(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 632 431**

(51) Int. CI.:

C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2010 E 14165977 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2774935**

(54) Título: **Moléculas de neurturina mejoradas**

(30) Prioridad:

30.10.2009 US 256352 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.09.2017

(73) Titular/es:

NTF THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
4950 South Chicago Beach Drive
Chicago, IL 60615, US

(72) Inventor/es:

RUNEBERG-ROOS, PIA;
BESPALOV, MAXIM;
PENN, RICHARD y
SAARMA, MART

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Moléculas de neurturina mejoradas

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº. 61/256352 presentada el 30 de octubre de 2009, cuyo contenido completo se incorpora en este documento como referencia.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere al desarrollo y uso de polipéptidos de neurturina mejorados que poseen afinidad de unión reducida de heparina y heparán sulfato, pero que retienen la actividad neurotrófica; ácidos nucleicos que codifican las variantes y vectores de neurturina y células hospedadoras que expresan los polipéptidos de neurturina mejorados. También está comprendido dentro de la invención el uso de polipéptidos de neurturina mejorados, ácidos nucleicos y células huésped en el tratamiento de la enfermedad.

Los ligandos de la familia (GFLs) del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) son miembros distantes de la superfamilia TGF-β que son potentes factores neurotróficos in vitro y son críticos para el desarrollo de distintas poblaciones neuronales in vivo (Airaksinen, M.S, et al., (1999) "GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?" Mol. Cell. Neurosci. 13, 313 - 325). Hay cuatro miembros conocidos de esta familia con alta similitud de secuencia; GDNF, neurturina (NRTN), artemin (ARTN) y persefina (PSPN). Todos estos factores funcionan a través de la activación del receptor transmembrana tirosina quinasa reordenado durante la transfección (RET), que activa múltiples vías de señalización. (Knowles, PP. (2006) "Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain", J. Biol. Chem. 281, 33577-33587. Incluido en el complejo receptor se encuentra una proteína de superficie celular anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) de alta afinidad designada como GFRα (receptor α de la familia GDNF), aunque existe un GFRα para cada GFL, se produce señalización cruzada entre los complejos receptores (Airaksinen et al, ibid). Los GFLs también comparten una afinidad por la heparina excepto PSPN que parece tener poca o ninguna afinidad (Maxim M. Bespalov Tesis doctoral, 18.12. 2009, Universidad de Helsinki). La heparina es un polisacárido sulfatado que se limita principalmente a los mastocitos. Sin embargo, el heparán-sulfato (HS) altamente relacionado es más ubicuo, residiendo en las superficies celulares y en la matriz extracelular. Se ha demostrado que la interacción entre GDNF y heparina/HS demuestra una dependencia particularmente alta de la presencia de 2-O-sulfatos (Rickard et al., (2003) "The binding of human glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to heparin and heparan sulfate: importance of 2-O- sulfate groups and effects on its interaction with its receptor GFRα1. Glycobiology 13, 419 - 426).

Debido a sus cualidades neurotróficas, los GFL son candidatos emergentes para el tratamiento de enfermedades y lesiones del sistema nervioso central y periférico. La centralidad para la utilidad terapéutica de GFLs tales como la neurturina es la capacidad de estas moléculas para estimular la supervivencia y el crecimiento de un amplia gama de neuronas, incluyendo por ejemplo, neuronas dopaminérgicas, simpáticas, parasimpáticas, sensoriales y neuronas motoras espinales. (Bespalov, MM & Saarma, M. (2007) "GDNF family receptor complexes are emerging drug targets" Trends in Pharm. Sci. 28(2) 68 - 74). Por ejemplo, tanto la proteína GDNF como la NRTN en un vector de terapia génica se han administrado a pacientes en ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y se ha demostrado que estimulan la rotación de dopamina en modelos animales. (Hadaczek et al., (2010) "Pharmacokinetics and bioactivity of glial cell line-derived factor (GDNF) and neurturin (NTN) infused into rat brain" Neuropharm. 58, 1114 - 1121). Adicionalmente, enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer, ALS, epilepsia, adicción, dolor crónico y accidente cerebrovascular también pueden beneficiarse del tratamiento con neurturina basado en la capacidad de la neurturina para promover la supervivencia y el crecimiento de las neuronas.

Además, existe un creciente apoyo para el concepto de que el tratamiento con neurturina puede ser útil para el tratamiento de la diabetes (Rossi, et al., (2005) Diabetes 54 (5) 1324-30, Mwangi et al., (2008) Gastroenterology 134 (3) 727 - 37, Mwangi et al., (2010) Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 299(1) G283 - 92); la disfunción eréctil (Laurikainen et al., (2000) Cell. Tissue. Res. 302(3) 321 - 9, Laurikainen et al., (2000) J. Neurobiol. 43(2) 198 - 205, May et al., (2008) Eur. Urol. 54(5) 1179 - 87; Kato et al., (2009) Gene Therapy 16 (1) 26 - 33); la pérdida del cabello (Botchkareva et al., (2000) Am. J. Pathol. 156(3), 1041 - 53, Adly et al., (2008) J. Am. Chem. Acad. Dermatol. 58 (2) 238 - 50); la pérdida auditiva (Ylikoski et al., (1998) Hear Res. 124(1-2) 17 - 26, Stover et al., (2001) Hear Res. 155(1-2) 143 - 51, Stover et al., (2000) Brain Res Mol Brain Res. 76(1) 25 - 35; la enfermedad de Hirschsprung, (Taraviras et al., (1999) Development 126 (12) 2785-97, Roberts et al., (2008) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 294(4) G996 - G1008; el dolor neuropático, Adler et al., (2009) Pain. Med. 10 (7) 1229 - 36; y la retinopatía (Igarahi et al., (2000) Cell. Struct. Funct. 25(4) 237 - 41, Nishikiori y col., (2007) 56 (5) 1333 - 40).

En un reciente ensayo clínico de fase II, se administró NRTN a pacientes con enfermedad de Parkinson utilizando un vector viral (CERE-120). CERE-120 fue administrado por inyección estereotáctica a la región putaminal del cerebro, proporcionando una expresión estable y duradera de la NRTN de una manera muy específica. Sin embargo, los resultados del ensayo controlado doble ciego indicaron que no hubo diferencias apreciables entre los pacientes

tratados con CERE-120 frente a los del grupo control. Ambos grupos mostraron una mejora aproximada de 7 puntos en el criterio de valoración primario definido por el protocolo (Unified Parkinson's Disease Rating Scale - motor off score a los 12 meses), en relación con una media en la línea de base de aproximadamente 39 puntos. Ambos grupos tuvieron un número sustancial de pacientes que demostraron una mejoría clínica significativa desde la línea de base. CERE-120 parecía ser seguro y bien tolerado. En un seguimiento de 18 meses del ensayo CERE-120, se observó un modesto beneficio clínico frente al placebo.

Las razones para el fracaso del ensayo no se entienden completamente. Una hipótesis es que, a pesar de la inyección directa en las áreas afectadas del cerebro, la alta afinidad de la neurturina por el sulfato de heparán impide la adecuada difusión de la molécula a una región lo suficientemente amplia como para ser eficaz. En apoyo de esta hipótesis, el análisis de la distribución de neurturina en los cerebros de dos pacientes tratados, así como estudios en animales sugieren que la neurturina no se distribuye uniformemente después de la infusión en el cerebro (Hadaczek et al., (2010) "Pharmacokinetics and bioactivity of glial cell line-derived factor (GDNF) and neurturin (NTN) infused into rat brain", Neuropharm. 58, 1114 - 1121; Ceregene Press Release 27 de mayo de 2009) una vez más sugiriendo que una mayor biodistribución podría ser favorable.

Por otra parte, estudios recientes en animales han incluido la co-infusión de heparina con neurturina en el cerebro en modelos de monos rhesus de la enfermedad de Parkinson (Grodin y col., "Intraputamenal infusion of exogenous neurturin protein restores motor and dopaminergic function in the globus pallidus of MPTP-lesioned rhesus monkeys". Cell Transplantation 17: 373 - 381, 2008). En teoría, la heparina co-infundida evitaría la unión de la neurturina a la matriz extracelular mientras que todavía permite la unión al complejo receptor RET/GFRα en las células diana. Por lo tanto, la neurturina co-inyectada podría difundirse en un área más amplia.

Otro enfoque para mejorar la eficacia y la biodistribución de la neurturina sería alterar la afinidad de unión a la heparina de la molécula sin afectar a sus propiedades neurotróficas. Sin embargo, antes del descubrimiento del solicitante, la ubicación y la identidad de los aminoácidos reales implicados en la mediación de la unión de heparina en neurturina no se conocían. Además, no se sabía si la mutación del dominio de unión a la heparina perturbaría la estructura plegable y/o tridimensional de la proteína y daría como resultado una pérdida de la función biológica y más específicamente la actividad neurotrófica de las moléculas mutadas. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de mejorar los polipéptidos de neurturina que exhiben una biodistribución mejorada, manteniendo al mismo tiempo una alta actividad biológica.

A pesar del atractivo de este enfoque, estudios previos que han investigado el impacto funcional de las características de unión a heparina de neurturina y otros miembros de la familia GDNF han proporcionado resultados contradictorios y mezclados. (Rider, CC, (2006) Biochem. Soc. Trans. 34(3) 458 - 460; Rickard SM et al., (2003) Glycobiology 13 (6) 419 - 26, Davies JA y col., (2003) Growth Factors 21 (3-4) 109 - 19, Rider CC, (2003) Biochem. Soc. Trans. 31(2) 337-9, Tanaka M et al., (2002) Neuroreport 13 (15) 1913 - 1916, Hamilton JF y col. (2001) Exp. Neurol. 168(1) 155 - 61, Ai X et al., (2007) Development 134 (18) 3327 - 38).

Por ejemplo, aunque estudios previos han demostrado que el motivo “BBXB” o “BBBXXB”, donde "B" es un aminoácido básico y "X" es cualquier aminoácido, es importante para la unión a heparina, otros han demostrado que las proteínas que no contienen este motivo también puede unirse a la heparina y HS (Delacoux et al. "Unraveling the amino acid sequence crucial for heparin binding to collagen V." J. Biol. Chem. 2000, 275 (38): 29377 - 82). Además, la falta de una estructura tridimensional detallada de neurturina impide un análisis detallado de si alguno de los residuos cargados positivamente correspondientes en neurturina están realmente expuestos a la superficie y orientados en la proteína madura de tal manera que sus cadenas laterales están correctamente alineadas para interactuar con heparina.

Además, los estudios con otros miembros de GFL han sugerido que la unión a heparina puede originarse principalmente en la región N-terminal de esta familia de proteínas, o distribuirse en varias regiones. (Alfano et al. ("The major determinant of the heparin binding of glial cell- line derived neurotrophic factor is near the N-terminus and is dispensable for receptor binding" Biochem. J. 404: 131 - 140, 2007); Silvian et al., ("Artemin crystal structure reveals insights into heparan sulfate binding" Biochemistry 45: 6801 - 6812, 2006)).

Silvian et al. exploraron las características de unión a heparina de ARTN, y mostraron que una serie de residuos de arginina en una región pre-alfa-helicoidal mostraba contacto con átomos de sulfato en la estructura cristalina. Se encontró que la región amino terminal de ARTN (aminoácidos 1 - 9), que estaba desordenada en el cristal, era responsable de alguna actividad de unión al HS. Además, mutagenizaron las tres argininas (Arg48, Arg49 y Arg51) en la región pre-alfa-helicoidal de ARTN sustituyendo estas con residuos de ácido glutámico. La incorporación de ácidos glutámicos redujo la afinidad por las moléculas de heparina, lo que sugiere que esta región pre-helicoidal puede desempeñar un papel en la interacción heparán sulfato. Sin embargo, esta región pre-helicoidal de ARTN no está bien conservada en neurturina lo que sugiere que la función de esta región en neurturina puede no ser preservada.

En estudios publicados por Alfano et al., la deleción de la región N-terminal de GDNF dio como resultado una reducción marcada en la unión a heparina. Además, Alfano et al. realizaron mutagénesis de exploración de alanina en pares de aminoácidos cargados positivamente (K81A/K84A y R88A/R90A) en una región en GDNF que contenía

varios aminoácidos básicos que residen en una cara de una región alfa-helicoidal de la proteína GDNF madura. Alfano et al. encontraron que ambos conjuntos de dos cambios de aminoácidos, ya sea individualmente o combinados, no pudieron reducir significativamente la afinidad de unión de GDNF a la heparina.

Aunque GDNF, ARTN y NRTN son homólogos y comprenden una estructura generalmente similar, tanto las regiones N-terminales de las proteínas maduras como las regiones alrededor de las secuencias teóricas de unión a la heparina no están bien conservadas. En consecuencia, las predicciones precisas en cuanto al papel de estos dominios de proteínas en NRTN no se pueden inferir con exactitud de los estudios de GDNF o ARTN. El documento WO2009/059755 describe conjugados y variantes de neurturina, donde las argininas en la región del talón fueron reemplazadas con lisina en un intento de incrementar la biodisponibilidad de la neurturina.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de los aminoácidos en la neurturina, que comprenden los aminoácidos 51 a 63 (numerados como en la neurturina humana madura), los cuales juegan un papel importante en la mediación de la interacción de neurturina con heparina. Además, los presentes solicitantes han descubierto sorprendentemente que la mutación de aminoácidos en esta región conduce a polipéptidos de neurturina mejorados que exhiben tanto una afinidad reducida por heparina como una retención de actividad neurotrófica y específicamente la capacidad de interaccionar con GFRα1 o GFRα2 para inducir la fosforilación de RET y para inducir efectos celulares. Por consiguiente, la presente invención proporciona nuevos polipéptidos de neurturina con actividad biológica mejorada, polinucleótidos que codifican tales polipéptidos y células que expresan dichos polipéptidos y métodos para su uso en el tratamiento y la prevención de enfermedades.

Sumario de la invención

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de moléculas de neurturina que tienen capacidad de unión a heparina reducida, sulfato de heparán y proteoglicano heparán sulfatado pero que conservan la capacidad de inducir la fosforilación de la proteína RET al unirse el complejo receptor. De acuerdo con esto, en una realización, la invención comprende polipéptidos purificados de neurturina que comprenden variantes de neurturina que poseen la capacidad de inducir la fosforilación de RET y poseen una actividad de unión reducida a la heparina. Las variantes purificadas del polipéptido de neurturina descritas comprenden una o más sustituciones en los aminoácidos 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62 ó 63. En otra realización, los polipéptidos purificados que comprenden variantes de neurturina comprenden SEQ. ID. NO. 1, 2, 3 y 4.

En otra realización, la invención incluye un polipéptido de neurturina, en el que el polipéptido de neurturina difiere de la neurturina de tipo natural maduro (SEQ ID NO: 5) por al menos una mutación de un aminoácido cargado positivamente en una región que comprende los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina madura de tipo natural, y en el que el polipéptido de neurturina tiene una afinidad disminuida respecto a la heparina en comparación con la neurturina madura de tipo natural.

En un aspecto, el polipéptido de neurturina tiene la capacidad de inducir la fosforilación de RET cuando se añade a fibroblastos a una concentración de 100 ng/ml durante 10 minutos a 37ºC, en donde los fibroblastos expresan RET y GFRalphal o GFRalpha2.

En un aspecto, el polipéptido de neurturina puede eluirse a partir de una columna de afinidad de heparina a una concentración de NaCl inferior a 1 M a pH 7,2.

En un aspecto, el polipéptido de neurturina tiene al menos una mutación en una posición seleccionada del grupo que consiste en R52, R54, R56, R58, R61 y R63.

En un aspecto, el polipéptido de neurturina tiene al menos una mutación en una posición seleccionada del grupo que consiste en R51, R54, Q55, R56, R57, R58, R60, R61 y E62. En un aspecto, la mutación introduce al menos un aminoácido alifático neutro, zwitteriónico o cargado negativamente. En otro aspecto, la mutación introduce al menos un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en glicina, alanina, leucina, valina, serina y glutamina.

En un aspecto, el polipéptido de neurturina comprende las mutaciones R52A, R56A y R58A. En un aspecto, el polipéptido de neurturina, el polipéptido comprende mutaciones R54A, R61A y R63A. En un aspecto, el polipéptido de neurturina comprende las mutaciones R52A, R54A, R56A, R58A y R61A En un aspecto, el polipéptido de neurturina comprende las mutaciones R51A, R54Q, Q55G, R56Q, R57G, R58A, R60V, R61G y E62S. En un aspecto, el polipéptido de neurturina comprende un reemplazo de los aminoácidos 51 a 62 por la secuencia ARLQGQGALVGS.

En otro aspecto de cualquiera de estos polipéptidos de neurturina, el polipéptido es un polipéptido de neurturina mejorado. En otro aspecto de cualquiera de estos polipéptidos de neurturina, el polipéptido es un polipéptido de neurturina humano mejorado.

En otro aspecto de cualquiera de estos polipéptidos de neurturina, el polipéptido de neurturina es sustancialmente homólogo, o sustancialmente similar a (SEQ ID NO: 5), sobre la secuencia de aminoácidos de la neurturina madura

de tipo natural, con excepción de los 13 aminoácidos abarcados por los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura.

Se describe un polipéptido de neurturina que comprende SEQ ID. No 1. Se describe un polipéptido de neurturina que comprende SEQ ID. No 2. También se describe un polipéptido de neurturina que comprende SEQ ID. No 3. En un aspecto de la invención, el polipéptido de neurturina comprende SEQ ID. No. 4.

En otro aspecto de cualquiera de estos polipéptidos de neurturina, el polipéptido de neurturina es una proteína de fusión con otra proteína.

En otra realización, se describe un método de tratamiento de la degeneración o insuficiencia celular que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina precedentes.

En un aspecto, el paciente tiene una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en neuropatía periférica, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral aguda, lesión aguda de la médula espinal, dolor neuropático, diabetes, disfunción eréctil, pérdida del cabello, enfermedad de Hirschsprung, tumores de sistemas nerviosos, esclerosis múltiple, pérdida de audición, retinopatía e infección.

En un aspecto, la degeneración o insuficiencia celular se compone de degeneración o insuficiencia de células hematopoyéticas seleccionada del grupo que consiste en eosinopenia, basopenia, linfopenia, monocitopenia, neutropenia, anemias, trombocitopenia e insuficiencia de células madre.

En un aspecto de cualquiera de estos métodos, el polipéptido de neurturina se administra mediante administración sistémica. En otro aspecto, el polipéptido de neurturina se administra por administración intratecal. En otro aspecto, el polipéptido de neurturina se administra mediante administración intranasal. En otro aspecto, el polipéptido de neurturina se administra por administración intraparenquimatosa. En otro aspecto, el polipéptido de neurturina se administra mediante una composición o dispositivo sostenido.

En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los péptidos de neurturina precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención incluye un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de neurturina, en el que el polipéptido de neurturina difiere de la neurturina de tipo natural maduro (SEQ ID NO: 5) por al menos una mutación de un aminoácido cargado positivamente en una región que comprende los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina madura de tipo natural, y en el que el polipéptido de neurturina tiene una afinidad disminuida respecto a la heparina en comparación con la neurturina madura de tipo natural.

En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que el polipéptido de neurturina tiene la capacidad de inducir la fosforilación de RET cuando se añade a fibroblastos a una concentración de 100 ng/ml durante 10 minutos a 37ºC, donde los fibroblastos expresan RET y GFRalpha1 o GFRalpha2.

En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que el polipéptido de neurturina puede eluirse a partir de una columna de afinidad de heparina a una concentración de NaCl de menos de 1 M de NaCl a pH 7,2.

En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que el polipéptido tiene al menos una mutación en una posición seleccionada del grupo que consiste en R52, R54, R56, R58, R61 y R63. En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que el polipéptido de neurturina tiene al menos una mutación en una posición seleccionada del grupo que consiste en R51, R54, Q55, R56, R57, R58, R60, R61 y E62. En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que la mutación introduce al menos un aminoácido alifático neutro, zwitteriónico o cargado negativamente. En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que la mutación introduce al menos un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en glicina, alanina, leucina, valina, serina y glutamina.

En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que el polipéptido comprende las mutaciones R52A, R56A y R58A. En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que el polipéptido de neurturina comprende las mutaciones R54A, R61A y R63A. En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que el polipéptido de neurturina comprende las mutaciones R52A, R54A, R56A, R58A y R61A. En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que el polipéptido de neurturina comprende las mutaciones R51A, R54Q, Q55G, R56Q, R57G, R58A y R61A, R58A, R60V, R61G y E62S. En un aspecto, el polinucleótido codifica un polipéptido de neurturina en el que el polipéptido comprende un reemplazo de los aminoácidos 51 a 62 por la secuencia ARLQGQGALVGS.

En otro aspecto se describen polinucleótidos que codifican los polipéptidos de neurturina en los que el polipéptido de neurturina es sustancialmente homólogo o sustancialmente similar a SEQ. ID. No. 5 respecto a la secuencia de

aminoácidos de la neurturina madura de tipo natural, excepto para los 13 aminoácidos abarcados por los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura.

En un aspecto, el polinucleótido comprende SEQ ID. No 6. En un aspecto, el polinucleótido comprende SEQ ID. No 7. En un aspecto, el polinucleótido comprende SEQ ID. No 8. En un aspecto, el polinucleótido comprende SEQ ID. No 9.

En otra realización, la invención incluye un vector recombinante que comprende los polinucleótidos precedentes. En un aspecto, el vector recombinante comprende además secuencias de control de la expresión unidas operativamente a los polinucleótidos. En un aspecto, el vector recombinante es un vector viral.

En otra realización, se describe un método de tratamiento de la degeneración o insuficiencia celular que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los vectores recombinantes precedentes.

En un aspecto de este método, el paciente tiene una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en neuropatía periférica, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral aguda, lesión aguda de la médula espinal, dolor neuropático, diabetes, disfunción eréctil, pérdida del cabello, enfermedad de Hirschsprung, tumores de sistemas nerviosos, esclerosis múltiple, pérdida de audición, retinopatía e infección.

En otro aspecto de este método, la degeneración o insuficiencia celular se compone de degeneración o insuficiencia de células hematopoyéticas seleccionada del grupo que consiste en eosinopenia, basopenia, linfopenia, monocitopenia, neutropenia, anemias, trombocitopenia e insuficiencia de células madre.

En un aspecto, el vector recombinante se administra mediante administración sistémica. En un aspecto, el vector recombinante se administra por administración intratecal. En un aspecto, el vector recombinante se administra por administración intranasal. En un aspecto, el vector recombinante se administra por administración intraparenquimatosa. En un aspecto, el vector recombinante se administra mediante una composición o dispositivo sostenido.

En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los vectores recombinantes precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención incluye una célula huésped que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 43. En un aspecto, el huésped ha sido transformado o transfectado con cualquiera de los vectores recombinantes precedentes. En un aspecto, la célula huésped segrega cualquiera de los polipéptidos de neurturina precedentes.

En otra realización, se describe un método para tratar la degeneración o insuficiencia celular que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las células hospedadoras anteriores.

En un aspecto, el paciente tiene una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en neuropatía periférica, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral aguda, lesión aguda de la médula espinal, dolor neuropático, diabetes, disfunción eréctil, pérdida del cabello, enfermedad de Hirschsprung, tumores de sistemas nerviosos, esclerosis múltiple, pérdida de audición, retinopatía e infección.

En un aspecto, la degeneración o insuficiencia celular se compone de degeneración o insuficiencia de células hematopoyéticas seleccionada del grupo que consiste en eosinopenia, basopenia, linfopenia, monocitopenia, neutropenia, anemias, trombocitopenia e insuficiencia de células madre.

En un aspecto, la célula huésped se administra por administración sistémica. En un aspecto, la célula huésped se administra por administración intratecal. En un aspecto, la célula huésped se administra por administración intranasal. En un aspecto, la célula huésped se administra por administración intraparenquimatosa. En un aspecto, la célula huésped se administra mediante una composición o dispositivo sostenido.

En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las células hospedadoras anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención incluye un sistema de suministro farmacéutico que comprende una bomba intratecal y cualquiera de los polipéptidos precedentes.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Con el fin de que la presente descripción se pueda entender más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada. Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la", incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye una o más de tales moléculas, "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos diferentes, la referencia a "un anticuerpo" incluye uno o más de tales anticuerpos diferentes, y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica que podrían ser modificados o sustituidos por los métodos descritos en la presente memoria.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo también se describe específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor declarado o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese intervalo indicado está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en el que uno, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños está también abarcado dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

El término "aproximadamente" o "alrededor de" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por cualquier experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 ó 2 desviaciones estándar, del valor medio. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar más o menos un intervalo de hasta 20%, preferiblemente hasta 10%, más preferiblemente hasta 5%.

Como se usa en la presente memoria, los términos "célula", "células", "célula huésped" y "células huésped" se usan indistintamente y abarcan células animales e incluyen células de invertebrados, vertebrados no mamíferos y mamíferos. Todas estas designaciones incluyen poblaciones celulares y progenies. Por lo tanto, los términos "transformantes" y "transfectantes" incluyen la célula del sujeto primario y las líneas celulares derivadas de ella sin tener en cuenta el número de transferencias. Ejemplos de células de vertebrados no mamíferos incluyen, por ejemplo, células aviares, células reptilianas y células anfibias. Ejemplos de células de invertebrados incluyen, pero no se limitan a, células de insecto tales como, por ejemplo, células de oruga (Spodoptera frugiperda), células de mosquito (Aedes aegypti), células de mosca de la fruta (Drosophila melanogaster), células de Schneider y células Bombyx mori. Véase, por ejemplo, Luckow et al., Bio/Technology 6: 47-55 (1988). Las células pueden diferenciarse, diferenciarse parcialmente o no diferenciarse, p. ej., las células madre, incluyendo las células madre embrionarias y las células madre pluripotentes. Adicionalmente, pueden usarse muestras de tejido procedentes de órganos o sistemas de órganos de acuerdo con la invención. Ejemplos de células de mamífero incluyen, por ejemplo, células derivadas de primates humanos, no humanos, gatos, perros, ovejas, cabras, vacas, caballos, cerdos, conejos, roedores incluyendo ratón, hámster, rata y cobaya y cualquier derivado y progenie de los mismos.

Las expresiones “cultivo de células” o “cultivo de tejidos” se refieren a células crecidas en suspensión o cultivadas adheridas a una variedad de superficies o sustratos en recipientes tales como botellas de rodillo, matraces de cultivo de tejidos, platos, placas de pocillos múltiples y similares.

El término “terapia celular” se refiere a una terapia que comprende inyectar, trasplantar o, de otro modo, colocar células en un cuerpo de mamífero para terapia. En diferentes aspectos, las células pueden ser autólogas, las células pueden producir una proteína, las células pueden ser regenerativas, las células pueden ser modificadas, las células pueden ser modificadas genéticamente, las células pueden ser células somáticas, células precursoras o células madre.

La frase "sustitución conservadora de aminoácidos" o "mutación conservadora" se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con una propiedad común. Una manera funcional de definir propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de los cambios de aminoácidos entre las proteínas correspondientes de organismos homólogos (Schulz, G. E. y R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). De acuerdo con tales análisis, pueden definirse grupos de aminoácidos donde los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferentemente entre sí y, por tanto, se parecen más entre sí en su impacto sobre la estructura proteica global (Schulz, GE y RH Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag).

Ejemplos de grupos de aminoácidos definidos de esta manera incluyen: un "grupo cargado/polar", que consiste en Glu, Asp, Asn, Gln, Lys, Arg y His; un grupo “aromático” o “cíclico”, que consiste en Pro, Phe, Tyr y Trp; y un "grupo alifático" que consiste en Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Ser, Thr y Cys.

Dentro de cada grupo, también se pueden identificar subgrupos, por ejemplo, el grupo de aminoácidos cargados/polares puede subdividirse en los subgrupos que consisten en el "subgrupo cargado positivamente", que consiste en Lys, Arg e His; el "subgrupo cargado negativamente", que consiste en Glu y Asp, y el "subgrupo polar" que consiste en Asn y Gln. El grupo aromático o cíclico puede subdividirse en los subgrupos que consisten en el

"subgrupo de anillo de nitrógeno", que consiste en Pro, His y Trp; y el "subgrupo fenilo" que consiste en Phe y Tyr. El grupo alifático puede subdividirse en los subgrupos que consisten en el "subgrupo alipático no polar grande", que consiste en Val, Leu y Ile; el "sub-grupo alifático ligeramente polar", que consiste en Met, Ser, Thr y Cys; y el "subgrupo de residuos pequeños", compuesto por Gly y Ala.

Ejemplos de mutaciones conservadoras incluyen sustituciones de aminoácidos dentro de los subgrupos anteriores, por ejemplo, Lys para Arg y viceversa, de manera que se puede mantener una carga positiva; Glu para Asp y viceversa, de manera que se puede mantener una carga negativa; Ser para Thr tal que se puede mantener un -OH libre; y Gln para Asn de manera que se pueda mantener un $-NH_2$ libre.

Tal como se usa en el presente documento, el término "disminución" o los términos relacionados "disminuyeron", "reducen" o "reducido" se refieren a una disminución estadísticamente significativa. Para evitar dudas, los términos generalmente se refieren al menos a una disminución del 10% en un parámetro dado, y pueden abarcar al menos una disminución del 20%, una disminución del 30%, una disminución del 40%, una disminución del 50%, una disminución del 60%, una disminución del 70%, una disminución del 80%, una disminución del 90%, una disminución del 95%, una disminución del 97%, 99% o incluso una disminución del 100% (es decir, el parámetro medido es cero).

El término “marcador de epítopo” se refiere a cualquier determinante antigénico, o cualquier estructura o secuencia biológica que se fusiona con la región codificadora de una proteína de interés para permitir la detección o purificación de la proteína de interés. Dichas proteínas de fusión pueden identificarse y purificarse, por ejemplo, utilizando anticuerpos específicos de epítopo. Ejemplos representativos de marcadores de epítopo incluyen, sin limitación, His tag (6-Histidina), marcador HA (hemaglutinina), marcador V5, marcador c-Myc, marcador GST y marcador FLAG (DYKDDDDK).

El término "encapsulado" en el contexto de la expresión "células encapsuladas" se refiere a células en las que el exterior de células o grupos de células individuales se ha recubierto con una membrana artificial.

El término "expresión", tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos dentro de una célula huésped. El nivel de expresión de un producto deseado en una célula huésped puede determinarse sobre la base de la cantidad de mRNA correspondiente que está presente en la célula o de la cantidad del polipéptido deseado codificado por la secuencia seleccionada. Por ejemplo, el ARNm transcrito a partir de una secuencia seleccionada puede cuantificarse mediante hibridación Northern blot, protección con ARN ribonucleasa, hibridación in situ con ARN celular o mediante PCR. Las proteínas codificadas por una secuencia seleccionada pueden cuantificarse por diversos métodos incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, ELISA, Western blot, radioinmunoensayos, inmunoprecipitación, ensayo de la actividad biológica de la proteína o por inmunotinción de la proteína seguido por análisis FACS.

Las "secuencias de control de expresión" son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores, sitios internos de entrada de ribosomas (IRES) y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula huésped. Ejemplos de secuencias de control de expresión se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

El término “ADN heterólogo” se refiere a ADN que se ha introducido en una célula, o secuencia de ácido nucleico, que se deriva de otra fuente, o que es de la misma fuente pero está situada en un contexto diferente (es decir, no nativo).

El término “homología” describe una comparación matemáticamente basada de similitudes de secuencia que se utiliza para identificar genes o proteínas con funciones o motivos similares. Las secuencias de ácido nucleico y proteína de la presente invención pueden usarse como una "secuencia problema" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar otros miembros de la familia, secuencias relacionadas o homólogos. Dichas búsquedas se pueden realizar usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas frente a moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas frente a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con espacios en blanco con propósitos de comparación, se puede utilizar el Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389 - 3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y BLAST).

El término “homólogo” se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluyendo proteínas de superfamilias (por ejemplo, la superfamilia de inmunoglobulinas) en la misma especie de animal, así como proteínas homólogas de diferentes especies de animales (por ejemplo, el polipéptido de cadena ligera de miosina, etc., véase Reeck et al., Cell, 50: 667, 1987). Tales proteínas (y sus ácidos nucleicos que

codifican) tienen homología de secuencia, como se refleja por su similitud de secuencia, ya sea en términos de identidad porcentual o por la presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas.

Tal como se utiliza en este documento, el término "aumento" o los términos relacionados "aumentó", "aumento" o "mejorado" se refiere a un aumento estadísticamente significativo. Para evitar dudas, los términos generalmente se refieren a al menos a un aumento del 10% en un parámetro dado, y pueden abarcar al menos un aumento del 20%, un aumento del 30%, un aumento del 40%, un aumento del 50%, un aumento del 60%, un aumento del 70%, un aumento del 80%, aumento del 90%, aumento del 95%, aumento del 97%, 99% o incluso un aumento del 100% sobre el valor de control.

El término "aislado", cuando se usa para describir un polipéptido de neurturina, significa una proteína que ha sido identificada y separada y/o recuperada de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interfieren con la investigación, los diagnósticos o usos terapéuticos de la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, la proteína se purificará hasta por lo menos un 95% de homogeneidad según se evaluaba mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. La proteína aislada incluye la proteína in situ dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural de la proteína de interés no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, la proteína aislada se preparará por al menos una etapa de purificación.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "identidad" significa el porcentaje de residuos de nucleótidos o aminoácidos idénticos en las posiciones correspondientes en dos o más secuencias cuando las secuencias están alineadas para maximizar la coincidencia de secuencias, es decir, teniendo en cuenta los vacíos y las inserciones. La identidad puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, AM, ed., Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, DW, ed., Academic Press, New York, 1993. Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, AM, y Griffin, HG, eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G. , Academic Press, 1987, y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, y Carillo, H. y Lipman, D., SIAM J. Applied Math , 48: 1073 (1988). Los métodos para determinar la identidad están diseñados para dar la coincidencia más grande entre las secuencias probadas. Además, los métodos para determinar la identidad se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux, J. y col., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, SF y col., J. Molec. Biol. 215: 403 - 410 (1990) y Altschul et al. Nuc. Acids Res. 25:3389 - 3402 (1997)). El programa BLAST X está disponible públicamente a partir de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215:403 - 410 (1990). El conocido algoritmo de Smith Waterman también se puede usar para determinar la identidad.

La expresión "unidos operativamente", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere al posicionamiento de dos o más secuencias de nucleótidos o elementos de secuencia de una manera que les permite funcionar de la manera deseada. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención incluye uno o más elementos de ADN capaces de abrir la cromatina y/o mantener la cromatina en un estado abierto unido operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína recombinante. En otras realizaciones, una molécula de ácido nucleico puede incluir adicionalmente una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas entre: (a) una secuencia de nucleótidos capaz de incrementar la traducción; (b) una secuencia de nucleótidos capaz de aumentar la secreción de la proteína recombinante fuera de una célula; y (c) una secuencia de nucleótidos capaz de incrementar la estabilidad del ARNm, donde dichas secuencias de nucleótidos están operativamente unidas a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína recombinante. Generalmente, pero no necesariamente, las secuencias de nucleótidos que están unidas operativamente son contiguas y, si es necesario, en el marco de lectura. Sin embargo, aunque el elemento de ADN unido operativamente capaz de abrir la cromatina y/o mantener la cromatina en un estado abierto está situado generalmente aguas arriba de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante; no es necesariamente contigua a ella. La unión operable de diversas secuencias de nucleótidos se logra por métodos recombinantes bien conocidos en la técnica, p. ej. utilizando la metodología de PCR, mediante ligación en sitios de restricción adecuados o mediante recocido. Se pueden usar conectores o adaptadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional si no están presentes sitios de restricción adecuados.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "paciente" en el contexto de la presente invención es preferiblemente un mamífero. El mamífero puede ser un humano, primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo o vaca, pero no se limita a estos ejemplos. Los mamíferos distintos de los humanos se pueden utilizar ventajosamente como pacientes que representan modelos animales de enfermedades y trastornos específicos. Un paciente puede ser un hombre o una mujer. Un paciente puede ser uno que ha sido previamente diagnosticado o identificado como que tiene degeneración o insuficiencia celular y, opcionalmente, ya ha sufrido o está experimentando una intervención terapéutica. Preferiblemente, el paciente es un ser humano.

Los términos "polinucleótido", "secuencia nucleotídica" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o

desoxirribonucleótidos. Estos términos incluyen un ADN de cadena sencilla, doble o triple, ADN genómico, ADNc, ARN, híbrido de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases de nucleótidos naturales, químicamente o bioquímicamente modificadas, no naturales o derivatizadas. La cadena principal del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (como se pueden encontrar típicamente en ARN o ADN), o grupos de azúcares o fosfatos modificados o sustituidos. Además, se puede obtener un polinucleótido bicatenario a partir del producto polinucleotídico de cadena sencilla de síntesis química bien sintetizando la cadena complementaria y recociendo los hilos en condiciones apropiadas, o sintetizando la cadena complementaria de novo usando una ADN polimerasa con un iniciador apropiado. Una molécula de ácido nucleico puede adoptar muchas formas diferentes, por ejemplo, un gen o fragmento génico, uno o más exones, uno o más intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, cDNA, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de unión tales como fluororibosa y tioato, y ramas de nucleótidos. Tal como se usa en la presente memoria, "ADN" o "secuencia de nucleótidos" incluye no sólo las bases A, T, C y G, sino también incluye cualquiera de sus análogos o formas modificadas de estas bases, tales como nucleótidos metilados, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces no cargados y tioatos, el uso de análogos de azúcar y estructuras de cadena principal modificadas y/o alternativas, tales como poliamidas.

Como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere a cualquier molécula que comprenda dos o más residuos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isósteres peptídicos. "Polipéptido" se refiere a ambas cadenas cortas, comúnmente referidas como péptidos, oligopéptidos u oligómeros, y a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por el gen. Los "polipéptidos" incluyen secuencias de aminoácidos modificadas por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa literatura de investigación familiar para cualquier experto en la técnica. Pueden producirse modificaciones en cualquier lugar de un polipéptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de aminoácidos y las terminaciones amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en igual o en diversos grados en varios sitios en un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales posteriores a la traducción o pueden realizarse mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, biotinilación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes GP1, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, palmitoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por la transferencia de ARN tales como la arginilación y la ubiquitinación (véase, por ejemplo, Proteins-Structure and Molecular Properties, 2ª ed. T.E.Creighton, WH Freeman and Company, Nueva York, 1993, Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12, en Post-translational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Sean et al, "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth Enzymol, 182, 626-646, 1990, y Rattan et al., "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci, 663, 48 - 62, 1992).

Un "promotor" es una región reguladora del ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante corriente abajo (dirección 3'). Como se usa en este documento, la secuencia del promotor está limitada en su extremo 3' por el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende hacia arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Se puede encontrar un sitio de iniciación de la transcripción (convenientemente definido por el mapeo con nucleasa SI) dentro de una secuencia promotora, así como dominios de unión a proteínas (secuencias de consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas pueden contener, a menudo, pero no siempre, cajas “TATA” y cajas “CAT”. Los promotores procarióticos contienen secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias de consenso -10 y -35. Un gran número de promotores, incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles, de una variedad de diferentes fuentes son bien conocidos en la técnica. Las fuentes representativas incluyen, por ejemplo, tipos de células víricas, de mamíferos, de insectos, de plantas, de levaduras y de bacterias, y los promotores adecuados de estas fuentes están fácilmente disponibles o se pueden hacer sintéticamente, basándose en secuencias públicamente disponibles en línea o, por ejemplo, depositarios tales como la ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales. Los promotores pueden ser unidireccionales (es decir, iniciar la transcripción en una dirección) o bidireccionales (es decir, iniciar la transcripción en una dirección 3 'o 5'). Ejemplos no limitantes de promotores incluyen, por ejemplo, el sistema de expresión bacteriana T7, el sistema de expresión bacteriana pBAD (araA), el promotor citomegalovirus (CMV), el promotor SV40, el promotor RSV, los promotores inducibles incluyen el sistema Tet (patentes de EE.UU. 5.464.758 y 5.814.618), el sistema inducible Ecdysone (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996) 93 (8): 3346 - 3351; el sistema T-RE$_X$ ™ (Invitrogen Carlsbad, CA), LacSwitch® (Stratagene, (San Diego, CA) y el sistema de recombinasa

inducible Cre-ER^T tamoxifeno (Indra et al., Nuc. Acid. Res. (1999) 27 (22): 4324 - 4357; Nuc. Acid. Res. (2000) 28 (23): e99; Patente de Estados Unidos Nº 7.112.715; y Kramer y Fussenegger, Methods Mol. Biol. (2005) 308: 123 - 144) o cualquier promotor conocido en la técnica adecuado para la expresión en las células deseadas.

El término "purificado", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a material que ha sido aislado bajo condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluyendo materiales nativos a partir de los cuales se obtiene el material. Por ejemplo, una proteína purificada está preferiblemente sustancialmente libre de otras proteínas o ácidos nucleicos con los que está asociado en una célula. Los métodos para la purificación son bien conocidos en la técnica. Como se usa en este documento, la expresión "sustancialmente libre" se utiliza operacionalmente, en el contexto de la prueba analítica del material. Preferiblemente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es al menos 50% puro; más preferiblemente, al menos 75% puro, y más preferiblemente todavía al menos 95% puro. La pureza puede evaluarse por cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de composición, ensayo biológico y otros métodos conocidos en la técnica. La expresión "sustancialmente puro" indica el grado más alto de pureza, que se puede lograr usando técnicas de purificación convencionales conocidas en la técnica.

La expresión "proteína recombinante" o "polipéptido recombinante" se refiere a i) una proteína codificada en total o en parte por ADN heterólogo, o ii) una proteína que se expresa a partir de secuencias de control de expresión (tales como un promotor o potenciador) creadas en todo o parte por el ADN heterólogo que activa la expresión de un gen endógeno.

La expresión "similitud de secuencia" se refiere al grado de identidad o correspondencia entre las secuencias de ácido nucleico o aminoácidos que pueden o no compartir un origen evolutivo común (véase Reeck et al., supra). Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio tal como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia y puede o no relacionarse con un origen evolutivo común.

En realizaciones específicas, dos secuencias de ácido nucleico son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente 85%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% de los nucleótidos coinciden en una longitud definida de las secuencias de ácido nucleico, como se determina mediante un algoritmo de comparación de secuencias conocido como BLAST, FASTA, Strider de ADN, CLUSTAL, etc. Un ejemplo de tal secuencia es una variante alélica o de especie de los genes específicos de la presente invención. Las secuencias que son sustancialmente homólogas también pueden identificarse por hibridación, por ejemplo, en un experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo, condiciones rigurosas como se define para ese sistema particular.

De manera similar, en realizaciones particulares de la invención, dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 90% de los residuos de aminoácidos son idénticos. Dos secuencias son funcionalmente idénticas cuando más de aproximadamente el 95% de los residuos de aminoácidos son similares. Preferiblemente, las secuencias de polipéptidos similares u homólogas se identifican por alineación utilizando, por ejemplo, el programa de acumulación GCG (Genetics Computer Group, Versión 7, Madison, Wis.) o utilizando cualquiera de los programas y algoritmos descritos anteriormente. El programa puede usar el algoritmo de homología local de Smith y Waterman con los valores por defecto: penalización de creación de hueco = -(1 + 1/k), siendo k el número de extensión de huecos, coincidencia media = 1, desajuste promedio = -0.333.

Como se define en este documento, las expresiones “liberación sostenida”, “liberación prolongada” o “formulación de depósito” se refieren a la liberación de un fármaco tal como un polipéptido de neurturina mejorado a partir de la composición de liberación sostenida o dispositivo de liberación sostenida que se produce durante un período que es más largo que el período durante el cual el polipéptido de neurturina estaría disponible después de la administración IV directa o SC de una dosis única del polipéptido de neurturina mejorado. En un aspecto, la liberación sostenida será una liberación que se produce durante un periodo de al menos aproximadamente una a dos semanas. En otro aspecto, la liberación sostenida será una liberación que tiene lugar durante un periodo de al menos aproximadamente cuatro meses. La continuidad de liberación y nivel de liberación pueden verse afectados por el tipo de dispositivo de liberación sostenida (por ejemplo, bomba programable o bomba accionada osmóticamente) o la composición de liberación sostenida usada (por ejemplo, relaciones de monómeros, peso molecular, composición de bloques y combinaciones variables de polímeros), carga de polipéptidos y/o selección de excipientes para producir el efecto deseado, como se describe más completamente en la presente memoria.

El término “transformación” o “transfección” se refiere a la transferencia de una o más moléculas de ácido nucleico en una célula u organismo huésped. Los métodos de introducción de moléculas de ácido nucleico en células huésped incluyen, por ejemplo, la transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, carga por raspado, introducción balística o infección por virus u otros agentes infecciosos. "Transformada", "transducida" o "transgénica", en el contexto de una célula, se refiere a una célula u organismo huésped en el que una molécula de ácido nucleico recombinante o heteróloga (por ejemplo, una o más construcciones de ADN o ARNsi) ha sido introducida. La molécula de ácido nucleico puede expresarse de forma estable (es decir, mantenerse en una forma funcional en la

célula durante más de aproximadamente tres meses) o mantenerse de forma no estable en una forma funcional en la célula durante menos de tres meses, es decir, expresarse transitoriamente. Por ejemplo, las células "transformadas", "transformantes" y "transgénicas" han pasado por el proceso de transformación y contienen ácido nucleico ajeno. La expresión "no transformado" se refiere a células que no han pasado por el proceso de transformación.

Los términos "tratar" o "tratamiento" significan aplacar, aliviar, retrasar, reducir, revertir, mejorar, manejar o prevenir al menos un síntoma de una afección en un paciente. El término "tratar" también puede significar detener, retrasar el comienzo (es decir, el período anterior a la manifestación clínica de una enfermedad) y/o reducir el riesgo de desarrollar o empeorar una condición.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad profilácticamente eficaz" o "cantidad eficaz desde el punto de vista del diagnóstico" es la cantidad del agente activo, p. ej. un polipéptido de neurturina mejorado, un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica tal neurturina mejorada, o una célula hospedadora que expresa neurturina recombinante mejorada, necesaria para provocar la respuesta biológica deseada después de la administración.

El término "variante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia, pero conserva algunas de sus propiedades esenciales. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. Generalmente, las alteraciones son limitadas de manera que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, inserciones o deleciones en cualquier combinación. Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede o no estar codificado por el código genético.

La expresión "neurturina de tipo natural" o "pre-pro neurturina" se refiere al gen que codifica la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO 26 en la Tabla D3). Las expresiones "neurturina de tipo natural maduro" o "neurturina humana madura" se refieren al gen que codifica la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5 en la Tabla D2), que ha sido procesado por eliminación de la señal de secreción y la pre-proteína. El término "NRTN" se refiere al gen que codifica la neurturina de tipo natural.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona con conocimientos ordinarios en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Books 1- 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos, Current Protocols in Molecular Biology, capítulos 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press; Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. I de Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); Antibodies: A Laboratory Manual de Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-3,4-2), 1855. Handbook of Drug Screening, editado por Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, Nueva York, N.Y., Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); y Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench, Editado por Jane Roskams y Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3. Cada uno de estos textos generales se incorpora en este documento como referencia.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece la invención. Aunque en la práctica o prueba de la invención pueden utilizarse cualesquiera métodos, composiciones, reactivos, células, similares o equivalentes a los descritos en este documento, se describen en este documento los métodos y materiales preferidos.

Las publicaciones mencionadas anteriormente se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anticipar tal descripción en virtud de la invención anterior.

Todas las publicaciones y referencias, incluyendo pero sin limitarse a patentes y solicitudes de patente, citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en este documento como referencia en su totalidad como si cada publicación o referencia individual estuviera indicada de forma específica e individual para incorporarse como referencia en el presente documento. Cualquier solicitud de patente a la que esta solicitud reivindica prioridad también se incorpora en este documento como referencia en su totalidad de la manera descrita anteriormente para publicaciones y referencias.

Visión de conjunto

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de moléculas de neurturina mejoradas que tienen capacidad de unión reducida a heparina y a sulfato de heparán, pero que conservan sorprendentemente la capacidad de inducir la fosforilación de la proteína RET al unirse al complejo receptor. En diferentes realizaciones, la invención comprende polipéptidos purificados, polinucleótidos que codifican los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que contienen los polinucleótidos y huéspedes que expresan los polipéptidos de neurturina mejorados que poseen la capacidad de inducir la fosforilación de RET y poseen una afinidad de unión disminuida de heparina. También se incluye en la invención el uso de estas diversas realizaciones en el tratamiento de enfermedades y trastornos humanos.

I. Polipéptidos de neurturina

Las expresiones "polipéptido de neurturina mejorado", o "neurturina mejorada" o "NRTN mejorada", tal como se usan en la presente invención, incluyen todas las formas de neurturina naturales y formas sintéticas que difieren de la SEQ. ID. NO. 5 de neurturina de tipo silvestre madura correspondiente por al menos una mutación de un aminoácido cargado positivamente en una región que comprende los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina madura de tipo natural y exhiben una afinidad disminuida a la heparina en comparación con la neurturina humana madura.

En otro aspecto, la neurturina mejorada difiere de la correspondiente SEQ. ID. NO. 5 de neurturina de tipo natural maduro correspondiente por la mutación de al menos dos de los aminoácidos cargados positivamente en una región que comprende los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina madura de tipo natural y exhiben una afinidad disminuida respecto a la heparina en comparación con la neurturina humana madura.

En otro aspecto, la neurturina mejorada difiere de la correspondiente SEQ. ID. NO. 5 de neurturina de tipo natural maduro correspondiente por la mutación de al menos tres de los aminoácidos cargados positivamente en una región que comprende los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina madura de tipo natural y exhiben una afinidad disminuida respecto a la heparina en comparación con la neurturina humana madura.

En otro aspecto, la neurturina mejorada difiere de la correspondiente SEQ. ID. NO. 5 de neurturina de tipo natural maduro correspondiente por la mutación de al menos cinco de los aminoácidos cargados positivamente en una región que comprende los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina madura de tipo natural y exhiben una afinidad disminuida respecto a la heparina en comparación con la neurturina humana madura.

En una realización, la expresión "polipéptido de neurturina mejorado" se refiere a un polipéptido que es al menos 90% idéntico a la neurturina madura de tipo natural (SEQ ID NO: 5), respecto a la secuencia de aminoácidos de la neurturina madura de tipo natural, excepto para los 13 aminoácidos abarcados por los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura. En otro aspecto, un "polipéptido de neurturina humano mejorado" para su uso en cualquiera de los métodos de la invención es al menos 95% idéntico respecto a la SEQ. ID. NO. 5 (neurturina de tipo natural madura), respecto a la secuencia de aminoácidos de la neurturina de tipo natural madura, excepto para los 13 aminoácidos abarcados por los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura.

En una realización, los polipéptidos de neurturina mejorados comprenden una o más mutaciones en los aminoácidos 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62 ó 63 en comparación con la neurturina madura de tipo natural, usando la numeración para la neurturina de tipo natural madura de tamaño de aminoácidos 102 (SEQ ID NO: 5). En un aspecto de la invención, la neurturina mejorada comprende de 1 a 13 mutaciones de aminoácidos dentro de la región abarcada por los residuos 51 a 63 de neurturina humana madura (SEQ ID NO: 5). En un aspecto, la neurturina mejorada comprenderá las mutaciones de aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 13 dentro de la región abarcada por los residuos 51 a 63 de neurturina humana madura (SEQ ID NO: 5). En otro aspecto más, la neurturina mejorada comprenderá 3, 5, 7, 9 ó 11 mutaciones de aminoácidos dentro de la región abarcada por los residuos 51 a 63 de neurturina humana madura.

En un aspecto de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorada, la una o más mutaciones introducen en la neurturina mejorada al menos un aminoácido alifático neutro, zwitteriónico o cargado negativamente. En otro aspecto de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorada, una o más mutaciones introducen en la neurturina mejorada al menos un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en glicina, alanina, leucina, valina, serina y glutamina.

En otro aspecto, el polipéptido de neurturina mejorado comprende un reemplazo de los aminoácidos 51 a 62 por la secuencia ARLQGQGALVGS (SEQ ID NO: 25). En otro aspecto, el polipéptido de neurturina mejorado comprende una secuencia seleccionada de la SEQ. ID. NO. 22 a 25. (Tabla D1), en el que el polipéptido de neurturina mejorado muestra una afinidad disminuida respecto a la heparina en comparación con la neurturina humana de tipo natural madura.

Tabla D1. Secuencias de aminoácidos que proporcionan una afinidad reducida respecto a la heparina cuando se insertan en la neurturina madura de tipo natural.	
SEQ. ID. NO.	Secuencia de aminoácidos
SEQ. ID. NO. 22	RALRQARA
SEQ. ID. NO. 23	RRLAQRRRLRAEA
SEQ. ID. NO. 24	RALAQARALRA
SEQ. ID. NO. 25	ARLQGQGALVGS

Se describen polipéptidos de neurturina mejorados que comprenden la SEQ. ID. NO. 1, 2, 3 ó 4. (Tabla D2)

Tabla D2. Secuencias de aminoácidos completas de variantes de neurturina madura N-1 a N-4 (SEQ. ID. Nos. 1, 2, 3, 4, respectivamente) y neurturina de tipo natural (SEQ. ID. Nos. 5).

SEQ. ID. NO.	Secuencia de aminoácidos
1	ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACE AAARVYDLGLR**A**LRQ**A**R**A**LRRERVRAQPCC RPTAYEDEVSFLDAHSRYHT VHELSARECACV
2	ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACE AAARVYDLGLRRL**A**QRRRLR**A**E**A**VRAQPCC RPTAYEDEVS FLDAHSRYHT VHELSARECACV
3	ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACE AAARVYDLGL R**A**LA**Q**A**R**A**LR**A**ERVRAQPCC RPTAYEDEVS FLDAHSRYHT VHELSARECACV
4	ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACE AAARVYDLGL A**R**L**QGQG**A**L**V**G**S**RVRAQPCC RPTAYEDEVS FLDAHSRYHT VHELSARECACV
5	ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACE AAARVYDLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPCC RPTAYEDEVSFLDAHSRYHT VHELSARECACV

Los aminoácidos sustituidos en las variantes se muestran en negrita en comparación con la secuencia de tipo natural.

Los polipéptidos de neurturina mejorados pueden poseer sustituciones de aminoácidos de adición fuera de la región 51 a 63 que no afectan adicionalmente sustancialmente a la unión a heparina o a la inducción de fosforilación de RET. Adicionalmente, se han secuenciado variantes de origen natural de la neurturina humana madura, y se conocen en la técnica que son, al menos parcialmente, funcionalmente intercambiables. Por lo tanto, sería una cuestión de rutina seleccionar una variante natural de neurturina, por ejemplo, como se muestra en la Tabla D3 (véase la SEQ ID NO: 26 a 30) para crear una neurturina mejorada que contenga uno o más cambios de aminoácidos conservados basados en la secuencia de cualquiera de los homólogos, ortólogos, y las isoformas de origen natural de humanos así como otras especies de neurturina.

Tabla D3

Variantes de neurturina naturales

SEQ. ID. No.	Secuencia	Referencia
(SEQ. ID. No. 26)	MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCREGLLLS HRLGPALVPL HRLPRTLDAR IARLAQYRAL LQGAPDAMEL RELTPWAGRP PGPRRRAGPR RRRARARLGA RPCGLRELEV RVSELGLGYA SDETVLFRYC AGACEAAARV YDLGLRRLRQ RRRLRRERVR AQPCCRPTAY EDEVSFLDAH SRYHTVHELS ARECACV	EAW69140.1 Neurturina humana tipo natural o pre-pro neurturina
(SEQ. ID. No. 27)	SRLGA RPCGLRELEV RVSELGLGYA SDETVLFRYC AGACEAAARV YDLGLRRLRQ RRRLRRERVR AQPCCRPTAY EDEVSFLDAH SRYHTVHELS ARECACV	VAR_009498 Variante humana de neurturina
(SEQ. ID. No. 28)	MSAGSGGHGS AHGGGGEVGR AARARCDGAG APLRPWTSKC ASEAGWARGG RGGSRNPLCS LCEGEPQTPR CLAVRRGPWG ASGPQTPAGE LPSAQLRAEV NICQWRVPAA AASGDTVSSG CPQAYWAPAT AASGCMGPRW SVQARALAPA APRCCDASVL CLAEMPSSLF GSQLPWLFRE ALWDPRMGVL PLPPPARHPP SSRAAFFTTL CSGFLMNRVD VMTDHYAEVD GNQGPRRAPG AWPSALFAPR MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCRDGLLLS HRLGPALAPL RRPPRTLDAR IARLAQYRAL LQGAPDAVEL RQLTPWAGGA AGPRRRAGPR RRRARTGSRP CGLRELEVRV SELGLGYASD ETVLFRYCAG ACEAAARVYD LGLRRLRQRR RVRRERVRAQ PCCRPTAYED EVSFLDAHSR YHTVHELSAR ECACV	XP_854570 [Canis familiaris]
(SEQ. ID. No. 29)	MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCREGLLLG HRLGPALAPL RRPPRTLDAR IARLAQYRAL LQGAPDAVEL RELTPWAGRS PGPRRRPGPR RRRARARSGT RPCGLRELEV RVSELGLGYA SEETVLFRYC AGACEAAARV YDLGLRRLRQ RRRVRRERVR AQPCCRPTAY EDEVSFLDTH SRYHTVHELS ARECACV	XP_603915 [Bos taurus]
(SEQ. ID. No. 30)	MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCREGLLLS HRLGPALVPL RRLPRTLDTR IARLAQYRAL LQGAPDAVEL RELTPWAGRP PGPRRRAGPR RRRARARSGA RPCGLRELEV RVSELGYASD ETVLFRYCAG ACEAAARVYD LGLRRLRQRR RLRRERVRAQ PCCRPTAYED EVSFLDAHSR YHTVHELSAR ECACV	XP_001085705 [Macaca mulatta]

Se sabe en la técnica cómo modificar sintéticamente las secuencias de proteínas o péptidos, manteniendo su actividad útil, y esto se puede lograr usando técnicas que son estándar en la técnica y que están ampliamente

descritas en la literatura, por ejemplo, mutagénesis dirigida al azar o dirigida, escisión y ligación de ácidos nucleicos, o mediante la síntesis química o modificación de aminoácidos o cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, se pueden introducir cambios de mutaciones conservadoras de aminoácidos en una neurturina mejorada y se consideran dentro del alcance de la invención.

La neurturina potenciada puede así incluir una o más deleciones, adiciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos basadas en cualquiera de las isoformas de origen natural de neurturina fuera de la región de unión a heparina que comprende los aminoácidos 51 a 63. Éstos pueden ser contiguos o no contiguos. Las variantes representativas pueden incluir aquellas que tienen de 1 a 8, o más preferiblemente de 1 a 4, 1 a 3, o 1 ó 2 sustituciones, inserciones y/o supresiones de aminoácidos en comparación con cualquiera de las secuencias listadas en la Tabla D2.

Del mismo modo, está dentro de la experiencia en la técnica tratar y/o mitigar los problemas de inmunogenicidad si surgen utilizando neurturina humana mejorada, por ejemplo, mediante el uso de programas automatizados de reconocimiento por ordenador para identificar epítopes potenciales de células T y enfoques de evolución dirigidos para identificar menos formas inmunogénicas. Cualquiera de tales modificaciones, o combinaciones de las mismas, se pueden fabricar y utilizar en cualquiera de los métodos de la invención, siempre que se mantenga la actividad.

Los polipéptidos de neurturina mejorados que pueden usarse en cualquiera de los métodos de la invención pueden tener secuencias de aminoácidos que son sustancialmente homólogas o sustancialmente similares a la secuencia de aminoácidos de neurturina humana madura (SEQ ID NO: 5), a lo largo de la longitud de neurturina de tipo natural maduro, excluyendo los 13 aminoácidos abarcados por los residuos 51 a 63 de neurturina humana madura; (es decir, es sustancialmente homóloga o sustancialmente similar a los aminoácidos 1 a 50 y 64 a 102 de la SEQ ID NO: 5).

Adicionalmente, en algunas realizaciones, los polipéptidos de neurturina mejorados pueden incluir secuencias de señal de secreción sintéticas o de origen natural, derivadas de otras proteínas secretadas bien caracterizadas tales como las inmunoglobulinas, incluyendo por ejemplo la secuencia de señal de secreción de IgG. Específicamente, la neurturina de tipo natural se sintetiza inicialmente como una proteína pre-pro, que comprende una señal de secreción, (aminoácidos 1-19) y un prepéptido que comprende los aminoácidos 20 a 95, que se procesan durante la biosíntesis y la secreción de la célula.

Por consiguiente, en un aspecto, los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención pueden incluir secuencias pre y pro idénticas o sustancialmente similares a las de la neurturina de tipo natural (SEQ ID Nº 26).

En algunas realizaciones, tales proteínas, pueden procesarse por escisión proteolítica para formar la neurturina madura mejorada in situ. Tales proteínas de fusiones incluyen por ejemplo fusiones de la neurturina mejorada a ubiquitina para proporcionar un nuevo aminoácido N-terminal, o el uso de una señal de secreción para mediar la secreción de alto nivel de la neurturina mejorada en el medio extracelular, o marcadores de épitopo N- o C-Terminal para mejorar la purificación o detección.

En otras realizaciones, se incluyen también proteínas de fusión de la neurturina humana potenciada a otras proteínas, y estas proteínas de fusión pueden aumentar la actividad biológica de los polipéptidos de neurturina mejorados, la orientación, la vida biológica, la capacidad de penetrar en la barrera hematoencefálica o las propiedades farmacocinéticas. Ejemplos de proteínas de fusión que mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen, sin limitación, fusiones a albúmina humana (Osborn et al.: Eur. J. Pharmacol. 456 (1-3): 149-158, (2002)), dominios Fc de anticuerpo, secuencias de poli Glu o poli Asp y transferrina. Además, la fusión con secuencias de polipéptidos conformacionalmente desordenadas compuestas de los aminoácidos Pro, Ala y Ser ('PASilación') o el almidón hidroxietilo (vendido bajo la marca comercial HESYLATION®) proporciona una manera sencilla de aumentar el volumen hidrodinámico de la neurturina mejorada. Esta extensión adicional adopta una estructura aleatoria voluminosa, que aumenta significativamente el tamaño de la proteína de fusión resultante. De este modo, el aclaramiento típicamente rápido de la neurturina mejorada a través de la filtración renal se retarda en varios órdenes de magnitud. Además, se ha demostrado que el uso de proteínas de fusión Ig G también permite que las proteínas de la proteína de fusión con proteínas tales como GDNF penetren por la barrera hematoencefálica (Fu et al., (2010) Brain Res. 1352: 208 - 13). Un enfoque de proteína de fusión adicional contemplado para su uso dentro de la presente invención incluye la fusión de la neurturina mejorada a un dominio de multimerización. Los dominios de multimerización representativos incluyen, sin limitación, dominios de dimerización de bobinas helicoidales tales como dominios de cremallera de leucina que se encuentran en ciertos polipéptidos de unión a ADN, el dominio de dimerización de un dominio constante de inmunoglobulina Fab, tal como una región constante de CHI de cadena pesada de inmunoglobulina o una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina. En una realización preferida, el dominio de multimerización se deriva de tetranectina, y comprende más específicamente el elemento estructural de trimerización de tetranectina, que se describe con detalle en el documento WO 98/56906.

Se apreciará que un enlazador molecular flexible (o espaciador) opcionalmente puede interponerse entre, y unirse covalentemente, a la neurturina potenciada y a cualquiera de las proteínas de fusión descritas en la presente memoria. Cualquiera de estas proteínas de fusión puede usarse en cualquiera de los métodos, proteínas, polinucleótidos y células huésped de la presente invención.

La neurturina potenciada puede estar en su forma nativa, es decir, como diferentes variantes como aparecen en la naturaleza que pueden ser vistas como variantes funcionalmente equivalentes de neurturina humana, o pueden ser derivados funcionalmente equivalentes naturales de los mismos, los cuales pueden diferir en su secuencia de aminoácidos, por ejemplo, mediante truncamiento proteolítico (por ejemplo, del extremo N o C o ambos) u otras modificaciones postraduccionales. También se incluyen específicamente en cualquiera de los métodos de la invención derivados químicos derivados de la naturaleza, incluyendo modificaciones postraduccionales y productos de degradación de neurturina humana potenciada, incluyendo, por ejemplo, variantes de piroglutamilo, iso aspartilo, proteolíticas, fosforiladas, glicosiladas, oxidadas, isomerizadas, y desaminadas de neurturina humana mejorada.

También pueden usarse modificaciones químicas de la neurturina mejorada, que retienen o estabilizan la actividad de neurturina o la semivida biológica mejorada, con cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. Tales estrategias de modificación química incluyen, sin limitación, pegilación, glicosilación y acilación (Clark et al., J. Biol. Chem. 271(36): 21969 - 21977, (1996); Roberts y otros: Adv. Drug. Deliv. Rev. 54(4): 459 - 476, (2002); Felix et al.: Int. J. Pept. Protein. Res. 46(3-4): 253 - 264, (1995); Garber AJ: Diabetes Obes. Metab. 7(6): 666 - 74 (2005)). También se pueden incluir grupos protectores C- y N-terminales, aminoácidos estabilizadores y unidades peptomiméticas.

Una amplia variedad de derivados de PEG están disponibles y son adecuados para su uso en la preparación de conjugados de PEG. Por ejemplo, los reactivos de PEG de NOF Corp., vendidos bajo la marca registrada SUNBRIGHT® Series, proporcionan numerosos derivados de PEG, incluyendo metoxipolietilenglicoles y derivados de PEG activados tales como aminas de metoxi-PEG, maleimidas y ácidos carboxílicos, para acoplamiento mediante diversos métodos a fármacos, enzimas, fosfolípidos y otros biomateriales y la tecnología de PEGilación avanzada de Nektar Therapeutics también ofrece diversas tecnologías de acoplamiento de PEG para mejorar la seguridad y la eficacia de la terapéutica.

Una búsqueda de patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones relacionadas proporcionará también a los expertos en la técnica la lectura de esta descripción con tecnologías de acoplamiento de PEG significativas y derivados de PEG. Por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.436.386; 5.932.462; 5.900.461; 5.824.784; y 4.904.584; cuyos contenidos se incorporan por referencia en su totalidad, describen tales tecnologías y derivados, y métodos para su fabricación. Por lo tanto, cualquier experto en la técnica, considerando tanto la descripción de esta invención como las descripciones de estas otras patentes, podría acoplar PEG, un derivado de PEG o algún otro polímero a la neurturina mejorada para su liberación prolongada.

El PEG es un polímero bien conocido que tiene las propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, falta de toxicidad, falta de inmunogenicidad, y también que es claro, incoloro, inodoro y estable. Un uso de PEG es unir covalentemente el polímero a moléculas insolubles para hacer soluble el conjugado de PEG-molécula resultante. Por estas razones y otras, el PEG se ha seleccionado como el polímero preferido para la unión, pero se ha empleado únicamente con fines ilustrativos y no limitativos. Pueden obtenerse productos similares con otros polímeros solubles en agua, incluyendo sin limitación; alcohol polivinílico, otros poli (óxidos de alquileno) tales como poli (propilenglicol) y similares, poli (polioles oxietilados) tales como poli (glicerol oxietilado) y similares, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, etileno/anhídrido maleico, y poliaminoácidos. Cualquier experto en la técnica será capaz de seleccionar el polímero deseado basado en la dosificación deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones.

Los isómeros de los L-aminoácidos nativos, por ejemplo, los D-aminoácidos pueden incorporarse en cualquiera de las formas anteriores de la neurturina mejorada, y utilizarse en cualquiera de los métodos de la invención. Otras variantes pueden incluir fusiones en el extremo amino y/o carboxilo, así como inserciones intrasecuencias de aminoácidos individuales o múltiples. Los péptidos más largos pueden comprender múltiples copias de una o más de las secuencias de neurturina mejoradas. Las variantes de secuencia de aminoácidos de inserción son aquellas en las que se introducen uno o más residuos de aminoácidos en un sitio en la proteína. Las variantes de deleción se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia. Las variantes pueden incluir, por ejemplo, variantes alélicas diferentes tal como aparecen en la naturaleza, por ejemplo, en otras especies o debido a la variación geográfica.

Las variantes, derivados y proteínas de fusión de la neurturina mejorada son funcionalmente equivalentes en el sentido de que tienen actividad detectable de neurturina. Más particularmente, presentan al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 80% de la actividad de la neurturina humana. Así, son capaces de sustituir la neurturina misma. Tal actividad significa cualquier actividad exhibida por una neurturina humana nativa, ya sea una respuesta fisiológica exhibida en un sistema de ensayo in vivo o in vitro, o cualquier actividad biológica o reacción mediada por una neurturina humana nativa, por ejemplo, en una enzima o un ensayo basado en células o en la unión a los tejidos de ensayo, membranas, o iones metálicos. Se incluyen todas estas variantes, derivados, proteínas de fusión o fragmentos de la neurturina mejorada, y se pueden usar en cualquiera de los polinucleótidos, vectores, células huésped y métodos descritos y/o reivindicados en la presente memoria, y se incluyen en la expresión "neurturina mejorada".

Los ensayos adecuados para determinar la actividad de neurturina funcional incluyen los ensayos de fosforilación RET de Virtanen et al. (2005) "The first cysteine -rich domain of the receptor GFRalphal stabilizes the binding of GDNF" Biochem J. 387: 817-824 y ensayos de crecimiento de neuritas de Virtanen et al., (2005) "The first cysteine -rich domain of the receptor GFRalphal stabilizes the binding of GDNF" Biochem J. 387: 817-824; y ensayos de unión frente al GFRα soluble de Virtanen et al., (2005) "The first cysteine-rich domain of the receptor GFRalphal stabilizes the binding of GDNF" Biochem J. 387: 817-824 o a N-sindecan de la Tesis doctoral de Maxim M. Bespalov, 18.12. 2009, Universidad de Helsinki, o a NCAM en presencia de proteínas GFRα de Paratcha et al. (2003) "The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands". 113: 867-879, o proteínas de GFRα ancladas en GPI en la superficie celular de Virtanen et al., (2005) "The first cysteine-rich domain of the receptor GFRalphal stabilizes the binding of GDNF", Biochem J. 387: 817-824; ensayos de supervivencia in vitro en las neuronas dopaminérgicas embrionarias de Lindholm et al. (2007) "Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo", Nature 448: 73-77, neuronas simpáticas del ganglio ganglionar superior embrionario Yu et al. (2003) "GDNF-deprived sympathetic neurons die via a novel nonmitochondrial pathway" J Cell Biol 163: 987-997, ganglio de la raíz dorsal o motoneuronas de Paveliev et al (2004) "GDNF family ligands activate multiple events during axonal growth in mature sensory neurons", Mol Cell Neurosci 25: 453-459 y la capacidad de proteger neuronas dopaminérgicas en roedores adultos en 6-OHDA neurotóxico de Lindholm et al., (2007) "Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo", Nature 448: 73-77, o ensayos de lesiones de MPTP de Schober et al., (2007), "GDNF applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF-beta for its neuroprotective action", Neurobiol Dis. 25: 378-391 in vivo.

Por ejemplo, los ensayos de fosforilación de RET pueden realizarse fácilmente usando fibroblastos que han sido transfectados de forma estable con la isoforma larga RET humana (Eketjall et al., 1999, EMBO J., 18: 5901) y que han sido transitoriamente transfectados con GFRα1 de rata o humano GFRα2. Un día después de la transfección, las células se privaron de DMEM (Sigma) sin suero durante cuatro horas y después se aplicó la prueba de neurturina durante 10 minutos. A continuación se lisan los fibroblastos y se usan los lisados para la inmunoprecipitación de RET (usando anticuerpos para RET, por ejemplo, que están comercialmente disponibles en Santa Cruz Biotechnology Inc). Los inmunocomplejos pueden ser recolectados usando Proteína G-Sepharose (GE Healthcare) y analizados en SDS-PAGE al 8% y Western blot. La fosforilación de RET puede detectarse mediante anticuerpos contra fosfotirosina (comercialmente disponible en Upstate Biotechnology). La fosforilación exitosa de RET muestra que la neurturina es funcionalmente activa como un factor neurotrófico.

En otro aspecto, los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención tienen una afinidad disminuida de unirse a heparina o sulfato de heparán en comparación con la neurturina humana madura de tipo natural. En diferentes realizaciones, la afinidad de los polipéptidos de neurturina mejorados puede tener aproximadamente un factor de 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 200 veces, aproximadamente 500 veces, o aproximadamente 1000 veces menor afinidad con heparina o sulfato de heparán en comparación con la neurturina humana madura de tipo natural.

Por consiguiente, en diferentes aspectos, los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención pueden tener una afinidad aparente con heparina (es decir, tener una K_d) superior a aproximadamente 5 x 10^{-6} M, superior a aproximadamente 1 x 10^{-6} M, superior a aproximadamente 5 x 10^{-7} M, superior a aproximadamente 1 x 10^{-7} M, superior a 5 x 10^{-8} M, o superior a 1 x 10^{-8} M. Medido bajo condiciones en las que la neurturina madura de tipo natural tiene una afinidad aparente (K_d) para heparina de aproximadamente 2 a 4 x 10^{-9} M.

La afinidad de los polipéptidos de neurturina mejorados con heparina se puede determinar fácilmente usando una variedad de métodos reconocidos en la técnica, incluyendo enfoques basados en resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando instrumentación vendida bajo la marca registrada BIACORE® por GE Healthcare, o determinaciones de afinidad basadas en soluciones, por ejemplo, utilizando la tecnología KinExA que está comercialmente disponible en Sapidyne. Estos sistemas incluyen una gran variedad de reactivos comercialmente disponibles y reactivos de acoplamiento para permitir que la afinidad de la heparina y la neurturina mejorada se determine fácilmente y con precisión.

Adicionalmente, la afinidad relativa de los polipéptidos de neurturina mejorados frente a heparina se puede determinar caracterizando la fuerza iónica requerida para eluir la proteína de una columna de afinidad de heparina, tales como los vendidos bajo la marca HITRAP™ heparina HP por GE Healthcare Life Sciences.

Por consiguiente, en un aspecto de la invención, los polipéptidos de neurturina mejorados, se pueden eluir de una heparina HP de HITRAP™ a una concentración de NaCl de menos de aproximadamente 1 molar de NaCl. En otros aspectos de la invención, los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención se pueden eluir de una heparina HP de HITRAP™ a una concentración de NaCl inferior a 1,0 M; menos de NaCl 0,9 M; menos de 0,8 M de NaCl; menos de 0,7 M de NaCl; menos de 0,6 M de NaCl; menos de 0,5 M de NaCl; menos de 0,4 M de NaCl; o menos de 0,3 molar de NaCl cuando se eluyó usando un gradiente de NaCl continuo consistente en Hepes 10 mM pH 7,2 aumentando NaCl a 2M. Aunque se aprecia que una proteína se eluirá a partir de una columna sobre fracciones múltiples, la mayoría (es decir, mayor que aproximadamente 75%) de la masa de los polipéptidos de la invención se eluirá a una concentración menor que la dada de NaCl medida por medios convencionales, tales como, pero no se limita a, Western blot o ELISA. En un tipo de experimento recíproco, un polipéptido de la invención que comprende un polipéptido de neurturina mejorado se unirá pobremente a heparina o sulfato de heparán, ya sea sobre un

soporte inmovilizado o en solución a más de 1 M de NaCl. Por ejemplo, a una concentración de NaCl superior a 1 M, menos del 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10% del polipéptido de la invención se unirá.

En otro aspecto, los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención pueden acoplarse a un fármaco para su administración a un sitio de tratamiento o acoplarse a un marcador detectable para facilitar la formación de imágenes de un sitio que comprende células de interés. Los métodos para el acoplamiento de proteínas a estos marcadores detectables son bien conocidos en la técnica, al igual que los métodos para la obtención de imágenes usando marcadores detectables. Las proteínas marcadas se pueden emplear en una amplia variedad de ensayos, empleando una amplia variedad de marcadores. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de marcadores detectables tales como radionúcleidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, complejos de grupos protésicos, radicales libres, partículas, colorantes y similares.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención incluye una neurturina mejorada que está marcada en su extremo N o C con un marcador detectable o un fármaco.

Ejemplos de marcadores fluorescentes detectables incluyen quelatos de tierras raras (quelatos de europio), fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina, rojo de Texas, así como colorantes infrarrojos tales como Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7, IR800CW, ICG y colorantes vendidos bajo la marca registrada ALEXA® FLUORS tales como ALEXA® FLUORS 680 y 750, todos los cuales están comercialmente disponibles en las sondas Molecular y otros vendedores.

Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S o ^{3}H. Tales reactivos marcados pueden usarse en una variedad de ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes y similares.

Un polipéptido de neurturina mejorado de acuerdo con la invención puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion o radioisótopo de metal radiactivo. Ejemplos de radioisótopos incluyen, pero sin limitación, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111, y similares. Tales conjugados pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada; el resto de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica.

II. Polinucleótidos que codifican la neurturina mejorada

En otra realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención.

En un aspecto, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de neurturina mejorado, en el que el polipéptido de neurturina mejorado difiere de la neurturina madura de tipo natural (SEQ ID NO: 5) por al menos una mutación de un aminoácido positivamente cargado en una región que comprende los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina de tipo natural maduro, y en el que la neurturina mejorada tiene una afinidad disminuida respecto a la heparina en comparación con la neurturina madura de tipo natural.

En otro aspecto, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una neurturina mejorada que difiere de la correspondiente SEQ. ID. NO. 5 de neurturina de tipo natural maduro por la mutación de al menos dos de los aminoácidos cargados positivamente en una región que comprende los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina madura de tipo natural y exhiben una afinidad disminuida respecto a la heparina en comparación con la neurturina humana madura.

En otro aspecto, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una neurturina mejorada que difiere de la SEQ. ID. NO. 5 de neurturina de tipo natural maduro correspondiente por la mutación de al menos tres de los aminoácidos cargados positivamente en una región que comprende los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina madura de tipo natural y exhiben una afinidad disminuida respecto a la heparina en comparación con la neurturina humana madura.

En otro aspecto, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una neurturina mejorada que difiere de la SEQ. ID. NO. 5 de neurturina de tipo natural maduro correspondiente por la mutación de al menos cinco de los aminoácidos cargados positivamente en una región que comprende los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina madura de tipo natural y exhiben una afinidad disminuida respecto a la heparina en comparación con la neurturina humana madura.

En una realización, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una neurturina mejorada que es al menos 90% idéntica a la SEQ. ID. NO. 5, respecto a la secuencia de aminoácidos de la neurturina de tipo natural madura, excepto para los 13 aminoácidos abarcados por los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura. En otro aspecto, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una neurturina mejorada que es al menos 95% idéntica a la SEQ. ID. NO. 5, respecto a la secuencia de aminoácidos de la neurturina de tipo natural madura, excepto para los 13 aminoácidos abarcados por los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura.

En una realización, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una neurturina mejorada que comprende una o más mutaciones en los aminoácidos 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62 ó 63 en comparación con la neurturina de tipo natural madura (SEQ ID NO: 5), usando la numeración para la neurturina de tipo natural maduro de 102 aminoácidos. En un aspecto, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una neurturina mejorada que comprende de 1 a 13 mutaciones de aminoácidos dentro de la región abarcada por los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura (SEQ ID NO: 5). En un aspecto, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una neurturina potenciada que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 13 mutaciones de aminoácidos dentro de la región comprendida por los restos 51 a 63 de la neurturina humana madura (SEQ ID NO: 5) en comparación con la secuencia de aminoácidos de neurturina de tipo natural madura. En otro aspecto más, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una neurturina mejorada que comprende mutaciones de 3, 5, 7 ó 9 aminoácidos dentro de la región abarcada por los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura (SEQ ID NO. 5).

En un aspecto, el polinucleótido aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de neurturina mejorado que comprende al menos un aminoácido alifático neutro, zwitteriónico o cargado negativamente en la región abarcada por los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura (SEQ ID. No. 5). En otro aspecto de cualquiera de los polinucleótidos aislados de la invención, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos de neurturina mejorados, que comprende al menos un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en glicina, alanina, leucina, valina, serina y glutamina en la región comprendida por los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura (SEQ ID NO: 5).

En otro aspecto de cualquiera de los polinucleótidos aislados de la invención, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de neurturina mejorado que comprende un reemplazo de los aminoácidos 51 a 62 por la secuencia ARLQGQGALVGS. En otro aspecto de cualquiera de los polinucleótidos aislados de la invención, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia seleccionada de la SEQ. ID. Nº 6 a 9. (Tabla D4)

Se describen polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ. ID. NO. 6, 7, 8 ó 9.

Tabla D4. Secuencias de nucleótidos de variantes de neurturina N-1 a N-4 (SEQ. ID. No.: de 6 a 9, respectivamente) y neurturina de tipo natural (SEQ. ID. No.: 10).

SEQ. ID. NO.	Secuencia de nucleótidos
6	gcgcggttgggggcgcggccttgcgggctgcgcgagctggaggtgcgcgtgagcgagctgggcctgggc tacgcgtccgacgagacggtgctgttccgctactgcgcaggcgcctgcgaggctgccgcg cgcgtctacgacctcgggctgcgagcactgcgccaggcgcgggccctgcggcgggagcgg gtgcgcgcgcagccctgctgccgcccgacggcctacgaggacgaggtgtccttcctggac gcgcacagccgctaccacacggtgcacgagctgtcggcgcgcgagtgcgcctgcgtgtga
7	gcgcggttgggggcgcggccttgcgggctgcgcgagctggaggtgcgcgtgagcgagctgggcctgggc tacgcgtccgacgagacggtgctgttccgctactgcgcaggcgcctgcgaggctgccgcg cgcgtctacgacctcgggctgcgacgactggcccagcggcggcgcctgcgggcggaggcg gtgcgcgcgcagccctgctgccgcccgacggcctacgaggacgaggtgtccttcctggac gcgcacagccgctaccacacggtgcacgagctgtcggcgcgcgagtgcgcctgcgtgtga
8	gcgcggttgggggcgcggccttgcgggctgcgcgagctggaggtgcgcgtgagcgagctgggcctgggc tacgcgtccgacgagacggtgctgttccgctactgcgcaggcgcctgcgaggctgccgcg cgcgtctacgacctcgggctgcgagcactggcccaggcgcgggccctgcgggcggaggcgg gtgcgcgcgcagccctgctgccgcccgacggcctacgaggacgaggtgtccttcctggac gcgcacagccgctaccacacggtgcacgagctgtcggcgcgcgagtgcgcctgcgtgtga
9	gcgcggttgggggcgcggccttgcgggctgcgcgagctggaggtgcgcgtgagcgagctgggcctgggc tacgcgtccgacgagacggtgctgttccgctactgcgcaggcgcctgcgaggctgccgcg cgcgtctacgacctcgggctggcacgactgcagggtcagggcgccctggtggggtcccgg gtgcgcgcgcagccctgctgccgcccgacggcctacgaggacgaggtgtccttcctggac gcgcacagccgctaccacacggtgcacgagctgtcggcgcgcgagtgcgcctgcgtgtga
10	gcgcggttgggggcgcggccttgcgggctgcgcgagctggaggtgcgcgtgagcgagctgggcctgggc tacgcgtccgacgagacggtgctgttccgctactgcgcaggcgcctgcgaggctgccgcg cgcgtctacgacctcgggctgcgacgactgcgccagcggcggcgcctgcggcgggagcgg gtgcgcgcgcagccctgctgccgcccgacggcctacgaggacgaggtgtccttcctggac gcgcacagccgctaccacacggtgcacgagctgtcggcgcgcgagtgcgcctgcgtgtga

Cualquier experto en la técnica entiende que el código genético es degenerado y que algunos aminoácidos tienen codones múltiples. Por lo tanto, múltiples polinucleótidos pueden codificar los polipéptidos de la invención. Además, la secuencia polinucleotídica puede manipularse por diversas razones. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan, a la incorporación de codones preferidos para mejorar la expresión del polinucleótido en diversos organismos (véase generalmente Nakamura et al., Nuc. Acid. Res. (2000) 28 (1): 292). Además, pueden incorporarse mutaciones silenciosas con el fin de introducir o eliminar sitios de restricción, disminuir la densidad de motivos de dinucleótidos CpG (véase por ejemplo, Kameda et al., Biochem. Biophys. Res. Comun. (2006) 349 (4): 1269-1277) o reducir la capacidad de secuencias de cadena sencilla para formar estructuras de tallo-bucle (véase, por ejemplo, Zuker M., Nucl. Acid Res. (2003); 31 (13): 3406 - 3415). Además, la expresión puede optimizarse adicionalmente incluyendo una secuencia consenso de Kozak [es decir, (a/g) cc (a/g) ccATGg] en el codón de inicio. Las secuencias consenso de Kozak útiles para este propósito son conocidas en la técnica (Mantyh y col., PNAS 92: 2662 - 2666 (1995), Mantyh et al., Prot. Exp. & Purif. 6, 124 (1995)).

III. Vectores recombinantes

Otra realización de la invención proporciona vectores recombinantes y vectores víricos recombinantes que comprenden un polinucleótido cuya secuencia comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención.

La selección de vectores recombinantes adecuados para expresar los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención, los métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar la neurturina mejorada en el vector y los métodos para suministrar el vector recombinante a las células de interés están dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Tuschl, T. (2002), Nat. Biotechnol, 20: 446 - 448; Brummelkamp T R et al. (2002), Science 296: 550 - 553; Miyagishi M et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:497-500; Paddison P J y col. (2002), Genes Dev. 16:948-958; Lee N S et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:500 - 505; Paul C P et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:505

- 508, Conese et al., Gene Therapy 11: 1735 - 1742 (2004), y Fjord - Larsen et al., (2005) Exp Neurol 195: 49 - 60 cuyas descripciones completas se incorporan en este documento como referencia.

Vectores de expresión recombinantes representativos disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, pREP4, pCEP4, pREP7 y pcDNA3.1 y pcDNA™ 5/FRT de Invitrogen, y pBK-CMV y vectores de núcleo pExchange-6 de Stratagene.

Los vectores recombinantes se pueden administrar a un paciente directamente o junto con un reactivo de liberación adecuado, incluyendo el reactivo lipófilo Minis Transit LT1; Lipofectina; Lipofectamina; Celfectina; Policationes (por ejemplo, polilisina) o liposomas.

La selección de vectores víricos recombinantes adecuados para su uso en la invención, los métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar el polipéptido de neurturina mejorado en el vector y los métodos para suministrar el vector viral a las células de interés están dentro de la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg R (1995), Gene Therap. 2:301-310; Eglitis M A (1988), Biotechniques 6: 608 - 614; Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14; y Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30, cuyas descripciones completas se incorporan en este documento como referencia.

Los vectores de expresión vírica comercialmente disponibles representativos incluyen, pero no se limitan a, los sistemas basados en adenovirus, tales como el sistema Per. C6 disponible de Crucell, Inc., sistemas basados en lentivirus tales como pLPI de Invitrogen, y vectores retrovirales tales como Vectores Retrovirales pFB-ERV y pCFB-EGSH de Stratagene (EE.UU.).

En general, puede usarse cualquier vector viral capaz de aceptar las secuencias codificantes para los polipéptidos de neurturina mejorados a expresar, por ejemplo vectores derivados de adenovirus (AV); virus adeno-asociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), rhabdovirus, virus de la leucemia murina); virus del herpes, papilomavirus (Patentes de Estados Unidos Nos. 6.399.383, y 7.205.126) y similares. El tropismo de los vectores víricos también puede modificarse por pseudotipado de los vectores con proteínas de envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus. Por ejemplo, un vector AAV de la invención puede ser pseudotipado con proteínas superficiales del virus de la estomatitis vesicular (VSV), la rabia, el ébola, mokola, y similares. Pueden usarse también pseudoviriones no infecciosos, por ejemplo de virus del papiloma, para permitir el suministro eficaz de genes a las membranas mucosas (Patente de Estados Unidos Nº 7.205.126, Peng et al., Gene Ther. 29 Jul 2010 epub).

En un aspecto, se pueden usar vectores virales derivados de AV y AAV en la presente invención. Los vectores AAV adecuados para expresar la neurturina mejorada de la invención, los métodos para construir el vector AAV recombinante y los métodos para suministrar los vectores a células diana se describen en Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096 - 3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol., 70: 520 - 532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63:3822 - 3826; Pat. de EE.UU. Nº 5.252.479; Pat. de EE.UU. Nº 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional Nº WO 94/13788; y la Solicitud de Patente Internacional Nº WO 93/24641, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia.

Típicamente, los vectores recombinantes y vectores víricos recombinantes incluyen secuencias de control de expresión que dirigen la expresión del polinucleótido de la invención en diversos sistemas, tanto in vitro como in vivo. Por ejemplo, un conjunto de elementos reguladores dirigirá la expresión en ciertas células o tejidos de mamíferos y otro conjunto de elementos reguladores dirigirá la expresión a células bacterianas y sin embargo un tercer conjunto de elementos reguladores dirigirá la expresión en sistemas de baculovirus. Algunos vectores son vectores híbridos que contienen elementos reguladores necesarios para la expresión en más de un sistema. Los vectores que contienen estos diversos sistemas reguladores están comercialmente disponibles y cualquier experto en la técnica podrá fácilmente clonar los polinucleótidos de la invención en tales vectores.

En algunos casos, los vectores poseerán promotores para la expresión en una amplia variedad de células. En otros casos, los vectores poseerán promotores que son específicos de tejido. Por ejemplo, los promotores dirigen la expresión sólo en neuronas. Se describen vectores que comprenden un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica para la SEQ. ID. NO. 1, 2, 3 ó 4.

IV. Células huésped

En otra realización, la invención proporciona una célula huésped transformada con un vector de la invención. En un aspecto, los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención son expresados por la célula huésped con el fin de producir o fabricar un polipéptido de neurturina mejorado. Tales células huésped incluyen bacterias, células de insecto, células de levadura o células de mamífero. Los huéspedes microbianos útiles incluyen, pero no se limitan a, bacterias de los géneros Bacillus, Escherichia (tales como E. coli), Pseudomonas, Streptomyces, Salmonella, Erwinia, Bacillus subtilis, Bacillus brevis, las diversas cepas de Escherichia coli (por ejemplo, HB101, (ATCC nº 33694) DH5α, DH10 y MC1061 (ATCC nº 53338)). Muchas cepas de células de levadura conocidas por los expertos en la técnica también están disponibles como células huésped para la expresión de polipéptidos incluyendo los de los géneros Hansenula, Kluyveromyces, Pichia, Rhino-sporidium, Saccharomyces y Schizosaccharomyces y otros hongos. Las células de levadura preferidas incluyen, por ejemplo, Saccharomyces cerivisae y Pichia pastoris.

Adicionalmente, cuando se desee, pueden utilizarse sistemas de células de insecto para producir la neurturina mejorada de la presente invención. Dichos sistemas se describen, por ejemplo, por Kitts et al., Biotechniques, 14: 810 - 817 (1993); Lucklow, Curr. Opin. Biotechnol., 4: 564 - 572 (1993); y Lucklow et al. (J. Virol., 67: 4566 - 4579 (1993). Las células de insecto preferidas incluyen Sf-9 y HI5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif).

También se conocen en la técnica varias células huésped mamíferas adecuadas y muchas están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, 20110 - 2209). Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (ATCC nº CCL61) células CHO DHFR (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 4216-4220 (1980)), células 293 o 293T de riñón embrionario humano (HEK) (ATCC nº CRL1573), células PER.C6, células NSO, ARPE-19 o 3T3 (ATCC nº CCL92). La selección de células huésped de mamífero adecuadas y los métodos para la transformación, cultivo, amplificación, cribado y producción y purificación de productos son conocidos en la técnica. Otras líneas de células de mamífero adecuadas son las líneas de células COS-1 (ATCC Nº CRL1650) y COS-7 (ATCC Nº CRL1651) y la línea celular CV-1 (ATCC N ◦ CCL70). Otras células huésped ejemplares de mamífero incluyen líneas celulares de primates y líneas celulares de roedores, incluyendo líneas celulares transformadas. También son adecuadas células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo in vitro de tejido primario, así como explantes primarios. Las células candidatas pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección de acción dominante. Otras líneas de células de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratones Swiss, Balb-c o NIH, líneas celulares de hámster BHK o HaK, que están disponibles en la ATCC. Cada una de estas líneas celulares es conocida y está disponible para la expresión de proteínas.

En otro aspecto, las células huésped pueden usarse para expresar y administrar una neurturina mejorada mediante terapia celular. En consecuencia, en otro aspecto, la presente invención incluye una terapia celular para tratar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar una célula huésped que expresa o es capaz de expresar una neurturina mejorada. En un aspecto, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral aguda, lesión aguda de la médula espinal, dolor neuropático, diabetes, disfunción eréctil, enfermedad de Hirschsprung, tumores de sistemas nerviosos, esclerosis múltiple, pérdida de audición y retinopatía.

La terapia celular implica la administración de células que han sido seleccionadas, multiplicadas y tratadas farmacológicamente o alteradas (es decir, modificadas genéticamente) fuera del cuerpo (Bordignon, C. et al., Cell Therapy: Achievements and Perspectives (1999), Haematologica, 84, pp. 1110-1149). Tales células huésped incluyen, por ejemplo, células primarias, incluyendo macrófagos, y células madre que han sido modificadas genéticamente para expresar un polipéptido de neurturina mejorado. El objetivo de la terapia celular es reemplazar, reparar o mejorar la función biológica de tejidos u órganos dañados (Bordignon, C. et al., (1999), Haematologica, 84, pp. 1110-1149).

El uso de células trasplantadas ha sido investigado para el tratamiento de numerosos trastornos endocrinos tales como anemia y enanismo, trastornos hematológicos, insuficiencia renal y hepática, deficiencias de la pituitaria y del SNC y diabetes mellitus (Uludag y col., Technology of Mammalian Cell Encapsulation, 2000), Advanced Drug Delivery Reviews, 42, pp. 29-64). Las células trasplantadas pueden funcionar liberando compuestos bioactivos tales como un polipéptido de neurturina mejorado de la invención, para reemplazar la neurturina endógena que está ausente o producida en cantidades insuficientes en un sistema afectado. Ejemplos de tales enfoques, que utilizan otras hormonas y neurotransmisores, incluyen el trasplante de células secretoras de GDNF encapsuladas para tratar la enfermedad de Parkinson (Lindvall O, y Wahlberg LU (2008) Exp Neurol. 209 (l): 82-88), el uso de la liberación de GDNF mediada por macrófagos (Biju K, et al., (2010) Mol Ther. 18 (8): 1536-44), la implantación de células de islotes pancreáticos para el tratamiento de la diabetes mellitus insulinodependiente (Miyamoto, M, Current Progress and Perspectives in Cell Therapy for Diabetes Mellitus (2001), Human Cell, 14, pp. 293-300) y la implantación de neuronas productoras de dopamina para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Lindvall, O. y Hagell, P., Cell Therapy and Transplantation in Parkinson's Disease (2001), Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 39, pp. 356-361).

En comparación con los trasplantes de órganos enteros, las terapias celulares están más fácilmente disponibles. Sin embargo, el rechazo de las células trasplantadas por el sistema inmune del receptor sigue siendo un problema especialmente cuando se desea un uso a largo plazo, tal como en el caso de implantes de islotes para pacientes diabéticos (Morris, PJ, Immunoprotection of Therapeutic Cell Transplants by Encapsulation (1996), Trends in Biotechnology, 14, pp. 163-167). Como alternativa a la inmunosupresión, se han desarrollado métodos de encapsulación mediante los cuales las células trasplantadas están físicamente protegidas del sistema inmune del receptor mediante una barrera de membrana (Morris, PJ, Immunoprotection of Therapeutic Cell Transplants by Encapsulation (1996), Trends in Biotechnology, 14, pp. 163-167). El uso de células encapsuladas es preferible ya que la administración sistémica de fármacos inmunosupresores está asociada con efectos secundarios deletéreos y complicaciones debidas a la supresión no específica del sistema inmune.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención incluye una terapia celular para tratar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar una célula huésped que expresa, o es capaz de expresar, una neurturina mejorada, en la que la célula huésped ha sido encapsulada.

Los métodos de encapsulación se clasifican generalmente en dos categorías: (1) microencapsulación, típicamente implicando pequeñas vesículas esféricas que varían en un tamaño de 0,3 a 1,5 mm de diámetro que contienen células individuales o pequeñas masas celulares y (2) macroencapsulación, que implica masas celulares mayores en dispositivos tubulares o huecos en forma de discos (Uludag et al., (2000), Advanced Drug Delivery Reviews, 42, pp. 29-64).

Se cree que, idealmente, la membrana protegerá a las células encapsuladas de las respuestas inmunes mientras que al mismo tiempo será suficientemente permeable para permitir la afluencia de las moléculas necesarias para la supervivencia celular y la secreción de los compuestos bioactivos y productos de desecho deseados. Se han empleado numerosos materiales para la encapsulación celular, siendo el alginato de polisacárido el más común (Rowely, J. A. et al., Alginate Hydrogels as Synthetic Extracellular Matrix Materials (1999), Biomaterials, 20, pp. 45-53). Las membranas están compuestas típicamente de polímeros naturales o sintéticos cargados opuestamente que forman complejos gelificados; siendo ampliamente utilizada la combinación de alginato polianiónico y poli (L-lisina) policatiónica (Uludag et al., (2000), Advanced Drug Delivery Reviews, 42, pp. 29-64). Variando la concentración de los respectivos polímeros y su tiempo de contacto, se puede modular la porosidad de la membrana de hidrogel resultante. Otros materiales de uso común incluyen los acrilmatos de (metilo) que tienden a ser más tóxicos y la agarosa, un polímero neutro (Uludag et al., (2000), Advanced Drug Delivery Reviews, 42, pp. 29-64).

Las células o masas de células pueden encapsularse mediante técnicas de revestimiento conformadas, por lo que la membrana está en contacto directo con las células (Uludag et al., (2000), Advanced Drug Delivery Reviews, 42, pp. 29-64). Alternativamente, la membrana puede formarse alrededor de un núcleo que contiene la masa celular. El núcleo puede ser diseñado para incluir componentes que promueven la supervivencia celular o la función celular, tales como la inclusión de nutrientes y factores tróficos.

Las membranas o los núcleos también pueden ser diseñados para funcionar como una matriz extracelular sintética (ECM). La adición de componentes de ECM puede ayudar a las células en la expresión de funciones diferenciadas y la organización de la masa celular dentro de la cápsula (Uludag et al., (2000), Advanced Drug Delivery Reviews, 42, pp. 29-64). El uso de la ECM sintética se ha investigado en relación con las células adherentes, ya que la naturaleza hidrófila de la mayoría de las membranas de alginato generalmente excluye la unión celular y la propagación (Rowely, JA y col., Alginate Hydrogels as Synthetic Extracellular Matrix Materials, Biomaterials (1999), páginas 45-53). Se ha demostrado que las láminas de hidrogel de alginato modificadas covalentemente con ligando que contiene RGD apoyan el crecimiento de los mioblastos (Rowely, J. A. y col., Alginate Hydrogels as Synthetic Extracellular Matrix Materials (1999), Biomaterials, 20, pp. 45-53). La interacción celular con hidrogeles de alginato modificados sólo se ha logrado cuando las células se hacen crecer en hojas planas, en oposición a las cápsulas cerradas (Rowley et al, 1999).

Lim, Pat. de EE.UU. Nos. 4.409.331 y 4.352.883, describe el uso de métodos de microencapsulación para producir materiales biológicos generados por células in vitro, en donde las cápsulas tienen permeabilidades variables dependiendo de los materiales biológicos de interés que se producen. Wu et al, Int. J. Pancreatology, 3: 91 - 100 (1988), describen el trasplante de islotes pancreáticos microencapsulados productores de insulina en ratas diabéticas. Aebischer et al., Biomaterials, 12: 50-55 (1991), describen la macroencapsulación de células que secretan la dopamina.

Además, se puede usar una amplia variedad de medios de encapsulación en los métodos y tratamientos de la presente invención. Los ejemplos incluyen: agarosa con fibrina, agarosa con fibronectina, o una combinación de fibronectina y fibrinógeno. Entre los medios naturales apropiados se incluyen gomas derivadas de plantas, tales como los alginatos y agarosa de metal alcalino, y otras sustancias derivadas de plantas, tales como celulosa y sus derivados (por ejemplo, metilcelulosa). También son útiles los medios derivados de tejidos animales tales como gelatina y quitosano. Alternativamente, la matriz del núcleo puede estar hecha de componentes de matriz extracelular (ECM), como se describe en Kleinman et al., Pat. de EE.UU. Nº. 4.829.000. Los hidrogeles sintéticos adecuados incluyen alcohol polivinílico, copolímero de bloque de alcohol vinílico de etileno, sulfonato de poliestireno sódico, cloruro de vinilmetiltiribenilamonio y polifosfazeno (Cohen, S. et al., J. Anal. Chem. Soc, 112, pp. 7832-7833 (1990)).

Las células se pueden encapsular en fibras huecas o en microcápsulas que tienen varios cientos de micras de tamaño. El primero tiene la ventaja de una mayor estabilidad mecánica y recuperabilidad. Por otra parte, las microcápsulas tienen una relación superficie/volumen más alta para el crecimiento de células dependientes del anclaje y una menor resistencia a la transferencia de masa para el suministro de nutrientes y la secreción del producto. Para combinar la resistencia de los dos enfoques, las células microencapsuladas pueden ser macroencapsuladas, por ejemplo, en fibras huecas; la elección de fibras huecas altamente permeables añadiría poco a la resistencia general de la transferencia de masa.

La formulación de microcápsulas es una tecnología conocida utilizada por la industria farmacéutica para fabricar productos de liberación sostenida. En el área de la encapsulación celular, la gelificación de los alginatos es el sistema más ampliamente estudiado. El alginato es un glicuranano extraído de algas pardas. El calcio u otros contraiones multivalentes forman quelatos con bloques contiguos de residuos de alfa-1,4-L-guluronano presentes en el polisacárido. La encapsulación celular se consigue cuando la solución de alginato que contiene células vivas suspendidas se deja caer o se extruye en una solución que contiene iones de calcio. Las microcápsulas formadas se pueden recubrir adicionalmente por adsorción de poli-iones tales como polilisina, que puede ser recubierta nuevamente por alginato. Muchos tipos de células, incluyendo los islotes, hepatocitos, células PC I12, condrocitos y fibroblastos, han sido encapsuladas por este método.

V. Métodos de uso

En otra realización, se describe un método para prevenir o tratar la degeneración o insuficiencia celular que comprende administrar a un paciente, que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes.

En otra realización, la invención comprende el uso de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes para su uso en el tratamiento de la degeneración o insuficiencia celular.

En un aspecto, la degeneración o insuficiencia celular se compone de degeneración neuronal resultante de una condición seleccionada del grupo que consiste en neuropatía periférica, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral aguda, lesiones de la médula espinal aguda, tumores de los sistemas nerviosos, esclerosis múltiple e infección.

En otro aspecto, la degeneración o insuficiencia celular se compone de degeneración o insuficiencia de células hematopoyéticas seleccionada del grupo que consiste en eosinopenia, basopenia, linfopenia, monocitopenia, neutropenia, anemias, trombocitopenia e insuficiencia de células madre.

Por consiguiente, un aspecto describe un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa del cerebro mediante la administración a un paciente que necesita tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes.

En otro aspecto, la presente invención incluye el uso de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes para el tratamiento de una enfermedad cerebral neurodegenerativa.

En un aspecto de cualquiera de estos métodos, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y demencia.

En un aspecto, se describe un método para detener, retrasar el comienzo, es decir, el período previo a la manifestación clínica de una enfermedad cerebral neurodegenerativa, o para reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad neurodegenerativa del cerebro. En otro aspecto, se describe un método para paliar, aliviar, reducir, revertir, mejorar o prevenir al menos un síntoma o signo de una enfermedad cerebral neurodegenerativa.

En un aspecto, la enfermedad neurodegenerativa es la esclerosis lateral amiotrófica y tales signos y síntomas de la enfermedad incluyen: dificultad para levantar la parte delantera del pie y dedos de los pies (pie caído), debilidad en la pierna, debilidad o torpeza de la mano, dificultad en el habla o problemas de deglución, calambres musculares y contracciones en los brazos, hombros y lengua, dificultad para masticar, tragar, hablar y respirar.

En un aspecto, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson, y tales signos y síntomas de la enfermedad incluyen: temblor, movimiento lento (bradicinesia), músculos rígidos, postura y equilibrio deteriorados, pérdida de movimientos automáticos, dificultad para hablar y demencia.

En un aspecto, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer, y tales signos y síntomas de la enfermedad incluyen: pérdida de memoria, problemas con el pensamiento abstracto, dificultad para encontrar la palabra correcta, desorientación, pérdida de juicio, dificultad para realizar tareas familiares y cambios de personalidad.

En un aspecto, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Huntington, y tales signos y síntomas de la enfermedad incluyen: cambios en la personalidad, disminución de las capacidades cognitivas, problemas ligeros del equilibrio, torpeza, movimientos faciales involuntarios, movimientos oculares rápidos, problemas de deglución y demencia.

En un aspecto, la enfermedad neurodegenerativa es la demencia, y tales signos y síntomas de la enfermedad incluyen: olvido, dificultades del lenguaje, confusión con el tiempo y el espacio, disminución del juicio y cambios de la personalidad.

En otro aspecto, se describe un método para tratar las lesiones neuronales mediante la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores virales recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes.

En otro aspecto, la presente invención incluye el uso de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes para el tratamiento de la lesión neuronal.

En un aspecto, dicha lesión neuronal se selecciona del grupo que consiste en accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral aguda, lesión aguda de la médula espinal y dolor neuropático.

En otro aspecto, se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con el envejecimiento mediante la administración a un paciente que necesita tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes.

En otro aspecto, la presente invención incluye el uso de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con el envejecimiento.

En un aspecto, tal enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en pérdida auditiva, disfunción eréctil, neuropatías periféricas o autonómicas, retinopatía y demencia senil.

En otro aspecto, se describe un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la diabetes mediante la administración a un paciente en necesidad de tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes.

En otro aspecto, la presente invención incluye el uso de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la diabetes.

En un aspecto, tal enfermedad o trastorno se selecciona entre hiperglucemia, diabetes tipo I, diabetes tipo II y diabetes tipo 1.5.

En otra realización, la invención proporciona un método para promover el crecimiento y/o la diferenciación de una célula, tal como una célula madre en un medio de cultivo que comprende administrar a la célula un polipéptido, un vector, un vector viral o una célula huésped de la invención. Los polipéptidos, vectores, vectores víricos o células huésped de la invención pueden administrarse a células en cultivo con el fin de alterar una propiedad fenotípica y/o

genotípica de la célula diana. Por ejemplo, ciertas células diana pueden estar expuestas a los polipéptidos de la invención de tal manera que los polipéptidos se unan a los receptores celulares e induzcan la transducción de señales en la célula. Esta transducción de señales puede inducir ciertas propiedades en la célula diana que son deseables para cualquier número de medios. A modo de ejemplo solamente y no limitativo, la administración de los polipéptidos de la invención puede inducir una diferenciación en las células diana. Estas células diferenciadas pueden tener una variedad de usos incluyendo, pero sin limitarse a, la implantación en un sujeto en un régimen profiláctico o terapéutico.

De una manera similar, los vectores o vectores virales de la invención se pueden aplicar a células diana en cultivo. La transducción de ácidos nucleicos de la invención por cualquiera de los dos medios puede dar lugar a cambios genotípicos transitorios o estables de calidad deseable. Por último, las células huésped de la invención pueden co-cultivarse con células diana en cultivo de tal manera que los polipéptidos o vectores virales de la invención sean producidos por las células huésped. Los polipéptidos o vectores producidos pueden unirse entonces a las células en cultivo para producir un cambio genotípico o fenotípico transitorio o estable según se desee. Las células huésped usadas de esta manera se consideran a menudo "células alimentadoras" porque las propiedades de la célula huésped tienen un impacto sobre las células diana con las que son co-cultivadas. Las células huésped de la invención pueden o no ser irradiadas antes del co-cultivo con las células diana.

VI. Composiciones farmacéuticas

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes.

Las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención pueden formularse de acuerdo con técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica y son ampliamente discutidos en la bibliografía y pueden comprender cualquiera de los vehículos, diluyentes o excipientes conocidos para proteínas, polinucleótidos y células huésped, respectivamente. Véase, por ejemplo, Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20a edición, ISBN: 0683306472.

En un aspecto, las composiciones pueden estar en forma de soluciones acuosas estériles y/o suspensiones de los ingredientes farmacéuticamente activos, aerosoles, ungüentos y similares. Las formulaciones que son soluciones acuosas son las más preferidas. Tales formulaciones contienen típicamente el propio potenciado, agua y uno o más tampones que actúan como estabilizantes (por ejemplo, tampones que contienen fosfato) y opcionalmente uno o más conservantes.

Tales formulaciones que contienen, por ejemplo, aproximadamente de 5,0 a 250 microgramos, de aproximadamente 5,0 a 200 microgramos, de aproximadamente 5,0 a 150 microgramos, de aproximadamente 5,0 a 120 microgramos, de aproximadamente 5,0 a 100 microgramos, de aproximadamente 5,0 a 80 microgramos, o cualquiera de los intervalos mencionados anteriormente, por ejemplo, aproximadamente 200 microgramos, aproximadamente 180 microgramos, aproximadamente 160 microgramos, aproximadamente 140 microgramos, aproximadamente 120 microgramos, aproximadamente 100 microgramos, aproximadamente 80 microgramos, aproximadamente 60 microgramos, o aproximadamente 40 microgramos de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención, o polinucleótidos de la invención, o vectores recombinantes de la invención constituyen un aspecto adicional de la invención. En un aspecto, tales formulaciones pueden administrarse una vez al día, o una vez por semana, mediante infusión directa o mediante inyección intraputamenal en el cerebro (Gill et al., (2003) Nat Med, 9 (5): 589-95; Lang Et al., (2006) Ann Neurol. 59(3): 459 - 66).

Las composiciones farmacéuticas para los polipéptidos de neurturina mejorados pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables de los polipéptidos de neurturina mejorados. Para una revisión sobre sales adecuadas, véase el “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, 2002). Las sales de bases adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Ejemplos representativos incluyen las sales de aluminio, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y cinc. Pueden formarse también hemisales de ácidos y bases, por ejemplo, sales de hemisulfato y hemicalcio.

Las composiciones farmacéuticas para los polipéptidos de neurturina mejorados que se utilizarán en la invención adecuadas para la administración parenteral pueden comprender soluciones acuosas estériles y/o suspensiones de los ingredientes farmacéuticamente activos preferiblemente isotónicos con la sangre del receptor, generalmente usando cloruro sódico, glicerina, glucosa, manitol, sorbitol y similares.

Las composiciones farmacéuticas para los polipéptidos de neurturina mejorados de la invención adecuadas para la administración oral pueden, por ejemplo, comprender péptidos en forma de polvo de reserva purificado estéril preferiblemente cubiertos por una envoltura o sobres (enterocápsulas) que protegen de la degradación de los

péptidos en el estómago y que permiten así la absorción de estas sustancias de la encía o en el intestino delgado. La cantidad total de ingrediente activo en la composición puede variar de 99,99 a 0,01 por ciento de peso.

En los presentes métodos, los polinucleótidos de la invención pueden administrarse al sujeto ya sea solo, junto con un reactivo de liberación, o como un vector recombinante o vector viral que exprese el polinucleótido. Los reactivos de suministro adecuados para la administración conjuntamente con los presentes vectores recombinantes incluyen el reactivo lipófilo Minis Transit TKO; lipofectina; lipofectamina; celfectina; o policationes (por ejemplo, polilisina), o liposomas.

Un reactivo de suministro preferido es un liposoma. Los liposomas pueden ayudar en la administración del vector recombinante a un tejido particular, y también pueden aumentar la semivida de la sangre del vector. Los liposomas adecuados para su uso en la invención se forman a partir de lípidos formadores de vesículas estándar, que incluyen generalmente fosfolípidos neutros o cargados negativamente y un esterol, tal como colesterol. La selección de lípidos se guía generalmente por la consideración de factores tales como el tamaño deseado de los liposomas y la semivida de los liposomas en la corriente sanguínea. Una búsqueda de patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones relacionadas proporcionará también a los expertos en la técnica la lectura de esta descripción con tecnologías liposómicas significativas posibles. Las Patentes de EE.UU. Nº 6.759.057; 6.406.713; 6.352.716; 6.316.024; 6.294.191; 6.126.966; 6.056.973; 6.043.094; 5.965.156; 5.916.588; 5.874.104; 5.215.680; y 4.684.479; cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia, describen liposomas y microburbujas recubiertas de lípidos, y métodos para su fabricación.

Los liposomas pueden estar constituidos por cualquier lípido o combinación de lípidos conocida en la técnica. Por ejemplo, los lípidos formadores de vesículas pueden ser lípidos naturales o sintéticos, incluyendo fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatidico, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y esfingomielina como se describe en las Patentes de EE.UU. Números 6.056.973 y 5.874.104. Los lípidos formadores de vesículas pueden ser también glicolípidos, cerebrósidos o lípidos catiónicos, tales como 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamino)propano (DOTAP); N-,1-(2,3,-ditetradeciloxi)propilo; bromuro de N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DMRIE); N 2,3, -dioleiloxi) propilo; bromuro de N,N-dimetil-N-hidroxi etilamonio (DORIE); cloruro de N,1-(2,3-dioleiloxi) propilo, cloruro de N,N,N-trimetilamonio (DOTMA); 3; N-(N',N' - dimetilaminoetano) carbamol; colesterol (DC-Choi); o dimetildioctadecilamonio (DDAB) también como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 6.056.973. El colesterol también puede estar presente en el intervalo apropiado para impartir estabilidad a la vesícula como se describe en las Patentes de EE.UU. Nº 5.916.588 y 5.874.104.

Los liposomas para uso en cualquiera de los métodos de la invención pueden fabricarse mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 5.916.588, se prepara una solución tamponada del agente activo. A continuación, se disuelve un lípido adecuado, tal como fosfatidilcolina de soja hidrogenada, y colesterol, ambos en forma de polvo, en cloroformo o similar y se seca por roto-evaporación. La película lipídica así formada se resuspende en éter dietílico o similar y se coloca en un matraz y se somete a ultrasonidos en un baño de agua durante la adición de la solución tamponada del agente activo. Una vez que el éter se ha evaporado, se suspende la sonicación y se aplica una corriente de nitrógeno hasta que se elimina el éter residual. Otros procedimientos de fabricación estándar se describen en las Patentes de EE.UU. Nº 6.352.716; 6.294.191; 6.126.966; 6.056.973; 5.965.156; y 5.874.104. Los liposomas de esta invención se pueden producir por cualquier método generalmente aceptado en la técnica para preparar liposomas, incluyendo, sin limitación, los métodos de los documentos citados anteriormente (cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia).

En un aspecto, los liposomas que encapsulan los presentes vectores recombinantes comprenden una molécula de ligando que puede dirigir el liposoma a una célula o tejido particular. En un aspecto, los liposomas que encapsulan los presentes vectores o polinucleótidos se modifican para evitar el aclaramiento por los sistemas mononucleares de macrófagos y reticuloendoteliales, por ejemplo por tener fracciones de inhibición de la opsonización unidas a la superficie de la estructura. En una realización, un liposoma de la invención puede comprender tanto restos de inhibición de la opsonización como un ligando.

Los restos inhibidores de la opsonización para usar en la preparación de los liposomas de la invención son típicamente polímeros hidrófilos grandes que están unidos a la membrana del liposoma. Tal como se usa en la presente memoria, un resto inhibidor de opsonización está "unido" a una membrana de liposoma cuando está unido químicamente o físicamente a la membrana, por ejemplo, mediante la intercalación de un anclaje soluble en lípidos en la propia membrana o por unión directa a grupos activos de lípidos de membrana. Estos polímeros hidrófilos inhibidores de la opsonización forman una capa superficial protectora que disminuye significativamente la captación de los liposomas por el sistema macrófago-monocito (MMS) y el sistema reticuloendotelial (RES); por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. 4.920.016, cuya descripción completa se incorpora en este documento como referencia. Los liposomas modificados con restos de inhibición de la opsonización permanecen así en la circulación mucho más tiempo que los liposomas no modificados.

Los polímeros hidrófilos adecuados para rodear los liposomas incluyen, sin limitación, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polihidroxipropilmetacrilato,

polihidroxietilacrilato, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polietilenglicol, poliaspartamida y secuencias de péptidos hidrófilos como se describen en las patentes de EE.UU. Nº 6.316.024; 6.126.966; 6.056.973; 6.043.094; cuyos contenidos se incorporan por referencia en su totalidad.

VII. Terapias combinadas

La presente invención también incluye terapias de combinación que comprenden administrar a un paciente una dosis terapéutica de los polipéptidos de neurturina mejorados, en combinación con un segundo agente activo.

En un aspecto, el segundo agente activo se selecciona del grupo que consiste en L-DOPA, BDNF, GFRalfa2 y CDNF.

En este contexto, "administrado en combinación" significa: (1) parte de la misma forma de dosificación unitaria; (2) administración por separado, pero como parte del mismo programa de tratamiento terapéutico o régimen, típicamente pero no necesariamente, en el mismo día. Cuando la neurturina mejorada se administra como terapia adyuvante con un segundo agente activo tal como L-DOPA, preferiblemente, la neurturina mejorada se puede administrar a una dosis diaria, o semanal fija, y la L-DOPA tomada según sea necesario.

Las vías de administración del segundo agente activo pueden ser cualquiera de las conocidas en la técnica. El segundo agente activo puede formularse como es conocido en la técnica, usualmente junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo como un comprimido, cápsula, pastilla, trocisco, elixir, solución o suspensión para su administración oral, en un vehículo inyectable adecuado para la administración parenteral, o como loción, ungüento o crema para su aplicación tópica.

La dosis exacta de cada componente administrado, por supuesto, diferirá dependiendo de los componentes específicos prescritos, del sujeto que se esté tratando, de la gravedad de la enfermedad o el trastorno, de la forma de administración y del criterio del médico que prescribe.

VIII. Métodos de administración

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes se pueden administrar directamente en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno.

Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraparenquimatosa, intraventricular, intrauretral, intrastemal, intracraneal, intramuscular, intrasinovial y subcutánea. Los dispositivos adecuados para la administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microagujas), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

Las formulaciones parenterales para los polipéptidos de neurturina mejorados son típicamente soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tamponantes (típicamente con un pH de 3 a 9 y en un aspecto a un pH de aproximadamente 5 y con una concentración de NaCl de aproximadamente 150 mM.

Para algunas aplicaciones, las formulaciones parenterales pueden formularse más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma secada para usarse junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril, libre de pirógenos. La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, mediante liofilización, puede realizarse fácilmente usando técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

Las formulaciones para la administración parenteral se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o sostenida. Las composiciones de liberación sostenida incluyen liberación retardada, modificada, pulsada, controlada, dirigida y programada. De este modo, los polipéptidos de neurturina mejorados pueden formularse como una suspensión o como un líquido sólido, semisólido o tixotrópico para su administración como un depósito implantado que proporciona una liberación sostenida de los polipéptidos de neurturina mejorados. Ejemplos de tales formulaciones incluyen, sin limitación, stents y semisólidos recubiertos de fármaco y suspensiones que comprenden vesículas lamelares o micropartículas de ácido poli (DL-láctico-co-glicólico) cargado con fármaco (PGLA), poli (DL-lactida-co-glicolida) (PLG) o poli (lactida) (PLA), hidrogeles (Hoffman AS: Ann. N. Y. Acad. Sci. 944: 62-73 (2001)), sistemas de nanopartículas de poli-aminoácidos, vendidos bajo la marca registrada MEDUSA® desarrollada por Flamel Technologies Inc., sistemas de gel no acuosos vendidos bajo la marca registrada ATRIGEL® desarrollada por Atrix, Inc. y formulaciones de liberación prolongada de isobutirato de acetato de sacarosa comercializadas bajo la marca SABER® desarrollada por Durect Corporation y sistemas basados en lípidos desarrollados por SkyePharma y vendidos bajo la marca DEPOFOAM®.

En la técnica se conocen dispositivos de liberación sostenida capaces de administrar las dosis deseadas de los polipéptidos de neurturina mejorados durante períodos prolongados de tiempo. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 5.034.229; 5.557.318; 5.110.596; 5.728.396; 5.985.305; 6.113.938; 6.156.331; 6.375.978; y 6.395.292 muestran dispositivos impulsados osmóticamente capaces de suministrar una formulación de agente activo, tal como una solución o una suspensión, a una velocidad deseada durante un periodo de tiempo prolongado (es decir, un período que va desde más de una semana hasta un año o más). Otros dispositivos ejemplares de liberación sostenida incluyen bombas de tipo regulador que proporcionan flujo constante, flujo ajustable o flujo programable de formulaciones de agentes beneficiosos, que están disponibles en Medtronic incluyendo las bombas Intrathecal vendidas bajo la marca comercial SYNCHROMED INFUSION SYSTEM®, los Sistemas Johnson y Johnson vendidos bajo la marca registrada bombas CODMAN® y bombas de las tecnológicas INSET®. Otros ejemplos de dispositivos se describen en las patentes de EE.UU. Nº 6.283.949; 5.976.109; 5.836.935; y 5.511.355.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes puede administrarse directamente al sistema nervioso central o al cerebro. Este enfoque típicamente permite dosis mucho más pequeñas que las administradas oralmente o por otras vías de inyección. Los efectos secundarios de los medicamentos a menudo se reducen o eliminan. Además, las composiciones se suministran a través de la barrera hematoencefálica.

Por consiguiente, en un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes se administran mediante la inyección intratecal en el canal espinal (espacio intratecal que rodea la médula espinal).

En otro aspecto, las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes se administran directamente al cerebro usando inyección intraparenquimatosa, intranasal a través del epitelio olfatorio (Ilium et al., (2003) J. Contol. Release 87 187 - 98, Sakane et al., (1991) Chem. Pharm. Bull. 39, 1458 - 2456, Hanson et al., (2008) BMC Neurosci. 10 (9 Suppl 3) S5), o la entrega mejorada por convección (Pasha & Gupta (2010) Expert Opin. Drug. Deliv. 7(1) 113 - 135, Allaed et al., (2009) Biomaterials 30 (12) 2302 - 18).

En algunos métodos de uso, se prefieren los tipos específicos de administración de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas. Por ejemplo, en un aspecto de los métodos reivindicados para el tratamiento de la ALS, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntinton y la lesión cerebral aguda, se prefiere la administración intraparenquimatosa. Además, dicho suministro intraparenquimatoso puede dirigirse a regiones específicas del cerebro. Por ejemplo, se prefiere la inyección estereotáctica directa en regiones específicas del cerebro, para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En este caso, se prefiere la infusión intraputamenal de cualquiera de las composiciones farmacéuticas que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes.

La función principal del putamen es regular los movimientos e influir en diversos tipos de aprendizaje. Emplea dopamina para realizar sus funciones. En la enfermedad de Parkinson, el putamen juega un papel clave porque sus insumos y productos están interconectados con la sustancia negra y el globus pallidus. En la enfermedad de Parkinson la actividad en las vías directas al interior globus pallidus disminuye y la actividad en las vías indirectas al globo externo pallidus aumenta. Juntas estas acciones causan la inhibición excesiva del tálamo.

Además, se ha demostrado que la infusión intraputamenal de factores neurotróficos derivados de células gliales (Hutchinson, M. y col., Journal of Neuroscience Methods 163 (2007) 190-192, Love, S. y col., Nature Medicine 11 (7) 2005) 703 - 704, Gill, S. y col., Nature Medicine 9 (5) (2003) 589 - 595) pueden usarse para tratar la enfermedad de Parkinson. La infusión de GDNF en el putamen posterior causa un marcado incremento local en las fibras nerviosas inmunopositivas a la tirosina hidroxilasa, y también puede haber brote de fibras en la sustancia negra. Aunque no está claro cuánto del aumento de las fibras nerviosas inmunopositivas a la tirosina hidroxilasa resulta del brote axonal y cuánto resulta de la regulación positiva de la tirosina hidroxilasa en fibras reservadas pero disfuncionales. En cualquier caso, sin embargo, los hallazgos proporcionan soporte para la mejora clínica sostenida en seres humanos que reciben la infusión intraputaminal del GDNF estrechamente relacionado.

Los polipéptidos de neurturina mejorados para su uso en la presente invención también pueden administrarse tópicamente, (intra)dermicamente o transdérmicamente a la piel o a la mucosa. En este caso, la administración tópica puede ser preferida para tratar la pérdida de audición, o la disfunción eréctil. Las formulaciones típicas para este propósito incluyen geles, hidrogeles, lociones, soluciones, cremas, ungüentos, polvos para pulverizaciones, apósitos, espumas, películas, parches de piel, obleas, implantes, esponjas, fibras, vendajes y microemulsiones. También se pueden usar liposomas. Los vehículos típicos incluyen alcohol, agua, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. Pueden incorporarse potenciadores de la penetración, véase, por ejemplo, Finnin y Morgan: J. Pharm. Sci. 88(10): 955 - 958 (1999). Otros medios de administración tópica incluyen la administración por electroporación, iontoforesis, fonoforesis, sonoforesis, e inyección de microagujas o inyección sin aguja, por ejemplo usando los sistemas vendidos bajo las marcas POWDERJECT™ y BIOJECT™.

Las formulaciones para la administración tópica pueden formularse para liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen la liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

En otra realización de la presente invención, la liberación sostenida de polipéptidos de neurturina mejorados en la sangre comprende una composición de liberación sostenida que comprende polipéptidos de neurturina mejorados que se llena en una microesfera. Las microesferas han demostrado utilidad en el suministro de agentes activos beneficiosos a un área diana de una manera controlada durante períodos prolongados de tiempo. Las microesferas son generalmente biodegradables y pueden usarse para la administración subcutánea, intramuscular e intravenosa.

Generalmente, cada microesfera está compuesta de un agente activo y moléculas de polímero como se describe en la Patente de EE.UU. No. 6.268.053, el agente activo puede estar situado centralmente dentro de una membrana formada por las moléculas de polímero o, alternativamente, dispersarse a través de la microesfera debido a que la estructura interna comprende una matriz del agente activo y un excipiente polimérico. Típicamente, la superficie externa de la microesfera es permeable al agua, lo que permite que fluidos acuosos entren en la microesfera, así como que el agente activo solubilizado y el polímero salgan de la microesfera.

En una realización, la membrana polimérica comprende polímeros reticulados como se describen en la Patente de EE.UU. No. 6.395.302. Cuando los tamaños de poro del polímero reticulado son iguales o menores que el diámetro hidrodinámico del agente activo, el agente activo se libera esencialmente cuando el polímero se degrada. Por otra parte, si los tamaños de poro de los polímeros reticulados son mayores que el tamaño del agente activo, el agente activo se libera al menos parcialmente por difusión.

Métodos adicionales para fabricar membranas de microesferas son conocidos y usados en la técnica y pueden usarse en la práctica de la invención descrita en la presente memoria. Los materiales típicos para la membrana externa incluyen las siguientes categorías de polímeros: (1) polímeros basados en carbohidratos, tales como metilcelulosa, polímeros a base de carboximetil celulosa, dextrano, polidextrosa, quitinas, quitosano y almidón (incluyendo hetalmidón) y derivados de los mismos; (2) alcoholes polialifáticos tales como óxido de polietileno y sus derivados, incluyendo PEG, PEG-acrilatos, polietilenimina, acetato de polivinilo y derivados de los mismos; (3) polímeros de polivinilo tales como alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli(vinil)fosfato, ácido poli(vinil)fosfónico y derivados de los mismos; (4) ácidos poliacrílicos y sus derivados; (5) ácidos poliorgánicos, tales como ácido polimaleico, y derivados de los mismos; (6) poliaminoácidos, tales como polilisina, y poli-iminoácidos, tales como poliimino-tirosina, y derivados de los mismos; (7) copolímeros y copolímeros de bloque, tales como poloxámero 407 o Pluronic L-101; polímero y sus derivados; (8) terc-polímeros y derivados de los mismos; (9) poliéteres, tales como poli(tetrametilén éter glicol), y derivados de los mismos; (10) polímeros de origen natural, tales como zeína, quitosano y pululano, y derivados de los mismos; (11) poliimidos, tales como poli (n-tris) (hidroximetil) metacrilato de metilo, y derivados de los mismos; (12) tensioactivos, tales como polioxietilensorbitán y sus derivados; (13) poliésteres tales como polietilenglicol (n) monometiléter éter mono(succinimidil succinato)éster, y derivados de los mismos; (14) polímeros ramificados y ciclo-polímeros, tales como PEG ramificado y ciclodextrinas, y derivados de los mismos; y (15) polialdehídos, tales como poli (óxido de perfluoropropileno-b-perfluoroformaldehído), y derivados de los mismos como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 6.268.053, cuyo contenido se incorpora en este documento como referencia. Otros polímeros típicos conocidos por los expertos en la técnica incluyen poli(lactida-co-glicolida), homopolímero de polilactida; homopolímero de poliglicolida; policaprolactona; copolímero de polihidroxibutirato - polihidroxivalerato; poli(lactida-co-caprolactona); poliesteramidas; poliortoésteres; poli ácido 13-hidroxi-butírico; y polianhídridos como se describe en la Patente de EE.UU. 6.517.859, cuyo contenido se incorpora en este documento como referencia.

En una realización, la microesfera de la presente invención se une o recubre con moléculas adicionales. Tales moléculas pueden facilitar el direccionamiento, potenciar la mediación del receptor y proporcionar el escape de la endocitosis o la destrucción. Las moléculas típicas incluyen fosfolípidos, receptores, anticuerpos, hormonas y polisacáridos. Adicionalmente, una o más moléculas escindibles pueden estar unidas a la superficie externa de las microesferas para dirigirla a un sitio predeterminado. A continuación, bajo condiciones biológicas apropiadas, la molécula se escinde causando la liberación de la microesfera de la diana.

Las microesferas para uso en las composiciones de liberación sostenida se fabrican mediante técnicas estándar. Por ejemplo, en una realización, la exclusión por volumen se lleva a cabo mezclando el agente activo en solución con un

polímero o mezcla de polímeros en solución en presencia de una fuente de energía durante un tiempo suficiente para formar partículas como se describe en la Patente de EE.UU. 6.268.053. El pH de la solución se ajusta a un pH próximo al punto isoeléctrico (pI) de la macromolécula. A continuación, la solución se expone a una fuente de energía, tal como calor, radiación o ionización, sola o en combinación con sonicación, vibración, mezcla o agitación, para formar micropartículas. Las micropartículas resultantes se separan después de cualquier componente no incorporado presente en la solución mediante métodos de separación físicos bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden lavarse después. Otros procedimientos de fabricación estándar se describen en la Patente de EE.UU. Nº 6.669.961; 6.517.859; 6.458.387; 6.395.302; 6.303.148; 6.268.053; 6.090.925; 6.024.983; 5.942.252; 5.981.719; 5.578.709; 5.554.730; 5.407.609; 4.897.268; y 4.542.025; cuyos contenidos se incorporan por referencia en su totalidad. Las microesferas son bien conocidas y están fácilmente disponibles para cualquier experto en la materia por parte de empresas con experiencia en el suministro de tales tecnologías para la administración de fármacos de liberación prolongada. Por ejemplo, Epic Therapeutics, una subsidiaria de Baxter Healthcare Corp., desarrolló un sistema de suministro de fármacos de matriz proteica que produce microesferas de proteínas bioerosionables en un proceso totalmente basado en agua, que se vende bajo la marca registrada PROMAXX®; OctoPlus desarrolló un sistema de microesferas de dextrano reticulado vendido bajo la marca comercial OCTODEX® que libera ingredientes activos basados en la degradación masiva de la matriz en lugar de basarse en la erosión superficial.

Una búsqueda de patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones relacionadas proporcionará también a los expertos en la técnica la lectura de esta descripción con tecnologías de microesferas significativas posibles para su uso en la formulación de composiciones de liberación sostenida. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 6.669.961; 6.517.859; 6.458.387; 6.395.302; 6.303.148; 6.268.053; 6.090.925; 6.024.983; 5.942.252; 5.981.719; 5.578.709; 5.554.730; 5.407.609; 4.897.268; y 4.542.025; cuyos contenidos se incorporan por referencia en su totalidad, describen microesferas y métodos para su fabricación. Cualquier experto en la técnica, considerando tanto la descripción de esta invención como las descripciones de estas otras patentes, podría fabricar y usar microesferas para la liberación sostenida de los polipéptidos de neurturina mejorados para su uso en cualquiera de los métodos o kits reivindicados en la presente memoria.

Los polipéptidos de neurturina mejorados pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación, típicamente en forma de un polvo seco (ya sea solos, como una mezcla, por ejemplo, en una mezcla seca con lactosa o como partículas de componentes mixtos, por ejemplo, mezcladas con fosfolípidos, tal como fosfatidilcolina) a partir de un inhalador de polvo seco, como pulverizador de aerosol de un recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador (preferiblemente un atomizador que utiliza electrohidrodinámica para producir una niebla fina) o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado, tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano, o como gotas nasales. Para uso intranasal, el polvo puede comprender un agente bioadhesivo, por ejemplo quitosano o ciclodextrina.

El recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador contiene una solución o suspensión del compuesto o compuestos de la invención que comprende, por ejemplo, etanol, etanol acuoso, o un agente alternativo adecuado para dispersar, solubilizar o extender la liberación del agente activo, un propulsor(es) como disolvente y un tensioactivo opcional, tal como trioleato de sorbitán, ácido oleico o un ácido oligoláctico.

Antes de su uso en una formulación en polvo seco o en suspensión, el producto farmacéutico se micronizа en un tamaño adecuado para la administración por inhalación (típicamente inferior a 5 µm). Esto puede conseguirse por cualquier método apropiado, tal como molienda en chorro espiral, molienda en chorro de lecho fluido, procesamiento de fluido supercrítico para formar nanopartículas, homogeneización a alta presión o secado por pulverización.

Las cápsulas (hechas, por ejemplo, a partir de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), ampollas y cartuchos para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla en polvo del compuesto de la invención, una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón y un modificador del rendimiento, tales como 1-leucina, manitol o estearato de magnesio. La lactosa puede ser anhidra o en forma de monohidrato, preferentemente la última. Otros excipientes adecuados incluyen dextrano, glucosa, maltosa, sorbitol, xilitol, fructosa, sacarosa y trehalosa.

Una formulación en solución adecuada para su uso en un atomizador que utiliza electrodinámica para producir una niebla fina puede contener de 1 µg a 20 mg de neurturina mejorada por actuación y el volumen de actuación puede variar de 1 µl a 100 µl. Una formulación típica puede comprender polipéptidos de neurturina mejorados, propilenglicol, agua estéril, etanol y cloruro de sodio. Disolventes alternativos que pueden usarse en lugar del propilenglicol incluyen glicerol y polietilenglicol. A las formulaciones de la invención destinadas a la administración inhalada/intranasal se pueden añadir sabores adecuados, tales como mentol y levomentol, o edulcorantes, tales como sacarina o sacarina sódica. Las formulaciones para la administración inhalada/intranasal se pueden formular para liberación inmediata y/o modificada utilizando, por ejemplo, PGLA. Las formulaciones de liberación modificada incluyen la liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

En el caso de inhaladores de polvo seco y aerosoles, la unidad de dosificación se determina por medio de una válvula que suministra una cantidad dosificada. Las unidades de acuerdo con la invención están típicamente dispuestas para administrar una dosis medida o "ráfaga" que contiene de 0,1 mg a 10 mg de un polipéptido de

neurturina mejorado. La dosis diaria global estará típicamente en el intervalo de 0,1 mg a 20 mg que se puede administrar en una dosis única o, más habitualmente, como dosis divididas durante todo el día.

La administración intranasal es una vía de administración sin aguja, de fácil uso, que permite evitar la barrera sanguínea. Además, el fluido del LCR, que parece moverse fuera del espacio aracnoideo, vuelve a circular hacia el LCR subaraconoideo y puede llevar el fármaco aplicado a la mucosa olfatoria de nuevo al espacio subaracnoideo del SNC (Begley et al., (2004) Pharmacol. Ther. 10429-45). Además, la simplicidad de la administración nasal permite la autoadministración en el hogar. Esta ruta es claramente de gran ventaja respecto a la administración parenteral que generalmente debe administrarse bajo supervisión médica. Otras ventajas de la administración intranasal incluyen la alta permeabilidad del epitelio nasal y, como resultado de la superficie bastante grande de la cavidad nasal y el flujo sanguíneo relativamente alto, la rápida absorción. En comparación con otras administraciones sin inyección, tales como la formulación oral, la administración nasal es una vía atractiva por sus características de evitar el efecto de primer paso del hígado, acción de inicio rápido y una biodisponibilidad más alta (Hussain, Adv. Drug Deliv. Rev. (1998) 29 (1-2): 39 - 49; Ilium, J. Control Release (2003) 87 (1-3): 187 - 98).

Históricamente, la biodisponibilidad de péptidos terapéuticos y proteínas después de la administración nasal tiende a ser relativamente baja debido principalmente a su gran tamaño molecular para permitir un fácil paso y debido a la rápida degradación enzimática. A medida que el número de aminoácidos aumenta más allá de aproximadamente 20, la biodisponibilidad normalmente se vuelve muy baja (Wearly, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 1991; 8: 331 - 394).

A pesar de estas limitaciones, algunos productos peptídicos han alcanzado con éxito el mercado como formulaciones intranasales (Ilium, The nasal route for delivery of polypeptides. En: Peptide and Protein Drug Delivery. Eds. Frokjaer, S., Christrup, L., Krogsgaard-Larsen, P., Munksgaard, Copenhague, 1990, p. 157-170). Los ejemplos aprobados por la FDA incluyen DDAVP®, MIACALCIN™ (calcitonina) y SYNAREL™ (nafarelina). Los ensayos clínicos han demostrado que la influenza (trivalente) y la toxina diftérica (CRM-197) se pueden administrar por vía nasal con buen efecto (Davis, Adv. Drug Del. Rev. (2001) 51: 21-42). Larsen et al. (EUR. J. Clin. Pharmacol. 1987; 33: 155 - 159) concluyeron que la aplicación intranasal del polipéptido de bajo peso molecular buserelina representaba un modo fiable de administración. Otros ejemplos de formulaciones intranasales de péptidos tales como insulina, hormona de crecimiento humana, glucagón, hirudina, interferón-β humano y hormona paratiroidea humana se discuten en Costantino et al. (www.ondrugdelivery.com, 2005, Sakr, Int. J. Pharmaceutics 1996, 132: 189 - 194; O'Hagan et al., Pharm. Res. 1990, 7: 772 - 776; Cefalu, Diabetes Care 2004, 27: 239 - 245; Zhang et al., Biol. Pharm. Bull 2005, 28: 2263 - 2267).

Además, se han administrado varios fármacos satisfactoriamente al cerebro después de la administración intranasal (Yu et al., (2005) Neurosci. Lett. 387(1) 5-10, Reger et al., (2008) J. Alzheimer's Dis. 13(3) 323 - 31, Thorne et al., (2004) Neuroscience 127, 481 - 96). Los métodos y las composiciones farmacéuticas para la administración intranasal se describen adicionalmente en los documentos US20100129354, US20030077300, Patente de EE.UU. No. 7.244.709 y Patente de EE.UU. No. 7.812.120.

Por consiguiente, en un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados, vectores víricos recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados o una célula huésped que expresa cualquiera de los polipéptidos de neurturina mejorados recombinantes se administran por administración intranasal. En otro aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas se formulan para administración intranasal, y opcionalmente comprenden uno o más agentes para aumentar la administración intranasal.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar la invención de ninguna manera, conforma o forma, explícita o implícitamente. Aunque son típicos de los que podrían ser utilizados, pueden usarse alternativamente otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1: Modelado molecular

Un análisis inicial de la secuencia primaria de neurturina reveló un tramo de residuos en la región del talón de la neurturina (RRLRQRRRLRRER) (SEQ ID NO: 31) que era consistente con las secuencias de consenso para la unión a la heparina; específicamente las secuencias "BBXB" o "BBBXXB" (Hileman y col., (1998) Bioessays 20 (2): 156-67), donde B es un aminoácido básico y X es cualquier resto. Aunque la identificación de esta secuencia es coherente con la unión a heparina, debe observarse que el hallazgo de esta secuencia consenso en la estructura primaria de una proteína no significa que la secuencia esté necesariamente implicada en la unión a heparina. Específicamente, se ha establecido tanto que i) las proteínas que carecen de estas secuencias de consenso pueden todavía unirse a heparina (Delacoux et al. (2000) J. Biol. Chem. 275 (38): 29377 - 82), y ii), que las proteínas que contienen este motivo no pueden unirse a la heparina.

De hecho, para todas las proteínas, la capacidad de estiramientos dispuestos consecutivamente de aminoácidos cargados positivamente para unirse a heparina o sulfato de heparán depende de la orientación tridimensional de los

residuos básicos dentro del contexto de la estructura tridimensional completa de la proteína madura plegada completamente. Además, como la heparina y los sulfatos de heparán son polímeros lineales, los residuos cargados positivamente en neurturina no sólo deben estar presentes en la secuencia primaria, sino que también deben estar correctamente alineados en el espacio. En otras palabras, al menos tres cadenas laterales cargadas positivamente deben estar expuestas a la superficie, orientarse en las direcciones correctas y estar dispuestas en la relación espacial relativa correcta para acoplarse eficientemente con los residuos cargados negativamente en heparina y sulfato de heparán.

Por consiguiente, para los presentes estudios se usó una combinación de análisis de secuencia primaria y homología para planificar los mutantes de los inventores. Específicamente para comprobar si los residuos cargados positivamente seleccionados en neurturina también cumplen con estas reglas espaciales, la estructura 3D de neurturina se modeló basándose en la estructura cristalina conocida de GDNF (Eigenbrot y Gerber, (1997) Nat. Struct. Biol. 1997, 4 (6): 435 - 8). Se visualizó la estructura y se realizó la mutagénesis in silico con el software PyMol (DeLano Scientific).

Los resultados de este análisis sugieren que el dominio de interacción de neurturina y heparina abarca aproximadamente la región limitada por los aminoácidos 51 a 63 de la neurturina madura. Más específicamente, el análisis sugiere que cada uno de los aminoácidos cargados positivamente en esta región puede contribuir a la interacción de heparina y sulfato de heparán con neurturina. Más específicamente, se concluye con base en este análisis que los aminoácidos cargados positivamente R51, R52, R54, R56, R57, R58, R60, R61 y R63 constituyen, al menos en cierta medida, una contribución a la afinidad de neurturina con heparina.

Para probar directamente esta hipótesis, se construyó una serie de mutantes en los que se sustituyeron números variables de los residuos de arginina cargados positivamente por residuos de alanina. Los constructos N1, N2 contenían cada uno tres cambios de aminoácidos que se dispersaron sobre la superficie del dominio de interacción putativo de neurturina y heparina que abarca los residuos 51 a 63 de la neurturina humana madura.

En la construcción N3, se combinaron las mutaciones producidas en la construcción de los mutantes N1 y N2, con el fin de introducir mutaciones de 5 puntos. En este constructo, R63 no se mutó para probar la hipótesis de que la conservación de un residuo de aminoácido básico en los genes relacionados, ARTN, PSPN y GDNF es funcionalmente significativa. Además, en una construcción final (N4), la región putativa de unión a la heparina de los residuos 51 a 62 de la neurturina se reemplazó con 7 residuos de la región correspondiente y la secuencia asociada de PSPN así como 5 residuos no relacionados (ARLQGQGALVGS) (SEQ ID. Nº 25). Este cambio dio como resultado 9 cambios de aminoácidos en comparación con la secuencia correspondiente de la neurturina humana de tipo natural.

Como se describe con más detalle a continuación, todas estas construcciones se expresaron con éxito, mostraron un plegamiento correcto y fueron ambas activas en un ensayo funcional y mostraron una afinidad reducida con respecto a la heparina. Se concluye que esta región de neurturina que abarca los aminoácidos 51 a 63 proporciona un área de la proteína que es fácilmente susceptible de la optimización de proteínas para producir mutantes funcionalmente activos de neurturina que exhiben una afinidad reducida respecto a la heparina.

Ejemplo 2: Generación de variantes de neurturina

El ADN que codifica la neurturina humana, correspondiente al número de acceso BC137399, se adquirió de OpenBiosystems. La secuencia madura de neurturina (excluyendo su secuencia señal endógena y pro-secuencia) se subclonó en el vector pSJP-2, cuyo esqueleto vectorial se basa en pAAV-MCS (Stratagene) produciendo un plásmido (E778) que codifica la secuencia señal de IgG (Fjord-Larsen et al., (2005) "Efficient in vivo protection of nigral dopaminergic neurons by lentiviral gene transfer of a modified Neurturin construct". Exp Neurol 195: 49 - 60), seguido por la secuencia de neurturina madura sin pro-secuencia. Se usó E778 como molde para la mutagénesis de PCR inversa. Los cebadores para la variante de neurturina N1 no marcada fueron: F/5'- ag gcg cgg gcc ctg cgg cgg gag cgg gtg cgc -3 '(SEQ ID NO: 11) y R/5'- g gcg cag tgc tcg cag ccc gag gtc gta gac g -3', (SEQ ID NO: 12) para N2: F/5'- ctg cgg gcg gag gcg gtg cgc gcg cag ccc tgc tgc - 3' (SEQ ID NO: 13) y R/5'- gcg ccg ccg ctg ggc cag tcg tcg cag ccc gag gtc g -3, (SEQ ID NO: 14) para N3: F/5'-cgg gcc ctg cgg gcg gag cgg gtg cgc gcg cag ccc-3' (SEQ ID NO: 15) y R/5'-cgc ctg ggc cag tgc tcg cag ccc gag gtc gta gac g -3' (SEQ ID NO: 16), para N4: F/5'-ggc gcc ctg gtg ggg tcc cgg gtg cgc gcg cag ccc tgc-3' (SEQ ID NO: 17), R/5'- ctg acc ctg cag tcg tgc cag ccc gag gtc gta gac gcg c-3' (SEQ ID NO: 18). Las reacciones de PCR se preformaron con ADN polimerasa Phusion™ de alta fidelidad (Finnzymes). Las mezclas de PCR se digirieron con Dpnl (Fermentas), y los plásmidos mutados se purificaron de gel de agarosa con el Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), fosforilados con T4 polinucleótido quinasa (Fermentas), ligados con T4 ADN ligasa (Fermentas) y transformados en células competentes DH5α E. coli. Se aisló ADN de plásmido a partir de colonias individuales y se verificó el resultado de la mutagénesis por secuenciación del inserto.

Se añadió un marcador V5 (GKPIPNPLLGLDST, SEQ ID NO: 19) al extremo N de todas las construcciones. Con el fin de mejorar la división después de la secuencia señal, se introdujeron dos residuos aminoácidos adicionales (alanina y arginina) entre la secuencia señal y el marcador V5. Con el fin de mejorar la exposición del epítopo marcador, se introdujeron dos residuos aminoácidos adicionales (serina y glicina) entre la secuencia V5 y la secuencia madura de neurturina. Se usaron E778, N1, N2, N3 y N4 como plantillas para la mutagénesis y los

cebadores fueron: F/5'- ctc ctc ggt ctc gat tct acg tcg ggg gcg cgg ttg ggg gcg cgg cct tg -3' (SEQ ID NO: 20), R/5'- agg gtt agg gat agg ctt acc ccg cgc cga att cac ccc tgt aga aag aaa ggc -3 '(SEQ ID NO: 21). La mutagénesis de PCR inversa y las etapas de clonación subsiguientes se realizaron como anteriormente. Los clones marcados con V5 se denominaron E779 (de E778), NV1 (de N1), NV2 (de N2), NV3 (de N3) y NV4 (de N4).

Ejemplo 3: Producción y purificación de variantes de neurturina

Se transfectaron células CHO transitoriamente con E436 (GFP), neurturina marcada con V5 de tipo natural o con las variantes de neurturina marcadas con V5 NV1 - NV4. La transfección se realizó utilizando Turbofect (Fermentas) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de cuatro horas, se reemplazó el medio que contenía el reactivo de transfección con medio normal que consistía en DMEM (Sigma), FBS al 10% (HyClone), 100 U/ml de penicilina (Gibco) y 100 μg/ml de estreptomicina (Gibco). Dos días más tarde se recogió el medio de cada placa. Con el fin de aglomerar las células flotantes, los medios fueron centrifugados (5 minutos, 16.200 x g) antes de su uso. La muestra cosechada se cargó en un SDS-PAGE al 15% y se analizó mediante transferencia Western con anticuerpos V5 (Invitrogen). Todas las variantes se expresaron con éxito, y se secretó en el medio, y se corrieron en SDS-PAGE a la masa molecular predicha corregida (datos no presentados).

Ejemplo 4: Propiedades de unión a la heparina de las variantes de neurturina

Los medios (5 ml) de las células CHO transfectadas transitoriamente se diluyeron con 20 ml de Hepes 10 mM, pH 7,2. La columna HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) se equilibró con 10 ml de Hepes 10 mM, pH 7,2 y las muestras diluidas se aplicaron con una jeringa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las columnas se lavaron con 5 ml de NaCl 0,1 M en Hepes 10 mM, pH 7,2 antes de la elución con un gradiente en etapas (cada paso de 0,5 ml) de NaCl 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M , 0,8 M, 0,9 M, 1,0 M, 1,1 M, 1,2 M y NaCl 1,5 M en Hepes 10 mM, pH 7,2. La columna se regeneró a continuación con 5 ml de NaCl 2,0 M según las instrucciones del fabricante, se reequilibró con 10 ml de tampón Hepes 10 mM, pH 7,2, y se usó para la siguiente muestra. El orden de las muestras analizadas fue 1º NVl, 2º NV2, 3º NV3, 4º NV4 y 5º neurturina de tipo natural. El tipo natural se aplicó como la última muestra con el fin de controlar la funcionalidad de la columna a lo largo del ensayo.

Las muestras (20 µl) de cada fracción de elución se hirvieron con tampón Laemmli, se cargaron en un SDS-PAGE al 15% y se analizaron mediante transferencia Western con anticuerpos V5 (Invitrogen). Como control, se cargaron 20 µl del medio original en el primer carril del gel. El ensayo se realizó dos veces con resultados idénticos. Los resultados se muestran en la Tabla E1. Debe observarse que en la tabla, la molaridad de NaCl indica la concentración de la solución aplicada a la columna y que la concentración de NaCl de las fracciones eluidas no se determinó en este ensayo. (++) indica una banda de neurturina más fuerte y (+) indica una más débil con un peso molecular de alrededor 15 kDa, detectado por WB con anticuerpos contra V5. Los resultados muestran que las cuatro variantes de neurturina marcadas con V5 han disminuido significativamente la unión a la heparina, en comparación con la neurturina de tipo natural.

Tabla E1

	0.2 M	0.3 M	0.4 M	0.5 M	0.6 M	0.7 M	0.8 M	0.9 M	1.0 M	1.1 M	1.2 M	1.5 M
NRTN WT									+	++	+	
NRTN NV1								+	++			
NRTN NV2					++	++	+					
NRTN NV3					++	+						
NRTN NV4			+	++	++	+						

Específicamente, la proteína de neurturina de tipo natural se eluyó de la columna en un intervalo de concentración de NaCl de aproximadamente 1,0 a 1,2 M de NaCl. Por comparación, el mutante de neurturina NV1 se eluyó de la columna en un intervalo de concentraciones de NaCl de aproximadamente 0,9 a 1,0 M NaCl; el mutante de neurturina NV2 se eluyó de la columna en un intervalo de concentración de NaCl de aproximadamente 0,6 a 0,8 M NaCl; el mutante de neurturina NV3 se eluyó de la columna en un intervalo de concentración de NaCl de aproximadamente 0,6 a 0,7 M NaCl; y el mutante de neurturina NV4 se eluyó de la columna en un intervalo de

concentración de NaCl de aproximadamente 0,4 a 0,7 M NaCl. Por lo tanto, se concluye que todos los mutantes de neurturina tenían una afinidad disminuida en comparación con la neurturina de tipo natural. Además, se concluye que los mutantes de neurturina NV4 y NV3 exhibieron la afinidad aparente más baja con la heparina.

Ejemplo 5: Propiedades de fosforilación del receptor de variantes de neurturina

Los fibroblastos (MG87-RET) que se transfectaron establemente con la isoforma larga RET humana (Eketjall et al., 1999, EMBO J., 18: 5901) se transfectaron transitoriamente con GFRαl de rata o GFRα2 humano. La transfección se realizó con Turbofect (Fermentas) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de cuatro horas, se reemplazó el medio que contenía el reactivo de transfección con medio normal que constaba de DMEM (Sigma), 10% de FBS (HyClone), 2 µg/ml de Puromicina (Sigma), 100 U/ml de penicilina (Gibco) y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco). Un día después, las células se privaron de nutrientes en DMEM (Sigma) durante cuatro horas. Después de la inanición, los medios de las células CHO transitoriamente transfectadas (que expresan GFP, neurturina marcada con V5 de tipo natural o variantes marcadas con V5 de neurturina, NV1-NV4) se diluyeron 1: 2 con DMEM (Sigma) y se aplicaron durante 10 min en los fibroblastos MG87-RET transfectados con GFRα1 o GFRα2. Posteriormente, los fibroblastos se lisaron y los lisados se utilizaron para la inmunoprecipitación de RET (anticuerpos contra RET de Santa Cruz Biotechnology Inc). Los inmunocomplejos se recogieron con Proteína G-Sepharose (GE Healthcare) y se analizaron en SDS-PAGE al 8% y Western blot. La fosforilación de RET fue detectada por anticuerpos frente a fosfotirosina (Upstate Biotechnology). La carga igual se verificó pelando el filtro y volviendo a probarlo con anticuerpos contra RET (Santa Cruz Biotechnology Inc). El ensayo se realizó dos veces con resultados idénticos.

Tabla E2

Receptor GFR usado para la transfección	GFRalpha2		GFRalpha1	
Anticuerpo Usado	P-Tyr	RET	P-Tyr	RET
GFP		+		+
NRTN WT	+	+	+	+
NRTN NV1	+	+	+	+
NRTN NV2	+	+	+	+
NRTN NV3	+	+	+	+
NRTN NV4	+	+	+	+

Los resultados que se resumen en la Tabla E2 muestran que todos los constructos fueron capaces de promover la fosforilación de RET mediada por el co-receptor GFR alfa 1 y GFR alfa2. En consecuencia, se concluye que todas estas variantes producen proteínas que son solubles, son expresadas correctamente y segregadas de un sistema de expresión de mamíferos, y adoptan una estructura tridimensional funcionalmente activa.

Ejemplo 6: Precipitación de neurturina con proteína de fusión GFRalpha2-Fc

Para determinar si las variantes de neurturina podrían purificarse a partir de preparaciones de medios crudos basadas en su afinidad con GFRα2, se recogieron medios de células CHO transfectadas transitoriamente con las variantes NRTN marcadas con V5, se almacenaron a +4ºC y se usaron para ensayos piloto de precipitación. Se incubó una alícuota de cada medio (400 µl) con la quimera GFRα2-Fc humana recombinante (0,4 µg, R & D Systems), anticuerpos contra el epítopo V5 (0,4 µg, Invitrogen) o anticuerpos contra NRTN (0,4 µg, R & D Systems) durante 1h a +4 ° C con mezcla. La proteína G tiene una fuerte afinidad por los anticuerpos de ratón y cabra, así como por la porción Fc de IgG_1 humana en la quimera GFRα2-Fc recombinante. Por lo tanto, se añadió Proteína G - Sefarosa a las muestras y se continuó la incubación durante 1 h a +4ºC con mezclado. Después de la granulación, las muestras se eluyeron de la proteína G-Sepharose con tampón Laemmli reductor y se cargaron en SDS-PAGE. Para el análisis de transferencia Western de las variantes marcadas con V5 de NRTN, se usó un anticuerpo anti-V5 (Invitrogen) con muestras cargadas en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Para el análisis de transferencia Western de las variantes no marcadas de NRTN, se utilizó un anticuerpo anti-NRTN (R & D Systems) con muestras cargadas en SDS-PAGE en condiciones no reductoras. La sensibilidad del anticuerpo anti-NRTN es significativamente menor con las muestras cargadas bajo condiciones reductoras.

Los resultados (no mostrados) demostraron que todas las variantes de neurturina pueden precipitarse con la ayuda de un GFRα2 comercialmente disponible que se fusiona con un dominio constante de anticuerpo (Fc), y puede purificarse posteriormente a través de una columna de proteína G-sepharose. Además, este enfoque de purificación parece ser al menos tan eficaz como la inmunoprecipitación usando el marcador de epítopo V-5.

Ejemplo 7: Ensayo de crecimiento de neuritas

Para corroborar los resultados con los ensayos de fosforilación de RET, se recogieron medios de células CHO transitoriamente transfectadas con GFP o las variantes NRTN marcadas con V5 durante dos días, se almacenaron a +4ºC y se usaron para ensayos piloto de crecimiento de neuritas. Las muestras de los medios (DMEM, suero bovino fetal al 10%, penicilina y estreptomicina) se diluyeron 1: 2 con DMEM y se añadió suero de caballo a una concentración final de 5%. Las células PC6-3, que están originalmente subclonadas de la línea celular PC12 parental, se transfectaron transitoriamente con GFRα2. Un día después de la transfección, el medio se reemplazó con el medio diluido de las células CHO. Los medios procedentes de células CHO transfectadas con GFP se diluyeron como anteriormente y se usaron en células PC6-3 como control negativo. Se añadió NRTN (50 ng/ml, PeproTech) a medio de CHO acondicionado (diluido como anteriormente) y se usó en células PC6-3 como control positivo. Las neuritas no se contaron, pero los campos representativos de las células se fotografiaron cinco días después de la inducción. Los resultados (no mostrados) demostraron que todas las variantes de neurturina eran también biológicamente activas en este ensayo.

Ejemplo 8: Ensayos de estabilidad

Las células CHO se transfectaron transitoriamente con las variantes NRTN marcadas con V5. Después de dos días se recogieron los medios y se usaron (A) sin diluir en presencia o ausencia de EDTA 10 mM o, (B) diluidos 1:10 con un tampón 50 mM (tampón Citrato de Sodio pH 6,0, tampón Tris pH 6,8 o Tampón Tris pH 8,0, tampón Tris pH 8,8, tampón Tris pH 9,5). Los medios no diluidos o diluidos (400 μl) se transfirieron a placas vacías, en ausencia de células y se incubaron durante 5 h a 37ºC. Al final de la incubación se tomaron muestras de 20 µl y se cargaron en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Se llevó a cabo el análisis de transferencia Western como se describió anteriormente y se detectaron las proteínas usando anticuerpos anti-V5. Los resultados mostrados en la Tabla E3 demuestran que la variante tipo natural y NV1 de neurturina desaparecieron de los medios en ausencia de células, tanto en presencia como en ausencia de EDTA. Por comparación, los mutantes NV2, NV3 y NV4 parecían tener una estabilidad mejorada bajo estas condiciones.

Tabla E3

Variante	Condiciones de Incubación		
	Medios de partida	+ EDTA 5 h	Sin EDTA 5 h
NRTN WT	+	-	-
NRTN NV1	+	-	-
NRTN NV2	++	+	+
NRTN NV3	++	++	++
NRTN NV4	++	++	++

Por consiguiente, estos datos demuestran que los polipéptidos de neurturina mejorados y, en particular, las variantes NV2, NV3 y NV4 tienen adicionalmente la propiedad inesperada de una estabilidad mejorada en comparación con la neurturina de tipo natural.

Ejemplo 9: Tinción inmunocitoquímica en células CHO normal y deficientes en sulfato de heparán

Las células CHO se transfectaron transitoriamente con NRTN de tipo natural no marcado, NRTN de tipo natural marcado con V5 o variante NRTN NV4 marcada con V5. Después de 2 días se recogieron muestras de medio y se almacenaron a +4ºC. Se colocó un segundo conjunto de células CHO en los cubreobjetos. Después de dos días, una parte de estas células se transfectaron con GFRα2. Un día después de la transfección, el medio se reemplazó con el medio almacenado recogido del primer conjunto de células CHO que expresaban las variantes de NRTN. Las células se incubaron con el medio durante 10 min y se aclararon posteriormente tres veces durante 5 min con PBS antes de fijar con PFA al 3% durante 15 min, permeabilización en Triton X-100 al 0,2% durante 5 min y bloqueo en BSA al 1% durante 30 min. Los anticuerpos contra V5 (Invitrogen) se diluyeron 1:500, y los anticuerpos anti-ratón de conejo conjugados con CY3 (Jackson) se diluyeron 1:400. El ensayo se repitió como antes, pero utilizando células CHO deficientes en heparán sulfato (psgA 745). En este caso, las células no fueron permeabilizadas y los núcleos se tiñeron con Hoechst (Invitrogen) antes del montaje.

Los resultados (no mostrados) demostraron que la neurturina de tipo natural se une a la superficie del tipo natural, pero no a las células CHO deficientes en heparán sulfato. En comparación, la variante de neurturina NV4 falla en unirse a las células CHO de tipo natural o deficientes en sulfato de heparán. Por lo tanto, se concluye que, al menos

con respecto a la variante NV4, la pérdida del dominio de interacción de alta afinidad abarcado por los aminoácidos 51 a 62 es suficiente para evitar la unión de la neurturina mejorada a la superficie celular.

Ejemplo 10: Ampliación de la producción y caracterización de polipéptidos de neurturina mejorados

La neurturina completamente plegada madura se caracteriza por una estructura de nudo de cisteína con siete puentes disulfuro. Cada monómero de la proteína dimérica aloja tres puentes disulfuro intramoleculares, y los monómeros están unidos entre sí por un puente disulfuro intermolecular adicional. Estudios previos han establecido que la expresión de NRTN en células de mamífero de ovario de hámster chino (células CHO) típicamente permite la producción de proteínas con una mayor actividad biológica (in vitro) que la NRTN producida por E. coli (Hoane et al. (2000) Exp. Neurol. 162(1): 189 - 93). Esto se debe a que las células de mamífero tienen un control de calidad intracelular estricto para el plegado de las proteínas secretadas con puentes disulfuro, mientras que la expresión de E. coli típicamente requiere que las proteínas unidas a di-sulfuros sean replegadas de los cuerpos de inclusión.

Por consiguiente, la producción a gran escala de las proteínas de neurturina mejoradas se completó usando células CHO, usando la tecnología QMCF patentada desarrollada por Icosagen Ltd. (Véase la patente europea nº EP1851319). En resumen, los vectores de expresión QMCF para la secuencia de codificación de neurturina mejorada portan el origen de replicación híbrido compuesto por el origen mínimo de replicación de poliomavirus sin potenciador y el elemento de mantenimiento proporcionado por la Familia de Repeticiones del Virus de Epstein-Barr. La tecnología QMCF se ha desarrollado para la expresión de proteínas terapéuticas utilizando células capaces de soportar la replicación y el mantenimiento estable de los vectores de expresión extracromosómicos nucleares múltiples de QMCF. Las líneas celulares utilizadas para la producción fueron células CHO de suspensión modificada (CHOEBNALT85), que expresaban dos proteínas adicionales para proporcionar la iniciación de la replicación en el origen sin potenciador de poliomavirus y proporcionan el mantenimiento eficaz de los vectores de expresión. Las variantes de neurturina se expresaron sin ningún marcador N-terminal, o residuos de aminoácidos N-terminales adicionales. Las secuencias se muestran en la Tabla D2.

Método de purificación

Medios de células CHO que expresan NRTN (QMCF Technology en Icosagen Ltd) se descongelaron a temperatura ambiente. Se equilibraron columnas HITRAP™ Heparina HP (I ml, GE Healthcare) con 10 ml de Hepes 10 mM, pH 7,2 y se aplicaron 1-10 ml de medio no diluido con una jeringa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El medio se recogió y se pasó por la columna una segunda vez. Las columnas se lavaron con 10 ml de NaCl 0,2 M en Hepes 10 mM, pH 7,2. Las muestras enriquecidas con NRTN se eluyeron con 5 x 600 µl de Hepes 10 mM, pH 7,2, NaCl 1,2 M. Las fracciones número dos y tres se recogieron y se concentraron hasta un volumen final de 50-65 µl, de acuerdo con las instrucciones del fabricante en concentradores 10K, 0,5 ml, de AmiconUltra (Millipore). Las muestras se diluyeron después 1:10 con Hepes 10 mM, pH 7,2, hasta una concentración final de NaCl de alrededor de 120 mM. La quimera recombinante GFRα2-Fc soluble (10-200 µg, R & D Systems) se unió a las columnas HP SpinTrap de Proteína G (GE Healthcare) en PBS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras diluidas 1:10 se añadieron a las columnas de GFRα2 y se incubaron durante al menos una hora a + 4ºC con mezclado. Las columnas se lavaron primero con 4 x 400 µl de Hepes frío 10 mM, pH 7,2, NaCl 1,0 M y después con 4 x 400 µl de Hepes 10 mM, frío, pH 7,2, NaCl 0,1 M. Las muestras de NRTN se eluyeron con 5 x 200 µl de Hepes 10 mM previamente calentado (25°C), pH 7,2, $MgCl_2$ 2,0 M. Las fracciones eluidas se diluyeron inmediatamente (1:2) con Hepes 10 mM, pH 7,2, NaCl 0,150 M y se concentraron con concentradores 10K AMICONULTRA™, 0,5 ml. Las muestras se diluyeron adicionalmente en el mismo tampón (1:2) y posteriormente se concentraron tres veces para producir una concentración final de alrededor de 125 mM de $MgCl_2$ y 150 mM de NaCl en 10 mM de Hepes pH 7,2. Se analizaron las muestras de las proteínas purificadas así como un lote disponible comercialmente de neurturina usando SDS-PAGE al 15%, en condiciones no reductoras, y se visualizaron mediante tinción con Coomassie. Los resultados demuestran que el procedimiento de purificación dio como resultado el aislamiento eficiente de cada una de las neurturinas mejoradas.

Secuenciación del N-terminal y análisis de espectrometría de masas

La secuencia N-terminal de las variantes purificadas de NRTN se determinó por degradación de Edman con un secuenciador Biosystems Precise 494A HT (Perkin Elmer, Waltham, MA), (donde la cisteína no se puede detectar sin modificación previa). La masa molecular de las proteínas diméricas se determinó con un instrumento MALDI-TOF (Ultraflex TOF/TOF, Bruker), que se calibró exactamente entre 5700 y 16900 Da. Los resultados de la Tabla E4 mostraron que las proteínas eran de la masa correcta, y mostraron poco o ningún recorte n-terminal.

Tabla E4		
Variante	Masa predicha	Masa experimentalmente determinada [M+H]+
NRTN WT	23354.6	23345.065
NRTN N1	22844.0	22807.642
NRTN N2	22844.0	22822.791
NRTN N3	22469.654	22469.654
NRTN N4	22165.2	22143.254

Ejemplo 11: Análisis de Biacore de la afinidad de las variantes de neurturina con heparina

La afinidad de las variantes de NRTN con heparina se ensayó por resonancia de plasmón de superficie, utilizando un instrumento Biacore T100 y un Sensor Chip SA recubierto con estreptavidina (Serie S, GE Healthcare). La heparina biotinilada (Sigma) se unió al chip. Para eliminar la biotina libre en la preparación de biotina-heparina, se diluyeron 50 µl de biotina-heparina (20 µg/µl) en 1:10 en Hepes 10 mM pH 7,2, y posteriormente se concentró con un tubo de concentración Amicon Ultra (10K, Millipore) a 50 µl. Mediante ciclos repetidos de dilución/concentración se consiguió un efecto de desalación de 1.000.000 de veces. Se asumió que la recuperación de la biotina-heparina desalada fue de 100%, y se diluyó hasta una concentración final de 200 µg/ml en tampón HBS-EP + tampón (GE Healthcare: Hepes 100 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05% (v/v) de tensioactivo P20), antes de cargarlo sobre el chip revestido con estreptavidina con un caudal de 5 µl/min durante 10 min. La unión de biotina-heparina al chip dio como resultado un aumento de 361 RU en el chip. No se añadió ningún ligando al chip de referencia.

La concentración real de las variantes de NRTN se determinó mediante tinción con Coomassie. Las variantes de NRTN se pasaron sobre el chip revestido con heparina a cinco concentraciones diferentes (25, 50, 100, 200 y 500 nM). La iniciación de la asociación se retrasó significativamente cuando las variantes de NRTN se diluyeron en el tampón estándar (HBS-EP +). Por lo tanto, aumentó la concentración de NaCl del tampón a 235 mM. Utilizando el tampón modificado se analizó la interacción entre las variantes de NRTN y heparina con un caudal de 30 µl/min, un tiempo de inyección de 240 s y un tiempo de disociación de 600 s. El chip se regeneró con NaCl 1 M durante 30 s entre los ciclos. El periodo de estabilización fue de 20 s.

Los resultados mostraron que la neurturina de tipo natural exhibía una afinidad aparente con la heparina en estas condiciones de entre 2,5 x 10^{-9} M y 3,8 x 10^{-9} M. En comparación, todas las variantes de neurturina exhibían afinidades aparentes con heparina que fueron considerablemente más bajas. (Datos no mostrados).

Ejemplo 12: Cromatografía de afinidad con heparina

Para caracterizar la afinidad de las variantes NRTN con la heparina se utilizó una pequeña columna de cromatografía de afinidad de heparina. Después de cargar aproximadamente 2 µg de cada una de las variantes de NRTN purificadas a la columna de cromatografía de afinidad con heparina en Hepes 10 mM, pH 7,2, las muestras se eluyeron con un gradiente de NaCl continuo (Hepes 10 mM con NaCl creciente hasta 2 M). La elución de las proteínas se controló por su absorción a 214 nm. La concentración exacta de sal de las fracciones que contenían las proteínas eluidas se determinó en base a la conductividad. El detector de A214 nm se localizó antes del detector de conductividad (aproximadamente 20-25 µl). Como la velocidad de flujo fue de 50 µl/min, la conductividad correspondiente a la absorbancia A214 se registró con un retardo de aproximadamente medio minuto.

Los resultados corresponden bien con el análisis anterior de los inventores (mostrado en la Tabla E1) de las características de elución de estas proteínas de la columna de afinidad de heparina. En ese momento se determinó la concentración exacta de sal de las fracciones que contenían las proteínas eluidas en base a la conductividad. El detector de A214 nm se localizó antes del detector de conductividad (aproximadamente 20-25 µl). Como la velocidad de flujo fue de 50 µl/min, la conductividad correspondiente a la absorbancia A214 se registró con un retardo de aproximadamente medio minuto. Específicamente, la proteína de tipo natural de neurturina se eluyó de la columna con un pico a una conductividad correspondiente a una concentración de NaCl de aproximadamente 1,08 M. Por comparación, el mutante de neurturina N1, aunque recuperado con un rendimiento inferior, se eluyó de la columna con un pico a una conductividad correspondiente a una concentración de NaCl de aproximadamente 0,97 M; el mutante de neurturina N2 se eluyó de la columna con un pico a una conductividad correspondiente a una concentración de NaCl de aproximadamente 0,56 M; el mutante de neurturina N3 se eluyó de la columna con un pico a una conductividad correspondiente a una concentración de NaCl de aproximadamente 0,56 M; y el mutante de neurturina N4 se eluyó de la columna con un pico a una conductividad correspondiente a una concentración de NaCl de aproximadamente 0,48 M.

Ejemplo 13: Propiedades de la fosforilación del receptor de las variantes purificadas de neurturina

Los fibroblastos (MG87-RET) que expresan de forma estable la isoforma larga RET humana (Eketjall et al., 1999, EMBO J., 18: 5901) se transfectaron transitoriamente con GFRαl de rata o GFRα2 humano como se describió anteriormente. Las muestras que contenían 100 ng/ml de neurturina comercial, o las variantes purificadas de NRTN

se añadieron a las células a 37ºC durante 10 min. Después los fibroblastos se lisaron y los lisados se utilizaron para la inmunoprecipitación de RET (anticuerpos contra RET de Santa Cruz Biotechnology Inc). Los inmunocomplejos se recogieron con Proteína G-Sepharose (GE Healthcare) y se analizaron en SDS-PAGE al 8% y Western blot. La fosforilación de RET se detectó mediante anticuerpos contra fosfotirosina (Upstate Biotechnology). La carga igual se verificó pelando el filtro y volviendo a probarlo con anticuerpos contra RET (Santa Cruz Biotechnology Inc). El ensayo se realizó dos veces con resultados idénticos.

Las células que expresan de forma estable RET se transfectaron transitoriamente con GFRα2, y después de la estimulación con las variantes de neurturina indicadas, se lisaron las células y se aisló RET por inmunoprecipitación. Las muestras se analizaron mediante sondeo con anticuerpos anti-fosfotirosina. Para confirmar una carga igual, las muestras se volvieron a probar posteriormente con anticuerpos anti-RET. Las células que expresan de manera estable RET se transfectaron transitoriamente con GFRαl, y después de la estimulación con las variantes de neurturina indicadas, se lisaron las células y se aisló RET por inmunoprecipitación. Las muestras se analizaron mediante sondeo con anticuerpos anti-fosfotirosina. Para confirmar una carga igual, las muestras se volvieron a probar posteriormente con anticuerpos anti-RET. Como se ha determinado anteriormente con preparaciones en bruto de las variantes de neurturina, los resultados confirman que todos los polipéptidos de neurturina mejorados presentan actividad funcional.

Lista SEQ ID Número			
SEQ. ID. NO.	Fuente	Tipo	Secuencia de aminoácidos
1	Sintética	Amino-ácido	ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACE AAARVYDLGLRALRQARALRRERVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHT VHELSARECACV
2	Sintética	Amino-ácido	ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACE AAARVYDLGLRRLAQRRRLRAEAVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHT VHELSARECACV
3	Sintética	Amino-ácido	ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACE AAARVYDLGLRALAQARALRAERVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHT VHELSARECACV
4	Sintética	Amino-ácido	ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACE AAARVYDLGLARLQGQGALVGSRVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHT VHELSARECACV
5	Humana	Amino-ácido	ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACE AAARVYDLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHT VHELSARECACV
6	Sintética	Ácido nucleico	gcgcggttgggggcgcggccttgcgggctgcgcgagctggaggtgcgcgtgagc gagctgggcctgggctacgcgtccgacgagacggtgctgttccgctactgcgca ggcgcctgcgaggctgccgcgcgcgtctacgacctcgggctgcgagcactgcgc caggcgcgggccctgcggcgggagcgggtgcgcgcgcagccctgctgccgcccg acggcctacgaggacgaggtgtccttcctggacgcgcacagccgctaccacacg gtgcacgagctgtcggcgcgcgagtgcgcctgcgtgtga
7	Sintética	Ácido nucleico	gcgcggttgggggcgcggccttgcgggctgcgcgagctggaggtgcgcgtgagc gagctgggcctgggctacgcgtccgacgagacggtgctgttccgctactgcgca ggcgcctgcgaggctgccgcgcgcgtctacgacctcgggctgcgacgactggcc cagcggcggcgcctgcgggcggaggcggtgcgcgcgcagccctgctgccgcccg acggcctacgaggacgaggtgtccttcctggacgcgcacagccgctaccacacg gtgcacgagctgtcggcgcgcgagtgcgcctgcgtgtga
8	Sintética	Ácido nucleico	gcgcggttgggggcgcggccttgcgggctgcgcgagctggaggtgcgcgtgagc gagctgggcctgggctacgcgtccgacgagacggtgctgttccgctactgcgca ggcgcctgcgaggctgccgcgcgcgtctacgacctcgggctgcgagcactggcc caggcgcgggccctgcgggcggagcgggtgcgcgcgcagccctgctgccgcccg acggcctacgaggacgaggtgtccttcctggacgcgcacagccgctaccacacg gtgcacgagctgtcggcgcgcgagtgcgcctgcgtgtga

9	Sintética	Ácido nucleico	gcgcggttgggggcgcggccttgcgggctgcgcgagctggaggtgcgcgtgagc gagctgggcctgggctacgcgtccgacgagacggtgctgttccgctactgcgca ggcgcctgcgaggctgccgcgcgcgtctacgacctcgggctggcacgactgcag ggtcagggcgccctggtggggtcccgggtgcgcgcgcagccctgctgccgcccg acggcctacgaggacgaggtgtccttcctggacgcgcacagccgctaccacacg gtgcacgagctgtcggcgcgcgagtgcgcctgcgtgtga
10	Humana	Ácido nucleico	gcgcggttgggggcgcggccttgcgggctgcgcgagctggaggtgcgcgtgagc gagctgggcctgggctacgcgtccgacgagacggtgctgttccgctactgcgca ggcgcctgcgaggctgccgcgcgcgtctacgacctcgggctgcgacgactgcgc cagcggcggcgcctgcggcgggagcgggtgcgcgcgcagccctgctgccgcccg acggcctacgaggacgaggtgtccttcctggacgcgcacagccgctaccacacg gtgcacgagctgtcggcgcgcgagtgcgcctgcgtgtga
11	Sintética	Ácido nucleico	ag gcg cgg gcc ctg cgg cgg gag cgg gtg cgc
12	Sintética	Ácido nucleico	g gcg cag tgc tcg cag ccc gag gtc gta gac g
13	Sintética	Ácido nucleico	ctg cgg gcg gag gcg gtg cgc gcg cag ccc tgc tgc
14	Sintética	Ácido nucleico	gcg ccg ccg ctg ggc cag tcg tcg cag ccc gag gtc g
15	Sintética	Ácido nucleico	cgg gcc ctg cgg gcg gag cgg gtg cgc gcg cag ccc
16	Sintética	Ácido nucleico	cgc ctg ggc cag tgc tcg cag ccc gag gtc gta gac g
17	Sintética	Ácido nucleico	ggc gcc ctg gtg ggg tcc cgg gtg cgc gcg cag ccc tgc
18	Sintética	Ácido nucleico	ctg acc ctg cag tcg tgc cag ccc gag gtc gta gac gcg c
19	Sintética	Amino-ácido	GKPIPNPLLGLDST
20	Humana	Ácido nucleico	ctc ctc ggt ctc gat tct acg tcg ggg gcg cgg ttg ggg gcg cgg cct tg
21	Humana	Ácido nucleico	agg gtt agg gat agg ctt acc ccg cgc cga att cac ccc tgt aga aag aaa ggc
22	Sintética	Amino-ácido	RALRQARA
23	Sintética	Amino-ácido	RRLAQRRRLRAEA
24	Sintética	Amino-ácido	RALAQARALRA
25	Sintética	Amino-ácido	ARLQGQGALVGS
26	Humana	Amino-ácido	MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCREGLLLS HRLGPALVPL HRLPRTLDAR IARLAQYRAL LQGAPDAMEL RELTPWAGRP PGPRRRAGPR RRRARARLGA RPCGLRELEV RVSELGLGYA SDETVLFRYC AGACEAAARV YDLGLRRLRQ RRRLRRERVR AQPCCRPTAY EDEVSFLDAH SRYHTVHELS ARECACV
27	Humana	Amino-ácido	SRLGA RPCGLRELEV RVSELGLGYA SDETVLFRYC AGACEAAARV YDLGLRRLRQ RRRLRRERVR AQPCCRPTAY EDEVSFLDAH SRYHTVHELS ARECACV

28	Canis familiaris	Amino-ácido	MSAGSGGHGS AHGGGGEVGR AARARCDGAG APLRPWTSKC ASEAGWARGG RGGSRNPLCS LCEGEPQTPR CLAVRRGPWG ASGPQTPAGE LPSAQLRAEV NICQWRVPAA AASGDTVSSG CPQAYWAPAT AASGCMGPRW SVQARALAPA APRCCDASVL CLAEMPSSLF GSQLPWLFRE ALWDPRMGVL PLPPPARHPP SSRAAFFTTL CSGFLMNRVD VMTDHYAEVD GNQGPRRAPG AWPSALFAPR MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCRDGLLLS HRLGPALAPL RRPPRTLDAR IARLAQYRAL LQGAPDAVEL RQLTPWAGGA AGPRRRAGPR RRRARTGSRP CGLRELEVRV SELGLGYASD ETVLFRYCAG ACEAAARVYD LGLRRLRQRR RVRRERVRAQ PCCRPTAYED EVSFLDAHSR YHTVHELSAR ECACV
29	Bos taurus	Amino-ácido	MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCREGLLLG HRLGPALAPL RRPPRTLDAR IARLAQYRAL LQGAPDAVEL RELTPWAGRS PGPRRRPGPR RRRARARSGT RPCGLRELEV RVSELGLGYA SEETVLFRYC AGACEAAARV YDLGLRRLRQ RRRVRRERVR AQPCCRPTAY EDEVSFLDTH SRYHTVHELS ARECACV
30	Macaca mulatta	Amino-ácido	MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCREGLLLS HRLGPALVPL RRLPRTLDTR IARLAQYRAL LQGAPDAVEL RELTPWAGRP PGPRRRAGPR RRRARARSGA RPCGLRELEV RVSELGYASD ETVLFRYCAG ACEAAARVYD LGLRRLRQRR RLRRERVRAQ PCCRPTAYED EVSFLDAHSR YHTVHELSAR ECACV
31	Humana	Amino-ácido	RRLRQRRRLRRER

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CNS Therapeutic

<120> MOLÉCULAS DE NEURTURINA MEJORADAS

<130> CNS0005-401-PC

<150> 61/256,352
<151> 30-10-2009

<160> 31

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 102
<212> PRT
<213>Sintético

<400> 1

```
Ala Arg Leu Gly Ala Arg Pro Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg
1               5                   10                  15

Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe
            20                  25                  30

Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu
        35                  40                  45

Gly Leu Arg Ala Leu Arg Gln Ala Arg Ala Leu Arg Arg Glu Arg Val
    50                  55                  60

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

Phe Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala
                85                  90                  95

Arg Glu Cys Ala Cys Val
            100
```

<210> 2
<211> 102
<212> PRT
<213>Sintético

<400> 2

```
Ala Arg Leu Gly Ala Arg Pro Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg
1               5                   10                  15

Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe
            20                  25                  30
```

Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu
35 40 45

Gly Leu Arg Arg Leu Ala Gln Arg Arg Arg Leu Arg Ala Glu Ala Val
50 55 60

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

Phe Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala
85 90 95

Arg Glu Cys Ala Cys Val
100

<210> 3
<211> 102
<212> PRT
<213>Sintético

<400> 3
Ala Arg Leu Gly Ala Arg Pro Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg
1 5 10 15

Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe
20 25 30

Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu
35 40 45

Gly Leu Arg Ala Leu Ala Gln Ala Arg Ala Leu Arg Ala Glu Arg Val
50 55 60

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

Phe Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala
85 90 95

Arg Glu Cys Ala Cys Val
100

<210> 4
<211> 102
<212> PRT
<213>Sintético

<400> 4

```
Ala Arg Leu Gly Ala Arg Pro Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg
1               5                   10                  15

Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe
            20                  25                  30

Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu
        35                  40                  45

Gly Leu Ala Arg Leu Gln Gly Gln Gly Ala Leu Val Gly Ser Arg Val
    50                  55                  60

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

Phe Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala
                85                  90                  95

Arg Glu Cys Ala Cys Val
            100
```

<210> 5
<211> 102
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS

<400> 5

```
Ala Arg Leu Gly Ala Arg Pro Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg
1               5                   10                  15

Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe
            20                  25                  30

Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu
        35                  40                  45

Gly Leu Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Leu Arg Arg Glu Arg Val
    50                  55                  60

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

Phe Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala
                85                  90                  95

Arg Glu Cys Ala Cys Val
            100
```

<210> 6
<211> 309
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 6

gcgcggttgg gggcgcggcc ttgcgggctg cgcgagctgg aggtgcgcgt gagcgagctg 60

ggcctgggct acgcgtccga cgagacggtg ctgttccgct actgcgcagg cgcctgcgag 120

gctgccgcgc gcgtctacga cctcgggctg cgagcactgc gccaggcgcg ggccctgcgg 180

cgggagcggg tgcgcgcgca gccctgctgc cgcccgacgg cctacgagga cgaggtgtcc 240

ttcctggacg cgcacagccg ctaccacacg gtgcacgagc tgtcggcgcg cgagtgcgcc 300

tgcgtgtga 309

<210> 7
<211> 309
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 7
gcgcggttgg gggcgcggcc ttgcgggctg cgcgagctgg aggtgcgcgt gagcgagctg 60

ggcctgggct acgcgtccga cgagacggtg ctgttccgct actgcgcagg cgcctgcgag 120

gctgccgcgc gcgtctacga cctcgggctg cgacgactgg cccagcggcg gcgcctgcgg 180

gcggaggcgg tgcgcgcgca gccctgctgc cgcccgacgg cctacgagga cgaggtgtcc 240

ttcctggacg cgcacagccg ctaccacacg gtgcacgagc tgtcggcgcg cgagtgcgcc 300

tgcgtgtga 309

<210> 8
<211> 309
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 8
gcgcggttgg gggcgcggcc ttgcgggctg cgcgagctgg aggtgcgcgt gagcgagctg 60

ggcctgggct acgcgtccga cgagacggtg ctgttccgct actgcgcagg cgcctgcgag 120

gctgccgcgc gcgtctacga cctcgggctg cgagcactgg cccaggcgcg ggccctgcgg 180

gcggagcggg tgcgcgcgca gccctgctgc cgcccgacgg cctacgagga cgaggtgtcc 240

ttcctggacg cgcacagccg ctaccacacg gtgcacgagc tgtcggcgcg cgagtgcgcc 300

tgcgtgtga 309

<210> 9
<211> 309
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 9
gcgcggttgg gggcgcggcc ttgcgggctg cgcgagctgg aggtgcgcgt gagcgagctg 60

ggcctgggct acgcgtccga cgagacggtg ctgttccgct actgcgcagg cgcctgcgag 120

gctgccgcgc gcgtctacga cctcgggctg gcacgactgc agggtcaggg cgccctggtg 180

gggtcccggg tgcgcgcgca gccctgctgc cgcccgacgg cctacgagga cgaggtgtcc 240

ttcctggacg cgcacagccg ctaccacacg gtgcacgagc tgtcggcgcg cgagtgcgcc 300

tgcgtgtga 309

<210> 10
<211> 309
<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 10
gcgcggttgg gggcgcggcc ttgcgggctg cgcgagctgg aggtgcgcgt gagcgagctg 60

ggcctgggct acgcgtccga cgagacggtg ctgttccgct actgcgcagg cgcctgcgag 120

gctgccgcgc gcgtctacga cctcgggctg cgacgactgc gccagcggcg gcgcctgcgg 180

cgggagcggg tgcgcgcgca gccctgctgc cgcccgacgg cctacgagga cgaggtgtcc 240

ttcctggacg cgcacagccg ctaccacacg gtgcacgagc tgtcggcgcg cgagtgcgcc 300

tgcgtgtga 309

<210> 11
<211> 32
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 11
aggcgcgggc cctgcggcgg gagcgggtgc gc 32

<210> 12
<211> 32
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 12
ggcgcagtgc tcgcagcccg aggtcgtaga cg 32

<210> 13
<211> 36
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 13
ctgcgggcgg aggcggtgcg cgcgcagccc tgctgc 36

<210> 14
<211> 37
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 14
gcgccgccgc tgggccagtc gtcgcagccc gaggtcg 37

<210> 15
<211> 36
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 15
cgggccctgc gggcggagcg ggtgcgcgcg cagccc 36

<210> 16
<211> 37
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 16
cgcctgggcc agtgctcgca gcccgaggtc gtagacg 37

<210> 17
<211> 39
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 17
ggcgccctgg tggggtcccg ggtgcgcgcg cagccctgc 39

<210> 18
<211> 40
<212> ADN
<213>Sintético

<400> 18
ctgaccctgc agtcgtgcca gcccgaggtc gtagacgcgc 40

<210> 19
<211> 14
<212> PRT
<213>Sintético

<400> 19
Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
1 5 10

<210> 20
<211> 50
<212> ADN
<213> HOMO SAPIENS

<400> 20
ctcctcggtc tcgattctac gtcgggggcg cggttggggg cgcggccttg 50

<210> 21
<211> 54
<212> ADN
<213> HOMO SAPIENS

<400> 21
agggttaggg ataggcttac cccgcgccga attcacccct gtagaaagaa aggc 54

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213>Sintético

<400> 22
Arg Ala Leu Arg Gln Ala Arg Ala
1 5

<210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213>Sintético

<400> 23
Arg Arg Leu Ala Gln Arg Arg Arg Leu Arg Ala Glu Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213>Sintético

<400> 24
Arg Ala Leu Ala Gln Ala Arg Ala Leu Arg Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 12
<212> PRT

<213>Sintético

<400> 25
Ala Arg Leu Gln Gly Gln Gly Ala Leu Val Gly Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 197
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS

<400> 26
Met Gln Arg Trp Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Cys Ser Ser
1 5 10 15

Val Leu Ser Ile Trp Met Cys Arg Glu Gly Leu Leu Leu Ser His Arg
20 25 30

Leu Gly Pro Ala Leu Val Pro Leu His Arg Leu Pro Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Ala Arg Ile Ala Arg Leu Ala Gln Tyr Arg Ala Leu Leu Gln Gly Ala
50 55 60

Pro Asp Ala Met Glu Leu Arg Glu Leu Thr Pro Trp Ala Gly Arg Pro
65 70 75 80

Pro Gly Pro Arg Arg Arg Ala Gly Pro Arg Arg Arg Arg Ala Arg Ala
85 90 95

Arg Leu Gly Ala Arg Pro Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg Val
100 105 110

Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg
115 120 125

Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu Gly
130 135 140

Leu Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Leu Arg Arg Glu Arg Val Arg
145 150 155 160

Ala Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe
165 170 175

Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala Arg
180 185 190

Glu Cys Ala Cys Val
195

<210> 27
<211> 102
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS

<400> 27

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

Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe
            20                  25                  30

Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu
        35                  40                  45

Gly Leu Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Leu Arg Arg Glu Arg Val
    50                  55                  60

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

Phe Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala
                85                  90                  95

Arg Glu Cys Ala Cys Val
            100
```

<210> 28
<211> 445
<212> PRT
<213> CANIS FAMILIARIS

<400> 28

```
Met Ser Ala Gly Ser Gly Gly His Gly Ser Ala His Gly Gly Gly Gly
1               5                  10                  15

Glu Val Gly Arg Ala Ala Arg Ala Arg Cys Asp Gly Ala Gly Ala Pro
            20                  25                  30

Leu Arg Pro Trp Thr Ser Lys Cys Ala Ser Glu Ala Gly Trp Ala Arg
        35                  40                  45

Gly Gly Arg Gly Gly Ser Arg Asn Pro Leu Cys Ser Leu Cys Glu Gly
    50                  55                  60

Glu Pro Gln Thr Pro Arg Cys Leu Ala Val Arg Arg Gly Pro Trp Gly
65                  70                  75                  80

Ala Ser Gly Pro Gln Thr Pro Ala Gly Glu Leu Pro Ser Ala Gln Leu
                85                  90                  95

Arg Ala Glu Val Asn Ile Cys Gln Trp Arg Val Pro Ala Ala Ala Ala
            100                 105                 110

Ser Gly Asp Thr Val Ser Ser Gly Cys Pro Gln Ala Tyr Trp Ala Pro
        115                 120                 125

Ala Thr Ala Ala Ser Gly Cys Met Gly Pro Arg Trp Ser Val Gln Ala
    130                 135                 140
```

```
Arg Ala Leu Ala Pro Ala Ala Pro Arg Cys Cys Asp Ala Ser Val Leu
145                 150                 155                 160

Cys Leu Ala Glu Met Pro Ser Ser Leu Phe Gly Ser Gln Leu Pro Trp
                165                 170                 175

Leu Phe Arg Glu Ala Leu Trp Asp Pro Arg Met Gly Val Leu Pro Leu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Arg His Pro Pro Ser Ser Arg Ala Ala Phe Phe Thr
        195                 200                 205

Thr Leu Cys Ser Gly Phe Leu Met Asn Arg Val Asp Val Met Thr Asp
    210                 215                 220

His Tyr Ala Glu Val Asp Gly Asn Gln Gly Pro Arg Arg Ala Pro Gly
225                 230                 235                 240

Ala Trp Pro Ser Ala Leu Phe Ala Pro Arg Met Gln Arg Trp Lys Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Cys Ser Ser Val Leu Ser Ile Trp Met
            260                 265                 270

Cys Arg Asp Gly Leu Leu Leu Ser His Arg Leu Gly Pro Ala Leu Ala
        275                 280                 285

Pro Leu Arg Arg Pro Pro Arg Thr Leu Asp Ala Arg Ile Ala Arg Leu
    290                 295                 300

Ala Gln Tyr Arg Ala Leu Leu Gln Gly Ala Pro Asp Ala Val Glu Leu
305                 310                 315                 320

Arg Gln Leu Thr Pro Trp Ala Gly Gly Ala Ala Gly Pro Arg Arg Arg
                325                 330                 335

Ala Gly Pro Arg Arg Arg Arg Ala Arg Thr Gly Ser Arg Pro Cys Gly
            340                 345                 350

Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala
        355                 360                 365

Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala
    370                 375                 380

Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg
385                 390                 395                 400

Arg Val Arg Arg Glu Arg Val Arg Ala Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr
                405                 410                 415

Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His
            420                 425                 430

Thr Val His Glu Leu Ser Ala Arg Glu Cys Ala Cys Val
        435                 440                 445
```

<210> 29
<211> 197
<212> PRT
<213> BOS TAURUS

<400> 29

```
Met Gln Arg Trp Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Cys Ser Ser
1               5                  10                  15

Val Leu Ser Ile Trp Met Cys Arg Glu Gly Leu Leu Leu Gly His Arg
            20                  25                  30

Leu Gly Pro Ala Leu Ala Pro Leu Arg Arg Pro Pro Arg Thr Leu Asp
        35                  40                  45

Ala Arg Ile Ala Arg Leu Ala Gln Tyr Arg Ala Leu Leu Gln Gly Ala
    50                  55                  60

Pro Asp Ala Val Glu Leu Arg Glu Leu Thr Pro Trp Ala Gly Arg Ser
65                  70                  75                  80

Pro Gly Pro Arg Arg Arg Pro Gly Pro Arg Arg Arg Arg Ala Arg Ala
                85                  90                  95

Arg Ser Gly Thr Arg Pro Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg Val
            100                 105                 110

Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Thr Val Leu Phe Arg
        115                 120                 125

Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu Gly
    130                 135                 140

Leu Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Val Arg Arg Glu Arg Val Arg
145                 150                 155                 160

Ala Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe
                165                 170                 175

Leu Asp Thr His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala Arg
            180                 185                 190

Glu Cys Ala Cys Val
        195
```

<210> 30
<211> 195
<212> PRT
<213> MACACA MULATTA

<400> 30

```
Met Gln Arg Trp Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Cys Ser Ser
1               5                  10                  15

Val Leu Ser Ile Trp Met Cys Arg Glu Gly Leu Leu Leu Ser His Arg
            20                  25                  30

Leu Gly Pro Ala Leu Val Pro Leu Arg Arg Leu Pro Arg Thr Leu Asp
        35                  40                  45

Thr Arg Ile Ala Arg Leu Ala Gln Tyr Arg Ala Leu Leu Gln Gly Ala
    50                  55                  60

Pro Asp Ala Val Glu Leu Arg Glu Leu Thr Pro Trp Ala Gly Arg Pro
65                  70                  75                  80

Pro Gly Pro Arg Arg Arg Ala Gly Pro Arg Arg Arg Arg Ala Arg Ala
                85                  90                  95

Arg Ser Gly Ala Arg Pro Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg Val
            100                 105                 110

Ser Glu Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg Tyr Cys
        115                 120                 125

Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu Gly Leu Arg
    130                 135                 140

Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Leu Arg Arg Glu Arg Val Arg Ala Gln
145                 150                 155                 160

Pro Cys Cys Arg Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe Leu Asp
                165                 170                 175

Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala Arg Glu Cys
            180                 185                 190

Ala Cys Val
        195
```

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> HOMO SAPIEN

<400> 31

```
Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Leu Arg Arg Glu Arg
1               5                  10
```

Reivindicaciones

1. Un polipéptido de neurturina, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.

2. Una composición farmacéutica, que comprende dicho polipéptido de neurturina de la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. El polipéptido de neurturina de la reivindicación 1 para su uso como medicamento.

4. El polipéptido de neurturina de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración o insuficiencia celular en un paciente seleccionada del grupo que consiste en neuropatía periférica, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral aguda, lesión aguda de la médula espinal, dolor neuropático, diabetes, disfunción eréctil, pérdida del cabello, enfermedad de Hirschsprung, tumores de sistemas nerviosos, esclerosis múltiple, pérdida de audición y retinopatía.

5. El polipéptido de neurturina para su uso según la reivindicación 4, en el que dicha enfermedad de degeneración o insuficiencia celular se compone de degeneración o insuficiencia de células hematopoyéticas seleccionada del grupo que consiste en eosinopenia, basopenia, linfopenia, monocitopenia, neutropenia, anemias, trombocitopenia e insuficiencia de células madre.

6. El polipéptido de neurturina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 - 5, en el que dicho polipéptido de neurturina se administra por una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración sistémica, administración intratecal, administración intranasal y administración intraparenquimatosa cerebral.

7. Un polipéptido de neurturina que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 para su uso en un método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson, que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de la variante de neurturina.

8. El polipéptido de neurturina para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho polipéptido de neurturina se administra intraparenquimalmente al cerebro.

9. El polipéptido de neurturina para su uso según la reivindicación 8, en el que dicho polipéptido de neurturina se administra intraputamenalmente.

10. El polipéptido de neurturina para su uso según la reivindicación 8, en el que dicho polipéptido de neurturina se administra por inyección.

11. El polipéptido de neurturina para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha administración intraparenquimatosa cerebral se lleva a cabo usando una formulación de liberación inmediata o sostenida, una formulación retardada o suministro mejorado por convección.

12. Un vector viral recombinante que comprende un polinucleótido que codifica una variante de neurturina que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 para su uso en un método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del polinucleótido.

13. El vector viral recombinante para su uso según la reivindicación 12, en el que la administración es por administración intraparenquimatosa.

14. El vector viral recombinante para su uso según la reivindicación 12, en el que dicho vector viral se selecciona del grupo que consiste en un adenovirus, un virus adenoasociado, un retrovirus, un virus del herpes y un virus del papiloma.