



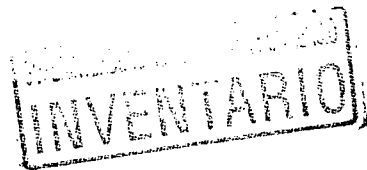
Organización y
Digitalización CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

10-67268

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

CONJUGADOS DE NEURTURINA NOVEDOSOS PARA USO

FARMACEUTICOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT

DOMICILIO

GOTTINGEN, ALEMANIA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35,456,344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-067268- -00000-0000

Fecha: 2010-06-03 15:57:25

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 154

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:****1**☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.**2****SOLICITANTE
(71)**Nombre: **DEVELOGEN****AKTIENGESELLSCHAFT**

Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania.

Dirección: Marie-Curie-Strasse 7,
37079 Göttingen,
AlemaniaDomicilio: Göttingen,
Alemania**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P 23.555**4****INVENTOR (ES)
(72)****1. Matthias AUSTEN**Lärchenweg 17,
37079 Göttingen,
Alemania**3. Rainer MUSSMANN**Waldweg 17,
CH-4312 Magden,
Alemania**5. Thomas SIEGMUND**Pötzwenden 5,
37136 Landolfshausen
Alemania**2. Marcus GEESE**Wilhelm-Weber-Strasse 35,
37073 Göttingen,
Alemania**4. Friedrich HARDER**Schwesternberg 6,
88131 Lindau,
Alemania**6. Martin SCHNEIDER**Schildweg 16,
37085 Göttingen,
Alemania**5****PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/009320Fecha: 05 de noviembre de 2008Publicación Internacional No. WO 2009/059755 A3Fecha: 14 de mayo de 2009**6****Título (54)****CONJUGADOS DE NEURTURINA NOVEDOSOS PARA USO FARMACEUTICO****7****Clasificación Internacional (51) A61K 047/048****8****Prioridad**

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐EP05 de noviembre de 200707021493.7

9

Comprobante de pago No.: 10-32,518**Fecha: 26 de abril de 2010****Comprobante de pago No.: 10-42,169****Fecha: 24 de mayo de 2010**

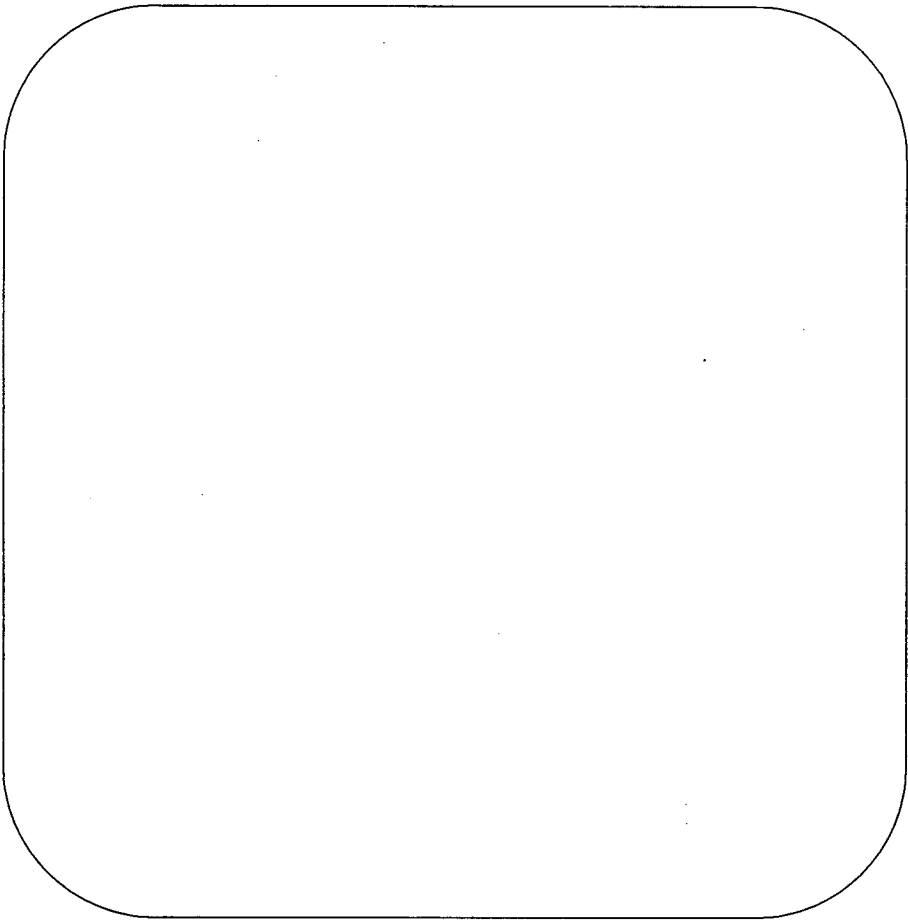
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago 23 por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$598.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luz Clemencia De Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/059755 A3

Descripción:

Páginas 33 en el idioma original

Páginas 55 en español

Reivindicaciones: Número (s) 33

Figuras: Número (s) 8

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Forma PCT/IB/306. Notificación de la inscripción donde se adiciona el inventor **Martin SCHNEIDER**.

5. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, D. C. COLOMBIA

189

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos y dibujos; marcas de fábrica y de servicios; nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio y licencias.

Vertretung und Vollmacht mit notarielle beglaubigung und Apostille für Patente, Modelle, Muster, Warenzeichen, Dienstleistungsmarken, Handelsnamen, Embleme, namen der domäne und lizenzen.

REPRESENTACION Y PODER

VERTRETUNG UND VOLLMACHT

Yo (nosotros), abajo firmado(s) / Ich (wir) unterzeichnende(r)

DeveloGen Aktiengesellschaft

domiciliado(s) en / wohnhaft in

Marie-Curie-Strasse 7, 37079 Goettingen, Germany

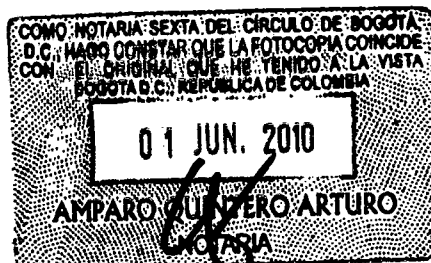
por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquel. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante los del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas,

© CAVELIER ABOGADOS
WPP0001-189 (MINUTA 12.1.1.4.1.2)

emmeno(n) hiermit in Übereinstimmung mit Abs. 1 des Artikels 543 des Handelsgesetzbuches EMILIO FERRERO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 31929), LUZ CLEMENCIA DE PAEZ (Rechtsanwaltsausweis Nr. 23555) und DANIEL PEÑA (Rechtsanwaltsausweis Nr. 65620), mit Geschäftssitz in Bogotá/Kolumbien, Carrera 4ª N° 72-35 zu meinen (unsere(n)) Prozeßbevollmächtigten (EMILIO FERRERO zum Hauptbevollmächtigten, die anderen - in der genannten Reihenfolge zu seinen Stellvertretern) in allen Angelegenheiten, die das gewerbliche Eigentum betreffen. Sie sind befugt, Zustellungen entgegenzunehmen und Prozeßbevollmächtigte und außergerichtliche Bevollmächtigte zu ernennen. Der erste Stellvertreter hat Herrn EMILIO FERRERO bei dessen Abwesenheit oder im Falle einer vorübergehenden oder endgültigen Verhinderung zu vertreten. Dasselbe gilt, wenn der zweite Stellvertreter den ersten, oder aber der dritte den zweiten, zu vertreten hat. In diesen Fällen wird der Hauptvertreter, oder gegebenenfalls der erste oder zweite Stellvertreter, oder beide, in Form einer durch einen Notar (in Kolumbien) oder durch einen Notar oder sonstigen öffentlichen Beamten oder Konsul von Kolumbien (im Ausland) beglaubigten Erklärung seine Absicht, die Vertretung nicht auszuüben, zum Ausdruck bringen. Sollte eine Verhinderung der Grund dafür sein, ist die entsprechende Bescheinigung beizufügen. Sollte einer der Ernannten endgültig ausscheiden, nimmt der Nachfolgende seine Stelle ein. Bei Beendigung der Abwesenheit oder Verhinderung des Hauptvertreters oder seines ersten oder zweiten Stellvertreters, können EMILIO FERRERO oder aber- je nach Fall die entsprechenden Stellvertreter, die Vertretung ohne weiteres wieder übernehmen und die jeweilige Stellvertretung gilt als aufgehoben.

Außerdem erteile ich (erteilen wir) den oben genannten Rechtsanwälten die Vollmacht, den Schutz meines (unsere(n)) gewerblichen Eigentums und den Schutz gegen unlauteren Wettbewerb zu erlangen. Zu diesem Zweck ermächtigen wir die genannten Bevollmächtigten zur Vertretung vor sämtlichen Stellen oder Personen, gleichgültig ob diese rechtsprechende Gewalt ausüben oder nicht, vor allem vor den Verwaltungsbehörden, vor der Verwaltungsgerichtsbarkeit und Gerichten, sowie vor den Schiedsgerichten, und zwar in allen Fragen, die sich auf folgende Angelegenheiten beziehen: a) Erlangung von Patenten für Erfindungen, Gebrauchsmuster, Industriezeichnungen, die Eintragung von



16793
569

defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos administrativos relacionados con estos derechos; en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Warenzeichen, Verbandszeichen, Defensivmarken, Dienstleistungsmarken, Werbeslogans, Handelsnamen, Emblemen, Namen der domäne, Genüßarten und Herkunftsbezeichnungen, ihre Erneuerung, Übertragung, Änderung des Namens oder des Geschäftssitzes, den freiwilligen Verzicht und die Eintragung von Nutzungslizenzen für diese Rechte; b) Klagen wegen unlauteren Wettbewerbs, Verbraucherschutz, Widersprüchen und Einsprüchen, verwaltungsrechtlicher und gerichtlicher Löschung, Nichtigkeit, einstweiligen Verfügungen, Konzessionen von Lizenzen, Verfassungsbeschwerden und allgemein für zivil-, straf- und verwaltungsrechtliche und verwaltungsgerichtliche Prozesse, die mit diesen Rechten in Verbindung stehen und die wir betreiben oder die gegen uns anhängig gemacht werden. Wir ermächtigen sie ebenfalls dazu, in allen oben genannten Angelegenheiten einen Unterbeauftragten einzusetzen, Vergleiche abzuschließen, zu schlichten, Prozeßsachverhalte anzuerkennen, zurückzutreten, zu quittieren, in Empfang zu nehmen, Verzicht zu erklären und die Rechtsgeschäfte nicht bevollmächtigter Personen zu genehmigen.

Dado y firmado hoy/Geschehen und unterzeichnet am _____

en /in _____

Por/ermittelt(n) _____

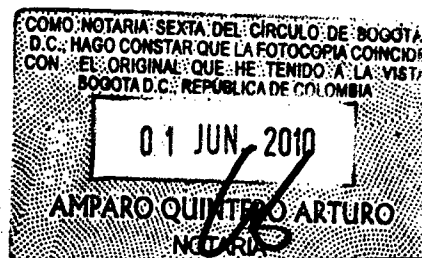
DeveloGen Aktiengesellschaft

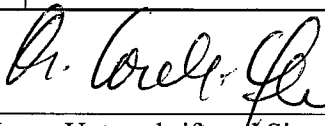
Firma

Unterschrift

Corrado Dohrmann
CEO, DeveloGen AG

Carsten Behning
CFO, DeveloGen AG

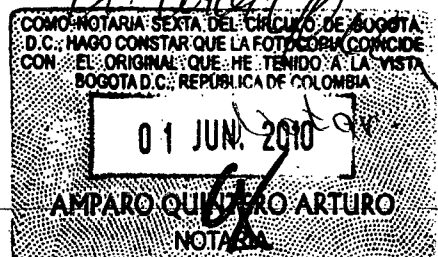


NOTARIELLE BESTÄTIGUNG	NOTARIAL CONFIRMATION
An diesem	On this
11.12.2008 Tag/day, Monat/month, Jahr/year	
erschieden persönlich vor mir, dem unterzeichnenden notary public	before me, the undersigned notary public appeared personally
1. Carsten Dehning, 2. Cord Dohrmann, beide geschäftsansässig: Marie-Curie-Straße 7, 370769 Göttingen	
die mir persönlich als die Personen bekannt sind, welche das beigelegte Dokument in meiner Gegenwart unterzeichnet haben..	personally known to me to be the persons who executed in my presence the attached document.
Außerdem bestätige ich, dass die Firma DeveloGen Aktiengesellschaft mit Sitz in Göttingen, im Handelsregister des Amtsgerichts Göttingen zu HR B 3010 eingetragen ist und dass die Herren Carsten Dehning und Cord Dohrmann gemeinsam berechtigt sind, die Gesellschaft zu vertreten.	Furthermore I certify, that DeveloGen Aktiengesellschaft, seated in Göttingen, is registered with the Municipal Court of Göttingen - Commercial Register - under Nr. HR B 3010 and that Mr. Carsten Dehning and Cord Dohrmann are entitled to act jointly as this company's legal representatives.
vom/dated 11. 12. 2008	
Diese Namensunterschriften der Herren Carsten Dehning und Cord ~~Dohrmann~~ beglaubige ich hiermit. Dohrmann	I herewith certify these signatures.
Zum Zeichen dessen unterschreibe ich und drücke mein Siegel bei.	Witness my hand and official seal
 Name, Unterschrift und Siegel des Notary Public/ Name, Signature and Seal of the Notary Public	

Sämtliche Schreibfehler
berichtigt am 13.1.2009

Göttingen, den 13. Januar 2009

1 von 2

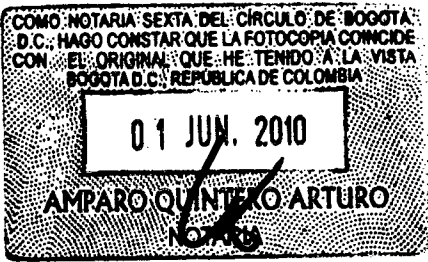
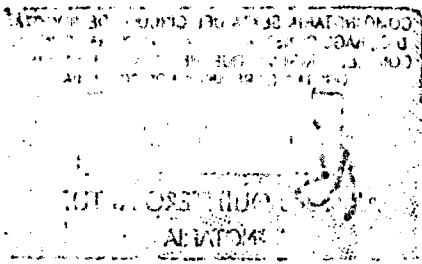


8.

Notarkostenberechnung (§§ 141, 154 KostO)

Geschäftswert: 3.000,00 EUR	
Beglaubigung von Unterschriften §§ 32, 45 I, 33 KostO	5/20 10,00 EUR
Erteilung einer Bescheinigung nach § 21 Abs. 1 Nr. 1 BNotO § 150 Nr. 1 KostO	13,00 EUR
Entgelte für die Übersendung auf Antrag erteilter Ausfertigungen, Ablichtungen und Ausdrucke § 152 II 1 a KostO	<u>1,45 EUR</u>
Zwischensumme netto	24,45 EUR
19 % Mehrwertsteuer § 151a KostO	<u>4,65 EUR</u>
Gesamtbetrag	<u>29,10 EUR</u>


Notar





APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland.
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von
Herrn Dr. Heise in Göttingen
3. in seiner Eigenschaft als Notar;
4. sie ist versehen mit dem Siegel des Notars
Dr. Cord J. Heise in Göttingen.

Bestätigt:

5. in Göttingen
6. am 18.12.2008
7. durch den Präsidenten des Landgerichts
in Göttingen
8. unter 910 E-18088
9. Siegel:

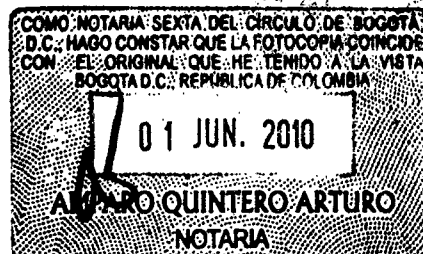
10. Unterschrift:

I. A.

(Hacke)
Justizamtsinspektor



COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA



La presente traducción oficial No. 0008/09 fue elaborada por Hernando Torres Barrera, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución 01305 de 1998 del Ministerio de Justicia y del Derecho.

A continuación se traduce una certificación notarial y una apostilla en alemán, que acompañan un DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN Y PODER.

REPRESENTACIÓN Y PODER

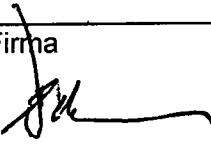
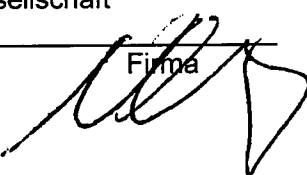
Yo (nosotros), el (los) abajo firmante(s)
DeveloGen Aktiengesellschaft
domiciliado(s) en
Marie-Curie-Strasse 7, 37079 Göttingen, Alemania

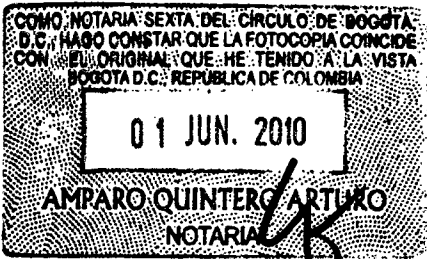
(sigue texto del poder en los idiomas español y alemán)

Dado y firmado hoy _____

en _____
Por _____

DeveloGen Aktiengesellschaft

Firma  Firma 




HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

En esta fecha

11.12.2008
día, mes, año

comparecieron personalmente ante mí, el notario público abajo firmante

1. Carsten Dehning,
2. Cord Dohrmann,

ambos con domicilio profesional en: Marie-Curie-Straße 7, 370769 Göttingen

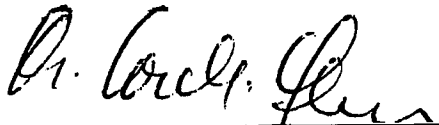
a quienes conozco personalmente como las personas que firmaron en mi presencia el documento adjunto.

Certifico además que la empresa DeveloGen Aktiengesellschaft, con sede en Göttingen, se halla inscrita en el Registro Mercantil del Juzgado Municipal de Göttingen bajo HR B 3010 y que los señores Carsten Dehning y Cord Dohrmann están autorizados de manera conjunta a representar a la sociedad.

Fechado el 11.12.2008

Por el presente certifico las presentes firmas autógrafas de los señores Carsten Dehning y Cord Dohrmann Dohrmann.

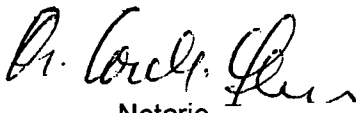
En constancia de lo anterior, firmo y estampo mi sello al pie de mi firma.



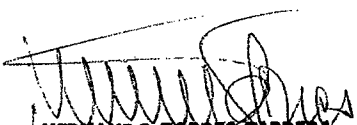
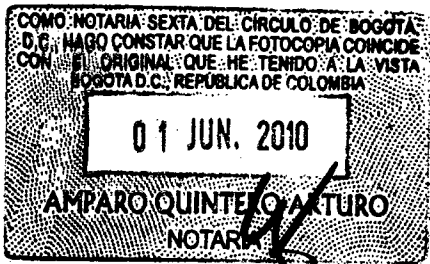
Nombre, firma y sello del Notario Público

Todos los errores de digitación/ortografía se corrigieron el 13 de enero de 2009. Göttingen, 13 de enero de 2009

1 de 2



Notario



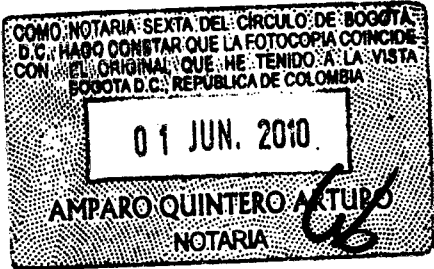
HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

21

Cálculo de Gastos Notariales según Artículos (§§) 141, 154 del Reglamento de Gastos (KostO):

Valor de la transacción: 3.000,00 EUROS		
Autenticación de firmas §§ 32, 45 I, 33 KostO	5/20	10,00 EUROS
Expedición de una certificación según § 21, parágrafo 1, numeral 1, del Reglamento Federal de Notarios (BNotO) § 150, numeral 1 KostO		13,00 EUROS
Reembolsos por envío, previa solicitud, de ejemplares formalizados, fotocopias y extractos § 152 II 1 KostO		1,45 EUROS
Subtotal neto		24,45 EUROS
19 % IVA § 151 a KostO		4,65 EUROS
Valor Total		29,10 EUROS


Notario




HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

22

RECEIVED
RELACIONES EXTERIORES
709 ENE 28 P 1:21
JEFE DE LEY
BOGOTA D.C.

APOSTILLA

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

- 1. País: República Federal de Alemania
- 2. Este documento público
- 3. está firmado por el Señor Dr. Heise en Göttingen
- 4. en su calidad de Notario
- 5. lleva el sello del Notario Dr. Cord J. Heise en Göttingen

00062

Certificado

- 5. en Göttingen
- 6. el 18 de diciembre de 2008
- 7. por el Presidente del Tribunal Regional en Göttingen
- 8. bajo el No. 910 E I 8088
- 9. Sello/timbre
- 10. Firma

En representación:

Hacke
(Hacke)
Inspector Judicial

868661

Hernando Torres

NO SE APOSE
RESPONSA
DEL TPTM

SELLO: EL PRESIDENTE DEL TRIBUNAL REGIONAL EN GÖTTINGEN

Bogotá, D. C, 26 de enero de 2009

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
01 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Hernando Torres Barrera
HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT

Poder conferido el : 13/01/2009

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

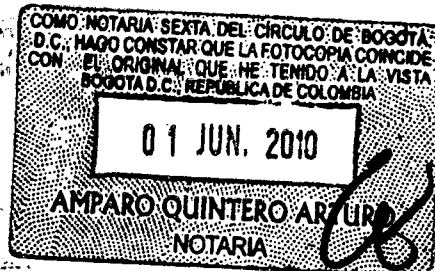
Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C.

Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,

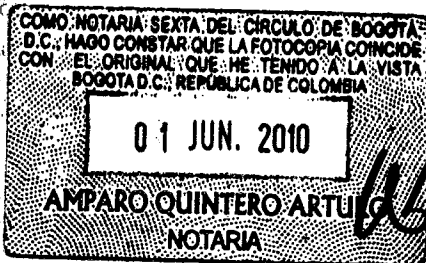
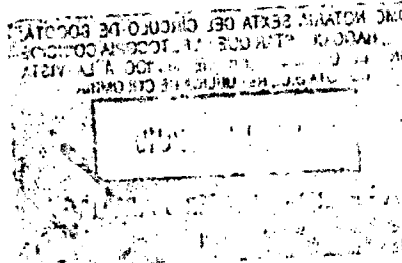
NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C.

Compareció(eron)

Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.

Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que se reco(n)
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

Emilia Fuenmayor
Luz Clemencia Sobez



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 May 2009 (14.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/059755 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 47/48 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2008/009320

(22) International Filing Date:

5 November 2008 (05.11.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

07021493.7 5 November 2007 (05.11.2007) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **DEVELO-
GEN AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Marie-
Curie-Strasse 7, 37079 Göttingen (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **AUSTEN, Matthias**
[DE/DE]; Lärchenweg 17, 37079 Göttingen (DE). **GEESE, Marcus** [DE/DE]; Wilhelm-Weber-Strasse 35,
37073 Göttingen (DE). **MUSSMANN, Rainer** [DE/CH];
Waldweg 17, CH-4312 Magden (DE). **HARDER,
Friedrich** [DE/DE]; Schwesternberg 6, 88131 Lindau
(DE). **SIEGMUND, Thomas** [DE/DE]; Potzwenden 5,
37136 Landolfshausen (DE).

(74) Agents: **WEICKMANN & WEICKMANN** et al.; Post-
fach 860 820, 81635 München (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:

24 September 2009

(54) Title: NOVEL NEURTURIN CONJUGATES FOR PHARMACEUTICAL USE

(57) Abstract: The present invention relates to neurturin protein products conjugated to polyols and to pharmaceutical compositions comprising neurturin conjugates as active ingredients, preferably PEGylated neurturin conjugates or variants thereof, having increased bioavailability.



WO 2009/059755 A3

Novel neurturin conjugates for pharmaceutical use

Description

5

Field of the Invention

10 The present invention relates to the modification of human neurturin to increase its serum half life and pharmacokinetic profile. In particular, the invention relates to novel neurturin conjugates comprising neurturin or biologically active fragments thereof covalently attached to polyol moieties, preferably polyethylene glycol. The invention further relates to pharmaceutical compositions with increased bioavailability comprising novel
15 neurturin conjugates as active agent for therapy, treatment, prevention and/or diagnosis of diabetes and neurodegeneration.

Background

20 Pancreatic beta-cells secrete insulin in response to elevated blood glucose levels. Insulin amongst other hormones plays a key role in the regulation of the fuel metabolism. Insulin leads to the storage of glycogen and triglycerides and to the synthesis of proteins. The entry of glucose into muscles and adipose cells is stimulated by insulin. In patients who suffer from diabetes mellitus type
25 I or LADA (latent autoimmune diabetes in adults, Pozzilli & Di Mario, 2001, Diabetes Care. 8:1460-1467) beta-cells are being destroyed due to autoimmune attack. The amount of insulin produced by the remaining pancreatic islet cells is too low, resulting in elevated blood glucose levels (hyperglycemia). In diabetes mellitus type II liver and muscle cells lose their
30 ability to respond to normal blood insulin levels (insulin resistance). High blood glucose levels (and also high blood lipid levels) in turn lead to an impairment of beta-cell function and to an increase in beta-cell death. Interestingly, beta-cell regenerative processes like neogenesis and replication do not appear to

- 2 -

compensate for the loss of beta cell mass in type II diabetics, thus causing a reduction in total beta-cell mass over time. Eventually the application of exogenous insulin becomes necessary in type II diabetics for an adequate control of blood glucose levels.

5

In type I diabetics, where beta-cells are being destroyed by autoimmune attack, treatments have been devised which modulate the immune system and may be able to stop or strongly reduce islet destruction (Raz et al., 2001, Lancet 358: 1749-1753; Chatenoud et al., 2003, Nat Rev Immunol. 3: 123-132; 10 Homann et al., Immunity. 2002, 3:403-415). However, due to the relatively slow regeneration of human beta-cells such treatments can be more successful if they are combined with treatments that can stimulate beta-cell regeneration.

15 Diabetes is a very disabling disease, because today's common anti-diabetic drugs do not control blood sugar levels well enough to completely prevent the occurrence of high and low blood sugar levels. Frequently elevated blood sugar levels are toxic and cause long-term complications like for example nephropathy, retinopathy, neuropathy and peripheral vascular disease. 20 Extensive loss of beta cells also leads to deregulation of glucagon secretion from pancreatic alpha cells which contributes to an increased risk of dangerous hypoglycemic episodes. There is also a host of related conditions, such as obesity, hypertension, heart disease and hyperlipidemia, for which persons with diabetes are substantially at risk.

25

Apart from the impaired quality of life for the patients, the treatment of diabetes and its long term complications presents an enormous financial burden to our healthcare systems with rising tendency. Thus, for the treatment of diabetes mellitus type I and LADA, but also for the treatment of late stages of diabetes 30 mellitus type II there is a strong need in the art to identify factors that induce regeneration of pancreatic insulin producing beta-cells. These factors could restore normal function of the endocrine pancreas once its function is impaired or event could prevent the development or progression of diabetes type I,

LADA or diabetes type II.

Neurturin is a secreted protein which is expressed in embryonic pancreas. Recombinant neurturin has been shown to stimulate the differentiation of mouse embryonic stemcells into insulin producing cells. Moreover, transgenic mice with elevated neurturin levels in the pancreas have a substantially increased pancreatic beta-cell mass. Based on these findings, the use of neurturin for the treatment of pancreatic disorders such as diabetes has been proposed (see for example WO 03/99318 and WO 2005/051415, the disclosure of which is herein incorporated by reference).

Neurturin is a member of the GDNF family of ligands (GFL) comprised of Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), Neurturin, Artemin and Persephin. Mature neurturin is a homodimer with a size of 23.6 kDa comprised of 102 amino acid monomers. Each monomer contains 3 intra-chain disulfide bonds forming a cystine knot. An additional disulfide bridge is connecting the monomers.

Neurturin had previously been proposed as a treatment for neurodegenerative diseases such as Parkinsons, Alzheimers and Huntington's disease, motor neuron disorders, spinal cord injuries or hearing disorders (WO 97/08196, WO 99/06064; Akerud et al. J Neurochem. 1999;73(1):70-78; Koeberle & Ball Neuroscience. 2002; 110(3):555-567; Bilak et al. Mol Cell Neurosci. 1999;13(5):326-336; Perez-Navarro et al. Neuroscience. 2000; 98(1):89-96; Rosenblad et al, Eur J Neurosci. 1999; 11(5):1554-1566, the disclosures of which are herein incorporated by reference).

It was found, however, that upon convection-enhanced delivery (CED) into rat brains, the distribution volume of neurturin and the related factor GDNF was limited (Hamilton et al., Exp Neurol. 2001; 168(1):155-161). Proteins must typically be administered by injection. After injection most proteins are cleared rapidly from the body, necessitating frequent injections. In our own

- 4 -

studies, we found that the bioavailability after subcutaneous and intravenous injection of neurturin in mammals is low. Only about 10 percent of subcutaneously injected neurturin enter the circulation. Consequently, it is difficult to achieve therapeutically useful blood levels of the proteins in patients.

Thus, there is a strong need to develop a neurturin variant with enhanced availability in patients and therewith the development of methods to prolong the circulating half-lives of protein therapeutics in the body – the bioavailability – so that neurturin as active agent does not have to be injected frequently in order to satisfy the needs of patients for "user-friendly" protein therapeutics.

Thus, the underlying problem of the present invention was to provide new variants and formulations of neurturin that enhance its bioavailability.

The problem is solved by providing the embodiments characterized in the claims.

20 Summary of the Invention

The present invention relates to a novel neurturin conjugate comprising a polyol moiety covalently bound to a human neurturin protein product.

25 The present invention further relates to a pharmaceutical composition comprising at least one neurturin protein product and/or a biologically active fragment thereof which is conjugated to at least one polyethylene glycol molecule as an active ingredient together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant.

30 In a further embodiment, the present invention relates to a method for administering a pharmaceutical composition to a subject in need thereof comprising a pharmaceutically active amount of at least one modified

- 5 -

neurturin protein product or a biologically active fragment thereof which is conjugated to at least one polyethylene glycol molecule as an active ingredient together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant.

5

It is a further aspect of the present invention to provide a method for administering a pharmaceutical composition to a subject in need thereof comprising a pharmaceutically active amount of at least one modified neurturin protein product or a biologically active fragment thereof which is conjugated to at least one polyethylene glycol molecule as an active ingredient together with a low-molecular weight substance together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant.

10

The compositions of the present invention are suitable for preventing or treating pancreatic disorders or neurodegenerative diseases, particularly pancreatic autoimmune disorders, e.g. autoimmune diabetes such as type I diabetes or LADA but also type II diabetes.

15

Detailed Description of the Invention

20

The present invention provides neurturin conjugates comprising covalently attached polyol moieties such as polyethylene glycol (PEG), as well as pharmaceutical compositions comprising these neurturin conjugates, as well as variants, derivatives or biologically active fragments thereof.

25

Unless specific definitions are provided, the nomenclature utilized in connection with, and the laboratory procedures, techniques and methods described herein are those known in the art to which they pertain. Standard chemical symbols and abbreviations are used interchangeably with the full names represented by such symbols. Standard techniques may be used for chemical syntheses, chemical analyses, pharmaceutical preparation, composition, delivery, and treatment of patients. Standard techniques may be used for recombinant DNA methodology, oligonucleotide synthesis, tissue

30

20

5 culture and the like. Reactions and purification techniques may be performed e.g., using kits according to manufacturer's specifications, as commonly accomplished in the art or as described herein. The foregoing techniques and procedures may be generally performed according to conventional methods well known in the art and as described in various general or more specific references that are cited and discussed throughout the present specification.

10 The term "analog" refers to a polypeptide which resembles neurturin in structure, having a similar function.

15 The term "biologically active" or "biologic activity" as used herein means that the neurturin product induces and/or stimulates the differentiation of insulin producing cells from progenitor, e.g. stem cells, and/or promotes the protection, survival, or regeneration of insulin producing cells, e. g. beta cells *in vivo* or *in vitro*. The biologic activity of the modified neurturin protein products as disclosed herein can easily be determined in standard *in vitro* assays as disclosed for the determination of GDNF activity, described in WO 93/06116 and in U.S. Patent Application No. 08/535,681 or as described in
20 the present Examples.

25 As used herein, "fragments" of neurturin refer to portions of neurturin that are generated by any method, including but not limited to enzymatic digestion and chemical cleavage (e.g. CNBr) of neurturin and physical shearing of the polypeptide. Fragments of neurturin may also be generated, e.g. by recombinant DNA technology and by amino acid synthesis.

30 As "active fragment" or "biologically active fragment" of neurturin as used in the present invention refers to any fragment or precursor of the polypeptidic chain of neurturin, alone or in combination with related molecules or residues bound to it, for example, residues of sugars or phosphates, or aggregates of the polypeptide molecule when such fragments or precursors show the same biological activity of neurturin. The term "biologically active fragment" also

relates to a fragment of a neurturin product which induces and/or stimulates the differentiation of insulin producing cells from progenitor, e.g. stem cells, and/or promotes the protection, survival, or regeneration of insulin producing cells, e. g. beta cells *in vivo* or *in vitro*. The biologic activity of a fragment of the modified neurturin protein products as disclosed herein can easily be determined in standard *in vitro* assays as disclosed for the determination of GDNF activity, described in WO 93/06116 and in U.S. Patent Application No. 08/535,681 or as described in the present Examples.

10 The term "homologue" is used herein to relate to a polypeptide related to neurturin by descent from a common ancestral protein sequence. The term, homolog, may apply to the relationship between proteins separated by the event of genetic duplication.

15 The term "low molecular weight substance" refers to a substance with an average molecular weight of between 100 and 12000 Da, preferably of between 200 and 8000 Da and most preferably of about 500 and 7000 Da.

20 The low molecular weight substance may be a polyanionic polymer which is natural or synthetic and which contains a plurality of anionic groups such as carboxylate and/or sulfate groups. For example, the polyanionic polymer may be selected from low molecular weight sulphated saccharides, sulphated cyclodextrins, or sulphated synthetic polymers such as acrylic polymers, aromatic polymers, and/or polyalcohols. More particularly, the polyanionic polymer is selected from low molecular weight heparins or heparin derivatives, heparan sulphates, chondroitin sulfates, dextran sulphates, chemically modified heparin-derived oligosaccharides (list from Wang et al. (2002), supra), heparin-like oligosaccharides, dextran sulphates, sulphated low molecular weight glycosaminoglycans, dextrin-2-sulphates, cellulose sulphates and naphthalene sulfonate polymer (e.g. PRO 2000), PAVAS (a co-polymer of acrylic acid with vinyl alcohol sulphate), the sulphonated polymer PAMPS [poly(2-acryl-amido-2-methyl-1-propanesulfonic acid) (M_w e.g. approximately 7000-12000), chondroitin

5 sulphates, sulphated cyclodextrins, laminarin sulphate (Alban, S. in *Carbohydrates in Drug Design* (Ed. Z.J. Witczak, K.A. Nieforth) Dekker, New York, 1997, pp 209.), polyglycerin sulphates (Türk, H., Haag, R., Alban, S. *Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 162;), pentosan polysulphates (PPS) and derivatives thereof such lactose-modified pentosan polysulphates, fractionated PPS/low molecular weight PPS, fucoidan, or derivatives or combinations thereof.

10 Low molecular weight heparin (LMWH) analogues such as Enoxaparin, Dalteparin or Fragmin are preferred examples of suitable polymers. They are obtained by fractionation and/or limited enzymatic or chemical digestion of heparin, and have an average molecular weight of preferably about 3000 to about 7000 Dalton (Weitz 1997 supra).

15 The term "modified neurturin protein product" as used herein relates to a chemically modified neurturin protein conjugate as well as cell-expressed conjugate comprising a covalently attached polyol moiety.

20 Chemically modified neurturin conjugates may be prepared by one of skill in the art given the disclosures herein or by any of the methods known in the art.

25 The polyol moiety of the neurturin conjugate of the invention can be any water-soluble mono- or bifunctional poly(alkylene oxide) having a linear or branched chain. Typically, the polyol is a poly(alkylene glycol) such as poly(ethylene glycol) (PEG). However, those of skill in the art will recognize that other polyols, such as, for example poly(propylene glycol) and copolymers of polyethylene glycol and polypropylene glycol, can be suitably used. Other neurturin conjugates can be prepared by coupling neurturin to a
30 water-soluble polymer. A non-limiting list of such polymers include other polyalkylene oxide homopolymers such as polypropylene glycols, polyoxyethylenated polyols, copolymers thereof and block copolymers thereof. As an alternative to polyalkylene oxide-based polymers, effectively

- 9 -

non-antigenic materials such as dextran, polyvinyl pyrrolidones, polyacrylamides, polyvinyl alcohols, carbohydrate-based polymers and the like can be used.

- 5 The protein conjugates may also be expressed in prokaryotic or eukaryotic cells well known in the art.

10 The term "neurturin conjugate" relates to a neurturin protein product which comprises a polyol moiety such as polyethylene glycol covalently attached to an amino acid of neurturin. The amino acid can be site-specific at the N-terminal amino acid or at any other amino acid. PEG conjugates can contain one or more PEG molecules covalently attached to any suitable site of the neurturin protein molecule.

15 The term "neurturin protein product", "neurturin product", "neurturin protein" or "neurturin" which are used interchangeably herein, relate to a protein or peptide having a degree of identity to the biologically active human neurturin product resulting in the cleavage of the neurturin precursor having the amino acid sequence published as GenBank Accession Number NP_004549 (SEQ
20 ID NO: 1, Fig. 3) or to the human neurturin precursor itself, that is in excess of 70%, preferably in excess of 80%, more preferably in excess of 90% and most preferably in excess of 95%, variants or derivatives thereof. The degree of identity between the mouse and the human protein is about 91%, and it is contemplated that preferred mammalian neurturin proteins will have
25 a similarly high degree of identity. The percentage of identity of a neurturin product and the human neurturin protein or a precursor may be determined according to standard procedures, e.g. by using the BLAST algorithm. Preferably, the percentage of identity is calculated as the percentage of amino acid residues found in the smaller of the two sequences that align with
30 identical amino acid residues in the sequence being compared, when four gaps in a length of 100 amino acids may be introduced to assist in that alignment.

- 10 -

The term "ortholog" relates to polypeptides in different species that evolved from a common ancestral gene by specification. Orthologs retain the same function in the course of evolution.

- 5 The term "polyethylene glycol" or "PEG" relates to PEG itself as well as derivatives thereof. The polymer PEG is commonly used as methoxy-PEG-OH, (m-PEG), in which one terminus is the relatively inert methoxy group, while the other terminus is a hydroxyl group that is subject to chemical modification. Branched PEGs are also in common use. The number of
- 10 branching arms (m) can range from three to a hundred or more. The hydroxyl groups are further subject to chemical modification. Another branched form, such as that described in PCT patent application WO 96/21469, has a single terminus that is subject to chemical modification. Yet another branched form, has reactive groups, such as carboxyl, along the
- 15 PEG backbone rather than at the end of PEG chains. In addition to these forms of PEG, the polymer can also be prepared with weak or degradable linkages in the backbone. For example, Harris has shown in U.S. patent application Ser. No. 06/026,716, which is incorporated by reference herein in its entirety, that PEG can be prepared with ester linkages in the polymer
- 20 backbone that are subject to hydrolysis. This hydrolysis results in cleavage of the polymer into fragments of lower molecular weight. The copolymers of ethylene oxide and propylene oxide are closely related to PEG in their chemistry, and they can be used instead of PEG in many of its applications.
- 25 The term "PEGylation" comprises covalent attachment of a polyethylene glycol molecule to a substrate, which can be a protein. PEGylation of proteins is widely known in the state of the art and has been reviewed by, for example, Veronese, F. M., *Biomaterials* 22 (2001) 405-417. PEG can be linked using different functional groups and polyethylene glycols with
- 30 different molecular weight, linear and branched PEGs as well as different linking groups (see also Francis, G. E., et al., *Int. J. Hematol.* 68 (1998) 1-18; Delgado, C., et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* 9 (1992) 249-304).

PEGylation can be performed in aqueous solution with PEGylation reagents as described, for example, in WO 00/44785, preferably using NHS-activated linear or branched PEG molecules of a molecular weight between 5 and 40 kDa. PEGylation can also be performed at the solid phase according to Lu, Y. et al., *Reactive Polymers* 22 (1994) 221-229.

Selective PEGylation at the N-terminal amino acid can be performed according to Felix, A. M., et al., *ACS Symp. Ser 680 (Poly(ethylene glycol))* (1997) 218-238. Selective N-terminal PEGylation is achieved during solid-phase synthesis by coupling of a N-PEGylated amino acid derivative to the N-terminal amino acid of the peptide chain. Side chain PEGylation is performed during solid-phase synthesis by coupling of N-PEGylated amino acid derivatives to the growing chain. Combined N-terminal and side chain PEGylation is processed either as described above within solid-phase synthesis or by solution phase synthesis by applying activated PEG reagents to the amino deprotected peptide.

Suitable PEG derivatives are activated PEG molecules with a preferred average molecular weight of from about 5 to about 40 kDa, more preferably from about 20 to about 40 kDa, and most preferably about 30 kDa. The PEG derivatives can be linear or branched PEGs.

Activated PEG derivatives are known in the art and described in, for example, Morpurgo, M., et al., *J. Bioconj. Chem.* 7 (1996) 363-368, for PEG-vinylsulfone. Linear chain and branched chain PEG species are suitable for the preparation of the PEGylated fragments. Examples of reactive PEG reagents are iodo-acetyl-methoxy-PEG and methoxy-PEG-vinylsulfone (m is preferably an integer from about 450 to about 900 and R is lower alkyl, linear or branched, having one to six carbon atoms such as methyl, ethyl, isopropyl, etc., from which methyl is preferred).

As used herein, the term "PEG" or "PEG moiety" is intended to include, but is not limited to, linear and branched PEG, methoxy PEG, hydrolytically or

enzymatically degradable PEG, pendant PEG, dendrimer PEG, copolymers of PEG and one or more polyols, and copolymers of PEG and PLGA (poly(lactic/glycolic acid)).

- 5 The term "PEGylated neurturin" or "neurturin modified by "PEGylation" or "neurturin conjugate comprising a polyethylen glycol moiety" relates to a neurturin protein product produced by a method by which a PEG moiety is covalently attached to form these PEGylated proteins.
- 10 The term "pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant" relates to one and more pharmaceutically and physiologically acceptable compounds such as excipients and auxiliaries, which facilitate processing of the active ingredient(s) into preparations, which can be used pharmaceutically. Details may be found in the latest edition of Remington's
- 15 Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

The term "unmodified control neurturin protein product" relates to a neurturin protein product of the same origin as the correlating modified neurturin protein product which is used as a control.

20

- The term "variant" as used herein relates to a polynucleotide variant which may contain one or more substitutions, additions, deletions and/or insertions, as further described below, relative to a native polypeptide. The term "variant" also encompasses homologous polypeptides of xenogenic origin.
- 25 Typically, a neurturin variant retains biological activity either completely, a substantial proportion thereof, or at least partially as, for example, can be determined using a specific assay as described below. The term "variant" as used herein also encompasses neurturin which was modified by altering the protein sequences by substitutions, additions or deletions providing
- 30 functionally equivalent molecules, as is well known in the art. The latter includes altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted by residues within the sequence resulting in a biologically silent exchange.

Neurturin variants are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the DNA encoding the polypeptide or by in vitro chemical synthesis of the desired polypeptide. It will be appreciated by those skilled in the art that deletions, insertions, and substitutions can be made, resulting in a protein product variant presenting neurturin biological activity.

Mutagenesis techniques for such a substitution, insertion or deletion of one or more selected amino acid residues are well known to one skilled in the art (e.g., U.S. Patent No. 4,518,584, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.)

In a preferred embodiment, amino acid changes are introduced into the region between amino acids 47-69, preferably 51-65, of mature human neurturin (amino acids 141-164, preferably 147-160 as shown in Figure 3). These amino acid changes may comprise at least one deletion or substitution of an arginine residue in this region, e.g. arginine residues 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 and/or 65. Preferred are substitutions of arginine by neutral or acidic amino acids, e.g. glycine, serine, alanine, aspartate or glutamate. Especially preferred is a substitution by glutamate, e.g. R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E and R65E or a neurturin variant comprising at least 2 of these substitutions.

Alternatively and/or additionally an amino acid residue of neurturin, e.g. in the above-indicated region, particularly an arginine residue, may be substituted by lysine in order to facilitate coupling to polyol groups. As there is no lysine in mature human neurturin, such a change allows site-specific modification with polyol groups. Especially preferred is a substitution by lysine in the above-indicated region, e.g. R51K, R52K, R54K, R56K, R57K, R58K, R60K, R61K and R65K or a neurturin variant comprising at least 2 of these substitutions.

Neurturin substitution variants have at least one amino acid residue of the

- 14 -

human or mouse neurturin amino acid sequence removed and a different residue inserted in its place. Such substitution variants include allelic variants, which are characterized by naturally occurring nucleotide sequence changes in the species population that may or may not result in an amino acid change.

Surprisingly, it was found by the present inventors that a pharmaceutical composition as disclosed has an increased bioavailability of its active ingredient, said conjugated neurturin and/or biologically active fragment thereof, compared to a pharmaceutical composition comprising no conjugated neurturin. The invention demonstrates that the conjugation of neurturin protein to a polyol such as PEG improves significantly the serum half life and bioavailability of a neurturin product. Improvement of the bioavailability of a neurturin product in turn may reduce accumulation or processing of the agent at the injection site if applied subcutaneously and may improve local tolerance this way.

The present invention provides for a method of applying the inventive neurturin conjugates as active agents to patients in a much lower dose compared to unmodified control neurturin in order to have a therapeutic effect. This complies with the need for "user-friendly protein therapeutics" and may also result in lower costs for producing active agent and/or pharmaceutical composition.

The present neurturin conjugates also have a higher solubility in aqueous solutions compared to unmodified neurturin which may result in a simplification of formulating the active agent.

As a further advantage, coupling polyols such as PEG to neurturin may reduce immunogenicity to neurturin and therefore the formation of neutralizing antibodies or allergic reactions against the active agent.

Preferably, the neurturin protein product of the present invention is a human

neurturin or a biologically active fragment thereof. Neurturin protein products are preferably produced via recombinant techniques because such methods are capable of achieving high amounts of protein at a great purity, and are not limited to products expressed in bacterial, plant, mammalian, or insect
5 cell systems.

Recombinant neurturin protein products include glycosylated and non-glycosylated forms of the protein. In general, recombinant techniques involve isolating the genes encoding a neurturin protein product, cloning the gene in
10 a suitable vector and/or cell type, modifying the gene if necessary to encode a desired variant, and expressing the gene in order to produce the neurturin protein product.

Alternatively, a nucleotide sequence encoding the desired neurturin product
15 may be chemically synthesized. It is contemplated that a neurturin product may be expressed using nucleotide sequences that vary in codon usage due to the degeneration of the genetic code or allelic variations or alterations made to facilitate production of the protein product by the selected cell.

20 Kotzbauer et al., Nature 384:467-470, describe the identification of a mouse cDNA and amino acid sequence and a human cDNA and amino acid sequence for a neurturin protein, identified herein as SEQ ID NO: 1.

The neurturin products according to the present invention may be isolated or
25 generated by a variety of means. Exemplary methods for producing neurturin products are described in patent application WO 97/08196, which is hereby incorporated by reference. Also described therein are a variety of vectors, host cells, and culture growth conditions for the expression of neurturin protein, as well as methods to synthesize variants of neurturin protein
30 product. Additional vectors suitable for the expression of neurturin protein product in E. coli are disclosed in Patent No. EP 0 423 980, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

- 16 -

30

The biologically active form of the protein neurturin is a disulfide-bonded dimer which can be determined by the molecular weight of purified neurturin. The material isolated after expression in a bacterial system is essentially biologically inactive, and exists as a monomer. Refolding is necessary to produce the biologically active disulfide-bonded dimer. Processes suitable for the refolding and maturation of the neurturin expressed in bacterial systems are substantially similar to those described in WO 93/06116. Standard in vitro assays for the determination of neurturin activity are also substantially similar to those determining GDNF activity as described in WO 93/06116 and in U.S. Patent Application No. 08/535,681, and are hereby incorporated by reference.

Covalent attachment of the inert, non-toxic, big-degradable polymer polyethylene glycol (PEG), also known as polyethylene oxide (PEO), to neurturin has important applications in biotechnology and medicine. PEGylation of neurturin results in improved pharmacokinetics resulting in sustained duration, improve safety (e.g. lower toxicity, immunogenicity and antigenicity), increase efficacy, decrease dosing frequency, improve drug solubility and stability, reduce proteolysis, and facilitate controlled drug release.

The present invention contemplates use of neurturin protein products, e.g. derivatives which are prokaryote-expressed neurturin, or variants thereof, linked to at least one polyethylene glycol molecule, as well as use of neurturin, or variants thereof, attached to one or more polyethylene glycol molecules via an acyl or alkyl linkage. PEGylation may be carried out by any of the pegylation reactions known in the art. See, for example: Focus on Growth Factors, 3 (2):4-10, 1992; EP 0 154 316, the disclosure of which is hereby incorporated by reference; EP 0 401 384; and the other publications cited herein that relate to PEGylation.

The pharmaceutical composition of the present invention has an increased bioavailability of the active ingredient in a mammal, e.g. a human, compared

31

- 17 -

to a pharmaceutical composition which does not contain the PEGylated neurturin (see Figure 2). Preferably, the PEGylated neurturin is present in an amount to provide an at least 2-fold, preferably at least 5-fold and more preferably at least 10-fold increase in the bioavailability of the active ingredient.

The increase of bioavailability may be determined as shown in the Examples of the present application. More particularly, a composition containing the active ingredient in a given amount or dose is compared to a pharmaceutical composition containing the active ingredient in the same dose but without PEGylation. The bioavailability of both compositions may be determined from the plasma concentration after subcutaneous administration to experimental animals, e.g. mice. Preferably, the plasma-concentration is measured over a time period of at least 120 min, preferably of 240 min and most preferably of 24 h (see Figure 2).

The pharmaceutical composition of the present invention may be adapted for administration by any effective route, e.g. by oral, nasal, rectal, pulmonal, topical, transdermal or parenteral routes of administration. Thus, the composition may be a solid or liquid composition, e.g. a tablet, capsule, powder, cream, gel, ointment, solution, emulsion, suspension, lyophilisate etc. Preferably, however, the composition is administered by injection or infusion, more preferably by injection, e.g. by subcutaneous or intravenous injection. The pharmaceutical composition is preferably an aqueous solution.

In addition to the active ingredient and optionally low molecular weight substance such as a polyanionic polymer, the pharmaceutical composition may comprise a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant, such as buffers, agents for adjusting tonicity, stabilizers, fillers, disintegrants, thickeners, etc.

The pharmaceutical composition contains the active ingredient in a therapeutically effective amount or dose. The therapeutically effective dose

- 18 -

depends on the type of the active ingredient, the type and the variety of the disease to be treated and the type of administration. For parenteral compositions containing neurturin as an active ingredient, the therapeutically effective dose is preferably in the range of about 0.001 mg to 500 mg, more preferably from about 0.05 to about 100 mg, most preferably from about 0.01 to about 5 mg per day.

10 The composition is preferably administered to a mammal, particularly a human. Thus, the composition is suitable for human and veterinary medicine. The composition is particularly suitable for the prevention and/or treatment of neurodegenerative or pancreatic disorders, particularly pancreatic autoimmune disorders such as diabetes type I and LADA, or diabetes type II.

15 The neurturin conjugate as described herein may be administered by any suitable means, preferably enterally or parenterally or topically directly to the pancreas, as known to those skilled in the art. The specific dose may be calculated according to considerations of body weight, body surface area or organ size. Further refinement of the calculations necessary to determine the appropriate dosage for treatment involving each of the above mentioned compositions is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed. Appropriate dosages may be ascertained through use of the established assays for determining dosages utilized in conjunction with appropriate dose-response data. The final dosage regimen involved in a method for treating the above described conditions will be determined by the attending physician, considering various factors which modify the action of drugs, e.g., the age, condition, body weight, sex and diet of the patient, the severity of any infection, time of administration and other clinical factors. As studies are conducted, further information will emerge regarding the appropriate dosage levels for the treatment of various diseases and conditions.

It is envisioned that the continuous administration or sustained delivery of a

neurturin conjugate as described herein may be advantageous for a given treatment. While continuous administration may be accomplished via a mechanical means, such as with an infusion pump, it is contemplated that other modes of continuous or near continuous administration may be practiced. For example, chemical derivatization or encapsulation may result in sustained release forms of the protein having the effect of continuous presence, in predictable amounts, based on a determined dosage regimen. Thus, neurturin protein products include proteins derivatized or otherwise formulated to effectuate such continuous administration.

10

In a further preferred embodiment, neurturin conjugate can be delivered directly to progenitor, e.g. stem cells in order to stimulate the differentiation of insulin producing cells *in vitro* or *in vivo*. In this embodiment of the invention, neurturin conjugate may be added preferably at concentrations between 0.1 ng/ml and 500 ng/ml, more preferably between 1 ng/ml and 100 ng/ml, even more preferably between 20 and 80 ng/ml and most preferably 50 ng/ml.

15

The neurturin conjugate as disclosed herein may be used either in a monotherapy or in a combination therapy with other pharmaceutical agents. For example, it may be administered together with other pharmaceutical agents suitable for the treatment or prevention of pancreatic diseases and/or obesity and/or metabolic syndrome, particularly with other pharmaceutical agents suitable for stimulating and/or inducing the differentiation of insulin producing cells from progenitor cells. Further, it may be used together with pharmaceutical agents which have an immunosuppressive activity, e.g. antibodies, polypeptides and/or peptidic or non-peptidic low molecular weight substances as disclosed in WO 2005/51415.

20

25

A further embodiment of the present invention is a variant of human neurturin comprising at least one, e.g. 1, 2, 3 or 4 amino acid changes compared to wild-type human neurturin. The variant of human neurturin may contain one or more substitutions, additions, deletions and/or insertions, as

30

- 20 -

described in detail above, relative to the native human polypeptide. Neurturin variants can be prepared as described above.

5 In a preferred embodiment, amino acid changes are present in the region between amino acids 47-69, preferably 51-65 of mature human neurturin (amino acids 141-164, preferably 147-160 as shown in Figure 3). These amino acid changes may comprise at least one deletion or substitution of an arginine residue in this region, e.g. arginine residues 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 and/or 65. Preferred are substitutions of arginine by neutral or acidic
10 amino acids, e.g. glycine, serine, alanine, aspartate or glutamate. Especially preferred is a substitution by glutamate, e.g. R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E and R65E, or a neurturin variant comprising at least two of these substitutions.

15 Also preferred are variants of human neurturin, wherein alternatively and/or additionally an amino acid residue, e.g. in the above-indicated region, particularly an arginine residue, is substituted by lysine. Thereby, site-specific coupling of the neurturin variant to polyol groups is facilitated. Especially preferred is a substitution by lysine in the above-indicated region,
20 e.g. R51K, R52K, R54K, R56K, R57K, R58K, R60K, R61K and R65K or a neurturin variant comprising at least 2 of these substitutions.

Neurturin substitution variants according to the present invention have at least one amino acid residue of the human neurturin amino acid sequence
25 removed and a different residue inserted in its place. Such substitution variants include allelic variants which are characterized by naturally occurring nucleotide sequence changes in the species population that may or may not result in an amino acid change.

30 The present invention further provides a method for administering a pharmaceutical composition to a subject in need thereof, wherein said composition comprises a pharmaceutically active amount or dose of at least one neurturin protein product conjugated with at least one polyol such as

PEG or a biologically active fragment of such conjugated neurturin as an active ingredient together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant.

- 5 The invention even further provides a method for administering a pharmaceutical composition to a subject in need thereof, wherein said composition comprises a pharmaceutically active amount or dose of at least one modified neurturin protein product or a biologically active fragment thereof as an active ingredient together with a low molecular weight
10 substance together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant.

Figures

- 15 The following Figures and Examples illustrate the invention and are non-limiting embodiments of the invention as claimed below. Numerous additional aspects and advantages of the invention will become apparent to those skilled in the art upon consideration of the following description of the Figures.

20

Figure 1: Biological activity of PEGylated neurturin in cell culture

- The reporter cell line was subjected to increasing concentrations of neurturin or neurturin conjugated with PEG (PEGylated neurturin). The resulting
25 reporter gene activity (relative light units (RLU) given on the y-axis) was plotted against the final concentration of the test agent (given on the x-axis in ng/ml; Figure 1A and B). Two independently produced batches of unmodified neurturin were used as experimental controls (PeproTech; Lot0805112 and Lot0106112) and their relative activity was compared to those of the three
30 PEGylated conjugates (mono-mPEG-NHS-neurturin, mono-mPEG-CHO-neurturin and mono-CES0310-neurturin). Given values are means of at least 3 wells $\pm$ S.D. The calculated EC_{50} of the various tests are: Neurturin (Lot0805112, unmodified protein): $EC_{50} = 2,2$ ng/ml, neurturin (Lot0106112 ,

unmodified protein): $EC_{50} = 1,2$ ng/ml, mono-CES0310-neurturin: $EC_{50} = 12$ ng/ml (Figure 1A), and neurturin (Lot0106112, unmodified protein): $EC_{50} = 3,8$ ng/ml, mono-mPEG-NHS-neurturin: $EC_{50} = 9,7$ ng/ml, and mono-mPEG-CHO-neurturin: $EC_{50} = 7,4$ ng/ml (Figure 1B).

5

Figure 2: Pharmacokinetic (PK) studies after subcutaneous administration of test agents in mice

Figure 2A and B show the neurturin plasma concentrations in ng/ml at various time points after the administration of 0,050 mg/kg BW (Fig. 2A) or 0,50mg/kg BW (Fig. 2B) neurturin or PEGylated neurturin to mice. Resulting plasma levels were determined by a neurturin ELISA assay. Time point zero shows the average background signal for neurturin in mouse serum using this ELISA assay. The background values were calculated from independently measured values from sera of 12 (Fig. 2A) or from 11 (Fig. 2B) untreated mice. The other indicated values are means of measured serum levels from three animals $\pm$ SD. Figure 2A shows PK data for the neurturin conjugate mono-NHS-neurturin stemming from two independent experiments (mono-NHS-neurturin_Exp.1 and -_Exp.2). Figure 2B shows data derived from yet another experiment where mice were treated with 0,50 mg/kg BW mono-NHS-neurturin.

For area under the curve (AUC) analysis covering all measured time points, the baseline was set to 0.6 ng/ml (the average background value at the time point 0): Neurturin unmodified protein: 18,8 ng*min/ml, mono-mPEG-NHS-neurturin_Exp1: 409 ng*min/ml, mono-mPEG-NHS-neurturin_Exp2: 918 ng*min/ml, mono-CES0310-neurturin: $EC_{50} = 142$ ng*min/ml (Figure 2A), and neurturin unmodified protein: 324 ng*min/ml, mono-mPEG-NHS-neurturin: 1157 ng*min/ml, and mono-mPEG-CHO-neurturin: 845 ng*min/ml (Figure 2B).

For the area under the curve (AUC) analysis (Figure 2A and B) of neurturin serum levels the baseline was set to 0,6 ng/ml neurturin which corresponds

to the average background level determined in the serum of untreated mice.

Figure 3:

5 Protein sequence of human neurturin precursor as published by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (accession number: NP_004549). The sequence of the mature protein which corresponds to the biologically as well as pharmacologically active form is highlighted in bold.

10 **Figure 4:**

Figure 4A. Expression of human neurturin and mutated neurturin variants. Native-PAGE/Western-blot of concentrated supernatant from HEK-293 cells expressing neurturin and neurturin variants (numbering of the positions according to the sequence of mature human neurturin, R: arginine, E: glutamic acid).

Figure 4B. Neurturin ELISA: Representative standard curve using human recombinant neurturin expressed from *E. coli*.

20

Figure 5: Quantification of biological activity of neurturin

Figure 5A. Cellular neurturin biological activity assay: Tyrosine hydroxylase reporter gene activity stimulated by exogenous human recombinant neurturin from *E.coli* in increasing concentrations combined with increasing serum concentrations.

25

Figure 5B. Biological activity of neurturin variants (n.d. : not detected)

30

Figure 6: Alignment of neurturin sequences from different vertebrate species

Amino acids 47-69 of mature human neurturin are shown (numbering of the

positions according to the sequence of mature human neurturin peptide, genbank accession number NP_004549, mature peptide aa 96-197). Amino acid variations different to human neurturin are printed bold and underlined (GenBank Accession Numbers in brackets).

5

Figure 7: DNA Sequence of a neurturin expression construct: Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturin (wt)

10

Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturin(wt) cloned into pMA vector. The DNA-sequence of the sense and the anti-sense strand are shown together with restriction sites and the resulting amino-acid sequence of the coding region.

Figure 8: Anti-neurturin antibody ELISA

15

Anti-neurturin antibody ELISA: left: Standard curve using anti-neurturin IgG, right: Standard curve using anti-neurturin IgG/IgM

It should be noted that all preferred embodiments discussed for one or several aspects of the invention also relate to all other aspects.

20

The versatility of the present invention is illustrated, but not limited, by the following Examples.

EXAMPLES

25

Example 1 – PEGylation of neurturin

30

Polyethylenglycol groups (PEG) were conjugated to neurturin through a process called PEGylation. This technology is widely used for the modification of therapeutic proteins and the procedure is familiar to anyone skilled in the art. In the present invention, mono-PEGylated neurturin conjugates were produced by linking a single PEG molecule to the N-terminal amino acid of one of the two subunits of the homodimer. Two

- 25 -

different conjugates of mono-PEGylated neurturin were produced that differ in size and structure of the attached PEG as well as in the method of production to conjugate the PEG to the protein. The conjugate disclosed as "mono-mPEG-NHS-neurturin" herein was produced using an about 5 kDa linear PEG-reagent (mPEG-succinimidyl succinat; NOF, Japan). This so-called "NHS-method" is the most commonly used method for PEGylation of soluble proteins. Further, a linear 5 kDa polyethylene glycol butyraldehyde (Nektar, 082M0H01) was used to generate the conjugate disclosed as "mono-mPEG-CHO-neurturin". Under specific experimental conditions NHS esters or aldehydes efficiently react with free amino groups of proteins and peptides. In yet another conjugate disclosed as "mono-CES0310-neurturin", the N-terminal amino acid of one chain of the neurturin homodimer was conjugated to a six-arm branched PEG of about 5 kDa using a PEGylation methodology known in the prior art (see, for example, but not limited to, DE 2005 100 04 157.0, EP 1 631 545 A2; WO 04/108634; WO 07/025763; CA 2528667). Neurturin does not contain lysine residues, therefore the PEGylation reactions described above are expected to primarily lead to a N-terminal PEGylation via the reactive amino groups of the N-terminal amino acids of the neurturin homodimer. The quality (size and purity) of the PEGylated products was confirmed using standard biochemical methodology known to anyone skilled in the art.

Example 2 – Biological activity of PEGylated neurturin conjugates or variants thereof

25

The biological activity of the neurturin conjugates was evaluated using a cell based reporter assay. It was determined how strong neurturin or its PEGylated conjugates activate a reporter gene construct in a cell line expressing neurturin receptors on the surface. In this assay the activity of both PEGylated neurturin conjugates was found to be reduced 3 to 10 fold relative to that of unmodified neurturin (Figure 1A and B).

30

The human neuroblastoma cell line TGW (JCRB0618) which expresses the

- 26 -

receptors for neurturin on the cell surface was stably transfected with a neurturin reporter gene construct. The reporter gene constructs contains a luciferase gene which is among other regulatory elements under the transcriptional control of repetitive serum response elements (SRE). In these
5 cells the expression of luciferase is stimulated in response to the activation of the MAPK pathway, for instance through binding of neurturin to its surface receptors. The assay is carried out in 96 well plates. The luciferase activity was measured by addition of luciferin substrate to the wells and read-out was generated on a Analyst reader (Molecular Devices) operating in the
10 luminescence mode.

Example 3 – Improved bioavailability of PEGylated neurturin conjugates or variants thereof

15 The relative bioavailability of the PEGylated conjugates of neurturin was estimated with the help of PK studies in mice (Fig. 2A and B). In these experiments the protein was subcutaneously injected into the neck region of mice. Following, the serum concentration of neurturin was determined at defined time points after the delivery of the protein using a specific neurturin
20 ELISA assay (Fig. 2A and B). The sensitivity of this neurturin ELISA assay was limited because of relatively high background signals in the presence of mouse serum, as detected by the use of serum from mice that were not treated with neurturin (point zero values). After the injection of 0,050 mg/kg body weight (BW) unmodified neurturin, the neurturin serum levels did not
25 significantly exceed this background level at any time point. On the contrary, when the same amount of PEGylated neurturin was applied a significant increase in serum levels of the injected protein was detected, irrespective of the kind of the PEG modification (Fig. 2A). When the amount of injected unmodified neurturin was increased 10 times (0,5 mg/kg BW) the protein
30 was significantly detected in the serum at time points 60, 90, 120 and 180 minutes (Fig. 2B). Significance of this observation was confirmed using the T-test and p-values < 0,05 were calculated. Also, the serum levels of the PEGylated neurturin derivatives given at the 0,5 mg/kg BW dose were a few-

fold higher than these of the unmodified protein (Fig. 2A and B).

The neurturin conjugates presented herein consistently demonstrate higher serum levels relative to those of the unmodified protein. In conclusion,
5 PEGylation of neurturin significantly improves the bioavailability of neurturin.

Example 4 – Neurturin variants

Basic arginine residues that are located within the basic patch of neurturin
10 (amino acids 51-65 of the mature protein) were replaced by acidic glutamic acid residues through site directed PCR-based mutagenesis. Briefly, the coding sequence of mature human neurturin with an additional N-terminal eukaryotic secretion signal peptide was modified by PCR-based mutagenesis using mismatch primers introducing the desired mutations:

15

R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E, R63E, or R65E

(numbering of the positions according to the sequence of mature human neurturin peptide, Genbank Accession Number NP_004549, mature peptide
20 aa 96-197, this sequence is also shown in Figure 3; R: arginine; E: glutamic acid).

The resulting plasmids were purified and the correctness of the coding sequence was checked by sequencing. The coding sequences were cloned
25 via flanking HindIII and XhoI cloning sites into pCDNA3.1+ vector (Invitrogen Cat. No. V790-20) for eukaryotic expression.

For eukaryotic expression, these vectors as well as empty control vector and GFP expression vector as transfection control were transiently transfected in
30 HEK-293 cells cultured on 175 cm² tissue culture vessels with 25 ml medium, each. Media harvest was performed 48 hours after transfection and the media supernatant was concentrated by the use of ultra-filtration columns to app. 0.4 ml, each.

42

The expression of wt human neurturin and the mutated variants was first controlled by native-PAGE/Western-blot using neurturin-specific antibodies for detection (see Figure 4). As control human recombinant neurturin expressed from *E. coli* was used.

Figure 4A shows that human wild-type neurturin (wt) as well as all modified neurturin variants except R63E were expressed in similar amounts. The apparent mass of the neurturin variants ranged between 20 and 25 kDa similar to wt neurturin.

The yield of expressed neurturin was determined by an ELISA specific for neurturin. Briefly, rabbit anti-neurturin-antibody was coated onto micro-wells for neurturin capture from the neurturin containing concentrated media supernatant. After washing, the captured neurturin was quantified by a luminescence read-out using biotin-conjugated goat anti-neurturin-antibody followed by the use of peroxidase-conjugated streptavidin. Human recombinant neurturin expressed from *E. coli* was used to establish a standard curve (see Figure 4B).

Furthermore, the biological activity of the expressed neurturin variants were quantified in a specific cellular assay. The assay principle is based on experiments by Tanaka et al., 2002, 2003 (Tanaka M, Xiao H, Kiuchi K. Heparin facilitates glial cell line-derived neurotrophic factor signal transduction. *Neuroreport*. 2002 Oct 28;13(15):1913-6; Tanaka M, Xiao H, Hirata Y, Kiuchi K. A rapid assay for glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin based on transfection of cells with tyrosine hydroxylase promoter-luciferase construct. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2003 May;11(2): 119-22.) showing the induction of a tyrosine hydroxylase (TH) reporter gene construct by neurturin stably expressed in the human TGW neuroblastoma cell line. Briefly, TGW cells over-expressing the tyrosine hydroxylase (TH) reporter gene construct were treated with the neurturin containing samples leading to induction of MAPK pathway by neurturin signaling. The reporter

- 29 -

gene constructs contains a luciferase gene under control of repetitive serum response elements (SRE). The expression of luciferase is depending of MAPK pathway activation. The assay is carried out in 96 well plates. neurturin mediated luciferase expression is measured by addition of luciferin and analyzed with a luminescence reader.

A representative experiment demonstrating the quantification of the biological activity of neurturin using human recombinant neurturin expressed in *E. coli* as standard in combination with increasing serum concentrations is shown in Figure 5A.

Figure 5B shows that wild-type recombinant human neurturin as well as all neurturin variants except R63E were expressed in similar amounts resulting in protein concentrations between 1.2 - 1.7 g/l, and all expressed variants displayed a similar biological activity in vitro compared to wild-type recombinant human neurturin with an EC_{50} between 0.32 - 0.89 ng/ml (see Figure 5B). The human recombinant neurturin from *E. coli* used for comparison showed a weaker potency with an EC_{50} of 2.20 ng/ml probably resulting from a portion of not properly refolded neurturin in the sample (see Figure 5B).

Thus, Figure 5 shows that modifications in neurturin's "heel" region such as an introduction of a negatively charged, acidic amino acid into the basic patch does not compromise the biological activity of neurturin in general. This is surprising that the prior art shows that a modification from basic to acidic amino acids in the heel region would interfere with the biological activity of neurturin (see sequence and structure comparisons with other GFL, as discussed above).

The failure of expressing neurturin variant R63E shows that at this position a change from arginine to glutamic acid is not tolerated. Nevertheless, other modifications not resulting in a complete change of amino acid charge are functional. A sequence comparison of known neurturin homologs shows that

- 30 -

a R63E variant exists in the human neurturin homolog of *Ornithorhynchus anatinus*, *Monodelphis domestica*, and *Gallus gallus*. Also natural variants of the arginin residues at position 52, 57, 58, and 61 exist in different neurturin homologs (see Figure 6).

5

In order to create biologically active neurturin variants with improved bioavailability, the inventors replaced basic arginines in the "heel" region with Lysine. As arginine and lysine are structurally related, such exchanges are expected to affect the structure of the neurturin molecule only minimally.

10

Such changes are enabling the site-specific directed PEGylation of neurturin via the the primary amine of the lysine side chain in a region of the protein shown to tolerate substantial amino acid changes, and which is therefore not important for biological activity. This reaction is highly specific since no lysine is present in the mature native human neurturin sequence. Reactions of

15

activated PEG with other amines are minimized by optimizing reaction conditions, e.g. pH, temperature and reaction time. By placing a PEG modification within the basic patch of the "heel" region, two objectives are achieved: (i) the benefits of protein PEGylation (improved bioavailability via reduced renal clearance, reduced immunogenicity, improved protein

20

stability) can be obtained while minimizing effects on protein activity and (ii) PEGylation in this region is expected to shield the basic patch by preventing interactions with negatively charged cell surface proteoglycans, which is also expected to improve protein bioavailability.

25

In a first step, the coding sequence of mature human neurturin which is optimized for human codon usage (with an additional N-terminal signal peptide for eukaryotic secretion) and an additional purification tag (repeat of six histidine residues with an additional site for cleavage of this purification tag with factor-Xa) is modified by PCR-based site directed mutagenesis.

30

Here, codons are exchanged at arginine residues 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63, or 65 with the codons for lysine residues.

The resulting expression construct referred to as **Kr-G3-H6-G3-Xa-**

rhneurturin in this invention containing the following features:

- 5 • Kr: DNA-sequence of mouse kringle-containing transmembrane protein 2, amino acids 1 - 26, signal peptide (GenBank Accession Number NP_082692) for cytoplasmic secretion optimized for human codon usage (amino acid sequence: MGTPHLQGFLLLFPLLLRLHGASAGS; SEQ ID NO: 2).
- 10 • G3: DNA-sequence of a glycine spacer optimized for human codon usage (amino acid sequence: GGG; SEQ ID NO: 3).
- H6: DNA-sequence of a 6-histidine tag for purification purposes optimized for human codon usage (amino acid sequence: HHHHHH; SEQ ID NO: 4).
- 15 • Xa: DNA-sequence of Factor-Xa protease recognition site optimized for human codon usage (amino acid sequence: IEGR; SEQ ID NO: 5). Factor-Xa protease cuts C-terminal after the arginine.
- 20 • rhneurturin: DNA-sequence of mature recombinant human neurturin optimized for human codon usage (amino acid sequence: ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACEAAARVY DLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHTV HELSARECACV; SEQ ID NO: 6). Single arginine codons at positions 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63, or 65 are replaced by the lysine codon AAG in the respective neurturin variant expression construct.

25 The complete DNA sequence of Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturin(wt) cloned into pMA vector is shown in Figure 7; SEQ ID NO: 7.

Example 5 – Pegylation of neurturin Variants

30 The resulting constructs are cloned in the eukaryotic expression vector pcDNA3.1+ which are transfected into HEK-293 cells for the expression of the modified neurturin variants as describe above.

The expressed neurturin variants are purified by ultra-filtration and by affinity

chromatography by means of the introduced purification tag.

The structure, purity and biological activity of the resulting neurturin variant preparations are checked by native-PAGE/Western-blot and neurturin activity assay as shown above.

Biological active neurturin variants which are expressed with sufficient yield and are purified to acceptable purity are used for covalent modification with different mono-disperse PEGs. This PEGs have a preferably size of 2.5 - 30 kDa, are linear or branched and activated with *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ester. The *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ester is spontaneously reactive with primary amines, providing for efficient PEGylation of proteins. Other PEG derivatives are for example but not limited to molecules with different sizes, not mono-disperse or with different branching patterns and coupling chemistries may be applied as well.

After the reaction, the purification tag is cleaved at the introduced proteinase site by factor-Xa and PEG-neurturin variants are purified by size exclusion and/or affinity chromatography.

A number of additional purification tags and protease site/recombinant protease combinations are well known in the art and may replace the His-Tag and/or factor-Xa site/factor Xa cleavage. Alternatively, the neurturin protein containing the introduced PEGylation site(s) may be purified from the supernatant of eukaryotic expression systems or from the lysate or supernatant of overexpressing bacteria without purification tag by chromatographic methods.

The structure, purity and biological activity of the resulting PEG-neurturin variant preparations are checked by SDS-PAGE/Western-blot, native-PAGE/Western-blot, and neurturin activity assay as shown above.

Purified PEG-neurturin variants showing sufficient biological activity in vitro

- 33 -

are assayed in vivo for their pharmacokinetic behavior after subcutaneous administration of 50 $\mu\text{mol/kg}$ s.c. to mice and rats. Plasma neurturin concentration is determined by neurturin ELISA at baseline, and at 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 and 8 hours after administration.

5

Selected PEG-neurturin variants showing improved bioavailability compared to wt neurturin are tested for their efficacy in vivo by subcutaneous administration to neo STZ rats once daily 50 $\mu\text{mol/kg}$ for 6 days. To assay beta-cell function, blood glucose is determined every day, and pancreatic insulin content is determined after 6 days treatment compared to vehicle control and wt neurturin groups.

10

Example 6 – Immunogenic potential of pegylated neurturin

Human recombinant wt neurturin has an immunogenic potential as demonstrated by the appearance of anti-neurturin antibodies after administration to adult mice for more than 2 weeks. The anti-neurturin antibodies have been detected with a specific assay. Briefly, recombinant human neurturin was coated on microplates to capture serum antibodies. After washing, the captured anti-neurturin antibodies were quantified by a luminescence read-out using biotin-conjugated goat anti-IgG antibody or goat anti-IgG/IgM antibody followed by the use of peroxidase conjugated streptavidin. Anti-neurturin IgG and anti-neurturin IgM diluted in serum was used to establish standard curves (see Figure 8).

20

25

As the PEGylation of pharmacologically active proteins reduces their immunogenic potential, selected PEG-neurturin variants with improved bioavailability and sustained potency are tested for their immunogenic potential by subcutaneous administration of once daily 50 $\mu\text{mol/kg}$ for 28 days in adult mice. The appearance of anti-neurturin antibodies is determined by anti-neurturin antibody ELISA every week compared to vehicle control and wt neurturin groups.

30

- 34 -

Claims

- 5 1. A neurturin conjugate comprising a polyol moiety covalently bound to a human neurturin protein product or a biologically active fragment thereof.
- 10 2. The neurturin conjugate according to claim 1, comprising a polypeptide encoded by the amino acid sequence set forth in SEQ ID. NO. 1, or a homologue, ortholog, variant, analog, derivative, biologically active fragment, or biologically active mutant thereof.
- 15 3. The neurturin conjugate according to claim 1 or 2, wherein the polyol moiety is a polyethylene glycol moiety.
4. The neurturin conjugate according to any one of the claims 1-3, wherein the polyol moiety is a single chain polyol moiety.
- 20 5. The neurturin conjugate according to any one of the claims 1-3, wherein the polyol moiety is a branched chain polyol moiety.
6. The neurturin conjugate according to any one of the claims 1-3, wherein the polyol moiety is a polyalkylene glycol moiety.
- 25 7. The neurturin conjugate according to any one of the claims 1-6, having the same or a higher in vivo neurturin activity as native human neurturin.
8. The neurturin conjugate according to any one of the claims 1-7 having at least one amino acid change compared to human neurturin.
- 30 9. The neurturin conjugate according to claim 8, wherein the amino acid change is between amino acids 47-69, preferably 51-65 of mature human neurturin.

10. The neurturin conjugate according to any one of claims 8 or 9, wherein at least one of the arginine residues 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 or 65 is deleted or substituted.
- 5 11. The neurturin conjugate according to claim 10, wherein at least one arginine residue is substituted by a neutral or acidic amino acid residue, e.g. glutamic acid.
- 10 12. The neurturin conjugate according to any one of claims 8-10, wherein at least one lysine residue is introduced.
13. A pharmaceutical composition comprising at least one neurturin protein product and/or a biologically active fragment thereof conjugated to at least one polyethylene glycol molecule as an active ingredient together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant.
- 15 14. The composition of claim 13, wherein said neurturin protein product is a human neurturin protein product or a biologically active fragment thereof.
- 20 15. The composition of any one of the claims 13 or 14, wherein said modified neurturin protein product is mono-PEGylated, comprising a single polyethylene glycol molecule chain.
- 25 16. The composition of any one of the claims 13 or 14, wherein said modified neurturin protein product is oligo- or poly-PEGylated, comprising two, three, four or several polyethylene glycol molecule chains.
- 30 17. The composition of any one of the claims 13-16, wherein said modified neurturin protein product comprises at least one linear polyethylene glycol molecule chain.

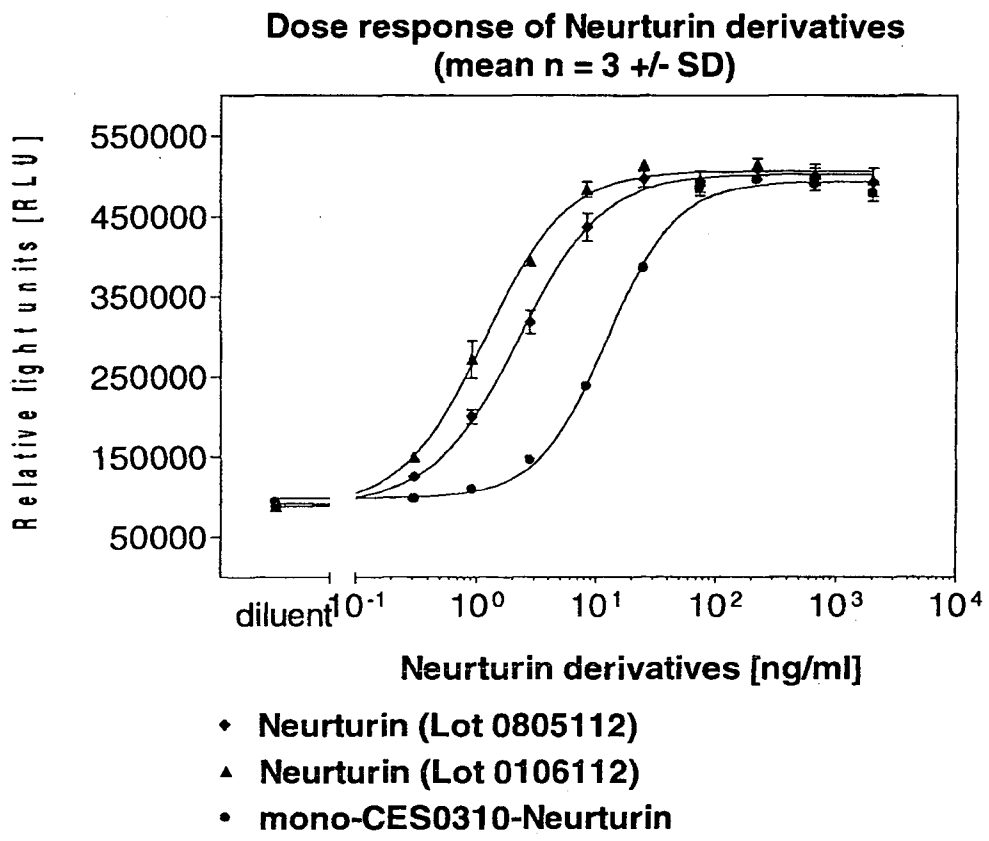
- 36 -

18. The composition of any one of the claims 13-16, wherein said modified neurturin protein product comprises at least one branched polyethylene glycol molecule chain.
- 5 19. The composition of any one of the claims 13-18, wherein said polyethylene glycol molecule has an average molecular weight of 100 to 10000 Da, preferably 200 to 8000 Da and most preferably of 1000 to 7000 Da.
- 10 20. The composition of any one of the claims 13-19, wherein said polyethylene glycol molecule is linked to the N-terminal amino acid of said modified neurturin protein product.
- 15 21. The composition of any one of the claims 13-20, wherein said polyethylene glycol molecule is linked to said modified neurturin protein product via an acyl or alkyl linkage.
- 20 22. The composition of any one of the claims 13-21, wherein said polyethylene glycol molecule is terminated by an OH-, OCH₃- or OEt-group.
- 25 23. The composition of any one of the claims 13-22, which has an increased bioavailability of the active ingredient compared to a composition with an unmodified control neurturin protein product.
- 30 24. The composition of any one of the claims 13-23, wherein said modified neurturin protein is present in an amount to provide an at least 2-fold, preferably at least 5-fold and more preferably at least 10-fold increase in the bioavailability of the active ingredient.
25. The composition of any one of the claims 13-24 for injection or infusion.
26. The composition of claim 25 for subcutaneous or intravenous injection.

27. The composition of any one of the claims 13-26 for the prevention or treatment of pancreatic or neurodegenerative disorders.
- 5 28. The composition of claim 27 for the prevention or treatment of diabetes mellitus type I, LADA and diabetes mellitus type II.
29. The composition of any one of the claims 13-28 for administration to a mammal, particularly a human.
- 10 30. A variant of human neurturin comprising at least one, e.g. 1, 2, 3 or 4 amino acid changes compared to wild-type human neurturin.
31. The variant of human neurturin of claim 30, wherein the amino acid changes are as defined in claims 9-12.
- 15 32. A method for administering a pharmaceutical composition to a subject in need thereof comprising a pharmaceutically active amount of at least one modified neurturin protein product or a biologically active fragment thereof which is conjugated to at least one polyethylene glycol molecule as an active ingredient together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant.
- 20 33. A method for administering a pharmaceutical composition to a subject in need thereof comprising a pharmaceutically active amount of at least one modified neurturin protein product or a biologically active fragment thereof which is conjugated to at least one polyethylene glycol molecule as an active ingredient together with a low-molecular weight substance together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant.
- 25 30

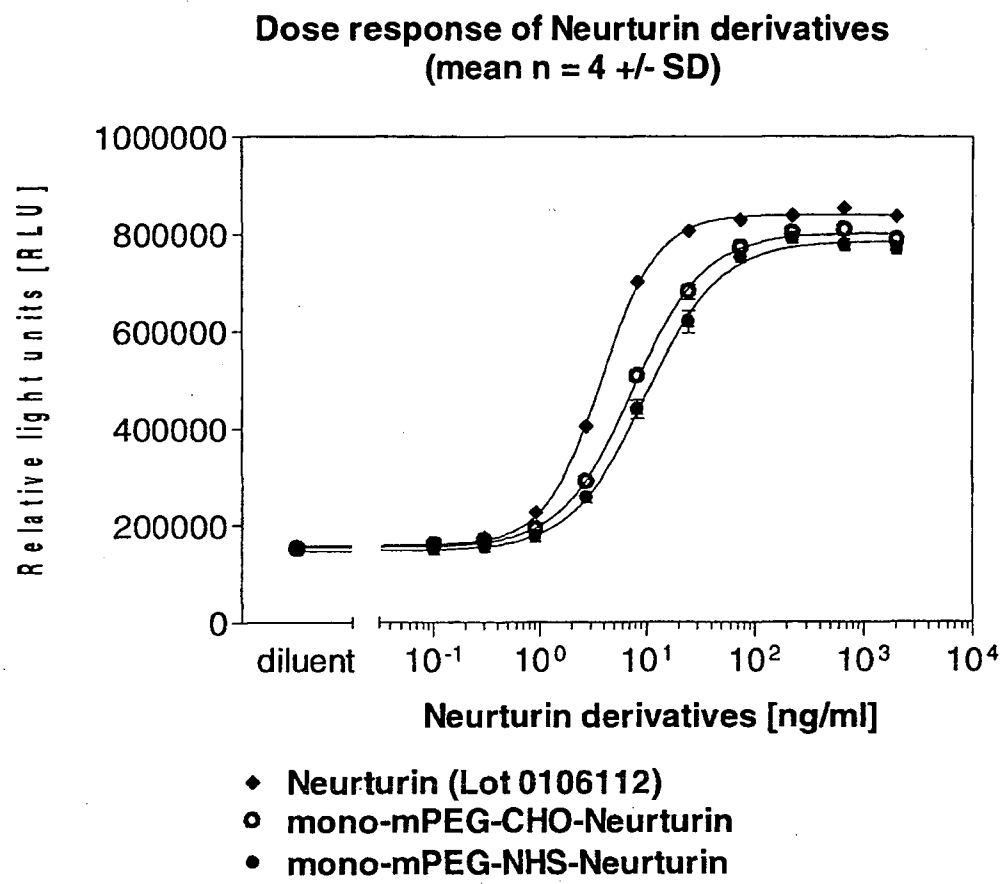
SD

Figure 1A



S3

Figure 1B



S4

Figure 2A

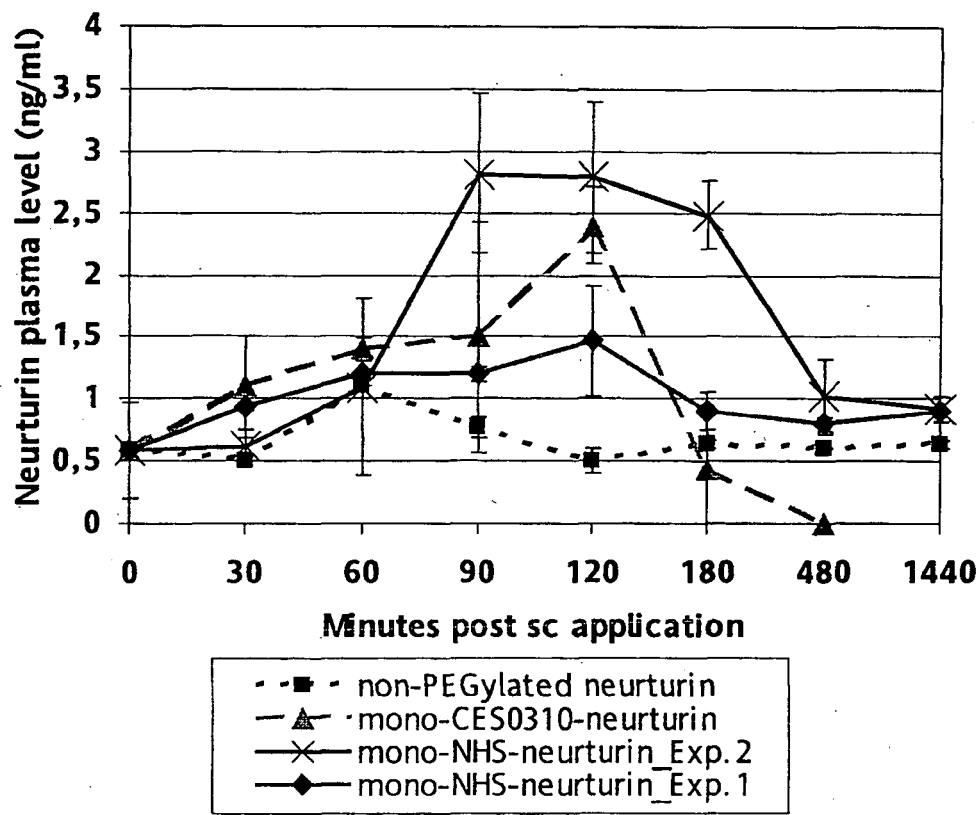
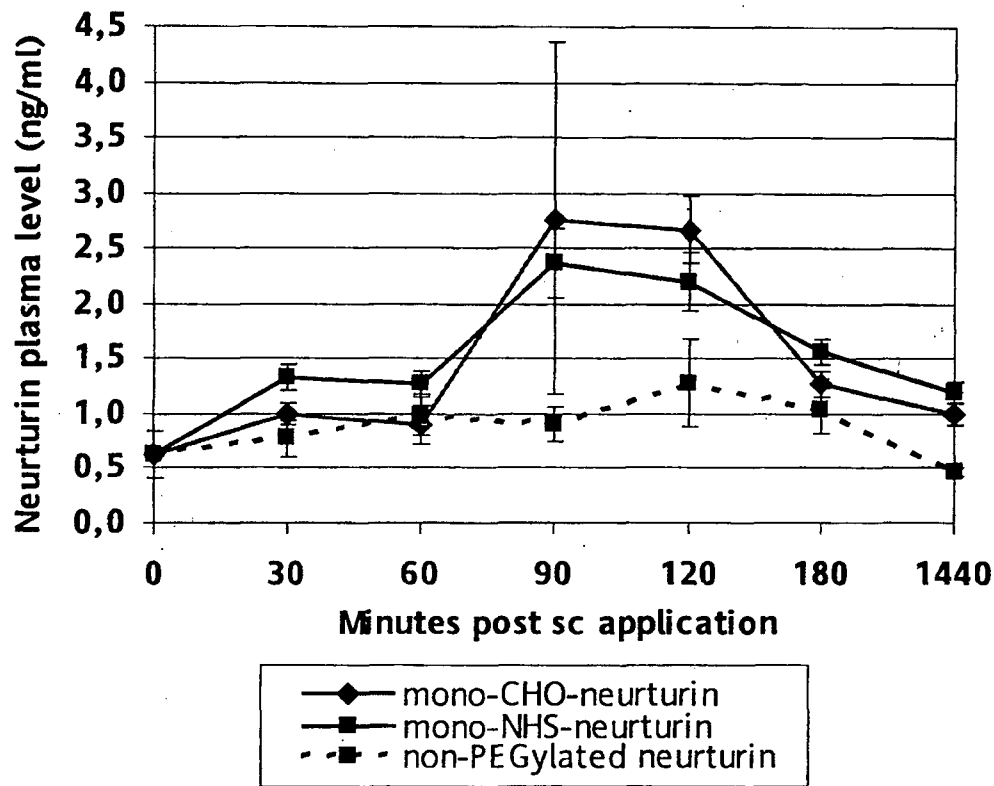


Figure 2B



26

Figure 3

MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCREGLLLS HRLGPALVPL HRLPRTLDR
IARLAQYRAL LQAPDAMEL RELTPWAGRP PGPRRRAGPR RRRAR**ARLGA**
RPCGLRELEV RVSELGLGYA SDETVLFRYC AGACEAAARV YDLGLRRLRQ
RRRLRRERVR AQPCCRPTAY EDEVSFLDAH SRYHTVHEL S ARECACV

57

Figure 4

Figure 4A

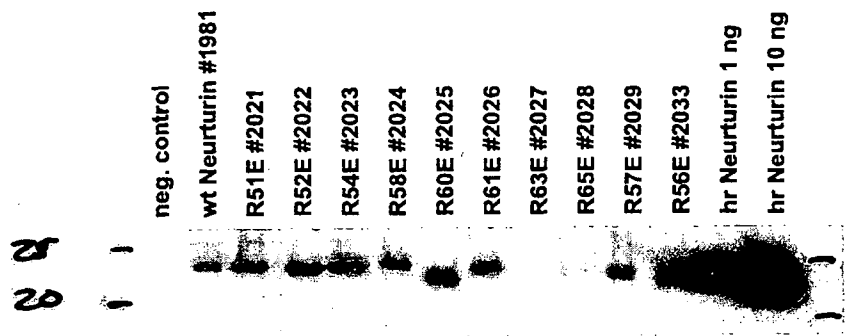


Figure 4B

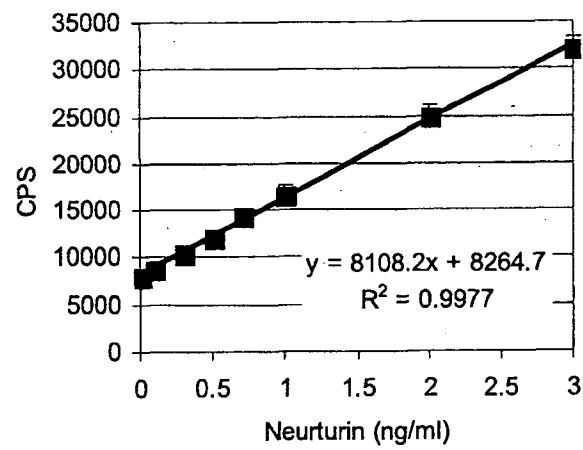


Figure 5

Figure 5A

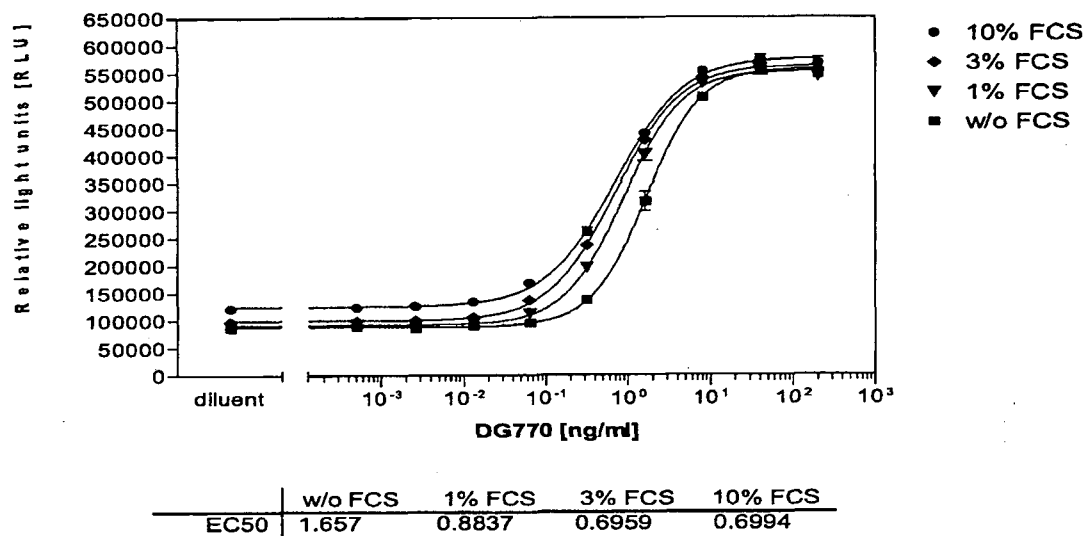


Figure 5B

position of mutated amino acid (human mature Neurturin)	Neurturin Concentration [ng/ml] by Neurturin ELISA	EC ₅₀ [ng/ml] of Neurturin activity by cellular tyrosine hydroxylase reporter gene assay
control	n.d.	n.d.
wt	1500	0.71
R51E	1600	0.58
R52E	1500	0.32
R54E	1700	0.41
R56E	1600	0.48
R57E	1300	0.58
R58E	1200	0.89
R60E	1600	0.47
R61E	1600	0.48
R63E	n.d.	n.d.
R65E	1500	0.37
wt (<i>E.coli</i>)	1500	2.20

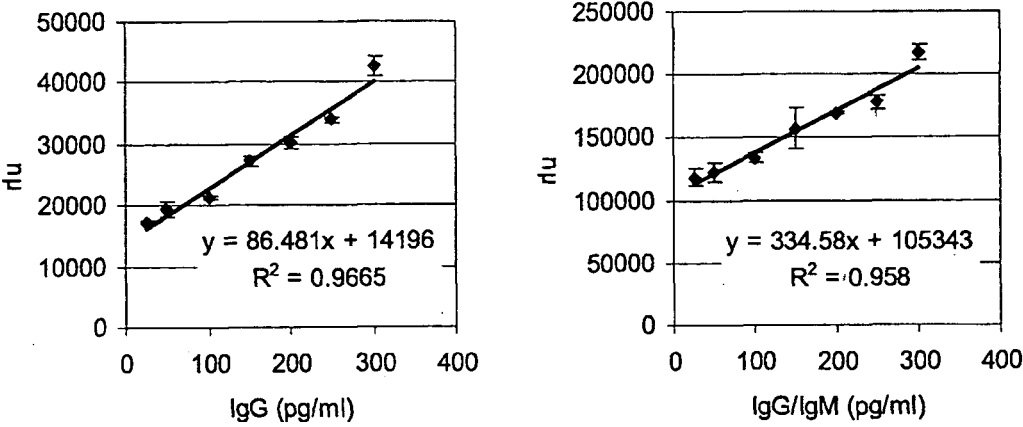
Figure 6

<i>Homo sapiens</i> (NP_004549)	DLGLRRLRGRRRLRRERVRAQPC
<i>Macaca mulatta</i> (XP_001085705.1)	DLGLRRLRGRRRLRRERVRAQPC
<i>Bos taurus</i> (XP_603915.2)	DLGLRRLRGRRRVRRERVRAQPC
<i>Canis familiaris</i> (XP_854570)	DLGLRRLRGRRRVRRERVRAQPC
<i>Mus musculus</i> (NP_032764.1)	DLGLRRLRGRRRVRRERARAHP
<i>Rattus norvegicus</i> (NP_445851.1)	DLGLRRLRGRRRVRRERVRAHP
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (XP_001509015.1)	DLGLRRLRGRRRVRRKRVRAQPC
<i>Monodelphis domestica</i> (XP_001369475.1)	DLGLRRLRGRRRVRRKIRARPC
<i>Gallus gallus</i> (NP_001074973.1)	DL <u>SL</u> RS <u>VS</u> RR <u>KK</u> IR <u>KE</u> KVRA <u>RP</u> PC

Figure 7

[illegible]

Figure 8



62
- 5. Nov. 2008

1/2

SEQUENCE LISTING

<110> DeveloGen AG
<120> Novel pegylated variants of neurturin for pharmaceutical use
<130> 41112P EP
<160> 1
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 197
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(197)
<223> human neurturin precursor

<400> 1

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

CONJUGADOS DE NEURTURINA NOVEDOSOS PARA USO FARMACEUTICOCAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con la
5 modificación de la neurturina humana para incrementar su
vida media en suero y perfil farmacocinético. En
particular, la invención se relaciona con conjugados de
neurturina novedosos que comprenden neurturina o fragmentos
biológicamente activos de los mismos unidos covalentemente
10 a porciones de poliol, preferiblemente polietilen glicol.
La invención se relaciona además con composiciones
farmacéuticas con mayor biodisponibilidad que comprenden
conjugados de neurturina novedosos como agente activo para
terapia, tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la
15 diabetes y neurodegeneración.

Las células beta pancreáticas secretan insulina
en respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre.
La insulina entre otras hormonas juega un papel clave en la
regulación del metabolismo combustible. La insulina conduce
20 al almacenamiento de glicógeno y triglicéridos y a la
síntesis de proteínas. La entrada de glucosa en los
músculos y células adiposas es estimulada por la insulina.
En pacientes que padecen de diabetes mellitus tipo 1, o
LADA (diabetes autoinmune en adultos, Pozzilli & Di Mario,
25 2001, Diabetes Care. 8:1460-1467) las células beta están

siendo destruidas debido a ataque autoinmune. La cantidad de insulina producida por las células de los islotes pancreáticos restantes es demasiado baja, dando como resultado niveles de glucosa en sangre elevados (hiperglicemia). En la diabetes mellitus tipo II las células hepáticas y musculares pierden su capacidad de responder a los niveles de insulina en sangre normales (resistencia a la insulina). Los altos niveles de glucosa en sangre (y también los altos niveles de lípidos en sangre) conducen a su vez a un deterioro de la función de las células beta y a un incremento en la muerte de las células beta. De manera interesante, los procesos degenerativos de células beta como la neogénesis y replicación no parecen compensar la pérdida de la masa de células beta en diabéticos tipo II, causando de este modo una reducción en la masa de células beta total con el tiempo. Eventualmente la aplicación de insulina exógena se vuelve necesaria en los diabéticos tipo II para un control adecuado de los niveles de glucosa en sangre.

En los diabéticos tipo I, donde las células beta están siendo destruidas por ataque autoinmune, han sido contemplados tratamientos los cuales modulan el sistema inmune y pueden ser capaces de detener o reducir fuertemente la destrucción de los islotes (Raz et al., 2001, Lancet 358: 1749-1753; Chatenoud et al., 2003, Nat

Rev Immunol. 3: 123-132; Homann et al., Immunity. 2002, 3:403-415). Sin embargo, debido a la regeneración relativamente lenta de las células beta humanas esos tratamientos pueden ser más exitosos si son combinados con
5 tratamientos que pueden estimular la regeneración de células beta.

La diabetes es una enfermedad muy discapacitante, debido a que los fármacos antidiabéticos comunes hoy en día no controlan suficientemente bien los niveles de azúcar en
10 sangre para evitar completamente la ocurrencia de niveles de azúcar en sangre altos y bajos. Con frecuencia los niveles de azúcar en sangre elevados son tóxicos y producen complicaciones a largo plazo como por ejemplo nefropatía, retinopatía, neuropatía y enfermedad vascular periférica.
15 La pérdida extensa de células beta también conduce a la desregulación de la secreción de glucagon de las células alfa pancreáticas la cual contribuye a un incremento en el riesgo de episodios hipoglicémicos peligrosos. También existen muchos riesgos de condiciones relacionadas, como
20 obesidad, hipertensión, enfermedad cardíaca e hiperlipidemia, de las cuales las personas con diabetes están sustancialmente en riesgo.

Además de la calidad de vida deteriorada de los pacientes, el tratamiento de la diabetes y sus
25 complicaciones a largo plazo presentan una enorme carga

financiera a nuestros sistemas de salud con tendencia a elevarse. De este modo, para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I y LADA, pero también para el tratamiento de las etapas tardías de la diabetes mellitus tipo II existe una fuerte necesidad en la técnica de identificar factores que induzcan la regeneración de células beta productoras de insulina pancreática. Esos factores podrían reestablecer la función normal del páncreas endocrino una vez que su función ha sido dañada o aún podrían prevenir el desarrollo o progreso de la diabetes tipo I, LADA o diabetes tipo II.

La neurturina es una proteína secretada la cual se expresa en páncreas embrionario. La neurturina recombinante ha mostrado estimular la diferenciación de células no diferenciadas embrionarias de ratón con células productoras de insulina. Además, los ratones transgénicos con niveles elevados de neurturina en el páncreas tienen una masa de células beta pancreática sustancialmente incrementada. Sobre la base de esos descubrimientos, ha sido propuesto el uso de neurturina para el tratamiento de trastornos pancreáticos como la diabetes (véase por ejemplo la WO 03/99318 y la WO 2005/051415, la descripción de las cuales se incorpora aquí como referencia).

La neurturina es un miembro de la familia de ligandos de GDNF (GFL) comprendida de la línea celular Glial derivada del factor neurotrófico (GDNF), Neurturina,

Artemina y Persefina. La neurturina madura es un homodímero con un tamaño de 23.6 kDa comprendida de 102 monómeros de aminoácido. Cada monómero contiene tres enlaces disulfuro intracadena formando un nudo de cistina. Un puente de sulfuro adicional conecta los monómeros.

La neurturina ya había sido previamente propuesta como tratamiento para enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y Huntington, trastornos neuronales motores, lesiones de la médula espinal o trastornos del oído (WO 97/08196, WO 99/06064; Akerud et al. J Neurochem. 1999; 73(1):70-78; Koeberle & Ball Neuroscience. 2002; 110(3):555-567; Bilak et al. Mol Cell Neurosci. 1999; 13(5):326-336; Perez-Navarro et al. Neuroscience. 2000; 98(1):89-96; Rosenblad et al, Eur J Neurosci. 1999; 11 (5): 1554-1566, las descripciones de las cuales se incorporan aquí como referencia).

Se ha encontrado, sin embargo, que tras la liberación mejorada por convección (CED) en cerebros de rata, el volumen de distribución de la neurturina y el factor relacionado GDNF fue limitada (Hamilton et al., Exp Neurol. 2001 ; 168(1):155-161). Las proteínas deben típicamente ser administradas por inyección. Después de la inyección, la mayoría de las proteínas son eliminadas rápidamente del cuerpo, necesitando inyecciones frecuentes. En nuestros estudios, hemos encontrado que la

biodisponibilidad después de la inyección subcutánea e intravenosa de la neurturina es mamíferos es baja. Solo aproximadamente 10% de la neurturina inyectada subcutáneamente entra a la circulación. En consecuencia, es
5 difícil alcanzar niveles en sangre terapéuticamente útiles de las proteínas en pacientes.

De este modo, existe una fuerte necesidad de desarrollar una variante de neurturina con mejor disponibilidad en pacientes y con esto el desarrollo del
10 métodos para prolongar las vidas medias en circulación de agentes terapéuticos de proteína en el cuerpo - la biodisponibilidad - de modo que la neurturina como agente activo no tenga que ser inyectada frecuentemente para satisfacer las necesidades de pacientes para fármacos
15 terapéuticos de proteína "amigables con el usuario".

De este modo, el problema que subyace a la presente invención fue proporcionar nuevas variantes y formulaciones de neurturina que mejoren su biodisponibilidad.

20 El problema es resuelto proporcionando las modalidades caracterizadas en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un
25 conjugado de neurturina novedoso que comprende una porción

de poliol unida covalentemente a un producto de proteína de neurturina humana.

La presente invención se relaciona además con una composición farmacéutica que comprende al menos un producto de proteína neurturina y/o un fragmento biológicamente activo de la misma, el cual se conjuga a al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con un soporte, un diluente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad más, la presente invención se relaciona con un método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite la misma, que comprende una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un producto de proteína neurturina modificada o un fragmento biológicamente activo de la misma, el cual se conjuga con al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con un soporte, diluente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto más de la presente invención es proporcionar el método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite de la misma, que comprende una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un producto de proteína neurturina modificada o un fragmento biológicamente activo de la misma que se conjugó a al menos una molécula de polietilen glicol como un

ingrediente activo junto con una sustancia de bajo peso molecular junto con un soporte, diluyente, y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

5 Las composiciones de la presente invención son adecuadas para prevenir o tratar trastornos pancreáticos, enfermedades neurodegenerativas, particularmente trastornos autoinmunes pancreáticos, por ejemplo diabetes autoinmune como la diabetes tipo I o LADA pero también diabetes tipo II.

10

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona conjugados de neurturina que comprenden porciones de poliol unidas covalentemente como el polietilen glicol (PEG), así como composiciones farmacéuticas que comprenden esos conjugados
15 de neurturina así como variantes, derivados o fragmentos biológicamente activos de la misma.

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos, técnicas y métodos de laboratorio
20 descritos aquí son aquéllos conocidos en la técnica a la cual pertenecen. Los símbolos y abreviaciones químicas estándar se usan de manera intercambiable con los nombres completos representados por esos símbolos. Las técnicas estándar pueden ser usadas para síntesis química, análisis
25 químico, preparación, composición, distribución y

tratamiento farmacéutico de los pacientes. Pueden ser usadas técnicas estándar para la metodología de ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo tisular y similares. Las reacciones y técnicas de purificación pueden ser efectuadas por ejemplo, usando equipos de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes, como comúnmente se efectúa en la técnica o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden ser detectados de manera general de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales o más específicas que se citan o describen a través de la presente especificación.

El término "análogo" se refiere a un polipéptido el cual se asemeja a la neurturina en una estructura, teniendo una función similar.

El término "biológicamente activo" o "actividad biológica" como se usa aquí, significa que el producto de neurturina induce y/o estimula la diferenciación de células productoras de insulina a partir de sus progenitoras, por ejemplo, células no diferenciadas, y/o promueve la protección, sobrevivencia o regeneración de células productoras de insulina, por ejemplo células beta *in vivo* o *in vitro*. La actividad biológica en los productos de proteína neurturina modificada como se describe aquí puede

ser fácilmente determinada en ensayos *in vitro* estándar como se describe en la determinación de la actividad de GDNF, descrita en la WO 93/06116 y en la Solicitud de Patente Estadounidense No. 08/535,681 o como se describe en los presentes Ejemplos.

Como se utiliza aquí, "fragmentos" de neurturina se refieren a porciones de neurturina que son generadas por cualquier método, incluyendo pero sin limitarse a la digestión enzimática y escisión química (por ejemplo CNBr) de neurturina y repartición física del polipéptido. Los fragmentos de neurturina también se pueden ser generados, por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante y por síntesis de aminoácidos.

Como "fragmento activo" o "fragmento biológicamente activo" de neurturina como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier fragmento o un precursor de la cadena polipeptídica de neurturina, solo o en combinación con moléculas relacionadas o residuos unidos a éste, por ejemplo, residuos de azúcares o fosfatos, o agregados de la molécula polipeptídica cuando los fragmentos o precursores muestran la misma actividad biológica de la neurturina. El término "fragmento biológicamente activo" también se relaciona con un fragmento de un producto neurturina el cual induce y/o estimula la diferenciación de las células productoras de

insulina a partir de progenitoras, por ejemplo, células no diferenciadas, y/o promueve la protección, sobrevivencia o regeneración de células productoras de insulina, por ejemplo células beta *in vivo* o *in vitro*. La actividad biológica de un fragmento de los productos de proteína neurturina modificada como se describe aquí pueden ser determinada fácilmente ensayos *in vitro* estándar, como se describe para la determinación de la actividad GDNF, descrito en la WO 93/06116 y en la Solicitud de Patente Estadounidense No. 08/535,681 o descrita en los ejemplos de la presente.

El término "homólogo" es usado aquí para referirse a un polipéptido relacionado con la neurturina por descender de una secuencia de proteína ancestral común. El término, homólogo, puede aplicarse a la relación entre proteínas separadas por el evento de duplicación genética.

El término "sustancia de bajo peso molecular" se refiere a un sustrato con un peso molecular promedio de entre 100 y 12000 Da, preferentemente de entre 200 y 8000 Da y más preferiblemente de aproximadamente 500 y 7000 Da.

La sustancia de bajo peso molecular puede ser un polímero polianiónico que sea natural o sintético y que contiene una pluralidad de grupos aniónicos como grupos carboxilato y/o sulfato. Por ejemplo, el polímero polianiónico puede ser seleccionado de sacáridos sulfatados

de bajo peso molecular, ciclodextrinas sulfatadas, o polímeros sintéticos sulfatados, como polímeros de acrílico, polímeros aromáticos, y/o polialcoholes. De manera más particular, el polímero polianiónico es

5 seleccionado de heparinas de bajo peso molecular o derivados heparina, sulfatos de heparina, sulfatos de condroitina, sulfatos dextran, oligosacáridos derivados de heparina modificados químicamente (lista de Wang et al. (2002), supra), oligosacáridos similares a la heparina,

10 sulfatos de dextran, glicosaminoglicanos de bajo peso molecular sulfatados, dextrin-2-sulfatos, sulfatos de celulosa y de polímeros de sulfonato de naftaleno (por ejemplo, PRO 2000), PAVAS (un copolímero de ácido acrílico con alcohol sulfato de vinilo), el polímero sulfonado PAMPS

15 [ácido poli(2-acril-amido-2-metil-1-propansulfónico)] (Mw por ejemplo, aproximadamente 7000 - 12000), sulfatos de condroitina, ciclodextrinas sulfatadas, sulfato de laminarina (Alban, S. in Carbohydrates in Drug Design (Ed. ZJ. Witczak, K.A. Nieforth) Dekker, New York, 1997, pp

20 209.), sulfatos de poliglicerina (Türk, H., Haag, R., Alban, S. Bioconjugate Chem. 2004, 15, 162;), polisulfatos de pentosan (PPS) y derivados de los mismos como polisulfatos de pentosan modificados con lactosa, PPS fraccionado/PPS de bajo peso molecular, fucoidan, o

25 derivados o combinaciones de los mismos.

Los análogos de heparina de bajo peso molecular (LMWH) como la Enoxaparina, Dalteparina o Fragmina son ejemplos preferidos de polímeros adecuados. Ellos son obtenidos por fraccionación y/o digestión limitada 5 enzimática o química de heparina, y tienen un peso molecular promedio preferido de aproximadamente 3000 hasta aproximadamente 7000 Dalton (Weitz 1997 supra).

El término "producto de proteína neurturina modificada" como se usa aquí se relaciona con un conjugado 10 de proteína neurturina modificada químicamente, así como un conjugado expresado en la célula que comprende una fracción de poliol unida covalentemente.

Los conjugados de neurturina modificados químicamente pueden ser preparados por un experto en la 15 técnica dada la discusión de la presente o por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

La fracción de poliol del conjugado de neurturina de la invención puede ser cualquier poli(óxido de alquilen) mono o bifuncional soluble en agua que tenga una 20 cadena lineal o ramificada. Típicamente, el poliol es un poli(alquilen glicol), como el poli(etilenglicol) (PEG). Sin embargo, aquellos expertos en la técnica reconocerán que pueden ser usados de manera adecuada otros polioles, como, por ejemplo, poli(propilenglicol) y copolímeros de 25 polietilen glicol y polipropilen glicol. Otros conjugados

de neurturina pueden ser preparados acoplando neurturina a un polímero soluble en agua. Una lista no limitante de esos polímeros incluyen otros homopolímeros de óxido polialquileno como los polipropilen glicoles, polioles oxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloques de los mismos. Como una alternativa los polímeros basados en óxido de polialquileno, los materiales efectivamente no antigénicos como el dextran, polivinil pirrolidonas, poliacrilamidas, alcoholes polivinílicos, polímeros basados en carbohidratos y similares pueden ser utilizados.

Los conjugados de proteína también pueden ser expresados en las células eucariotas o procariotas, bien conocido en la técnica.

El término "conjugado de neurturina" se relaciona con un producto de proteína neurturina que comprende una fracción de poliol como el polietilenglicol unido covalentemente a un aminoácido de neurturina. El aminoácido puede ser específico del ciclo en el aminoácido N-terminal o en cualquier otro aminoácido. Los conjugados de PEG pueden contener una o más moléculas PEG unidas covalentemente a cualquier sitio adecuado de la molécula de proteína neurturina.

El término "producto de proteína neurturina", "producto de neurturina", "proteína neurturina" o

"neurturina", que se utilizan de manera intercambiable aquí, se relacionan con una proteína o péptido que tiene un grado de identidad con producto biológicamente activo de neurturina humana que da como resultado de la escisión del precursor neurturina que tiene la secuencia de aminoácidos publicada como Número de Acceso del GenBank NP_004549 (SEQ ID NO: 1, Fig. 3) o el precursor de neurturina humana en sí, que es superior al 70%, preferiblemente en exceso del 80%, más preferiblemente un exceso del 90% y más preferiblemente un exceso del 95%, variantes o derivados de los mismos. El grado de identidad entre la proteína de ratón y humana es de aproximadamente 91%, y se contempló que las proteínas de neurturina de mamífero preferidas tendrán un alto grado de similitud de identidad. El porcentaje de identidad de un producto de neurturina y la proteína neurturina humana o un precursor puede ser determinado de acuerdo a procedimientos estándar, por ejemplo, mediante el algoritmo BLAST. Preferentemente, el porcentaje de identidad se calcula como el porcentaje de aminoácidos residuales encontrados en la más pequeña de dos secuencias que se alinean con aminoácidos residuales idénticos en la secuencia que esté siendo comparada. Cuando pretenden ser introducidos cuatro espacios en la longitud de 100 aminoácidos para ayudar a esa alineación.

El término "ortólogo" se relaciona con

polipéptidos en diferentes especies que evolucionaron de un gen ancestral común por especificación. Los ortólogos conservan la misma función en el curso de la evolución.

El término "polietilen glicol" o "PEG" se relaciona con el PEG en sí, así como derivados del mismo. El PEG polimérico es usado como metoxi-PEG-OH, (m-PEG), en el cual un término es el grupo metoxi relativamente inerte, mientras que el otro término es un grupo hidroxilo que está sujeto a modificación química. Los PEG ramificados están también en uso común. El número de brazos ramificantes (m) puede variar de tres a cien o más. Los grupos hidroxilo son sometidos además a modificación química. Otra forma ramificada, como la descrita en la Solicitud de Patente PCT WO 96/21469, tiene un solo término que es objeto de modificación química. Otra forma ramificada más, tiene grupos reactivos, como carboxilo, a lo largo del esqueleto del PEG más que al final de las cadenas de PEG. Además de esas formas de PEG, el polímero también puede ser preparado con enlaces débiles o degradables en el esqueleto. Por ejemplo, Harris ha mostrado en la Solicitud de Patente Estadounidense No. de Serie 06/026,716, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad, que el PEG se puede ser preparado con enlaces éster en el esqueleto polimérico que son objeto de hidrólisis. Esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de

peso molecular más bajo. Los copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno están estrechamente relacionados con el PEG en su química, y pueden ser usados en lugar del PEG en muchas de sus aplicaciones.

5 El término "PEGilación" comprende la unión covalente de una molécula de polietilen glicol a un sustrato, el cual puede ser una proteína. La PEGilación de proteínas es ampliamente conocida en el estado de la técnica y ha sido revisada por, por ejemplo, Veronese, F.
10 M., Biomaterials 22 (2001) 405-417. El PEG puede ser ligado usando diferentes grupos funcionales y polietilen glicoles con distinto peso molecular, PEG lineales y ramificados, así como diferentes grupos de enlace (véase también Francis, G. E., et al., Int. J. Hematol. 68 (1998) 1-18;
15 Delgado, C1 et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems 9 (1992 (249-304)).

La PEGilación puede ser efectuada en una solución acuosa con reactivos de PEGilación como se describe, por ejemplo, en la WO 00/44785, preferiblemente usando
20 moléculas de PEG lineales o ramificadas activadas con NHS de un peso molecular de entre 5 y 40 kDa. La PEGilación también puede ser efectuada en fase sólida de acuerdo con Lu, Y. et al., Reactive Polymers 22 (1994) 221-229.

La PEGilación selectiva en el aminoácido N-
25 terminal puede ser efectuada de acuerdo con Félix, A.M., et

al., ACS Symp. Ser 680 (Poly(ethylene glycol)) (1997) 218-238. La PEGilación N-terminal selectiva es lograda durante la síntesis en fase sólida por acoplamiento de un derivado de aminoácido N-PEGilado al aminoácido N-terminal de la

5 cadena peptídica. La PEGilación de la cadena lateral se realiza durante la síntesis de fase sólida por acoplamiento de derivados del aminoácido N-PEGilados a la cadena en crecimiento. La PEGilación de la cadena lateral y el N-terminal combinados es procesada como se describió

10 anteriormente con la síntesis en fase sólida o por síntesis en fase de solución aplicando reactivos de PEG activados al péptido desprotegido en el amino.

Los derivados de PEG adecuados son moléculas de PEG activadas con un peso molecular promedio preferido de

15 aproximadamente 5 hasta aproximadamente 40 kDa, de manera más preferible de aproximadamente 20 hasta aproximadamente 40 kDa, y de manera más preferible de aproximadamente 30 kDa. Los derivados de PEG puede ser PEG lineales o ramificados.

20 Los derivados de PEG activados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Morpurgo, M., et al., J. Bioconj. Chem. 7 (1996) 363-368, para PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y cadena ramificada especies son adecuadas para la preparación de

25 fragmentos PEGilados. Los ejemplos de reactivos de PEG

reactivados son yodo-acetil-metoxi-PEG y metoxi-PEG-vinilsulfona (m es un entero de preferencia de aproximadamente 450 hasta aproximadamente 900 y R es alquilo inferior, lineal o ramificado, que tiene de uno a
5 seis átomos de carbono como el metilo, etilo, isopropilo, etc., de los cuales se prefiere de metilo.

Como se utiliza aquí, el término "PEG" o "porción de PEG" pretenden incluir, pero no se limita a, PEG lineal o ramificado, metoxi PEG, PEG degradable hidrolítica o
10 enzimáticamente, PEG colgante, PEG dendrímero, copolímeros de PEG y uno o más polioles, y copolímeros de PEG y PLGA (poli (ácido láctico/glicólico)).

El término "neurturina PEGilada" o "neurturina modificada por" "PEGilación" o "conjugado de neurturina que
15 comprende una porción de polietilen glicol" se relaciona con un producto de proteína neurturina producido por un método por el cual una porción de PEG se une covalentemente para formar estas proteínas PEGiladas.

El término "soporte, diluyente y/o adyuvante
20 farmacéuticamente aceptable" se relaciona con uno y más compuestos farmacéutico y fisiológicamente aceptables, como excipientes y auxiliares, lo cual facilita el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones, las cuales pueden ser usadas farmacéuticamente. Los detalles se pueden
25 encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical

Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

El término "productos de proteína neurturina de control no modificado" se relaciona con un producto de proteína neurturina del mismo origen que el producto de
5 proteína neurturina modificada correlacionada que se usa como control.

El término "variante" como se usa aquí se relaciona con una variante polinucleotídica que puede contener una o más sustituciones, adiciones, supresiones
10 y/o inserciones, como se describe más adelante, con relación con un polipéptido nativo. El término "variante" también abarca polipéptidos homólogos de origen xenogénico. Por lo general, una variante de neurturina mantiene la actividad biológica ya sea completamente, una proporción
15 sustancial de la misma, o al menos parcialmente, como, por ejemplo, se puede determinar usando un ensayo específico como se describe más adelante. El término "variante" como se usa aquí también abarca la neurturina que fue modificada mediante la alteración de las
20 secuencias de proteínas por sustituciones, adiciones o supresiones proporcionando moléculas funcionalmente equivalente, como es bien sabido en la técnica. La última incluye secuencias alteradas en las cuales aminoácidos residuales funcionalmente equivalentes son sustituidos por
25 los residuos dentro de la secuencia dando como resultado el

intercambio biológicamente silencioso.

Las variantes de neurturina se preparan introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ADN que codifica para el polipéptido o por síntesis química in vitro del polipéptido deseado. Será apreciado por aquellos expertos en la técnica que pueden hacerse supresiones, inserciones y sustituciones, dando como resultado una variante producto de la proteína que presenta actividad biológica de neurturina.

Las técnicas de mutagénesis como de sustitución, inserción o supresión de uno o más aminoácidos seleccionados son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica (por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,518,584, la descripción de la cual se incorpora por lo tanto aquí como referencia.)

En una modalidad preferida, son introducidos cambios de aminoácidos en la región entre los aminoácidos 47-69, preferiblemente 51-65, de la neurturina humana madura (aminoácidos 141-164, preferiblemente 147-160, como se muestra en la Figura 3). Esos cambios de aminoácidos pueden comprender al menos una supresión o sustitución de un residuo de arginina en esta región, por ejemplo, los residuos de arginina 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 y/o 65. Los preferidos son sustituciones de arginina por aminoácidos neutros o ácidos, por ejemplo, glicina, serina,

alanina, aspartato o glutamato. Especialmente preferida es una sustitución por el glutamato, por ejemplo, R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E y R65E o una variante de neurturina que comprende al menos 2 de esas sustituciones.

5 De manera alternativa y/o adicionalmente un aminoácido residual de neurturina, por ejemplo, en la región indicada anteriormente, en particular un residuo de arginina, puede ser sustituido por la lisina para facilitar el acoplamiento a grupos poliol. Puesto que no existe
10 lisina en neurturina humana madura, ese cambio permite la modificación específica del sitio con grupos poliol. Específicamente preferida es una sustitución por la lisina en la región antes indicada, por ejemplo, R51K, R52K, R54K, R56K, R57K, R58K, R60K, R61K y R65K o una variante de
15 neurturina que comprende al menos 2 de esas sustituciones.

Las variantes de sustitución de neurturina tienen al menos un aminoácido residual de la secuencia de aminoácidos de la neurturina humana o de ratón removido y un residuo diferente insertado en su lugar. Esas variantes
20 de sustitución incluyen variantes alélicas, las cuales se caracterizan por cambios en la secuencia nucleotídica natural en la relación de especies que pueden o no dar como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos.

De manera sorprendente, se ha encontrado por los
25 inventores de la presente que una composición farmacéutica

como la descrita tiene una mayor biodisponibilidad de su ingrediente activo, la neurturina conjugada y/o fragmento biológicamente activo de la misma, en comparación con una composición farmacéutica que no comprende neurturina conjugada. La invención demuestra que la conjugación de la proteína neurturina con un poliol como el PEG mejora significativamente la vida media en suero y biodisponibilidad de un producto de neurturina. La mejora de la biodisponibilidad de un producto de neurturina a su vez puede reducir la acumulación o procesamiento del agente en el sitio de la inyección si se aplica subcutáneamente y que puede mejorar la tolerancia local de esta manera.

La presente invención proporciona el método de aplicación de los conjugados de neurturina de la invención como agentes activos a pacientes en una dosis mucho menor en comparación con la neurturina de control no modificada para tener un efecto terapéutico. Esto cumple con la necesidad de "agentes terapéuticos de proteína amigables con el usuario" y también puede dar como resultado costos de producción más bajo del agente activo y/o la composición farmacéutica.

Los conjugados de la neurturina de la presente también tienen una mayor solubilidad en soluciones acuosas en comparación con la neurturina no modificada, lo cual puede dar como resultado una simplificación de la

formulación del agente activo.

Como una ventaja más, el acoplamiento de polioles como el PEG a la neurturina puede reducir la inmunogenicidad a la neurturina y por lo tanto la formación de anticuerpos neutralizantes o reacciones alérgicas contra el agente activo.

Preferiblemente, el producto de proteína neurturina de la presente invención es una neurturina humana o un fragmento biológicamente activo de la misma. Los productos de proteína neurturina son producidos preferiblemente vía técnicas recombinantes debido a que esos métodos son capaces de lograr grandes cantidades de proteína con una gran pureza y no se limitan a productos expresados en sistemas celulares, de bacterias, plantas, mamíferos o insectos.

Los productos de proteína neurturina recombinante incluyen formas glicosiladas y no glicosiladas de la proteína. En general las técnicas recombinantes implican el aislamiento de los genes que codifican para un producto de proteína neurturina, clonación del gen en un vector y/o tipo de célula adecuada, modificación del gen si es necesario para codificar para una variante deseada, y expresar el gen para producir el producto de proteína neurturina.

De manera alternativa, puede ser sintetizada

químicamente una secuencia nucleotídica que codifique para el producto de neurturina deseado. Se contempló que un producto de neurturina puede ser expresado usando secuencias nucleotídicas que varíen en el uso del codón debido a la degeneración del código genético o variaciones alélicas o alteraciones hechas para facilitar la producción del producto de proteína por la célula seleccionada.

Kotzbauer et al., Nature 384:467-470, describe la identificación de un ADNc de ratón y secuencias de aminoácidos y un ADNc humano y secuencias de aminoácidos para una proteína neurturina, identificada aquí como SEQ ID NO:1.

Los productos de neurturina de acuerdo con la presente invención pueden ser aislados o generados por una variedad de medios. Métodos ejemplares para producir productos de neurturina están descritos en la solicitud de patente WO 97/08196, la cual se incorpora aquí como referencia. También se describen una variedad de vectores, células anfitrionas, condiciones de crecimiento en cultivo para la expresión de la proteína neurturina, así como métodos para sintetizar varios productos de proteína neurturina. Los vectores adicionales adecuados para la expresión de producto de proteína neurturina en E. coli son descritos en la Patente No. EP 0 423 980, la descripción de la cual se incorpora aquí como referencia.

La forma biológicamente activa de la proteína

neurturina es un dímero unido por enlaces disulfuro, lo cual puede ser determinado por el peso molecular de la neurturina modificada. El material aislado después de la expresión en el sistema bacteriano es en esencia biológicamente inactivo, y existe como un monómero. Es necesario el repliegue para producir el dímero unido por enlaces disulfuro biológicamente activo. Los procesos adecuados en el repliegue y maduración de la neurturina expresada en sistemas bacterianos son sustancialmente similares a aquéllos descritos en la WO 93/06116. Los ensayos estándar *in vitro* para la determinación de la actividad de la neurturina son también esencialmente similares a aquéllos que determinan la actividad GDNF como se describe en la WO 93/06116 y la Solicitud de Patente Estadounidense No. 08/535,681, y por lo tanto se incorporan aquí como referencia.

La unión covalente entre el polímero biodegradable, inerte, no tóxico, polietilen glicol (PEG), también conocido como óxido de polietileno (PEO), a la neurturina tiene aplicaciones importantes en biotecnología y medicina. La PEGilación de la neurturina da como resultado una mejor farmacocinética lo cual también da como resultado una duración sostenida, mejor seguridad (es decir, menos toxicidad, inmunogenicidad y antigenicidad), incremento de la eficacia, disminución de la frecuencia de

dosificación, mejor solubilidad y estabilidad del fármaco, reducción de la proteólisis, y facilita la liberación controlada del fármaco.

La presente invención contempla el uso de
5 productos de proteína neurturina, por ejemplo los derivados que son neurturinas expresadas por procariotes, o variantes de las mismas, ligadas al menos a una molécula de polietilen glicol, así como el uso de neurturina, o variantes de la misma, unida a una o más moléculas de
10 polietilen glicol, vía un enlace acilo o alquilo. La PEGilación puede ser llevada a cabo por cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo: Enfoque sobre los Factores de Crecimiento, 3(2):4-10, 1992; EP 0 154 316, la descripción de la cual se
15 incorpora aquí como referencia; EP 0 401 384; y las otras publicaciones citadas aquí que se relacionan con la PEGilación.

La composición farmacéutica de la presente invención tiene una mayor biodisponibilidad del ingrediente
20 activo en un mamífero, por ejemplo, un humano, en comparación con una composición farmacéutica la cual no contiene la neurturina PEGilada (véase la Figuras 2A y 2B). Preferiblemente, la neurturina PEGilada está presente en una cantidad para proporcionar un incremento de al menos 2
25 veces, preferiblemente al menos 5 veces y de manera más

preferible al menos 10 veces en la biodisponibilidad del ingrediente activo.

El incremento de la biodisponibilidad puede estar determinado como se muestra en los Ejemplos de la presente solicitud. De manera más particular, una composición que contiene el ingrediente activo en una cantidad o dosis dada en comparación con una composición farmacéutica que contiene el ingrediente activo en la misma dosis pero sin PEGilación. La biodisponibilidad de ambas composiciones puede ser determinada de la concentración en plasma después de la administración subcutánea a animales de experimentación, por ejemplo, ratones. De manera más preferible, la concentración en plasma es medida durante un periodo de tiempo de al menos 120 min, preferiblemente de 240 min y de manera más preferible de 24 h (véase las Figuras 2A y 2B).

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser adaptada para su administración por cualquier ruta efectiva, por ejemplo por las rutas de administración oral, nasal, rectal, pulmonar, tópica, transdérmica o parenteral. De este modo, la composición puede ser una composición sólida o líquida, por ejemplo, una tableta, cápsula, polvo, crema, gel, ungüento, solución, emulsión, suspensión, liofilizado, etc. Preferiblemente, sin embargo, la composición es administrada por inyección o infusión, de manera más

preferible por inyección, por ejemplo, por inyección subcutánea o intravenosa. La composición farmacéutica es preferiblemente una solución acuosa.

Además el ingrediente activo y opcionalmente una
5 sustancia de bajo peso molecular como un polímero polianiónico, la composición farmacéutica puede comprender un soporte, un diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, como amortiguadores, agentes para ajustar tonicidad, estabilizadores, cargas, desintegrantes,
10 espesantes, etc.

La composición farmacéutica contiene el ingrediente activo en una cantidad o dosis terapéuticamente efectiva. La dosis terapéuticamente efectiva depende del tipo del ingrediente activo, el tipo y la variedad de la
15 enfermedad a ser tratada y el tipo de administración. Para composiciones parenterales que contienen neurturina como ingrediente activo, la dosis terapéuticamente efectiva está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0.001 mg a 500 mg, de manera más preferible de aproximadamente 0.05
20 hasta aproximadamente 100 mg, aún más preferible de aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 5 mg por día.

La composición es administrada preferiblemente a un mamífero, particularmente un humano. De este modo, la composición es adecuada para medicina veterinaria y humana.
25 La composición es particularmente adecuada para la

prevención y/o tratamiento de trastornos neurodegenerativos o pancreáticos, particularmente trastornos autoinmunes pancreáticos como la diabetes tipo I y LADA, o diabetes tipo II.

5 El conjugado de neurturina como se describe aquí puede ser administrado por cualesquier medios adecuados, preferiblemente enteral o parenteral o tópicamente de manera directa al páncreas, como es sabido por aquellos expertos en la técnica. La dosis específica puede ser

10 calculada de acuerdo a consideraciones de peso corporal, área de superficie corporal o tamaño del órgano. La refinación adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosis apropiada para el tratamiento e implica cada una de las composiciones mencionadas anteriormente es

15 efectuada de manera rutinaria por aquellos expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas efectuadas de manera rutinaria. Las dosis apropiadas pueden ser determinadas a través del uso de ensayos establecidos para determinar las dosis utilizadas en conjunto con los datos

20 de dosis-respuesta apropiados. El régimen de dosis final implicado en un método para tratar las condiciones descritas anteriormente será determinado por el médico que preste la atención, considerando varios factores que modifiquen la acción de los fármacos, por ejemplo, la edad,

25 condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la

severidad de cualquier infección, tiempo de administración y otros factores clínicos. A medida que se conduzcan estudios, emergerá mayor información con respecto a los niveles de dosis apropiada para el tratamiento de varias enfermedades y condiciones.

Se contempló que la administración continua o liberación sostenida de un conjugado de neurturina como se describe aquí puede ser ventajosa para un tratamiento dado. Aunque la administración continua puede ser efectuada vía medios mecánicos, como con una bomba de infusión, se contempló que pueden ser practicados otros modos de administración continua o casi continua. Por ejemplo, la derivación o encapsulación química pueden dar como resultado formas de liberación sostenida de la proteína que tienen el efecto de la presencia continua, en cantidades precisas, sobre la base de un régimen de dosis determinado. De este modo, los productos de proteína neurturina incluyen proteínas derivadas o de otro modo formuladas para efectuar esa administración continua.

En una modalidad más preferida, el conjugado de neurturina puede ser proporcionado directamente al progenitor, por ejemplo células no diferenciadas para estimular la diferenciación de células productoras de insulina *in vitro* o *in vivo*. En esta modalidad de la invención, el conjugado de neurturina puede ser agregado de

manera preferible a concentraciones entre 0.1 ng/ml y 500 ng/ml, de manera más preferible entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, de manera aún más preferible entre 20 y 80 ng/ml y de manera más preferible 50 ng/ml.

5 El conjugado de neurturina como se describe aquí puede ser usado en una monoterapia o una terapia de combinación con otros agentes farmacéuticos. Por ejemplo, puede ser administrado junto con otros agentes farmacéuticos adecuados para el tratamiento o prevención de
10 enfermedades pancreáticas y/o obesidad y/o síndrome metabólico, particularmente con otros agentes farmacéuticos adecuados para estimular y/o inducir la diferenciación de células productoras de insulina de células progenitoras. Además, puede ser usado junto con agentes farmacéuticos que
15 tengan una actividad inmunosupresora, como por ejemplo anticuerpos, polipéptidos y/o sustancias de bajo peso molecular peptídicas o no peptídicas como se describe en la WO 2005/51415.

Una modalidad más de la presente invención es una
20 variante de la neurturina humana que comprende al menos uno, por ejemplo 1,2,3 o 4 cambios de aminoácidos en comparación con la neurturina humana natural. La variante de la neurturina humana puede tener una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones, como
25 se describe con detalle más arriba, en relación al

polipéptido humano nativo. Las variantes de neurturinas pueden ser preparadas como se describió anteriormente.

En una modalidad preferida, están presentes cambios de aminoácidos en la región entre los aminoácidos 47-69, preferiblemente 51-65 de neurturina humana madura (aminoácidos 141-164, preferiblemente 147-160 como se muestra en la Figura 3). Esos cambios de aminoácidos pueden comprender al menos una supresión o sustitución de un residuo de arginina en esta región. Por ejemplo los residuos de arginina 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 y/o 65. Las preferidas son sustituciones de arginina por aminoácidos neutros o ácidos, por ejemplo, glicina, serina, alanina, aspartato o glutamato. Especialmente preferida es una sustitución por glutamato, por ejemplo, R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E y R65E, o una variante de neurturina que comprende al menos dos de esas sustituciones.

También son preferidas las variantes de la neurturina humana, donde de manera alternativa y/o adicional un aminoácido residual, por ejemplo, en la región indicada anteriormente, particularmente un residuo de arginina, es sustituido por lisina. Por lo tanto, es facilitado el acoplamiento específico al sitio de la variante de neurturina a grupos poliol. Específicamente preferidos una sustitución por lisina en la región indicada

anteriormente, por ejemplo, R51K, R52K, R54K, R56K, R57K, R58K, R60K, R61K y R65K o una variante de neurturina que comprende al menos 2 de estas sustituciones.

5 Las variantes de sustitución de neurturina de acuerdo con la presente invención tienen al menos un aminoácido residual de la secuencia de aminoácidos de la neurturina humana removido y un residuo diferente insertado en su lugar. Esas sustitución incluyen variantes alélicas las cuales se caracterizan por cambios en la secuencia
10 nucleotídica natural en poblaciones de especies que pueden dar como resultado o no un cambio de aminoácido.

La presente invención proporciona además un método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite del mismo, donde la composición
15 comprende una cantidad o dosis farmacéuticamente activa de al menos un producto de proteína neurturina conjugado con al menos un poliol como el PEG o un fragmento biológicamente activo de esa neurturina conjugada como un ingrediente activo junto con un soporte, diluyente y/o
20 adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona también además un método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite del mismo, donde la composición comprende una cantidad o dosis farmacéuticamente activa de al menos un
25 producto de proteína neurturina modificada o un fragmento

biológicamente activo del mismo como un ingrediente activo junto con una sustancia de peso molecular junto con soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

5

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Las siguientes Figuras 1A a 8B y Ejemplos ilustran la invención y son modalidades no limitantes de la invención como se reclama más adelante. Numerosos aspectos y ventajas adicionales de la invención se volverán evidentes a aquellos expertos en la técnica tras la consideración de la siguiente descripción de las Figuras.

Figuras 1A y 1B: Actividad biológica de neurturina PEGilada en cultivo celular.

Dosis respuesta de derivados de Neurturina (media $n=3+/-$ DE); (media $n=4+/-$ DE)

La línea celular reportera que es sometida a concentraciones crecientes de neurturina o conjugado de neurturina con PEG (neurturina PEGilada). La actividad del gen reportero resultante (unidades de luz relativas (RLU) dadas sobre el eje y) fue graficada contra la concentración final del agente de prueba (dada en el eje x en ng/ml; Figuras 1A y 1B). Fueron usados dos lotes producidos independientemente de neurturina no modificada como

controles experimentales (PeproTech; Lot0805112 y Lot0106112) y su actividad relativa fue comparada con aquéllas de tres conjugados PEGilados (mono-mPEG-NHS-neurturina, mono-mPEG-CHO-neurturina y mono-CES0310-neurturina). Los valores dados son medios de al menos 3 pozos $\pm$ D.E. Las CE_{50} calculadas de las diferentes pruebas son: Neurturina (Lote 0805112, proteína no modificada): $CE_{50} = 2.2$ ng/ml, neurturina (Lote 0106112, proteína no modificada): $CE_{50} = 1.2$ ng/ml, mono-CES0310-neurturina: $CE_{50} = 12$ ng/ml (Figura 1A), y neurturina (Lote 0106112, proteína no modificada): $CE_{50} = 3.8$ ng/ml, mono-mPEG-NHS-neurturina: $CE_{50} = 9.7$ ng/ml, y mono-mPEG-CHO-neurturina: $CE_{50} = 7.4$ ng/ml (Figura 1B).

Figuras 2A y 2B: Estudios farmacocinéticos (PK) después de la administración subcutánea de agentes de prueba en ratones

Las Figuras 2A y 2B muestran la concentración en plasma de neurturina en ng/ml en varios puntos en el tiempo después de la administración de 0.050 mg/kg de PC (Fig. 2A) o 0.50mg/kg de PC (Fig. 2B) de neurturina o neurturina PEGilada a ratones. Los niveles en plasma resultantes fueron determinados por un ensayo de ELISA de neurturina. El punto cero en el tiempo muestra la señal de fondo promedio para la neurturina en suero de ratón usando este

ensayo de ELISA. Los valores de fondo fueron calculados a partir de valores medidos independientemente de suero de 12 (Fig. 2A) o de 11 (Fig. 2B) ratones no tratados. Los otros valores indicados son las medias de niveles en suero medidos de tres animales $\pm$ DE. La Figura 2A muestra datos de PK para el conjugado de neurturina mono-NHS-neurturina provenientes de dos experimentos independientes (mono-NHS-neurturina_Exp.1 y -_Exp.2). La Figura 2B muestra los datos derivados de otro experimento más donde los ratones fueron tratados con 0.50 mg/kg de PC de mono-NHS-neurturina.

Para el análisis el área bajo la curva (ABC) cubre todos los puntos en el tiempo medidos, el valor basal se fijó a 0.6 ng/ml (el valor de fondo promedio en el punto cero en el tiempo): proteína neurturina no modificada: 18.8 ng*min/ml, mono-mPEG-NHS-neurturina_Exp1: 409 ng*min/ml, mono-mPEG-NHS-neurturina_Exp2: 918 ng*min/ml, mono-CES0310-neurturina: $CE_{50} = 142$ ng*min/ml (Figura 2A), y proteína neurturina no modificada: 324 ng*min/ml, mono-mPEG-NHS-neurturina: 1157 ng*min/ml, y mono-mPEG-CHO-neurturina: 845 ng*min/ml (Figura 2B).

Para el análisis el área bajo la curva (ABC) (Figuras 2A y 2B) de los niveles de neurturina en suero el valor basal se fijó en 0.6 ng/ml de neurturina, lo cual corresponde al nivel de fondo promedio determinado en suero de ratones no tratados.

Figura 3:

Secuencia de proteína de precursor de la neurturina de acuerdo a lo publicado por el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) (número de acceso: NP_004549). La secuencia de la proteína madura que corresponde a la forma activa biológica así como farmacológicamente se resaltó en negrillas.

Figuras 4A y 4B:

Figura 4A. Expresión de neurturina humana y variantes de neurturina mutantes. El PAGE Nativo/Western-blot del sobrenadante concentrado de células HEK-293 que expresa neurturina y variantes de neurturina (numeración de las posiciones de acuerdo con la secuencia de la neurturina humana madura, R: arginina, E: ácido glutámico).

Figura 4B. ELISA de Neurturina: Curva estándar Representativa usando neurturina recombinante humana expresada de *E. coli*.

Figuras 5A y 5B: Cuantificación de la actividad biológica de la neurturina

Figura 5A. Ensayo de actividad biológica de neurturina celular: Actividad del gen reportero de Tirosina hidroxilasa estimulada por neurturina recombinante humana exógena de *E.coli* en concentraciones crecientes combinadas

con concentraciones crecientes de suero.

Figura 5B. Actividad biológica de variantes de neurturina (n.d.: no detectada)

5 **Figura 6: Alineación de las secuencias de neurturina de diferentes especies vertebradas.**

10 Los aminoácidos 47-69 de neurturina humana madura muestran (la numeración de las posiciones de acuerdo con la secuencia del péptido de neurturina humana madura, número de acceso del gen banco NP_004549, péptido maduro aa 96-197). Las variaciones de aminoácidos diferentes de la neurturina humana se grafican en negrillas y subrayado (Números de Acceso del GenBank entre corchetes).

15 **Figura 7: Secuencia de ADN de un plásmido recombinante de expresión de neurturina: Kr-G3-H6-G3-Xa-neurturina (wt)**

20 Kr-G3-H6-G3-Xa-neurturina(wt) clonada en vector de pMA. La secuencia de ADN de la hebra sentido y antisentido se muestran junto con los sitios de restricción y la secuencia de aminoácidos resultantes de la región codificadora.

25 **Figuras 8A y 8B: ELISA de anticuerpo anti-neurturina**

ELISA de anticuerpo anti-neurturina: Figura 8A: Curva estándar usando IgG anti-neurturina, Figura 8B: Curva estándar usando IgG/IgM anti-neurturina.

5 Deberá notarse que todas las modalidades preferidas discutidas para uno o varios aspectos de la invención también se relacionan con otros aspectos.

La versatilidad de la presente invención es ilustrada, pero no limitada, por los siguientes Ejemplos.

10

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - PEGilación de neurturina

Los grupos polietilenglicol (PEG) fueron conjugados a la neurturina a través de un proceso llamado PEGilación. Esta tecnología es usada ampliamente para la

15 modificación de proteínas terapéuticas y el procedimiento es familiar a cualquier experto en la técnica. En la presente invención, los conjugados de neurturina mono PEGilados fueron producidos enlazando una sola molécula de PEG al aminoácido N-terminal de uno de las dos subunidades

20 del homodímero. Se produjeron dos conjugados diferentes de neurturina mono-PEGilada que difieren en tamaño y estructura del PEG unido así como en el método de producción para conjugar el PEG a la proteína. El conjugado descrito como "mono-mPEG-NHS-neurturina" aquí fue producido

25 usando un reactivo de PEG lineal de aproximadamente 5 kDa

(succinato de mPEG-succinimidilo; NOF, Japón). Este llamado "método de NHS" es el método más comúnmente usado para la PEGilación de proteínas solubles. Además, se usó un polietilen glicol butiraldehído (Nektar, 082M0H01) de 5 kDa para generar el conjugado descrito como "mono-mPEG-CHO-neurturina". Bajo condiciones experimentales específicas los ésteres o aldehídos de NHS reaccionan eficientemente con grupos amino libres de proteínas y péptidos. En otro conjugado más descritos como "mono-CES0310-neurturina", el aminoácido N-terminal de una cadena del homodímero de neurturina fue conjugado con un PEG ramificado de seis brazos de aproximadamente 5 kDa usando una metodología de PEGilación conocida en la técnica (véase, por ejemplo, pero sin limitarse a, DE 2005 100 04 157.0, EP 1 631 545 A2; WO 04/108634; WO 07/025763; CA 2528667). La neurturina no contiene residuos de lisina, por lo tanto se espera que las reacciones de PEGilación descritas anteriormente principalmente PEGilación N-terminal vía los grupos amino reactivos de los aminoácidos N-terminales del homodímero de neurturina. La calidad (tamaño y pureza) de los productos PEGilados fue confirmada usando la metodología bioquímica estándar conocida por cualquier experto en la técnica.

Ejemplo 2 - Actividad biológica de conjugados de neurturina PEGilados o variantes de los mismos

La actividad biológica de los conjugados de neurturina fue evaluada usando un ensayo reportero basado en células. Se determinó que tan fuertemente la neurturina o sus conjugados PEGilados activan un plásmido recombinante de gen reportero en una línea celular que expresa receptores de neurturina sobre la superficie. En este ensayo se encontró que la actividad de ambos conjugados de neurturina PEGilados se redujo de 3 a 10 veces con relación a la neurturina no modificada (Figuras 1A y 1B).

La línea celular de neuroblastoma humano TGW (JCRB0618) que expresa los receptores de neurturina sobre la superficie celular fue transfectada de manera estable con un constructo de gen reportero de neurturina. Los constructos de gen reportero contienen un gen de luciferasa el cual se encuentra entre otros elementos reguladores bajo el control transcripcional de elementos de respuesta en suero repetitivos (SRE). En esas células la expresión de luciferasa es estimulada en respuesta a la activación de la vía de MAPK, por ejemplo a través de la unión de neurturina a sus receptores de superficie. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos. La actividad de la luciferasa fue medida mediante la adición del sustrato de luciferina a los pozos y las lecturas fueron generadas en un lector de análisis (Molecular Devices) operando en el modo de luminescencia.

**Ejemplo 3 - Biodiponibilidad mejorada de
conjugados de neurturina PEGilados o variantes de los
mismos**

La biodisponibilidad relativa de los conjugados
5 PEGilados de neurturina fue estimada con la ayuda de
estudios de PK en ratones (Figuras 2A y 2B). En esos
experimentos la proteína fue inyecta subcutáneamente en la
región del cuello de los ratones. A continuación, se
determinó la concentración de neurturina en suero en los
10 puntos en el tiempo definido después de la entrega de la
proteína usando un ensayo de ELISA específico para la
neurturina (Figuras 2A y 2B). La sensibilidad de este
ensayo de ELISA para la neurturina fue limitada debido a
señales de fondo relativamente altas en presencia de suero
15 de ratón, de acuerdo a lo detectado por el uso de suero de
ratones que no fueron tratados con neurturina (valores del
punto cero). Después de la inyección de 0.050 mg/kg de peso
corporal (PC) de neurturina no modificada, los niveles de
neurturina en suero no excedieron significativamente este
20 del fondo en ningún punto en el tiempo. Por el contrario,
cuando se aplicó la misma cantidad de neurturina PEGilada
se detectó un incremento significativo de los niveles en
suero de la proteína inyectada, sin importar el tipo de
modificación con PEG (Fig. 2A). Cuando la cantidad de
25 neurturina no modificada inyectada se incrementó 10 veces

(0.5 mg/kg PC) la proteína fue detectada significativamente en suero en los puntos en el tiempo 60, 90, 120 y 180 minutos (Fig. 2B). La importancia de esta observación fue confirmada usando la prueba T y se calcularon los valores de $p < 0.05$, También los niveles en suero de los derivados de neurturina PEGilados dados en la dosis de 0.5 mg/kg PC fueron pocas veces mayor que los de la proteína no modificada (Figuras 2A y 2B).

Los conjugados de neurturina presentados aquí demostraron consistentemente niveles en suero más altos con relación a aquéllos de la proteína no modificada. En conclusión, la PEGilación de la neurturina mejora significativamente la biodisponibilidad de la neurturina.

15 **Ejemplo 4 - Variantes de neurturina**

Los residuos de arginina básicos que se localizan dentro del parche básico de neurturina (aminoácidos 51-65 de la proteína madura) fueron reemplazados por residuos de ácido glutámico a través de mutagénesis basada en PCR dirigida al sitio. De manera breve, la secuencia que codifica para la neurturina humana madura con un péptido señal de secreción eucariótico N-terminal adicional fue modificada por mutagénesis basada en PCR utilizando cebadores desajuste que introducen las mutaciones deseadas:

25 R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E,

R63E o R65E

(numeración de las posiciones de acuerdo con la secuencia del péptido de neurturina humano maduro, el Número de Acceso del Genbank NP_004549, péptido maduro aa 5 96-197, esta secuencia también se muestra en la Figura 3; R: arginina, E: ácido glutámico).

Los plásmidos resultantes se purificaron y la corrección de la secuencia codificadora fue verificada por secuenciamiento. Las secuencias de codificación fueron 10 clonadas vía sitios de clonación HindIII y XhoI flanqueantes en el vector pCDNA3.1 + (Invitrogen Cat. No. V790-20) para expresión eucariótica.

Para la expresión eucariota, esos vectores, así como de control del vector vacío y el vector de expresión 15 de GFP como control de transfección fueron transfectados de manera transitoria en células HEK-293 cultivadas en recipientes de cultivo tisular de 175 cm² con 25 ml de medio, cada uno. La cosecha de los medios se realizó 48 horas después de la transfección y los sobrenadantes fueron 20 concentrados mediante el uso de columnas de ultrafiltración hasta aproximadamente 0.4 ml, cada uno.

La expresión de neurturina humana wt y las variantes mutantes fue controlada primero por PAGE nativo/Western-blot utilizando anticuerpos para la 25 detección específica de neurturina (véase la Figura 4A).

Como control se usó neurturina recombinante humana expresada de E. coli.

La figura 4A muestra que la neurturina natural humana (wt), así como todas las variantes de neurturina modificada R63E fueron expresados en cantidades similares. La masa aparente de las variantes de neurturina fluctuó entre 20 y 25 kDa de manera similar neurturina wt.

El rendimiento de la neurturina expresada fue determinada por ELISA específico para la neurturina. De manera breve, se recubrió anticuerpo antineurturina de conejos sobre micropozos para capturar la neurturina de sobrenadantes de medios concentrados que contienen neurturina. Después del lavado, la neurturina capturada fue cuantificada por una lectura de luminiscencia usando anticuerpo anti-neurturina de cabra seguido con biotina seguido por el uso de estreptavidina conjugada con peroxidasa. Se usó neurturina recombinante humana expresada de E. coli para establecer una curva de estándar (véase la Figura 4B).

Además, se cuantificaron las actividades biológicas de las variantes de neurturina expresadas en un ensayo celular específico. El principio del ensayo se basa en los experimentos de Tanaka et al., 2002, 2003 (Tanaka M, Xiao H, Kiuchi K. Heparin facilitates glial cell line-derived neurotrophic factor signal transduction.

Neuroreport. 2002 Oct 28;13(15):1913-6; Tanaka M, Xiao H, Hirata Y, Kiuchi K. A rapid assay for glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin based on transfection of cells with tyrosine hydroxylase promoter-luciferase construct. Brain Res Brain Res Protoc. 2003 May; 11 (2): 119-22). Que muestra la inducción de un plásmido recombinante de gen reportero de tirosina hidroxilasa (TH) por neurturina expresada estable en la línea celular de neuroblastoma TGW humano. Brevemente, las células TGW que sobre expresan el plásmido recombinante de gen reportero de tirosina hidroxilasa (TH) se hicieron reaccionar con las muestras que contienen neurturina conduciendo a la inducción de la vía de MAPK por señalización de la neurturina. Los plásmidos recombinantes del gen reportero contienen un gen de luciferasa bajo el control de elementos de respuesta en suero repetitivos (SRE). La expresión de la luciferasa depende de la activación de la vía MAPK. El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, la expresión de luciferasa mediada por neurturina se mide mediante la adición de luciferina y analizada con un lector de luminiscencia.

Un experimento representativo que demuestra la cuantificación de la actividad biológica de la neurturina utilizando neurturina recombinante humana expresada en E. coli como estándar en combinación con las concentraciones

crecientes en suero se muestra en la Figura 5A.

Figura 5B muestra que la neurturina humana recombinante natural, así como las variantes de neurturina excepto la R63E son expresadas en cantidades similares dando como resultado concentraciones de proteína entre 1.2-1.7 g/l, y todas las variantes expresadas mostraron una actividad biológica similar *in vitro* en comparación con la neurturina humana recombinante natural tipo con una CE_{50} entre 0.32-0.89 ng/ml (véase la Figura 5B). La neurturina recombinante humana de *E. coli* usada para la comparación, mostró una potencia más débil con una CE_{50} de 2.20 ng/ml, probablemente como resultado de una porción de neurturina no replegada apropiadamente en la muestra (véase la Figura 5B).

De este modo, la Figura 5B muestra que las modificaciones en la región del "talón de la neurturina" como una introducción de un aminoácido, cargado negativamente, en el parche de base no compromete la actividad biológica de neurturina en general. De este modo es sorprendente que la técnica anterior muestre que una modificación de aminoácidos básicos a ácidos en la región del talón podría interferir con la actividad biológica de la neurturina (véanse las comparaciones de secuencia y estructura con otros GFL, como se discutió anteriormente).

La falla de expresión de la variante de neurturina R63E muestra que en esta posición no es tolerado

un cambio de arginina a ácido glutámico. Sin embargo, otras modificaciones que no dan como resultado un cambio completo de la carga de aminoácidos son funcionales. Una comparación de las secuencias de homólogos de neurturina conocidos muestra que existe una variante R63E en la neurturina humana homóloga de *Ornithorhynchus anatinus*, *Monodelphis domestica*, y *Gallus gallus*. También existen variantes naturales de los residuos de arginina en las posiciones 52, 57, 58 y 61 en diferentes homólogos de neurturina (véase la Figura 6).

Para crear variantes de neurturina biológicamente activos con una biodisponibilidad mejorada, los inventores reemplazaron las argininas básicas en la región del "talón" con Lisina. Puesto que la arginina y la lisina están relacionadas estructuralmente, se espera que esos intercambios afecten la estructura de la molécula de neurturina sólo mínimamente. Esos cambios permiten la PEGilación de la neurturina dirigida específicamente al sitio vía la amina primaria de la cadena lateral de la lisina en una región de la proteína que muestra tolerar cambios sustanciales de aminoácidos, y la cual por lo tanto no es importante para la actividad biológica. Esta reacción es altamente específica, debido a que no está presente lisina en las secuencias neurturina humana nativas maduras. Las reacciones de PEG activada con otras aminas se

minimizan mediante la optimización de las condiciones de reacción, por ejemplo, pH, temperatura y tiempo de reacción. Efectuando una modificación del PEG dentro del parche básico en la región del "talón", se logran dos
5 objetivos: (i) pueden obtenerse beneficios de la PEGilación de la proteína (mejor biodisponibilidad vía la eliminación renal reducida, la reducción de la inmunogenicidad, mejor estabilidad proteica) minimizando a la vez los efectos sobre la actividad de la proteína y (ii) se espera que la
10 PEGilación en esta región proteja el parche básico evitando interacciones con proteoglicanos de la superficie celular cargados negativamente, los cual también se espera mejore la biodisponibilidad de la proteína.

En un primer paso, la secuencia codificadora de
15 neuriturina humana madura la cual se optimizó para el uso del codón humano (con un péptido señal N-terminal adicional para secreción de eucariótica) y una marca de purificación adicional (repetición de seis residuos de histidina con un
sitio adicional para la escisión de esta marca de
20 depuración con el factor Xa) modificado por mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR. Aquí, los codones son intercambiados en residuos de arginina 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63, o 65 con los codones para los residuos de lisina.

25 El plásmido recombinante de expresión resultante

resultante referido como **Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturin** en esta invención que contiene las siguientes características:

- Kr: secuencia de ADN de proteína transmembranal 2 que contiene kringle de ratón aminoácidos 1 - 26, péptido señal (número de acceso del GenBank NP_082692) para la secreción citoplasmática optimizada para el uso del codón humano (secuencia de aminoácidos: MGTPHLQGFLLLFPLLLRLHGASAGS; SEQ ID NO: 2).
- G3: secuencia de ADN de un separador de glicina optimizado para uso de codones humanos (secuencia de aminoácidos: GGG, SEQ ID NO: 3).
- H6: secuencia de ADN de una marca de 6 histidinas para propósitos de purificación optimizada para el uso de codones humanos (secuencia de aminoácidos: HHHHHH; SEQ ID NO: 4).
- Xa: secuencia de ADN del sitio de reconocimiento de proteasa de Factor Xa optimizada para uso de codones humanos (secuencia de aminoácidos: IEGR; SEQ ID NO: 5). Cortes de proteasa de Factor Xa C-terminales después de la arginina.
- rhneurturina: secuencia de ADN de neurturina humana recombinante madura optimizada para uso de codones humanos (secuencia de aminoácidos: ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACEAAARVYDLGLRRLRQRRRL

LJS

RRERVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHTVHELARECACV; SEQ ID NO: 6).

Los codones de arginina individuales en las posiciones 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63, o 65 se sustituyen por el codón de lisina AAG en el plásmido recombinante de expresión variante de neurturina respectivos.

La secuencia de ADN completa de Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturina (wt) clonada en vector de PMA se muestra en la Figura 7, SEQ ID NO: 7.

10 **Ejemplo 5 - Pegilación de variantes de neurturina**

Los constructos resultantes son clonados en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1+, que se transfectaron en células HEK-293 para la expresión de las variantes de neurturina modificada como se describió anteriormente.

Las variantes de neurturina expresadas son purificadas por ultrafiltración y por cromatografía de afinidad por medio de la marca de depuración introducida.

La estructura, pureza y actividad biológica en las preparaciones de variante de neurturina resultante son verificadas por PAGE nativo/Western-blot y ensayo de actividad de neurturina como se mostró anteriormente.

Las variantes de neurturina biológicamente activas que son expresadas con suficiente rendimiento y son purificadas a una pureza aceptable son usadas para la

modificación covalente con diferentes PEG monodispersos. Estos PEG tienen un tamaño preferible de 2.5 - 30 kDa, son lineales o ramificados y activados con éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). El éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) es espontáneamente reactivo con aminas primarias, proporcionando la PEGilación eficiente de proteínas. Otros derivados de PEG son por ejemplo pero no se limitan a moléculas con diferentes tamaños, no monodispersos o con diferentes patrones de ramificación y también pueden ser aplicadas otras químicas de acoplamiento.

Después de la reacción, la marca de purificación es escindida en el sitio de proteinasa introducido por el factor Xa y las variantes de PEG-neurturina son purificadas por cromatografía de exclusión por tamaño y/o afinidad.

Un número de marcas de purificación y combinaciones del sitio de proteasa/proteasa recombinante adicionales son bien conocidos en la técnica y pueden reemplazar la marca de His y/o sitio de factor Xa/escisión de factor Xa. De manera alternativa, la proteína neurturina que contiene los sitios de PEGilación introducidos pueden ser purificados del sobrenadante de sistemas de expresión eucarióticos o formar el lisado o sobrenadante de bacterias sobreexpresantes sin marca de purificación por métodos cromatográficos.

La estructura, pureza y actividad biológica de

JH

las preparaciones de variantes de PEG-neurturina resultantes son verificadas por SDS-PAGE/Western-blot, PAGE nativo/Western-blot, y ensayo de actividad de neurturina como se mostró anteriormente.

5 Las variantes de PEG-neurturina purificadas que muestran suficiente actividad biológica *in vitro* son ensayadas *in vivo* por su comportamiento farmacocinético después de la administración subcutánea de 50 $\mu\text{mol/kg}$ s.c. a ratones y ratas. La concentración de neurturina en plasma
10 es determinada por ELISA de neurturina en la línea basal, y a las 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 y 8 horas después de la administración.

Las variantes de PEG-neurturina seleccionadas que muestran mejor biodisponibilidad en comparación con la
15 neurturina wt son probadas por su eficacia *in vivo* por administración subcutánea a ratas neo STZ una vez al día con 50 $\mu\text{mol/kg}$ durante 6 días. Para ensayar la función las células beta, la glucosa en sangre es determinada cada día, y el contenido de insulina pancreática es determinado
20 después de 6 días de tratamiento en comparación con los grupos control con vehículo y con neurturina wt.

Ejemplo 6 - Potencial inmunogénico de neurturina pegilada

25 La neurturina wt recombinante humana tiene un

potencial inmunogénico como es demostrado por la aparición de anticuerpos anti-neurturina después de la administración a ratones adultos de más de 2 semanas. Los anticuerpos anti-neurturina han sido detectados con un ensayo específico. De manera breve, la neurturina humana recombinante fue recubierta sobre microplacas para capturar anticuerpos de suero. Después del lavado, los anticuerpos anti-neurturina capturados fueron cuantificados de una lectura de luminiscencia usando anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con biotina de anticuerpo anti-IgG/IgM de cabra seguido por el uso de estreptavidina conjugada con proxidasa. La IgG anti-neurturina y la IgM anti-neurturina diluidas en suero fueron usadas para establecer las curvas estándar (véase las Figs. 8A y 8B).

Puesto que la PEGilación de las proteínas farmacológicamente activas reduce su potencial inmunogénico, se probaron variantes de PEG-neurturina seleccionada con biodisponibilidad mejorada y potencia sostenida por su potencial inmunogénico de la administración subcutánea una vez al día de 50 $\mu\text{mol/kg}$ durante 28 días en ratones adultos. La aparición de los anticuerpos anti-neurturina es determinada por ensayo de ELISA anticuerpo anti-neurturina cada semana en comparación con grupos control con vehículo y con neurturina wt.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de neurturina que comprende una porción de poliol unida covalentemente a un producto de proteína neurturina humana o un fragmento biológicamente activo de la misma.

2. Conjugado de neurturina según la reivindicación 1, que comprende un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID. NO. 1, o un homólogo, ortólogo, variante, análogo, derivado, fragmento biológicamente activo o mutante biológicamente activo del mismo.

3. Conjugado de neurturina según las reivindicaciones 1 o 2, donde la porción de poliol es una porción de polietilen glicol.

4. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la porción de poliol es una porción de poliol de cadena simple.

5. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la porción de poliol es una porción de poliol de cadena ramificada.

6. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la porción de poliol es una porción de polialquilen glicol.

7. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que tiene la misma o una

actividad de neurturina *in vivo* mayor que la neurturina humana nativa.

8. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la neurturina humana.

9. Conjugado de neurturina según la reivindicación 8, donde el cambio de aminoácido es entre los aminoácidos 47-69, preferiblemente 51-65 de la neurturina humana madura.

10. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde al menos uno de los residuos de arginina 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 o 65 es suprimido o sustituido.

11. Conjugado de neurturina según la reivindicación 10, donde al menos un residuo de arginina es sustituido por un aminoácido residual neutro o ácido, por ejemplo ácido glutámico.

12. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde al menos es introducido un residuo de lisina.

13. Composición farmacéutica que comprende al menos un producto de proteína neurturina y/o un fragmento biológicamente activo del mismo conjugado con al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con un soporte, diluyente y/o adyuvante

farmacéuticamente aceptable.

14. Composición según la reivindicación 13, donde el producto de proteína neurturina es un producto de proteína neurturina humana o un fragmento biológicamente activo de la misma.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde el producto de proteína neurturina modificada está monoPEGilado, que comprende una molécula de polietilen glicol de una sola cadena.

16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde el producto de proteína de neurturina modificada está oligo o poliPEGilada, comprendiendo dos, tres, cuatro o varias cadenas de molécula de polietilen glicol.

17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, donde el producto de proteína de neurturina modificada comprende al menos una molécula de polietilen glicol de cadena lineal.

18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, donde el producto de proteína neurturina modificada comprende al menos una molécula de polietilen glicol de cadena ramificada.

19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-18, donde la molécula de polietilen glicol tiene un peso molecular promedio de 100 a 10000 Da,

preferiblemente 200 a 8000 Da y de manera más preferible 1000 a 7000 Da.

20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-19, donde la molécula de polietilen glicol está ligada al aminoácido N-terminal del producto de proteína neurturina modificada.

21. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-20, donde la molécula de polietilen glicol se liga al producto de proteína neurturina modificada vía un enlace acilo o alquilo.

22. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-21, donde la molécula de polietilen glicol es terminada por un grupo OH-, OCH₃- o OEt-.

23. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-22, el cual tiene una mayor biodisponibilidad del ingrediente activo en comparación con una composición con un producto de proteína neurturina de control sin modificar.

24. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-23, donde la proteína neurturina modificada está presente en una cantidad para proporcionar un incremento de al menos 2 veces, preferiblemente al menos 5 veces y de manera más preferible al menos 10 veces en la biodisponibilidad del ingrediente activo.

25. Composición según cualquiera de las

reivindicaciones 13-24 para inyección o infusión.

26. Composición según la reivindicación 25 para inyección subcutánea o intravenosa.

27. Composición según cualquiera de las
5 reivindicaciones 13-26 para la prevención o tratamiento de trastornos pancreáticos o neurodegenerativos.

28. Composición según la reivindicación 27 para la prevención o tratamiento de diabetes mellitus tipo I, LADA y diabetes mellitus tipo II.

10 29. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-28 para la administración a un mamífero, particularmente un humano.

15 30. Variante de neurturina humana que comprende al menos uno, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 cambios de aminoácido en comparación con la neurturina humana natural.

31. Variante de neurturina humana según la reivindicación 30, donde los cambios de aminoácido son como se definen en las reivindicaciones 9-12.

20 32. Método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite del mismo que comprende una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un producto de proteína neurturina modificada o un fragmento biológicamente activo de la misma, el cual está conjugado a al menos una molécula de polietilen glicol como
25 un ingrediente activo junto con un soporte, diluyente y/o

adyuvante farmacéuticamente aceptable.

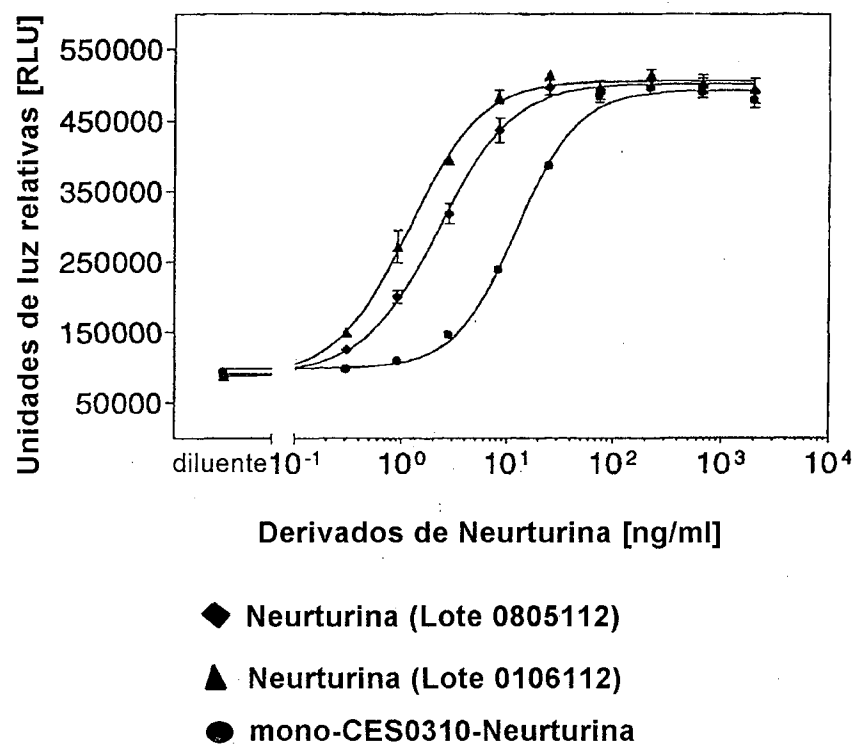
33. Método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite del mismo que comprende una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un producto de proteína neurturina modificada o un fragmento biológicamente activo de la misma, el cual está conjugado con al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con una sustancia de bajo peso molecular con un soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

15

20

25

Figura 1A



239

2/10

Figura 1B

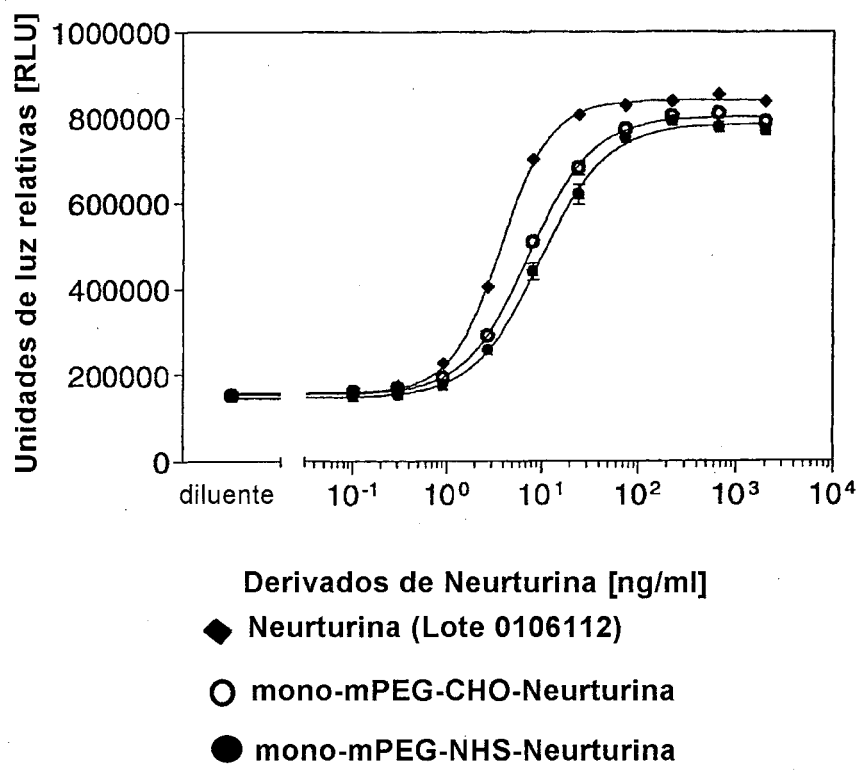


Figura 2A

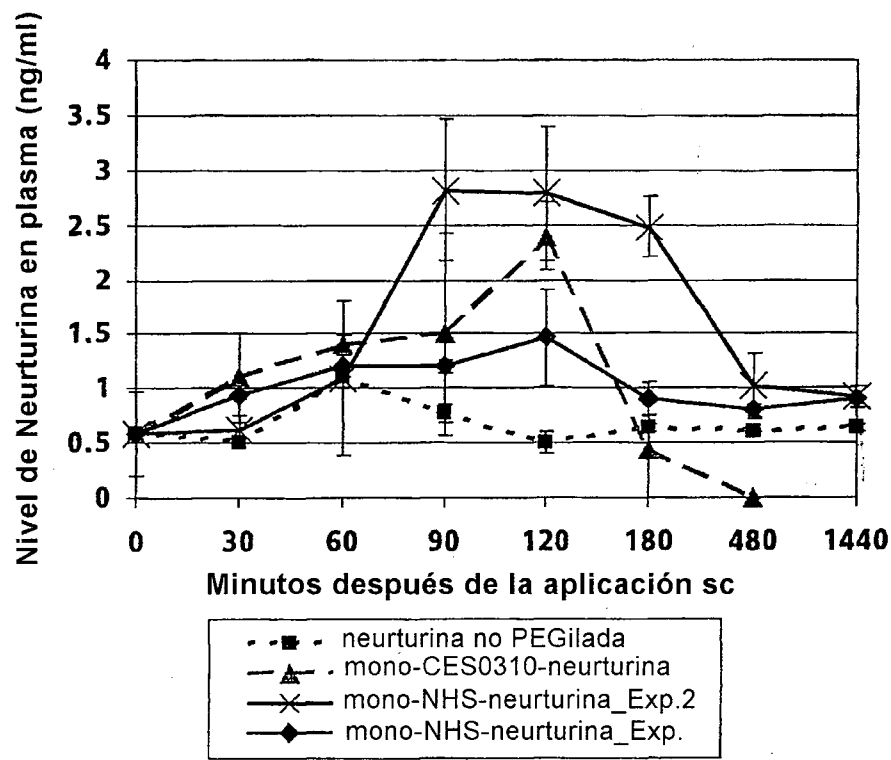


Figura 2B

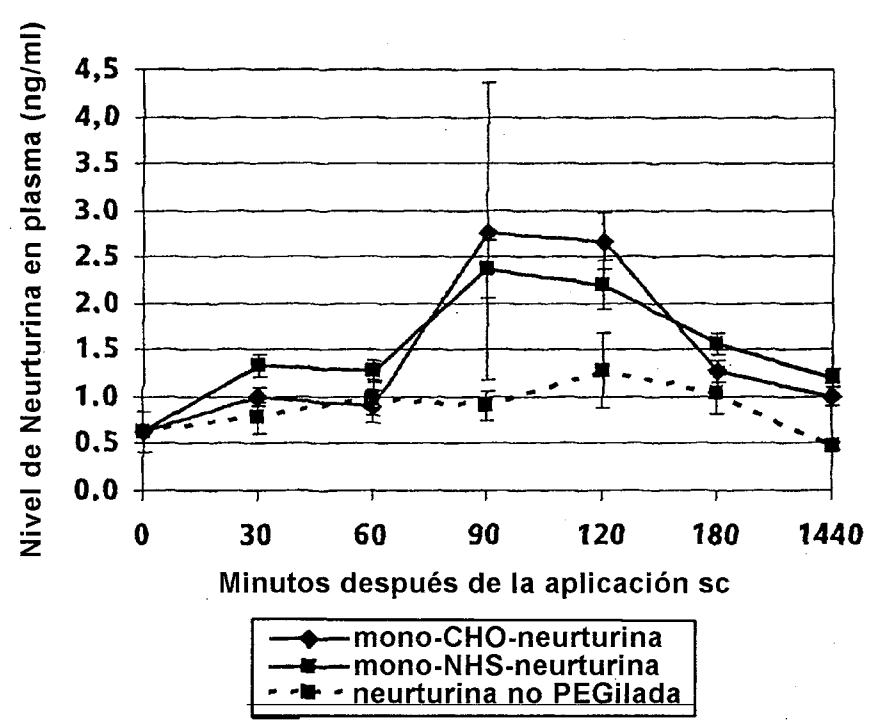


Figura 3

MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCREGLLLS HRLGPALVPL HRLPRTLDA
IARLAQYRAL LQGAPDAMEL RELTPWAGRP PGPRRRAGPR RRRAR**ARLGA**
RPCGLRELEV RVSELGLGYA SDETVLFRYC AGACEAAARV YDLGLRRLRQ
RRRLRRERVR AQPCCRPTAY EDEVSFDAH SRYHTVHEL ARECACV

Figura 4A

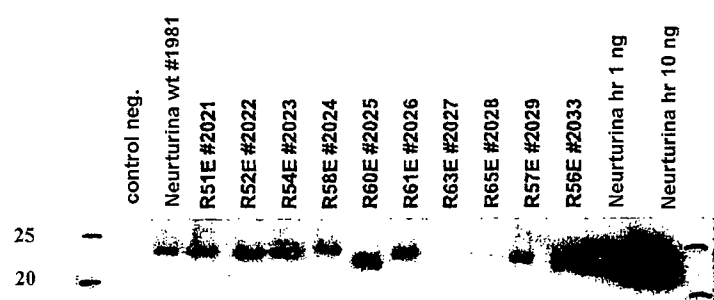
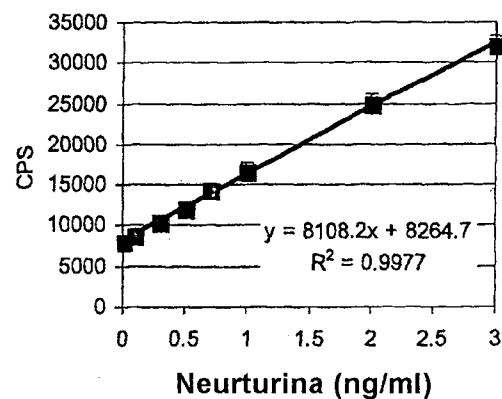


Figura 4B



7/10

Figura 5A

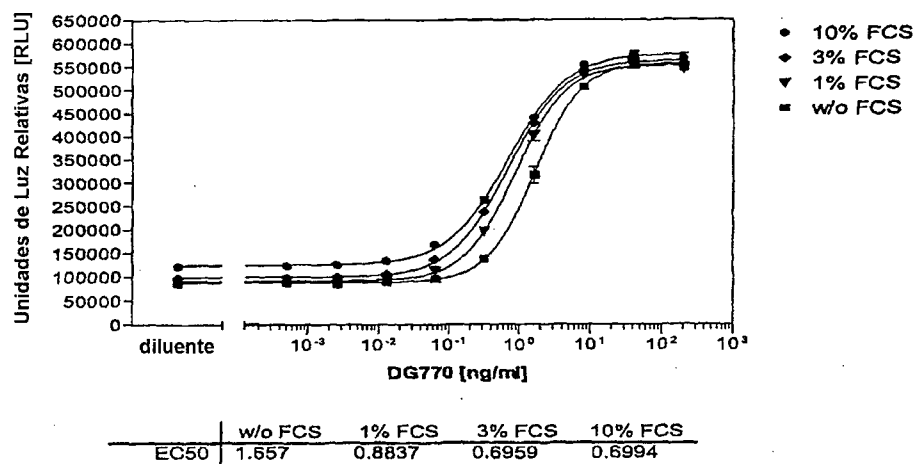


Figura 5B

posición del aminoácido mutante (Neurturina madura humana)	Concentración de Neurturina [ng/ml] por ELISA de Neurturina	CE50[ng/ml] de la actividad de Neurturina por ensayo del gen reportero de tirosina hidroxilasa celular
control	n.d.	n.d.
wt	1500	0.71
R51E	1600	0.58
R52E	1500	0.32
R54E	1700	0.41
R56E	1600	0.48
R57E	1300	0.58
R58E	1200	0.89
R60E	1600	0.47
R61E	1600	0.48
R63E	n.d.	n.d.
R65E	1500	0.37
wt (E.coli)	1500	2.20

Figura 6

<i>Homo sapiens</i> (NP_004549)	DLGLRRLRGRRRLRRERVRAQPC
<i>Macaca mulatta</i> (XP_001085705.1)	DLGLRRLRGRRRLRRERVRAQPC
<i>Bos taurus</i> (XP_603915.2)	DLGLRRLRGRRRVRRERVRAQPC
<i>Canis familiaris</i> (XP_854570)	DLGLRRLRGRRRVRRERVRAQPC
<i>Mus musculus</i> (NP_032764.1)	DLGLRRLRGRRRVRRERARAHP
<i>Rattus norvegicus</i> (NP_445851.1)	DLGLRRLRGRRRVRRERVRAHP
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (XP_001509015.1)	DLGLRRLRGRRRVRRERVRAQPC
<i>Monodelphis domestica</i> (XP_001369475.1)	DLGLRRLRGRRRVRRERVRAQPC
<i>Gallus gallus</i> (NP_001074973.1)	DL <u>SL</u> RS <u>VS</u> RR <u>KK</u> IR <u>KE</u> KVRARPC

Figura 7

[illegible]

Figura 8A

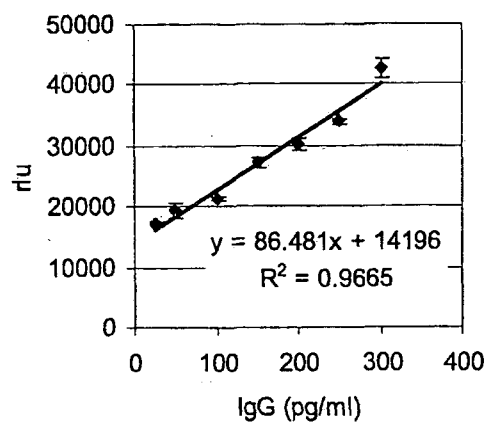
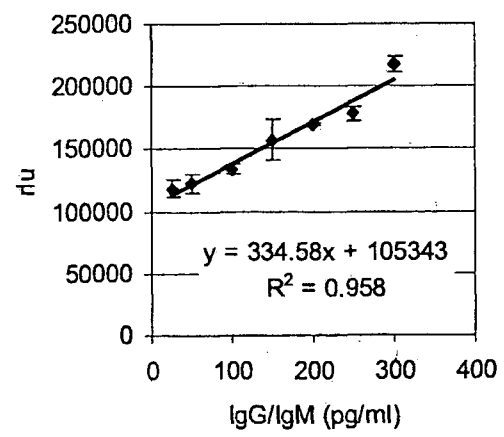


Figura 8B



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DeveloGen AG

<120> Conjugados de neurturina novedosos para uso

5 farmacéutico

<130> 41112P EP

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

10 <211> 197

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

15 <222> (1)..(197)

<223> precursor de neurturina humana

<400> 1

Met Gln Arg Trp Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Cys Ser Ser

1 5 10 15

20 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

25 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
5 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
10 130 135 140
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
15 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

248.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/009320

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48 C07K14/475 A61K38/18 A61P3/10 A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/051415 A (DEVELOGEN AG [DE]; AUSTEN MATTHIAS [DE]; BURK ULRIKE [DE]) 9 June 2005 (2005-06-09) cited in the application	1-33
Y	page 8, line 26 - page 10, line 3 page 15, line 1 - page 16, line 10 claims 15-17	1-33
X	WO 99/06064 A (AMGEN INC [US]) 11 February 1999 (1999-02-11) cited in the application page 16, line 9 - page 29, line 19 claims 22,24,25	1-26, 29-33
X	US 2004/265972 A1 (WEINTRAUB BRUCE D [US] ET AL) 30 December 2004 (2004-12-30) paragraphs [0726] - [0741]	30,31
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 July 2009

Date of mailing of the international search report

07/08/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Monami, Amélie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/009320

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EP 1 872 790 A (DEVELOGEN AG [DE]) 2 January 2008 (2008-01-02) paragraphs [0028], [0029] -----	1-33
Y	WO 2004/069176 A (BIOGEN IDEC INC [US]; SAH DINAH WEN-YEE [US]; PEPINSKY R BLAKE [US]; B) 19 August 2004 (2004-08-19) page 1, line 23 - line 27 examples 1-5 -----	1-33
A	PASUT G ET AL: "PROTEIN, PEPTIDE AND NON-PEPTIDE DRUG PEGYLATION FOR THERAPEUTIC APPLICATION" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS, INFORMA HEALTHCARE, GB, vol. 14, no. 6, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 859-894, XP001202106 ISSN: 1354-3776 the whole document -----	1-33
A	CALICETI P ET AL: "Pharmacokinetic and Biodistribution Properties of Poly(ethylene glycol)-Protein Conjugates" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 55, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 1261-1277, XP003001867 ISSN: 0169-409X the whole document -----	1-33

ISO

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/009320

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005051415	A	09-06-2005	AT 435026 T JP 2007512290 T US 2008241106 A1	15-07-2009 17-05-2007 02-10-2008
WO 9906064	A	11-02-1999	AT 230607 T AU 8658298 A CA 2298414 A1 DE 69810635 D1 DE 69810635 T2 DK 1005358 T3 EP 1005358 A1 ES 2190093 T3 JP 2001525316 T US 6043221 A US 6274554 B1	15-01-2003 22-02-1999 11-02-1999 13-02-2003 28-05-2003 24-02-2003 07-06-2000 16-07-2003 11-12-2001 28-03-2000 14-08-2001
US 2004265972	A1	30-12-2004	NONE	
EP 1872790	A	02-01-2008	EP 2040736 A1 WO 2008000447 A1	01-04-2009 03-01-2008
WO 2004069176	A	19-08-2004	US 2008306212 A1 US 2005142098 A1	11-12-2008 30-06-2005

151

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2008/009320

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

WEICKMANN & WEICKMANN
Postfach 860 820
81635 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)
05 May 2010 (05.05.2010)

Applicant's or agent's file reference
41112P WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2008/009320

International filing date (day/month/year)
05 November 2008 (05.11.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address SCHNEIDER, Martin Schildweg 16 37085 Göttingen Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Gaspais Stephane e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05
---	--

Facsimile No. +41 22 338 89 75

152

PC Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 047/048	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 07021493.7	(32) Fecha 05/11/2007	(33) País EP
		(72) Inventor(es) MATTHIAS AUSTEN Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 05/06/2010		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 14/05/2009
	Fecha de presentación de la solicitud: 05/11/2008		N° publicación: WO 2009/059755 A3
	No. de solicitud PCT/EP2008/009320		
(54) Titulo: CONJUGADOS DE NEURTURINA NOVEDOSOS PARA USO FARMACEUTICO			

Reivindicación(es):

1. Conjugado de neurturina que comprende una porción de poliol unida covalentemente a un producto de proteína neurturina humana o un fragmento biológicamente activo de la misma.
2. Conjugado de neurturina según la reivindicación 1, que comprende un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID. NO. 1, o un homólogo, ortólogo, variante, análogo, derivado, fragmento biológicamente activo o mutante biológicamente activo del mismo.
3. Conjugado de neurturina según las reivindicaciones 1 o 2, donde la porción de poliol es una porción de polietilen glicol.
4. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la porción de poliol es una porción de poliol de cadena simple.
5. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la porción de poliol es una porción de poliol de cadena ramificada.
6. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la porción de poliol es una porción de polialquilen glicol.
7. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que tiene la misma o una actividad de neurturina *in vivo* mayor que la neurturina humana nativa.
8. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la neurturina humana.
9. Conjugado de neurturina según la reivindicación 8, donde el cambio de aminoácido es entre los aminoácidos 47-69, preferiblemente 51-65 de la neurturina humana madura.
10. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde al menos uno de los residuos de arginina 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 o 65 es suprimido o sustituido.

11. Conjugado de neurturina según la reivindicación 10, donde al menos un residuo de arginina es sustituido por un aminoácido residual neutro o ácido, por ejemplo ácido glutámico.
12. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde al menos es introducido un residuo de lisina.
13. Composición farmacéutica que comprende al menos un producto de proteína neurturina y/o un fragmento biológicamente activo del mismo conjugado con al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con un soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
14. Composición según la reivindicación 13, donde el producto de proteína neurturina es un producto de proteína neurturina humana o un fragmento biológicamente activo de la misma.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde el producto de proteína neurturina modificada está monoPEGilado, que comprende una molécula de polietilen glicol de una sola cadena.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde el producto de proteína de neurturina modificada está oligo o poliPEGilada, comprendiendo dos, tres, cuatro o varias cadenas de molécula de polietilen glicol.
17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, donde el producto de proteína de neurturina modificada comprende al menos una molécula de polietilen glicol de cadena lineal.
18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, donde el producto de proteína neurturina modificada comprende al menos una molécula de polietilen glicol de cadena ramificada.
19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-18, donde la molécula de polietilen glicol tiene un peso molecular promedio de 100 a 10000 Da, preferiblemente 200 a 8000 Da y de manera más preferible 1000 a 7000 Da.

153.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 32,518
FECHA : ABRIL 26 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-067268- -00000-0000

Fecha: 2010-06-03 15:57:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 154

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664722	26/04/2010	42,961,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	*** S.DISTINTIVO CAMBIO TITULARIDAD-	350,000.00
	TOTAL :	\$ 350,000.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

020: 16793 - 841 - 003 - 9

154

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176989-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 42,169
FECHA : MAYO 24 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-067268- -00000-0000

Fecha: 2010-06-03 15:57:25 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 154

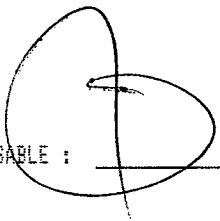
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664663	24/05/2010	23,760,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02	PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES
			TOTAL : \$ 819,000.00

SON: OCHOCIENTOS DIEZ Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010.16793-84 003-9.



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT

REFERENCIA	Radicación No.	10 067268
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/009320
	Fecha inicio fase nacional	05/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

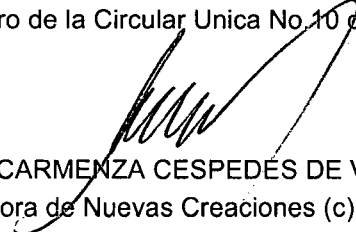
07886

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDÉS DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

18 JUN. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11