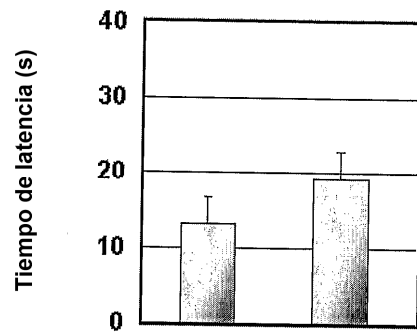


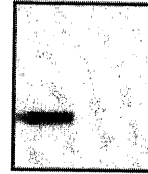
Fig. 20

Sensibilidad al dolor térmico (prueba de placa caliente)



Ganglio espinal

+/+ -/-



Transf. West.: sortilina

Fig. 21

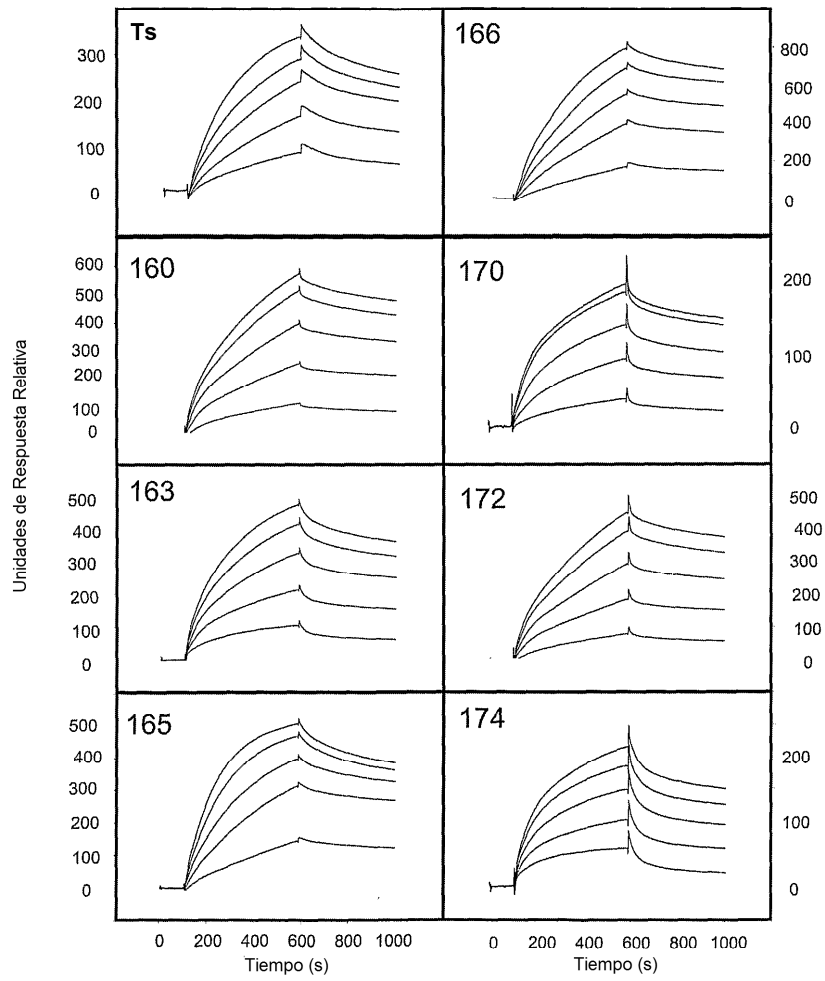


Fig. 22

