



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 353 457**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **09153016 .2**

(96) Fecha de presentación : **10.06.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2058329**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2009**

(54) Título: **Secreción mejorada de neublastina.**

(30) Prioridad: **10.06.2003 DK 2003 00861**
02.10.2003 US 507483 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2011

(73) Titular/es: **NsGene A/S**
Baltorpvej 154
2750 Ballerup, DK
BIOGEN IDEC MA Inc.

(72) Inventor/es: **Grønborg, Mette;**
Sisk, William P.;
Tornøe, Jens;
Pederson, Nels E.;
Kusk, Philip y
Wahlberg, Lars Ulrik

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Secreción mejorada de neublastina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para producir un polipéptido de neublastina así como a la liberación local de neublastina a regiones específicas del sistema nervioso incluyendo el sistema nervioso central y el ojo, por ejemplo, mediante terapia génica. La invención incluye la liberación de neublastina a partir de células trans-
 10 ducidas o transfectadas encapsuladas dentro de una macrocápsula con una membrana semipermeable. La invención se refiere adicionalmente a células de mamífero que pueden producir neublastina en cantidades aumentadas.

Antecedentes de la invención

15 Las células tienen formas para dirigir las proteínas sintetizadas *de novo* a diversos compartimentos de las células y al espacio extracelular. Los péptidos señal se encuentran en la parte codificante del ADN cromosómico y se sintetizan como parte de la proteína mediante el aparato ribosómico. Los péptidos señal constituyen el extremo N-terminal y provocan que los polipéptidos recién sintetizados se dirijan hacia el retículo endoplasmático rugoso. En éste, el péptido señal se escinde a partir del polipéptido y la proteína madura se secreta hacia el entorno. Por tanto, el péptido
 20 señal permanece dentro de la célula.

La pro-parte de la proteína se escinde de la parte madura de la proteína y acaba fuera de la célula. Para algunos factores neurotróficos, por ejemplo NGF, la pro-parte de la proteína es bioactiva como neuropéptido.

25 En terapia génica, cuando el gen insertado codifica para una proteína que va a secretarse, se necesitará colocar una secuencia señal en frente de la proteína madura para garantizar su procesamiento apropiado a través del retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi. La primera elección es casi invariablemente la secuencia señal nativa de la proteína en cuestión, debido a que generalmente se desea que la proteína se secrete y/o procese en la misma forma que se secreta y procesa por la célula nativa. Para algunos usos también se desea que la cantidad de proteína expresada
 30 sea la misma que en la célula nativa. Además, no puede excluirse la posibilidad de que la secuencia señal escindida desempeñe un papel en el metabolismo de la célula. Finalmente, un experto en la técnica elegiría utilizar la parte de la pre-pro-proteína para garantizar un procesamiento y plegado correctos de la proteína madura.

35 En muchos casos ha resultado que las células transducidas y transfectadas *in vivo* que se supone que secretan un factor terapéutico no secretan el factor terapéutico en cantidades terapéuticamente suficientes y durante un tiempo suficiente. Esto también puede ser un problema en la terapia génica *ex vivo* en la que las células se transfectan o transducen fuera del organismo y se insertan en el paciente tras la modificación genética.

40 La técnica anterior no proporciona mucha información con respecto al acoplamiento del péptido señal con proteínas heterólogas en mamíferos. Para la expresión heteróloga de proteínas de mamífero en hongos o levaduras, es una práctica común sustituir el péptido señal de mamífero por uno que es funcional en la especie productora.

El documento 2004/094592 describe la expresión de un polipéptido que comprende un péptido señal de albúmina o un péptido señal de hormona de crecimiento unido a una neublastina truncada en el extremo N-terminal de 104
 45 residuos de aminoácido (NBN 104) y en la que el polipéptido carece de la pro-región de neublastina.

Sumario de la invención

50 La presente invención se refiere a un método para producir un polipéptido de neublastina biológicamente activo, que comprende cultivar una célula que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal y un polipéptido de neublastina, en el que dicha secuencia de nucleótidos no codifica para una pro-región de neublastina.

55 El polipéptido de pre-pro-neublastina nativa humana tiene 220 aminoácidos de longitud (figura 17A) (SEQ ID NO: 10). El péptido señal de neublastina consiste en 39 aminoácidos, empezando con metionina en la posición 1 y terminando con alanina en la posición 39 (figura 17B). El pro-dominio de longitud completa más largo de neublastina consiste en 69 aminoácidos, empezando con serina en la posición 40 y terminando con arginina en la posición 107 (figura 17C). Un polipéptido de neublastina madura consiste en los 113 aminoácidos C terminales, empezando con
 60 alanina en la posición 108 y terminando con glicina en la posición 220. La pre-pro-Neublastina contiene varios sitios de escisión pro-propéptido posibles y la expresión de pre-pro-neublastina en células de mamífero da como resultado la secreción de una variedad de péptidos maduros, formas posibles que consisten en los 140, 113, 107 y 104 aminoácidos C-terminales. Para cada una de estas formas maduras existe un pro-dominio correspondiente constituido por los aminoácidos desde la posición 40 hasta la posición anterior al primer residuo en la proteína madura.

65 La presente invención proporciona una solución al problema de ausencia casi completa de secreción del factor neurotrófico, incluyendo neublastina, frecuentemente experimentada tras la transducción de células de mamífero con vectores virales tanto *in vivo* como *in vitro*. También se observa el fenómeno para vectores de expresión basados en

plásmidos. Por algunas razones desconocidas, se bloquea frecuentemente en las células de mamífero la secreción del factor neurotrófico codificado por el vector. Una explicación posible podría ser que el procesamiento correcto de las proteínas secretadas es específico de la célula. Esto representa un grave problema en el uso de terapia génica con vector viral. Actualmente, la terapia génica con vectores virales se considera el método más preferido (si no el único relevante) para terapia génica *in vivo* o *ex vivo* debido a que los vectores virales garantizan la integración estable en el genoma de la célula transducida.

La invención proporciona la expresión eficaz de una neublastina humana madura, o un truncamiento biológicamente activo de una neublastina humana madura, es decir, un polipéptido secretado de neublastina, como una pre-proteína, en vez de como una pre-pro-proteína. Una pre-proteína de neublastina según la invención comprende generalmente dos componentes: un polipéptido secretado de neublastina (como se definió anteriormente) y una secuencia señal heteróloga.

Además, los presentes inventores han mostrado que mediante la sustitución del péptido señal nativo de neublastina por un péptido señal alternativo a partir de otras proteínas, tal como a partir de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina, la secreción de neublastina se potencia adicionalmente, especialmente a partir de las células transducidas.

Además, los presentes inventores han mostrado que mediante la eliminación de la secuencia de nucleótidos que codifica para la pro-región de la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido señal así como el polipéptido de neublastina, es posible entonces expresar y tener una mayor cantidad de neublastina secretada, que si se incluyera la pro-región.

Se ha encontrado que aunque la pro-región es necesaria para que se plieguen correctamente muchas proteínas, es posible producir un polipéptido de neublastina biológicamente activo sin una pro-región.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido señal y el polipéptido de neublastina, al vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos, a una composición farmacéutica que comprende el vector según la invención y uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede utilizarse para terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.

En un aspecto adicional la invención se refiere a una célula huésped aislada transducida o transfectada con el vector según la invención.

Ha resultado que tales células huésped genéticamente modificadas producen cantidades inesperadamente elevadas de neublastina en comparación con las células transducidas o transfectadas con vectores que codifican para neublastina con su secuencia señal nativa. Por tanto estas células huésped transducidas o transfectadas constituyen una fuente prometedora de células productoras para la producción de neublastina a escala industrial. Las células secretoras de neublastina también pueden utilizarse para trasplante en sujetos mamíferos como fuente de neublastina. Una aplicación particular es la terapia génica *ex vivo*.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una línea celular de empaquetamiento que puede producir una partícula de vector infectiva, comprendiendo dicha partícula de vector un genoma derivado de retrovirus que comprende una LTR retroviral en 5', un sitio de unión a ARNt, una señal de empaquetamiento, un promotor operativamente unido a una secuencia polinucleotídica que codifica para una proteína de fusión que comprende neublastina y un péptido señal de inmunoglobulina, un origen de síntesis de la segunda hebra de ADN y una LTR retroviral en 3'.

Estas líneas celulares de empaquetamiento pueden utilizarse para producir los vectores virales según la invención. También pueden utilizarse para terapia génica *in vivo* cuando se encapsulan y trasplantan al SNC.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un mamífero transgénico no humano que comprende al menos una célula que se transduce o transfecta con el vector según la invención. Tales animales que sobreexpresan neublastina pueden utilizarse para obtener el perfil genético y en la selección y el desarrollo de fármacos.

Preferiblemente, la célula transducida o transfectada tiene el genotipo del animal individual, es decir, no es un trasplante alogénico o xenogénico.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un dispositivo implantable para cultivo celular, comprendiendo el dispositivo:

una membrana semipermeable que permite la difusión de un factor neurotrófico a su través; y

al menos una célula huésped aislada según la invención.

Estas cápsulas pueden utilizarse para la liberación local de neublastina tras el trasplante en el sistema nervioso central. La liberación localizada y prolongada del factor de crecimiento es un método de administración preferido para el tratamiento de varios trastornos del SNC, incluyendo pero sin limitarse a enfermedad de Parkinson, enferme-

dad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular y esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Las cápsulas pueden utilizarse asimismo para la liberación local y prolongada de neublastina para tratar trastornos periféricos incluyendo pero sin limitarse a neuropatía y dolor neuropático. Las indicaciones adicionales incluyen trastornos oculares.

Las cápsulas de esta invención proporcionan la liberación de partículas virales en un sitio deseado en un paciente utilizando un enfoque capsular. La encapsulación de las líneas celulares que producen el vector permite la liberación continua de la partícula viral al sitio diana, en contraposición a una única infusión. Además, es posible la terapia repetida, con probabilidad reducida de ataque inmunitario. Las cápsulas tienen poros lo suficientemente grandes como para permitir el paso de partículas virales liberadas a partir de las células de empaquetamiento, aunque impiden el paso de la célula huésped hacia la cápsula.

Este enfoque capsular aumenta la seguridad y el control de la terapia debido a que los dispositivos pueden retirarse fácilmente (terminando el tratamiento de transducción) o extraerse y reimplantarse (modificando el tratamiento). Además, se reduce la posibilidad de infección debido a que el dispositivo capsular no se abre ni externaliza.

Finalmente, debido a que la encapsulación impide que las células de empaquetamiento migren dentro del paciente, y prolonga la viabilidad de las células de empaquetamiento tras el implante, probablemente se necesitan menos células para esta terapia. Esto puede ser ventajoso en la disminución adicional de una reacción inmunitaria en el paciente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del vector según la invención como medicamento.

Todavía en un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del vector según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del vector según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno del SNC.

Además, la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso, comprendiendo dicho método administrar a un individuo que necesita del mismo:

una cantidad terapéuticamente eficaz del vector de la invención; o

una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende el vector.

Según este aspecto de la invención, se proporcionan métodos mejorados de terapia génica *in vivo* para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso. Tal como se demuestra mediante los ejemplos adjuntos, la transducción con los vectores virales de la presente invención da como resultado la secreción no observada hasta la fecha de la neublastina codificada y como consecuencia un efecto terapéutico mejorado.

Todavía en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso, comprendiendo dicho método trasplantar a un individuo que necesita del mismo:

- una cantidad terapéuticamente eficaz de las células transducidas de la invención; o

- un dispositivo implantable según la invención.

Este aspecto proporciona otra forma de tratamiento de trastornos del sistema nervioso basado en terapia génica *ex vivo* e implante de células terapéuticas que pueden secretar cantidades aumentadas de neublastina.

El método actualmente preferido para la producción a gran escala de neublastina es la expresión heteróloga en *E. coli*, posterior lisis, extracción, purificación, replegado y opcionalmente escisión de la proteína. Un método alternativo que se utiliza para la producción de cantidades a escala de investigación incluye el cultivo de una célula productora de mamífero tal como células CHO que secretan neublastina correctamente procesada y plegada en el medio de cultivo, del que puede aislarse de manera relativamente fácil. Las células de mamífero de la presente invención producen neublastina en cantidades superiores que las observadas anteriormente para las células de mamífero y, por tanto, representan una fuente mejorada de células para producir neublastina bioactiva, que es neublastina correctamente procesada y plegada.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Alineamiento de las secuencias de IgSP de diversos mamíferos.

Figura 2: Mapa de vector del constructo de vector lentiviral pHsC.IgSP.hNBN.W utilizado para los experimentos de transducción en el ejemplo 2.

Figura 3: Mapa de vector del pNS1n.IgSP.hNBN. La misma secuencia de IgSP-NBN que pHsC.IgSP.hNBN.W entre los sitios de restricción BamHI y XhoI utilizados en el ejemplo 1.

Figura 4: Determinación de la actividad de NBN en el ELISA de RetL3 (muestras duplicadas). (a) Se determinaron las actividades de NBN en los sobrenadantes celulares utilizando artemina recombinante de ratón producida en *E. coli* (mART) como patrón, (b) análisis de los sobrenadantes de células transfectadas, (c) análisis de los sobrenadantes de células transducidas.

Figura 5: Análisis de *Western-blot* con el anticuerpo anti-NBN nº 378. (a) Análisis de afinidad de GFR[alfa]3 por NBN purificada a partir de células CHO-NBN16 (CHO-NBN) y 20 ng de NBN recombinante de rata (rNBN). (b) Análisis de sobrenadantes de ARPE-19 transfectadas o transducidas con constructos de expresión de IgSP-NBN y dos clones de células CHO que sobreexpresan de manera estable NBN a partir de un constructo de tipo salvaje (CHO-NBN25c y CHO-NBN16). Las flechas indican la posición de los monómeros de neublastina glicosilados y no glicosilados tras la reducción por el anticuerpo nº 378.

Figura 6: Predicción de la escisión del péptido señal mediante SignalP. Para una explicación véase el ejemplo 4.

Figura 7: La figura 7A muestra el plásmido pHs C.hNBN.W y la figura 7B muestra el plásmido pHsCXW. Para una explicación véase el ejemplo 6.

Figura 8: La figura 8A muestra el medio condicionado por la liberación de NBN relativa y las figuras 8B y 8C muestran NBN en diferentes líneas celulares, véase también el ejemplo 7.

La figura 9 representa la secuencia de los 104 aminoácidos carboxilo (C) terminales del polipéptido de neublastina nativa humana (SEQ ID NO: 19) y la secuencia de ADN correspondiente que codifica para los 104 aminoácidos C terminales de la neublastina nativa humana (SEQ ID NO: 58) alineada con un gen sintético que codifica para los 104 aminoácidos C terminales de la neublastina nativa humana optimizada para su expresión en células CHO (SEQ ID NO: 59). Los nucleótidos en el gen sintético que se han cambiado con respecto a la secuencia nativa están indicados (*).

La figura 10 representa la secuencia de neublastina dentro del plásmido pNBN026-35 (SEQ ID NO: 60). Inmediatamente en sentido 5' de la secuencia presentada se encuentra un dinucleótido "CT" que contribuye a un sitio de restricción XhoI. Inmediatamente en sentido 3' se encuentra un sitio de restricción BamHI.

La figura 11 representa la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 61) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 62) de los 104 aminoácidos C terminales de neublastina fusionados a una secuencia señal sintética. La secuencia señal está subrayada.

La figura 12 representa la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 63) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 64) de los 104 aminoácidos C terminales de neublastina fusionados a una secuencia señal de neublastina. La secuencia señal está subrayada.

La figura 13A representa la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 65) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 66) de los 104 aminoácidos C terminales de neublastina fusionados a una secuencia señal de albúmina. La secuencia señal está subrayada.

La figura 13B representa la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 69) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 70) de los 104 aminoácidos C terminales de neublastina fusionados a una secuencia señal de albúmina modificada. La secuencia señal está subrayada.

La figura 14 representa la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 67) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 68) de los 104 aminoácidos C terminales de neublastina fusionados a una secuencia señal de hormona de crecimiento humana. La secuencia señal, que contiene un intrón, está subrayada.

La figura 15 representa los resultados del espectrómetro de masas de neublastina secretada a partir de células CHO utilizando la secuencia señal de albúmina (15A) o la secuencia señal de hormona de crecimiento humana (15B) (15C). Los picos a 11.156 y 11.157 daltons corresponden a un fragmento C terminal de neublastina de 104 aminoácidos. Los picos a 11.084 y 11.085 daltons corresponden a un fragmento C terminal de neublastina de 103 aminoácidos. La figura 15A representa la neublastina deglicosilada a partir de la secreción dirigida por albúmina. La figura 15B representa la neublastina deglicosilada a partir de la secreción dirigida por hormona de crecimiento humana. La figura 15C representa neublastina a partir de la secreción dirigida por hormona de crecimiento humana. Los picos con masas más grandes corresponden a la presencia de diversas glicoformas.

La figura 16 representa los resultados del ensayo KIRA que demuestran la actividad de la neublastina producida de manera recombinante en células CHO.

La figura 17A representa la secuencia de aminoácidos de la neublastina de longitud completa incluyendo la proteína madura, el pro-dominio y el péptido señal (SEQ ID NO: 10). La figura 17B representa la secuencia de aminoácidos del péptido señal de neublastina nativa de longitud completa. La figura 17C representa la secuencia de aminoácidos del pro-dominio de neublastina de longitud completa.

Definiciones

“Aminoácidos C-terminales”, tal como se utiliza en el presente documento, significa una serie de aminoácidos contiguos en la parte más distal de una cadena polipeptídica con respecto al extremo amino (N) terminal del polipéptido.

“Pro-región de neublastina” significa una región que comprende al menos aminoácidos que corresponden a los aminoácidos -41 a -11 de SEQ ID NO: 10, 11, 12.

“Polipéptido de pre-pro-neublastina” (SEQ ID NO: 10), tal como se utiliza en el presente documento, significa un polipéptido que consiste en neublastina madura humana, es decir, los 113 aminoácidos C-terminales de neublastina (aminoácidos 108 a 220 de SEQ ID NO: 10), el pro-dominio de neublastina humana de longitud completa, es decir, los 68 aminoácidos proximales al extremo N-terminal de la neublastina madura (aminoácidos 40 a 107 de SEQ ID NO: 10), y el péptido señal de neublastina humana, es decir, los 39 aminoácidos proximales al extremo N-terminal del pro-dominio de neublastina (aminoácidos 1 a 39 de SEQ ID NO: 10).

Péptido señal - péptido señal eucariótico. Un péptido señal eucariótico es un péptido presente en proteínas que están destinadas o bien a secretarse o bien a componentes de la membrana. Habitualmente, está en posición N-terminal en la proteína. En el presente contexto, todos los péptidos señal identificados en SignalP (versión 2.0 o preferiblemente versión 3.0) se consideran un péptido señal.

“Péptido señal de neublastina funcional”, tal como se utiliza en el presente documento, significa los primeros 39 aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o cualquier parte de la misma que efectúa la secreción de la neublastina madura a partir de una célula.

“Secuencia señal de neublastina funcional” significa una secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido señal de neublastina funcional.

Un péptido señal de mamífero es un péptido señal derivado de una proteína de mamífero secretada a través del RE (retículo endoplasmático).

Polipéptido de neublastina madura humana tal como se utiliza en la presente invención significa los 113 aminoácidos C-terminales de neublastina nativa humana, es decir, aminoácidos 108-220 de SEQ ID No. 10.

Polipéptido de neublastina madura de ratón tal como se utiliza en el presente documento significa los 113 aminoácidos C-terminales de neublastina nativa de ratón, es decir, aminoácidos 112-224 de SEQ ID No. 11.

Polipéptido de neublastina madura de rata tal como se utiliza en el presente documento significa los 113 aminoácidos C-terminales de neublastina nativa de rata, es decir, aminoácidos 112-224 de SEQ ID No. 12.

Polipéptido de neublastina tal como se utiliza en el presente documento significa un polipéptido que comprende los 99-140 aminoácidos C-terminales de neublastina nativa humana, los 99-144 aminoácidos C-terminales de neublastina nativa de rata o de ratón. Más preferiblemente, un polipéptido de neublastina comprende los 99-113 aminoácidos C-terminales de neublastina nativa humana, los 99-113 aminoácidos C-terminales de neublastina nativa de rata o los 99-113 aminoácidos C-terminales de neublastina de ratón, cada una con hasta 15 sustituciones de aminoácidos en la secuencia nativa. En ciertos contextos se entenderá que “polipéptido de neublastina secretado” significa un polipéptido que va a secretarse en contraposición a uno que ya se ha secretado. El polipéptido de neublastina secretado no contiene una pro-región de neublastina.

El prodominio de neublastina funcional es un péptido ubicado entre el péptido señal y el péptido maduro, pro-péptido que puede escindirse del péptido maduro mediante furina tras escindir el péptido señal.

Bioactividad: capacidad de unirse cuando se dimeriza junto con GFR α 3 a RET e inducir dimerización y autofosforilación de RET. Medida con ensayos de Elisa Kira o Elisa RET L3.

“Heterólogo”, tal como se utiliza cuando se refiere a una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos, significa una secuencia que se origina a partir de una fuente externa a la célula huésped particular, o, si es a partir de la misma célula huésped, se modifica con respecto a su forma original.

Péptido señal heterólogo; un péptido señal que no está operativamente unido de manera natural a un polipéptido de neublastina.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un método para producir un polipéptido de neublastina en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de neublastina no codifica para una pro-región. En el presente contexto, una pro-región comprende al menos los aminoácidos -41 a -11 de SEQ. ID. NO.: 10, 11 ó 12. Más preferiblemente, la pro-región comprende al menos los aminoácidos -41 a -1 de cualquiera de SEQ. ID. NO.: 10, 11 ó 12. Más preferiblemen-

te, la pro-región comprende al menos los aminoácidos -41 a 10 de cualquiera de SEQ. ID. NO.: 10, 11 ó 12, lo más preferiblemente comprende el pro-dominio de las secuencias, que corresponde a los aminoácidos -41 a 27 de SEQ ID NO: 10, o aminoácidos -41 a 31 de SEQ ID NO: 11, o de SEQ ID NO: 12.

5

Péptidos señal

El vector de expresión según la invención comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora que puede cultivar una célula transducida con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora que puede dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal operativamente unido a un polipéptido de neublastina, en el que dicha secuencia de nucleótidos no codifica para una pro-región de un polipéptido de neublastina.

Durante el proceso de secreción, el péptido señal de la pre-proteína de neublastina se escinde por la célula huésped produciendo el polipéptido de neublastina. Aunque el sitio de escisión generalmente está definido, un experto en la técnica apreciará que puede existir variabilidad en el sitio de escisión del péptido señal. Por consiguiente, las realizaciones que tienen cierta ambigüedad con respecto al sitio de escisión exacto se encuentran dentro del alcance de la invención.

El péptido señal puede ser cualquier péptido señal funcional, tal como un péptido señal heterólogo, tal como un péptido señal de mamífero. El péptido señal puede ser de cualquier especie adecuada, tal como de ser humano, ratón, rata, mono, cerdo, perro, gato, vaca o caballo.

El péptido señal está unido al polipéptido de neublastina, y preferiblemente se fusiona directamente a dicho polipéptido de neublastina, tal como el extremo C-terminal del péptido señal que se fusiona al extremo N-terminal del polipéptido de neublastina.

Tal como se demuestra mediante los ejemplos adjuntos, el uso de este péptido señal en general da como resultado una secreción mejorada de neublastina tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados fueron reproducibles tanto con células transducidas con lentivirus (*in vivo* e *in vitro*) como con células transfectadas con plásmidos (*in vitro*). Las células producen la proteína madura como una proteína biológicamente activa cuando el gen del péptido señal se fusiona directamente al gen que codifica para la proteína madura (es decir, excluyendo la pro-parte).

Los inventores han descubierto que no solamente el péptido señal de neublastina nativa funciona como péptido señal, sino que también los péptidos señal heterólogos son útiles y frecuentemente proporcionan un rendimiento superior que el péptido señal nativo. El péptido señal heterólogo puede seleccionarse del grupo que consiste en un péptido señal de factor de crecimiento, un péptido señal de hormona, un péptido señal de citocina y un péptido señal de inmunoglobulina.

Por tanto, ejemplos de péptidos señal son péptidos señal seleccionados del grupo que consiste en péptidos señal de TGF β , péptidos señal de GDF, péptidos señal de IGF, péptidos señal de BMP, péptidos señal de neurotrofina, péptido señal de PDGF y péptido señal de EGF, péptidos señal seleccionados de un péptido señal de hormona, seleccionándose dicha hormona del grupo que consiste en hormona de crecimiento, insulina, ADH, LH, FSH, ACTH, MSH, TSH, T3, T4 y DHEA, o un péptido señal de interleucina.

En una realización, el péptido señal se selecciona del grupo que consiste en péptido señal de neurturina, péptido señal de GDNF, péptido señal de persefina y péptido señal de NGF.

En otra realización, el péptido señal se selecciona del grupo que consiste en péptido señal de albúmina, péptido señal de albúmina modificado y péptido señal de hormona de crecimiento, tal como un péptido señal seleccionado del grupo que consiste en péptido señal de albúmina de rata, péptido señal de albúmina de rata modificado y péptido señal de hormona de crecimiento humana, tal como péptido señal de albúmina de rata y péptido señal de hormona de crecimiento humana.

Por tanto, en algunas realizaciones, el polipéptido de neublastina secretado se fusiona a un péptido señal de albúmina de rata nativo. Esto se muestra a modo de ejemplo mediante SEQ ID NO: 66. En otras realizaciones, el polipéptido de neublastina secretado se une a una secuencia señal de albúmina de rata modificada. Esto se muestra a modo de ejemplo mediante SEQ ID NO: 70. En otras realizaciones, el polipéptido de neublastina secretado se fusiona a una secuencia señal de hormona de crecimiento humana. Esto se muestra a modo de ejemplo mediante SEQ ID NO: 68.

Aún en otra realización, el péptido señal es un péptido señal de inmunoglobulina, tal como el péptido señal de la cadena pesada de la inmunoglobulina. En particular, un péptido señal de inmunoglobulina puede ser un péptido señal seleccionado del grupo que consiste en IgSP de ratón (SEQ ID NO 4), IgSP de rata (SEQ ID NO 6), IgSP porcino (SEQ ID NO 5), IgSP de simio (SEQ ID NO 2 ó 3), IgSP humano (SEQ ID NO 1), tal como IgSP de ratón (SEQ ID NO 4) o IgSP humano (SEQ ID NO 1).

El péptido señal de inmunoglobulina (IgSP) es un péptido pequeño de 19 aminoácidos conocido de un gran grupo de mamíferos. Las secuencias de ser humano, mono rhesus, tití, rata, ratón y cerdo se alinean en la figura 1. El porcentaje de identidad de secuencia en comparación con IgSP humano varía desde el 21 (cerdo) hasta el 68 (tití) por ciento. Esta variación relativamente grande indica que la secuencia específica puede alterarse hasta un grado importante sin que cambie sustancialmente la función biológica del péptido señal. También se observa que existe reactividad cruzada entre especies tal como se demuestra mediante los ejemplos adjuntos. Éstos se llevaron a cabo con el IgSP de ratón que era funcional en rata (experimentos *in vivo*) y en células humanas (células ARPE-19).

Preferiblemente, el IgSP es de origen humano o de ratón debido a que se sabe que el IgSP de ratón es funcional en ratón, rata y seres humanos. Para su uso en seres humanos, el IgSP preferiblemente es de origen humano con el fin de reducir el riesgo de cualquier efecto secundario entre especies.

En otra realización, el péptido señal es un péptido señal de neublastina nativa tal como un péptido señal de neublastina nativa humana. En este contexto, el último constructo del péptido señal de neublastina nativa y un polipéptido de neublastina se denomina delta-pro-neublastina.

Aún en otra realización, el péptido señal es un péptido señal sintético, tal como el péptido señal que tiene la secuencia de aminoácidos de AA1-AA38 de SEQ ID NO 62. (MetSerTrpAlaTrpAlaAlaCysProProCysProThrAlaLeuGlyLeuGlyGlySerAlaLeuTrpProThrLeuAlaAlaLeuAlaLeuLeuSerSerValAlaGluAla).

Neublastina

Los polipéptidos de neublastina son proteínas que promueven la supervivencia, mantienen la diferenciación fenotípica, previenen la degeneración, promueven la regeneración y restablecen la actividad de células neuronales y tejidos. La neublastina (inicialmente descrita, por ejemplo, en el documento WO 00/01815) se ha denominado alternativamente “artemina” (véase, por ejemplo, el documento WO 00/18799) y “enovina” (véase, por ejemplo, el documento WO 00/04050).

La neublastina se ha clasificado como un miembro distante de la superfamilia de TGF- β (Massague, *et al.*, 1994, Trends in Cell Biology, 4: 172-178) y es un miembro de la familia del ligando de factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (“GDNF”; documento WO 93/06116), en la familia que incluye GDNF, persefina (“PSP”; Milbrandt *et al.*, 1998, Neuron 20: 245253) y neurturina (“NTN”; documento WO 97/08196). Los ligandos de la subfamilia de GDNF tienen en común su capacidad para inducir la señalización a través del receptor tirosina cinasa RET. Estos tres ligandos de la subfamilia de GDNF difieren en sus afinidades relativas por una familia de receptores neurotróficos, los receptores de GFR[alfa]. La neublastina actúa preferiblemente a través del complejo GFR[alfa]3-RET. Baudet *et al.*, Development, 127, páginas 4335-44 (2000); Baloh *et al.*, Neuron, 21, páginas 1291-1302 (1998); Airaksinen *et al.*, Mol. Cell. Neuroscience, 13, páginas 313-325 (1999).

En la tabla 1 se muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos de neublastina (SEQ ID NO: 10) con los miembros de la subfamilia de GDNF neurturina, persefina y GDNF. Los polipéptidos de neublastina útiles en esta invención preferiblemente mantienen la huella genética de la subfamilia de GDNF, es decir, los residuos de aminoácidos subrayados en la tabla 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 353 457 T3

TABLA 1

Comparación de la secuencia de aminoácidos de neublastina con persefina, neurturina y GDNF

5	Neurturina-completa	-----MQRWKAALASVLCSSVLSIWMCRBGLLSHRLGPA
	Neublastina	MELGLGGLSTLSHC PWRRQPALWPTLAALALLSSVAEASLGSA PRSPAPREGPPP
	Persefina-completa	-----
	GDNF_HUMANO-completo	-----MKLWDVVAVCLVLLHTASAPPLPAGKRPPPEAPAE DRSLGRRRAPFALSSDS
10	Neurturina-completa	LVPLHRLPRTLDA RIARLAQYR ALLQGAPDAMELRELTPWAGRPPGPRRRAGPRRR
	Neublastina	VLAS PAGHLPGGR TARWCSGRARRPPQPSRPAPPPAPPSALPRGGRAARAGGFG
	Persefina-completa	-MAVGK FLLGSL LLLSLQLGQGWGPDARGVPVADGEFSSEQVAKAGCTWLGT HRPL
	GDNF_HUMANO-completo	NMPEDY PDQPD VMDFIQATIKRLK RS PKQMAVLPRRERNROAAAANPENS RKGG
15	Neurturina-completa	RARARLGAR PCGLRE LEVRVSELGLGYASDET VLFRY CAGACEA-AARVYD LGRR
	Neublastina	SRARAAGARGCRLRSQ LVPRALGL HRSD ELVFR PCSG ECRR -ARSPHDLSIAS
	Persefina-completa	ARLRALSGP QLWS TL SV AE LG LYASEEK VI FRY CAG SCPRGARTQHGLALAR
	GDNF_HUMANO-completo	RRGQ RGK NRGCVLTATHLNVTD LG LYETKEEL FRY CEGSCDA-AETTYD RILKN
		* * * * * : : : : : * : : *
20	Neurturina-completa	LRQRRLRRE---RVRAQ PCCE PTAYED EV SFLDAHSRYHTV HEL SA RE CACV-
	Neublastina	LLGAGAL PPPGSR PVS QPCCE PT RYE -AVS FM DVNSTWRTVDR LSA TAC GLG
	Persefina-completa	LQGGRAHGG----- PCCE PT RYT -DVAFLD RR HWQRLPQL SA AAC CGG
	GDNF_HUMANO-completo	LSRNRLVSD---RVGQ ACCE PLAFDDDL SFL DDNLVYHIL RK SA KRC CG CI -
		* : : : : : : : : : : *

25 * indica las posiciones que tienen un único residuo, completamente conservado.

: indica que uno de los siguientes grupos "fuertes" está completamente conservado: -STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW.

. indica que uno de los siguientes grupos "débiles" está completamente conservado: -CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, VLIM, HFY.

A partir del alineamiento de la secuencia de aminoácidos mostrada en la tabla 1, puede observarse que la neublastina tiene siete residuos de cisteína en ubicaciones que están conservadas dentro de la superfamilia de TGF-[beta]. Basándose en este alineamiento de secuencias, se mostró que la neublastina es un miembro de la subfamilia de GDNF de factores neurotróficos (LGLG-FR(Y/F)CSGSC-QxCCRP-SAXxCGC, la huella genética de la subfamilia de GDNF, subrayada en la tabla 1).

Los polipéptidos de neublastina útiles en el presente documento pueden proporcionarse en cualquier forma bioactiva, incluyendo la forma de pre-proteínas, proteínas maduras, proteínas glicosiladas, proteínas fosforiladas, formas truncadas o cualquier otra proteína modificada postraduccionalmente. Se supone que una neublastina bioactiva se encuentra en forma dimerizada para cada variante de NBN, debido a que la formación del dímero se requiere para la actividad. Se observa de poca a ninguna actividad en un polipéptido de NBN monomérico. Un polipéptido de neublastina bioactiva incluye un polipéptido dimerizado que, en presencia de un cofactor (tal como GFR[alfa]3 o RET), se une a GFR[alfa]3 o a un complejo de GFR[alfa]3 y RET, induce la dimerización de RET y la autofosforilación de RET. Por consiguiente, un "polipéptido de neublastina", tal como se utiliza en el presente documento, es un polipéptido que tiene actividad neurotrófica (por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 00/01815).

Los polipéptidos de neublastina producidos mediante los métodos de esta invención presentan al menos una actividad biológica de neublastina nativa. La actividad biológica para los fines de esta invención puede determinarse mediante cualquier método adecuado. Un polipéptido de neublastina biológicamente activo es un polipéptido que, cuando se dimeriza, puede unirse, junto con GFR α 3, a RET e inducir dimerización de RET y autofosforilación. (Véase por ejemplo Sanicola *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 6238). Puede utilizarse cualquier método de determinación de la unión al receptor y autofosforilación del receptor para evaluar la actividad biológica del polipéptido de neublastina producido mediante los métodos de la invención. Por ejemplo, puede utilizarse el ensayo KIRA (ELISA) descrito en el ejemplo 17 para evaluar la actividad biológica de la neublastina. (Véase también, Sadick *et al.*, 1996, Anal. Biochem., 235 (2): 207).

ES 2 353 457 T3

La neublastina en forma bioactiva también puede detectarse utilizando el ensayo ELISA de RetL3 descrito en el ejemplo 1. La neublastina sin función biológica no se detectará mediante el ensayo de ELISA de RetL3.

Las siguientes secuencias de longitud completa representan la pre-pro-neublastina de tipo salvaje con péptido señal de tipo salvaje. Tras la transducción o transfección en células de mamífero, las neublastinas maduras resultantes solamente se secretan en cantidades muy pequeñas. El péptido señal nativo de neublastina humana, de ratón y de rata está representado por los primeros 39 aminoácidos.

--AA₋₈₀-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 10 (prepro humana "salvaje"),

--AA₋₈₀-AA₁₄₄ de SEQ ID No. 11 (prepro de ratón),

--AA₋₈₀-AA₁₄₄ de SEQ ID NO: 12 (prepro de rata).

El polipéptido de neublastina secretado según la invención puede variar en longitud. Aunque el polipéptido de neublastina madura humana normalmente consiste en los 113 aminoácidos C-terminales de pre-pro-neublastina, no todos los 113 aminoácidos se requieren para lograr una actividad biológica útil de la neublastina. El truncamiento amino terminal es aceptable. Por tanto, el polipéptido de neublastina secretado corresponde a los 99-113 aminoácidos C-terminales de neublastina nativa humana, es decir, su longitud puede ser de 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 ó 113 aminoácidos. La selección de la longitud exacta del polipéptido de neublastina que va a secretarse es una elección de diseño, que puede realizar un experto en la técnica. Un polipéptido de neublastina humana secretado que consiste en los 104 aminoácidos C-terminales de neublastina nativa humana se muestra a modo de ejemplo en los ejemplos de trabajo proporcionados a continuación. Además de variar en longitud, el polipéptido de neublastina humana secretado puede variar en secuencia.

Las siguientes secuencias de aminoácidos ("aa" o "AA") de neublastina "salvaje" son a modo de ejemplo de aquéllas que son útiles en los métodos y composiciones de esta invención:

--AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 10 (140AA madura; en lo sucesivo "140NBN"),

--AA₂₅-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 10 (116AA madura; en lo sucesivo "116NBN"),

--AA₂₈-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 10 (113AA madura (SEQ ID No. 14); en lo sucesivo "113NBN"),

--AA₁-AA₁₄₄ de SEQ ID NO: 11 (144AA madura de ratón),

--AA₁-AA₁₄₄ de SEQ ID NO: 12 (144AA madura de rata),

--Péptidos con una secuencia C-terminal expuesta en AA₁₀₇-AA₁₄₀ de SEQ ID No. 10, más preferiblemente AA₇₆-AA₁₄₀ de SEQ ID NO. 10, y que conserva los 7 residuos de Cys característicos de la familia de GDNF y de la superfamilia de TGF-beta.

En una realización, el polipéptido de neublastina preferido contiene (siete) cisteínas conservadas como en SEQ ID NO. 10 en las posiciones 43, 70, 74, 107, 108, 136 y 138. Se sabe que estos siete residuos de cisteína conservados dentro de la superfamilia de TGF forman tres enlaces disulfuro intramonoméricos (contemplados, por ejemplo, en SEQ ID No. 10 entre los residuos de cisteína 43-108, 70-136 y 74-138) y un enlace disulfuro intermonomérico (contemplado, por ejemplo, en SEQ ID NO. 10 entre los residuos de cisteína 107-107), que junto con la región de hebra beta extendida constituye el motivo estructural conservado para la superfamilia de TGF-[beta]. Véase, por ejemplo, Daopin *et al.*, Proteins 1993, 17: 176-192.

Preferiblemente, el polipéptido de neublastina es una de las formas maduras de la proteína de tipo salvaje. Actualmente, se cree que la ausencia de la pro-región es importante para lograr elevados niveles de secreción en células de mamífero genéticamente modificadas.

Los polipéptidos de neublastina útiles en la presente invención también incluyen formas truncadas de la molécula de neublastina de longitud completa. En tales moléculas truncadas, uno o más aminoácidos se han delecionado del extremo N-terminal o el C-terminal, preferiblemente el extremo N-terminal. El polipéptido de neublastina truncada puede obtenerse proporcionando un polipéptido de neublastina madura y poniendo en contacto el polipéptido de neublastina madura con al menos una proteasa en condiciones suficientes para producir el polipéptido de neublastina truncada. Preferiblemente, al menos una proteasa es una exoproteasa, y ponerla en contacto con el polipéptido de neublastina madura da como resultado la formación de un producto de digestión con exopeptidasa del polipéptido de neublastina que puede digerirse adicionalmente con una dipeptidil peptidasa. Más preferiblemente, según la presente invención la proteína codificada por los vectores de expresión es la forma truncada y no necesita procesamiento adicional.

ES 2 353 457 T3

Los polipéptidos de neublastina truncada descritos en el presente documento incluyen preferiblemente una secuencia polipeptídica que abarca los siete residuos de cisteína conservados en la secuencia de neublastina madura. En ciertas realizaciones preferidas, el polipéptido de neublastina truncada incluye al menos los 85 aminoácidos carboxilo-terminales del polipéptido de neublastina 113NBN madura. En realizaciones más preferidas, el polipéptido de neublastina truncada incluye al menos los 98 aminoácidos carboxilo-terminales de 113NBN madura humana.

Una forma truncada incluye los 97 aminoácidos desde el primero hasta el último de los siete residuos de cisteína de la neublastina madura. Esto corresponde a los aminoácidos número 2 a 97 de SEQ ID No 20.

Otras variantes de neublastina incluyen formas de NBN truncada. Los ejemplos de éstas incluyen:

(i) La secuencia polipeptídica de 112 AA designada en el presente documento como NBN112, que tiene los 112 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 29-140 de SEQ ID NO. 10.

(ii) La secuencia polipeptídica de 111 AA designada en el presente documento como NBN111, que tiene los 111 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 30-140 de SEQ ID NO. 10.

(iii) La secuencia polipeptídica de 110 AA designada en el presente documento como NBN110, que tiene los 110 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 31-140 de SEQ ID NO. 10.

(iv) La secuencia polipeptídica de 109 AA designada en el presente documento como NBN109, que tiene los 109 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 32-140 de SEQ ID NO. 10.

(v) La secuencia polipeptídica de 108 AA designada en el presente documento como NBN108, que tiene los 108 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 33-140 de SEQ ID NO. 10.

(vi) La secuencia polipeptídica de 107 AA designada en el presente documento como NBN107, que tiene los 107 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 34-140 de SEQ ID NO. 10.

(vii) La secuencia polipeptídica de 106 AA designada en el presente documento como NBN106, que tiene los 106 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 35-140 de SEQ ID NO. 10.

(viii) La secuencia polipeptídica de 105 AA designada en el presente documento como NBN105, que tiene los 105 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 36-140 de SEQ ID NO. 10.

(ix) La secuencia polipeptídica de 104 AA designada en el presente documento como NBN104, que tiene los 104 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 37-140 de SEQ ID NO. 10 (también expuesta como SEQ ID No. 19).

(x) La secuencia polipeptídica de 103 AA designada en el presente documento como NBN103, que tiene los 103 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 38-140 de SEQ ID NO. 10.

(xi) La secuencia polipeptídica de 102 AA designada en el presente documento como NBN 102, que tiene los 102 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 39-140 de SEQ ID NO. 10.

(xii) La secuencia polipeptídica de 101 AA designada en el presente documento como NBN101, que tiene los 101 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 40-140 de SEQ ID NO. 10.

(xiii) La secuencia polipeptídica de 100 AA designada en el presente documento como NBN100, que tiene los 100 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 41-140 de SEQ ID NO. 10.

(xiv) La secuencia polipeptídica de 99 AA designada en el presente documento como NBN99, que tiene los 99 aminoácidos carboxilo-terminales de un polipéptido de neublastina madura, por ejemplo, aminoácidos 42-140 de SEQ ID NO. 10 (también expuesta como SEQ ID No. 20).

ES 2 353 457 T3

Se entiende que las formas truncadas de neublastina dadas a conocer en el presente documento (por ejemplo, las formas de 112 AA a 99 AA) tienen actividad neurotrófica.

En las realizaciones más preferidas, el polipéptido de neublastina truncada es los aminoácidos 99 aa, 100 aa, 101 aa, 102 aa, 103 aa, 104 aa, 105 aa, 106 aa, 107 aa, 108 aa, 109 aa, 110 aa, 111 aa o 112 aa carboxilo-terminales del polipéptido de neublastina de 113 AA madura (es decir, NBN99, NBN100, NBN101, NBN102, NBN103, NBN104, NBN105, NBN106, NBN107, NBN108, NBN109, NBN110, NBN111 o NBN112, respectivamente). Las secuencias también pueden encontrarse en los polipéptidos de neublastina de ratón y de rata como los 99 aa, 100 aa, 101 aa, 102 aa, 103 aa, 104 aa, 105 aa, 106 aa, 107 aa, 108 aa, 109 aa, 110 aa, 111 aa ó 112 aa carboxilo-terminales, respectivamente, en SEQ ID No. 11 y 12. Estos ejemplos más preferidos de formas truncadas de NBN son bioactivos (denominados “polipéptidos de neublastina truncada bioactiva”) puesto que se ha demostrado que tienen actividad neurotrófica. Tal como se estableció anteriormente, se requiere la dimerización de NBN para la bioactividad, puesto que se observó de poca a ninguna actividad con el polipéptido monomérico de NBN.

También se contemplan formas truncadas de las neublastinas de ratón y de rata. Éstas pueden consistir en los 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 ó 116 aminoácidos C-terminales de SEQ ID No 16 (ratón) o pueden consistir en los 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 ó 112 aminoácidos C-terminales de SEQ ID No 18 (rata).

Por tanto, la invención abarca un polipéptido de neublastina seleccionado del grupo que consiste en NBN madura seleccionada de neublastina que tiene una secuencia identificada como los aminoácidos 1-140 de SEQ ID No 10, o aminoácidos 1-144 de SEQ ID No 11 ó 12, SEQ ID No 13, 14, 15, 16, 17 ó 18, NBN truncada en el extremo N-terminal, NBN mutada, o NBN mutada y N-truncada, tal como una NBN madura seleccionada del grupo que consiste en neublastina que tiene una secuencia identificada por SEQ ID No 13, 14, 15, 16, 16, 17 ó 18), más particularmente un polipéptido de neublastina seleccionado del grupo que consiste en neublastina truncada en el extremo N-terminal con los 106, 104, 102 ó 99 aminoácidos C-terminales de SEQ ID NO 10 o un polipéptido de neublastina seleccionado del grupo que consiste en los 116 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 113 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 104 aminoácidos C-terminales de neublastina humana y los 116 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, un polipéptido de neublastina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 19 o un polipéptido de neublastina que contiene los 99 aminoácidos de SEQ ID NO 20.

Las NBNs útiles en esta invención incluyen también aquellos polipéptidos de NBN que tienen una secuencia de aminoácidos con similitud o identidad sustancial con respecto a los diversos polipéptidos de “neublastina” prepro, pro, madura y truncada expuestos anteriormente. Preferiblemente, el polipéptido de neublastina utilizado tiene al menos el 70%, más preferiblemente el 85%, todavía más preferiblemente el 90%, o todavía más preferiblemente de manera adicional el 95% de identidad o similitud con respecto al péptido maduro de los polipéptidos de neublastina en SEQ ID NO. 10-23. Lo más preferiblemente, el polipéptido de neublastina utilizado tiene al menos el 99% de similitud o identidad con respecto a los péptidos maduros de los polipéptidos de neublastina en SEQ ID No. 10-23.

El grado hasta el que un polipéptido candidato comparte homología con un polipéptido de neublastina de la invención se determina como el grado de similitud o identidad entre dos secuencias de aminoácidos.

Un alto nivel de identidad de secuencia indica la probabilidad de que la primera secuencia se derive de la segunda secuencia. La identidad de secuencia de aminoácidos requiere secuencias de aminoácidos idénticas entre dos secuencias alineadas. Por tanto, una secuencia candidata que comparte el 70% de identidad de aminoácidos con una secuencia de referencia, requiere que, tras el alineamiento, el 70% de los aminoácidos en la secuencia candidata sean idénticos a los aminoácidos correspondientes en la secuencia de referencia. La identidad se determina mediante análisis informático, tal como, sin limitaciones, el programa de alineamiento informático ClustalX (Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, & Higgins DG: “The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools”; Nucleic Acids Res. 1997, 25 (24): 4876-82), y los parámetros por defecto sugeridos en ese documento. Utilizando este programa, la parte madura de un polipéptido codificado por una secuencia de ADN análoga de la invención presenta un grado de identidad de al menos el 70%, más preferiblemente del 85%, todavía más preferiblemente del 90% o todavía más preferiblemente del 95%, lo más preferiblemente de al menos el 99% con las secuencias de aminoácidos presentadas en el presente documento como SEQ ID NO: 10 (NBN humana), SEQ ID NOS: 11 y 12 (NBN de roedor).

Se conocen otras herramientas de alineamiento, tales como el algoritmo de programación dinámica descrito en Needleman *et al.*, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), y el programa Align, un paquete de software comercial producido por DNASTAR, Inc. cuyas enseñanzas se incorporan al presente documento como referencia. Una vez que se realiza y se refina el alineamiento entre la secuencia candidata y de referencia, se calcula una puntuación de homología en tanto por ciento. Los aminoácidos individuales de cada secuencia se comparan secuencialmente según su similitud entre sí.

Los factores de similitud incluyen carga eléctrica, forma y tamaño similares. Un método particularmente preferido para determinar similitudes de aminoácidos es la matriz PAM250 descrita en Dayhoff *et al.*, Atlas of protein sequence and structure 345-352 (1978 & Supp.), incorporado al presente documento como referencia. Se calcula en primer lugar

ES 2 353 457 T3

una puntuación de similitud como la suma de las puntuaciones de similitud de aminoácidos por parejas alineados. Las inserciones y deleciones se ignoran para los fines de determinar la homología e identidad en tanto por ciento. Por consiguiente, no se utilizan penalizaciones por hueco en este cálculo.

- 5 Entonces se normaliza la puntuación sin tratar dividiéndola entre la media geométrica de las puntuaciones del compuesto candidato y el esqueleto de siete cisteínas de los polipéptidos de neublastina. La media geométrica es la raíz cuadrada del producto de estas puntuaciones. La puntuación sin tratar normalizada es la homología en tanto por ciento.
- 10 Tal como se indicó anteriormente, los polipéptidos de neublastina de la invención incluyen polipéptidos variantes. En el contexto de esta invención, la expresión "polipéptido variante" incluye un polipéptido (o proteína) que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere del péptido maduro presentado como parte de SEQ ID NO. 10, 13, 14, 19, 20, 21, 22 ó 23 (NBN humana), o SEQ ID No. 11, 12, 15-18 (NBN de roedor), en una o más posiciones de aminoácido.
- 15 Tales polipéptidos variantes incluyen los polipéptidos modificados descritos anteriormente, así como sustituciones conservativas, variantes de corte y empalme, isoformas, homólogos de otras especies y polimorfismos.

20 Tal como se define en el presente documento, la expresión "sustituciones conservativas" indica la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo, biológicamente similar. Normalmente, la similitud biológica, tal como se hizo referencia anteriormente, refleja sustituciones en la secuencia de tipo salvaje con aminoácidos conservados.

25 Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia del polipéptido de neublastina pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido (véase la tabla 1). Además, diversos aminoácidos se sustituyen comúnmente por aminoácidos neutros, por ejemplo, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. (Véase por ejemplo MacLennan *et al.*, 1998, Acta Physiol. Scand. Suppl., 643: 55-67; Sasaki *et al.*, 1998, Adv. Biophys., 35: 1-24). Las sustituciones múltiples se encuentran dentro del alcance de la invención; sin embargo, todos los polipéptidos de neublastina de la invención deben tener al menos una actividad de neublastina nativa tal como se describe a continuación en la sección C, véase también la siguiente tabla:

30

Residuos originales	Sustituciones a modo de ejemplo
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser, Ala
Gln (Q)	Asn
Gly (G)	Pro, Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina

55

60

65

ES 2 353 457 T3

Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, ácido 1,4-diaminobutírico, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Ala, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina

Por ejemplo, podría esperarse que las sustituciones de aminoácidos conservativas tengan poco o ningún efecto sobre la actividad biológica, particularmente si representan menos del 10% del número total de residuos en el polipéptido o la proteína. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos conservativas representan cambios en menos del 5% del polipéptido o la proteína, lo más preferiblemente menos del 2% del polipéptido o la proteína.

El polipéptido de neublastina en una realización comprende hasta 15 sustituciones de aminoácidos, tal como hasta 12 sustituciones de aminoácidos, tal como hasta 10 sustituciones de aminoácidos, tal como hasta 8 sustituciones de aminoácidos, tal como hasta 5 sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, cuando se calculan según, por ejemplo, la 113NBN humana, las sustituciones conservativas más preferidas representarían menos de tres sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos madura de tipo salvaje. En una realización particularmente preferida, existe una única sustitución de aminoácido en la secuencia madura, en la que tanto los aminoácidos sustituidos como de sustitución son no cíclicos. Otros ejemplos de sustituciones particularmente conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo por otro, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por aspártico, o glutamina por asparagina, y similares.

La expresión sustitución conservativa también incluye el uso de un residuo de aminoácido sustituido en lugar de un residuo de aminoácido original no sustituido siempre que los anticuerpos generados frente al polipéptido sustituido también sean inmunorreactivos con el polipéptido no sustituido.

Las modificaciones de esta secuencia de aminoácidos primaria pueden dar como resultado proteínas, que tienen actividad sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido equivalente no modificado, y por tanto pueden considerarse análogos funcionales de las proteínas originales. Tales modificaciones pueden ser intencionadas, por ejemplo como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden producirse de manera espontánea, e incluyen variantes de corte y empalme, isoformas, homólogos de otras especies y polimorfismos. Tales análogos funcionales también se contemplan según la invención.

A continuación se muestra un alineamiento de 99 aminoácidos C-terminales de seres humanos, ratones y ratas:

Alineamiento de secuencias múltiples CLUSTAL W (1.82)

```

      %                               %
Ratón  GCRLRSQLVFVSALGLGHSSDELIFRFCSGSCRRARSQHDLSLASLLGAGALRSPFGSR
Rata   GCRLRSQLVFVSALGLGHSSDELIFRFCSGSCRRARSQHDLSLASLLDAGALRSPFGSR
Ser humano GCRLRSQLVFVRALGLGHRSDELIFRFCSGSCRRARSQHDLSLASLLGAGALRSPFGSR
*****  *****  *****;*****;*****;*****

      %
Ratón  FISQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLSATACGCLG
Rata   FISQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLSATACGCLG
Ser humano PVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG
*;*;*****;*****;*****;*****;*****

```

Preferiblemente, las sustituciones se llevan a cabo en posiciones que no se conservan marcadas con “sin asterisco”, “.” o “:”.

Otras posiciones preferidas para la sustitución se indican con “%”.

Además, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos primaria pueden dar como resultado proteínas que no conservan la actividad biológica de la proteína original, incluyendo formas dominantes negativas, etc. Una proteína dominante negativa puede interferir con la proteína de tipo salvaje uniéndose a, o secuestrando de otra manera agentes reguladores, tales como componentes en sentido 5' o en sentido 3', que normalmente interaccionan funcionalmente con el polipéptido. Dichas formas dominantes negativas también se contemplan según la invención.

Las formas biológicamente activas de neublastina truncada se conocen a partir del documento WO 02/072826 (NsGene y Biogen). Las moléculas de neublastina truncada y mutada también se conocen a partir del documento WO 02/060929 (Biogen), especialmente neublastina mutada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de los aminoácidos 8-113 de SEQ ID No. 14, en la que el polipéptido de neublastina variante incluye una o más de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: un aminoácido diferente a la arginina en la posición 14 en la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido variante, un aminoácido diferente a la arginina en la posición 39 en la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido variante, un aminoácido diferente a la arginina en la posición 68 de dicho polipéptido variante y un aminoácido diferente a la asparagina en la posición 95 de dicho polipéptido variante, por ejemplo a un residuo de lisina, en el que las posiciones de dichos aminoácidos están numeradas según la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 10. Las formas mutadas pueden estar truncadas tal como se describió anteriormente o incluir la longitud completa de la proteína madura (aminoácidos 1-113 de SEQ ID NO 14). Preferiblemente el aminoácido en la posición 14, 39 ó 68 es una lisina.

Escisión del péptido señal

Antes de decidir la forma de neublastina específica que va a incorporarse en un constructo de expresión, puede comprobarse la posibilidad de escisión del péptido señal, tal como Igsp, usando herramientas de predicción del estado de la técnica. Una herramienta preferida para la predicción de este tipo es el software SignalP disponible en el servidor de WWW de SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>), o preferiblemente, la versión 3.0 más reciente disponible del mismo servidor (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>).

El servidor de WWW de *SignalP* devolverá tres puntuaciones entre 0 y 1 para cada posición en la secuencia:

Puntuación C (puntuación del sitio de escisión sin tratar)

La puntuación de salida a partir de redes entrenadas para reconocer sitios de escisión frente a otras posiciones de secuencia. Entrenadas para ser:

altas en la posición +1 (inmediatamente tras el sitio de escisión)

bajas en todas las otras posiciones.

Puntuación S (puntuación del péptido señal)

La puntuación de salida a partir de redes entrenadas para reconocer el péptido señal frente a posiciones de péptido no señal. Entrenadas para ser:

altas en todas las posiciones antes del sitio de escisión

en las 30 posiciones tras el sitio de escisión y

bajas en los extremos N-terminales de las proteínas no secretoras.

Puntuación Y (puntuación del sitio de escisión combinada)

La predicción de la ubicación del sitio de escisión se optimiza observando dónde la puntuación C es alta y la puntuación S cambia desde un valor alto hasta uno bajo. La puntuación Y formaliza esto mediante la combinación de la altura de la puntuación C con la pendiente de la puntuación S. Específicamente, la puntuación Y es un promedio geométrico entre la puntuación C y un derivado homogéneo de la puntuación S (es decir, la diferencia entre la puntuación S media a lo largo de d posiciones antes y d posiciones tras la posición actual, variando d con el conjunto de red elegido).

Las tres puntuaciones son el promedio de cinco redes entrenadas en diferentes particiones de los datos.

Para cada secuencia, *SignalP* notificará las puntuaciones C, S e Y máximas, y la puntuación S media entre el sitio de escisión predicho y el extremo N-terminal. Estos valores se utilizan para distinguir entre péptidos señal y

péptidos no señal. Si se predice que la secuencia tiene un péptido señal, se predice que el sitio de escisión se encuentra inmediatamente antes de la posición con la puntuación Y máxima.

Para un péptido señal típico, las puntuaciones C e Y serán altas en la posición +1, mientras que la puntuación S será alta antes del sitio de escisión y baja tras el mismo.

Para la comparación, se puede comparar la predicción con la escisión predicha del péptido señal de neublastina de tipo salvaje (escisión entre los aminoácidos número 39 y 40 de pre-pro-NBN).

Las neublastinas preferidas son aquellas que tienen una escisión predicha entre el péptido señal y la neublastina o bien en el programa SignalP-NN o bien en el SignalP-HMM. Éstas incluyen pero no se limitan a NBN113, NBN106, NBN104, NBN102 y NBN99. Se prefieren particularmente neublastinas que tienen un péptido señal predicho en esta posición tanto en SignalP-NN como en SignalP-HMM. Éstas incluyen NBN113 y NBN99.

La versión más reciente (3.0) también incluye una nueva puntuación D o Dmax (puntuación de discriminación) que describe la "propiedad de péptido señal" que se correlaciona con el nivel de secreción utilizando dicho péptido señal con la proteína en cuestión.

Se prefiere que un péptido señal utilizado en la presente invención presente un valor Dmax de al menos 0,5, tal como al menos 0,6, tal como al menos 0,7, tal como al menos 0,8, con el polipéptido de neublastina seleccionado.

Bibliografía: Henrik Nielsen, Jacob Engelbrecht, Søren Brunak y Gunnar von Heijne: Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10, 1-6 (1997). Para el modelo de salida SignalP-HMM: Henrik Nielsen y Anders Krogh: Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. En *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6)*, AAAI Press, Menlo Park, California, páginas 122-130 (1998). Improved prediction of signal peptides - SignalP 3.0. Jannick Dyrlov Bendtsen, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijne y Søren Brunak. *JMB* (2004). Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. Henrik Nielsen y Anders Krogh. *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6)*, AAAI Press, Menlo Park, California, páginas 122-130, 1998.

Uso médico y métodos de tratamiento

En un aspecto la invención se refiere al uso del vector según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso. El trastorno del sistema nervioso puede ser un trastorno del sistema nervioso periférico o del sistema nervioso central.

La neublastina es útil para el tratamiento de un defecto en una neurona, incluyendo sin limitación neuronas lesionadas y neuronas con traumatismo. Los nervios periféricos que experimentan traumatismo incluyen, pero no se limitan a, nervios del bulbo raquídeo o de la médula espinal. La neublastina es útil en el tratamiento de trastornos del SNC, tales como una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, daño neuronal isquémico cerebral; neuropatía, por ejemplo, neuropatía periférica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La neublastina se contempla adicionalmente para su uso en el tratamiento de memoria deteriorada, por ejemplo, deterioro de memoria asociada con demencia.

La neublastina también se conoce como un candidato terapéutico para el tratamiento de neuropatías periféricas, tales como dolor neuropático en un mamífero. El dolor neuropático puede estar asociado con daño nervioso inducido por toxina, daño nervioso inducido por patógeno, daño nervioso inducido por traumatismo, daño nervioso inducido por fármaco, neuropatía idiopática, neuropatía diabética, daño nervioso inducido por inflamación, o neurodegeneración. La neublastina también puede utilizarse para el tratamiento de la neuropatía periférica en un mamífero. La neuropatía periférica puede incluir el grupo que consiste en neuropatías inducidas por traumatismo, neuropatías inducidas por agentes virales, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías inducidas por toxina, neuropatías inducidas por fármaco, neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas y neuropatías diabéticas. Los métodos y las composiciones para el tratamiento del dolor neuropático utilizando neublastina se dan a conocer en el documento WO 02/078730 (Biogen).

Preferiblemente, la neublastina se utiliza para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en neuropatía periférica incluyendo dolor neuropático, lesión de médula espinal, avulsión de la raíz espinal, tic doloroso, causalgia, heridas corneales y retinopatías.

Según una realización preferida de la invención, la enfermedad neurodegenerativa que va a tratarse es la enfermedad de Parkinson. Se sabe que la neublastina aumenta la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas (documento WO 00/01815 NsGene; Baloh *et al* 1998 *Neuron* 21: 1291-1302).

Los vectores, las cápsulas y las composiciones de la presente invención también pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades oculares, tales como retinitis pigmentosa, degeneración macular, glaucoma y retinopatía

diabética. La neublastina también puede utilizarse en el tratamiento de heridas y úlceras corneales (documento EP 1 223 966 Biopharm).

Las enfermedades del sistema nervioso pueden tratarse mediante la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz del vector de la invención; o una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la invención.

También se proporcionan coordenadas estereotáxicas para las partes del cerebro a las que va a transducirse o en las que van a transplantarse células desnudas o encapsuladas (tabla II):

TABLA II

REGIÓN	DIMENSIÓN	DIMENSIÓN	DIMENSIÓN
CEREBRAL	MEDIAL- LATERAL	DORSAL-VENTRAL	ANTERIOR- POSTERIOR
Gpe	de 1,6 a 2,7	de 1,0 a -1,0	de 2,0 a -1,0
Gpi	de 0,5 a 2,0	de 0,5 a -0,7	de 0,7 a 2,0
SNr	de 0,5 a 1,5	de -0,6 a -1,5	de 0,7 a -0,7
STN	de 0,5 a 2,0	de 0,0 a -1,0	de 0,6 a -1,0
NBM	de 1,5 a 2,5	de 0,0 a -1,2	de 0,5 a 1,6
Estriado:	de 0,5 a 2,0	de 1,5 a 3,0	de 1,5 a 3,0
caudado	de 1,2 a 3,3	de 1,5 a -1,0	de 2,5 a -1,2
putamen			

En la tabla anterior: las dimensiones medial-lateral son con respecto a la línea media del cerebro; las dimensiones anterior-posterior son con respecto al punto medio entre la comisura anterior y la comisura posterior indicando el signo negativo la dirección posterior; las dimensiones dorsal-ventral son con respecto a una línea que conecta los puntos medios de las comisuras anterior y posterior siendo el signo negativo ventral a dicha línea; todas las dimensiones son en centímetros; y Gpe significa segmento externo del globo pálido; Gpi significa segmento interno del globo pálido; Snr significa parte reticular de la sustancia negra, STN significa núcleo subtalámico; NBM significa núcleo basal de meynert; y caudado significa el núcleo caudado.

En lugar de la transducción *in vivo*, las enfermedades del sistema nervioso pueden tratarse mediante trasplante a un individuo que necesita del mismo de:

- i. una cantidad terapéuticamente eficaz de células transducidas o transfectadas según la invención; o
- ii. un dispositivo implantable que comprende células transducidas o transfectadas.

Preferiblemente el trasplante comprende células o dispositivos implantables.

Dicho trasplante puede comprender un trasplante autólogo, un trasplante alogénico o un trasplante xenogénico.

Tejidos diana para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos en el sistema nervioso central

Un parámetro importante es la selección de un tejido diana adecuado. Se selecciona una región del cerebro por su grado de respuesta retenida a factores neurotróficos. La selección como diana de una zona puede lograrse mediante la liberación de una unidad de dosificación de un vector de terapia génica tal como se describe en el presente documento o mediante el implante de células desnudas o encapsuladas según la invención.

En seres humanos, las neuronas del SNC que retienen el grado de respuesta a factores neurotróficos hasta la edad adulta incluyen las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, las neuronas de la corteza entorhinal, las neuronas del tálamo, las neuronas del locus cerúleo, las neuronas sensitivas espinales y las neuronas motoras espinales.

Puede realizarse un barrido inicial, tal como un barrido por MRI, en el paciente para determinar la ubicación precisa del sitio de tratamiento. Por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, los ganglios basales,

incluyendo la sustancia negra, son sitios de tratamiento. Las zonas afectadas del cerebro serán probablemente de un tamaño tal que la selección de 5 o menos sitios de liberación será suficiente para el restablecimiento de un número clínicamente significativo de neuronas dopaminérgicas. El mismo número de sitios de liberación puede ser válido fuera del cerebro.

Para terapia génica *in vivo*, la liberación puede ser sistémica o local. Por liberación sistémica se pretende la administración de un vector de terapia génica por vía intramuscular, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal, que dará como resultado una liberación continua de la neublastina al sistema circulatorio.

Para terapia génica *in vivo*, se seleccionan los sitios específicos para la liberación de genes *in vivo* de modo que se agrupen en una zona de pérdida neuronal o terminal. Dichas zonas pueden identificarse clínicamente utilizando varias técnicas conocidas, incluyendo formación de imagen por resonancia magnética (MRI) y biopsia. En seres humanos, se preferirán los métodos no invasivos, *in vivo* para formación de imagen tales como MRI. Una vez que se identifican las zonas de pérdida neuronal o terminal, los sitios de liberación se seleccionan para distribución estereotáxica de manera que cada dosificación unitaria de neublastina se libera al cerebro o a la médula espinal en, o dentro de 500 μm a partir de, una célula diana, y no más de aproximadamente 10 mm a partir de otro sitio de liberación. Dentro del cerebro, puede administrarse el vector de terapia génica al parénquima o a los ventrículos.

Dentro del ojo, puede administrarse el vector de terapia génica al humor vítreo, al espacio subretiniano y a la cápsula sub-tenar.

Para el tratamiento de la neuropatía periférica incluyendo dolor neuropático, puede administrarse el vector de terapia génica a una zona del cuerpo implicada en la transmisión de la sensación de dolor. Tal zona puede incluir administración a la médula espinal e intratecal.

En una realización, el vector se administra por vía intramuscular, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal. En otra realización, el vector o la composición se administra a una zona del cuerpo implicada en la transmisión de la sensación de dolor. En una tercera realización, el vector o la composición se administra por vía intratecal o a la médula espinal. En una cuarta realización, el vector se administra al cerebro, incluyendo el parénquima, y los ventrículos. En una quinta realización, el vector se administra en el ojo, incluyendo el humor vítreo, el espacio subretiniano y la cápsula sub-tenar.

Requisitos de dosificación y protocolo de liberación para terapia génica in vivo

Un parámetro importante adicional es la dosificación de la neublastina que va a liberarse en el tejido diana. A este respecto, “dosificación unitaria” se refiere generalmente a la concentración de neublastina/ml de composición de neublastina. Para los vectores virales, la concentración de neublastina se define mediante el número de partículas virales/ml de composición neurotrófica. De manera óptima, para la liberación de neublastina utilizando un vector de expresión viral, cada dosificación unitaria de neublastina comprenderá de 2,5 a 25 μl de una composición de neublastina, incluyendo la composición un vector de expresión viral en un fluido farmacéuticamente aceptable y proporciona desde 10^{10} hasta 10^{15} partículas virales que contienen neublastina por ml de composición de neublastina. Tales títulos altos se utilizan particularmente para virus adeno-asociados. Para lentivirus, el título normalmente es menor, tal como desde 10^8 hasta 10^{10} unidades de transducción por ml (UT/ml), determinado tal como se describe en el ejemplo 2.

La composición de neublastina se libera en cada sitio celular de liberación en el tejido diana mediante microinyección, infusión, carga por raspaduras, electroporación u otros medios adecuados para liberar directamente la composición al sitio de liberación del tejido a través de una incisión quirúrgica. La liberación se realiza lentamente, tal como a lo largo de un periodo de aproximadamente 5-10 minutos (dependiendo del volumen total de la composición de neublastina que va a liberarse).

Los expertos en la técnica apreciarán que el método de liberación directa empleado por la invención obvia un factor de riesgo limitativo asociado a la terapia génica *in vivo*; es decir, el potencial para la transducción de células no diana con el vector que porta el transgén que codifica para la neublastina. En la invención, la liberación es directa y los sitios de liberación se eligen de manera que la difusión de la neublastina secretada tiene lugar en una región controlada y predeterminada del cerebro para optimizar el contacto con las neuronas diana, a la vez que se minimiza el contacto con las células no diana.

Vectores de terapia génica

De manera amplia, la terapia génica busca transferir nuevo material genético a las células de un paciente con un beneficio terapéutico resultante para el paciente. Tales beneficios incluyen tratamiento o profilaxis de una amplia gama de enfermedades, trastornos y otros estados.

Los enfoques de terapia génica *ex vivo* implican la modificación de células aisladas, que entonces se infunden, injertan o transplantan de otro modo en el paciente. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 4.868.116,

5.399.346 y 5.460.959. La terapia génica *in vivo* busca seleccionar como diana directamente el tejido del paciente huésped *in vivo*.

Los virus útiles como vectores de transferencia de genes incluyen papovavirus, adenovirus, virus vaccinia, virus adeno-asociados, herpesvirus y retrovirus. Los retrovirus adecuados incluyen el grupo que consiste en VIH, VIS, VIF, VAIE, VLMMo.

Los virus preferidos para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso son lentivirus y virus adeno-asociados. Ambos tipos de virus pueden integrarse en el genoma sin divisiones celulares, y ambos tipos se han sometido a prueba en estudios con animales pre-clínicos para indicaciones del sistema nervioso, en particular del sistema nervioso central.

Los métodos para la preparación de VAA se describen en la técnica, por ejemplo el documento US 5.677.158. Los documentos US 6.309.634 y US 6.683.058 describen ejemplos de liberación de VAA al sistema nervioso central.

Los tipos especiales y preferidos de retrovirus incluyen los lentivirus que pueden transducir una célula e integrarse en su genoma sin división celular. Por tanto, preferiblemente el vector es una partícula de lentivirus de replicación defectuosa. Puede producirse una partícula de lentivirus de este tipo a partir de un vector lentiviral que comprende una LTR lentiviral en 5', un sitio de unión a ARNt, una señal de empaquetamiento, un promotor operativamente unido a una señal polinucleotídica que codifica para dicha proteína de fusión, un origen de síntesis de la segunda hebra de ADN y una LTR lentiviral en 3'. Los métodos para preparación y administración *in vivo* de lentivirus a células neuronales se describen en el documento US 20020037281 (métodos para la transducción de células neuronales utilizando vectores lentivirales).

Los vectores retrovirales son los vectores más comúnmente utilizados en ensayos clínicos en seres humanos, puesto que portan 7-8 kb lo que es más que muchos otros vectores virales y puesto que tienen la capacidad de infectar células y tienen su material genético integrado de manera estable en la célula huésped con alta eficacia. Véase, por ejemplo, el documento WO 95/30761; documento WO 95/24929. La familia *Oncovirinae* requiere al menos una ronda de proliferación de células diana para la transferencia e integración de las secuencias de ácido nucleico exógeno en el paciente. Los vectores retrovirales se integran al azar en el genoma del paciente.

Se han descrito dos clases de partículas retrovirales; ecotrópicas, que pueden infectar células de ratón de manera eficaz, y amfotrópicas, que pueden infectar células de muchas especies. Una tercera clase incluye retrovirus xenotróficos que pueden infectar células de especies distintas de las especies que produjeron el virus. Su capacidad para integrarse solamente en el genoma de células en división ha hecho a los retrovirus atractivos para la elaboración de linajes celulares en estudios de desarrollo y para la liberación de los genes terapéuticos o suicidas a cánceres o tumores. Estos vectores pueden ser particularmente útiles en el sistema nervioso central, en el que existe una carencia relativa de división celular en pacientes adultos.

Para su uso en pacientes humanos, los vectores retrovirales deben ser de replicación defectuosa. Esto previene la generación adicional de partículas retrovirales infecciosas en el tejido diana en lugar del vector de replicación defectuosa que se vuelve un transgén "cautivo" estable incorporado en el genoma de la célula diana. Normalmente, en los vectores de replicación defectuosa, los genes gag, env y pol se han delecionado (junto con la mayoría del resto del genoma viral). El ADN heterólogo se inserta en el lugar de los genes virales delecionados. Los genes heterólogos pueden estar bajo el control del promotor heterólogo endógeno, otro promotor heterólogo activo en la célula diana, o la LTR retroviral en 5' (la LTR viral es activa en diversos tejidos). Normalmente, los vectores retrovirales tienen una capacidad de transgén de aproximadamente 7-8 kb.

Los vectores retrovirales de replicación defectuosa requieren la provisión de las proteínas virales necesarias para la replicación y el ensamblaje *in trans*, a partir de, por ejemplo, líneas celulares de empaquetamiento modificadas mediante ingeniería genética. Es importante que las células de empaquetamiento no liberen el virus competente en replicación y/o el virus auxiliar. Esto se ha logrado mediante la expresión de proteínas virales a partir de ARNs que carecen de la señal Ψ , y la expresión de los genes gag/pol y el gen env a partir de unidades transcripcionales separadas. Además, en algunas líneas celulares de empaquetamiento, las LTR en 5' se han reemplazado con promotores no virales que controlan la expresión de estos genes y se han añadido señales de poliadenilación. Estos diseños minimizan la posibilidad de recombinación que lleva a la producción de vectores competentes en replicación, o virus auxiliares. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 4.861.719.

La invención se refiere adicionalmente a un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de neublastina y una secuencia señal. El péptido señal y el polipéptido de neublastina son tal como se describieron anteriormente. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el constructo de ácido nucleico codifica para una secuencia que consiste en los 113 codones C-terminales del polipéptido de pre-pro-neublastina. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico codifica para una secuencia que consiste en los 104 codones C-terminales del polipéptido de pre-pro-neublastina.

La secuencia de ácido nucleico puede comprender un péptido señal heterólogo, tal como una secuencia señal de albúmina, por ejemplo, una secuencia señal de albúmina de rata, y comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 65. En algunas realizaciones, el constructo de ácido nucleico codifica para una secuencia señal modificada de albúmina, por ejemplo, una secuencia señal de albúmina de rata. Una realización a modo de ejemplo es un constructo

de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 69. En otras realizaciones, el constructo de ácido nucleico codifica para una secuencia señal de la hormona de crecimiento humana. Una realización a modo de ejemplo es un constructo de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 67. La secuencia señal de hormona de crecimiento humana puede comprender un intrón.

En una realización específica de la invención, el constructo de ácido nucleico contiene una secuencia de ácido nucleico optimizada para la expresión en una célula huésped transfectada. La optimización del uso de codón puede ser ventajosa proporcionando un rendimiento aumentado de polipéptido, o una eficacia mejorada de transcripción o traducción. Una realización a modo de ejemplo de un constructo de ácido nucleico optimizado de la invención se expone en la SEQ ID NO: 59.

Debido a la degeneración conocida del código genético, en el que más de un codón puede codificar el mismo aminoácido, una secuencia de ADN puede variar a partir de lo que se muestra en las SEQ ID NOS: 65, 67 ó 69 y aún así codificar para un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NOS: 66, 68 ó 70 respectivamente. Tales secuencias variantes de ADN pueden resultar de mutaciones silenciosas (por ejemplo que se producen durante la amplificación por PCR), o pueden ser el producto de mutagénesis voluntaria de una secuencia nativa, por ejemplo, optimización de codón.

El constructo de ácido nucleico puede ser un vector. Los ejemplos de vectores plasmídicos adecuados incluyen pero no se limitan a pFRT/lac Zeo, pFRT/dhfr-1, (Invitrogen, Carlsbad, CA) pUC, pGEM y pGEX (Pharmacia, Peapack, NJ). Otros vectores adecuados incluyen vectores virales (por ejemplo retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), los cuales sirven para funciones equivalentes.

Vectores de expresión

Los vectores de expresión pueden incluir una o más secuencias reguladoras operativamente unidas a la secuencia de ácido nucleico que va a expresarse. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, potenciadores y señales de poliadenilación. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, 1990 Methods Enzymol., 185:3. Las secuencias reguladoras incluyen aquéllas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquéllas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solamente en ciertas células huésped (por ejemplo secuencias reguladoras específicas de tejido). Se apreciará por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión dependerá de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, el nivel de expresión de proteína deseada, y similares. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para producir así proteínas o péptidos.

La construcción de vectores para expresión recombinante de neublastina para su uso en la invención puede lograrse utilizando técnicas convencionales que no requieren una explicación detallada para un experto en la técnica. Sin embargo, para revisión, los expertos en la técnica pueden desear consultar Maniatis *et al.*, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (NY 1982).

En resumen, la construcción de vectores de expresión recombinantes emplea técnicas de ligación convencionales. Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los vectores construidos, las mezclas de ligación pueden utilizarse para transfectar/transducir una célula huésped y pueden seleccionarse células genéticamente alteradas de manera satisfactoria mediante la resistencia a antibióticos cuando sea apropiado.

Los vectores de las células transfectadas/transducidas se preparan, analizan mediante restricción y/o se secuencian mediante, por ejemplo, el método de Messing, *et al.* (Nucleic Acids Res., 9: 309-, 1981), el método de Maxam, *et al.* (Methods in Enzymology, 65: 499, 1980), el método dideoxi de Sanger, u otros métodos adecuados que se conocerán por los expertos en la técnica.

La separación por tamaño de los fragmentos escindidos se realiza utilizando electroforesis en gel convencional tal como se describe, por ejemplo, por Maniatis, *et al.* (Molecular Cloning, páginas 133-134, 1982).

Los elementos de expresión empleados en la invención pueden variar en su fuerza y especificidades. Dependiendo del sistema huésped/vector utilizado, puede utilizarse cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, en el vector de expresión. Cuando la clonación se va a llevar a cabo en sistemas de células de mamífero, pueden utilizarse promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo promotor de metalotioneína) o a partir de virus de mamífero (por ejemplo el promotor de CMV, el promotor tardío de adenovirus, el promotor del virus vaccinia de 7,5 K); cuando se generan líneas celulares que contienen múltiples copias del producto de expresión, pueden utilizarse vectores a base de SV40-, BPV- y EBV-70 con un marcador seleccionable apropiado.

La expresión de un gen se controla a los niveles de transcripción, traducción o pos-traducción. El inicio de la transcripción es un acontecimiento temprano y crítico en la expresión génica. Esto depende de las secuencias promotora y potenciadora y se ve influido por factores celulares específicos que interaccionan con estas secuencias. La unidad transcripcional de muchos genes procariotas consiste en el promotor y en algunos casos en elementos potenciadores o reguladores (Banerji *et al.*, Cell 27: 299 (1981); Corden *et al.*, Science 209: 1406 (1980); y Breathnach y Cham-

bon, Ann. Rev. Biochem. 50: 349 (1981)). Para los retrovirus, los elementos control implicados en la replicación del genoma retroviral residen en la repetición terminal larga (LTR) (Weiss *et al.*, eds., The molecular biology of tumor viruses: RNA tumor viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982)). Las LTR del virus de la leucemia de Moloney de murino (VLM) y el virus de sarcoma de Rous (VSR) contienen secuencias promotoras y potenciadoras (Jolly *et al.*, Nucleic Acids Res. 11: 1855 (1983); Capecchi *et al.*, En: Enhancer and eukaryotic gene expression, Gulzman y Shenk, eds., páginas 101-102, Cold Spring Harbor Laboratories (NY 1991). Otros promotores potentes incluyen aquéllos derivados de citomegalovirus (CMV) y otros promotores virales de tipo salvaje.

También se han descrito regiones promotoras y potenciadoras de varios promotores no virales (Schmidt *et al.*, Nature 314: 285 (1985); Rossi y deCrombrughe, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5590-5594 (1987)). Los métodos para el mantenimiento y el aumento de la expresión transgénica en células quiescentes incluyen el uso de promotores incluyendo los promotores de colágeno tipo I (1 y 2) (Prockop y Kivirikko, N. Eng. J. Med. 311:376 (1984); Smith y Niles, Biochem. 19: 1820 (1980); de Wet *et al.*, J. Biol. Chem., 258: 14385 (1983)), los promotores de SV40 y de LTR.

En células huésped de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, puede ligarse una secuencia codificante a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder triparental. Este gen quimérico puede insertarse entonces en el genoma de adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y que puede expresar un péptido en huéspedes infectados (véase por ejemplo Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3655). Alternativamente, puede utilizarse el promotor de vaccinia 7.5 K (véase, por ejemplo, Mackett *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 7415; Mackett *et al.*, 1984, J. Virol., 49: 857; Panicali *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 4927).

Según una realización de la invención, el promotor es un promotor constitutivo seleccionado del grupo que consiste en: promotor de ubiquitina, promotor de CMV, promotor de JeT, promotor de SV40, y promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1-alfa).

Los ejemplos de promotores inducibles/represibles incluyen: Tet-On, Tet-Off, promotor inducible por rapamicina, Mx1.

Además de utilizar promotores virales y no virales para dirigir la expresión transgénica, puede utilizarse una secuencia potenciadora para aumentar el nivel de expresión transgénica. Los potenciadores pueden aumentar la actividad transcripcional no solamente de su gen nativo sino también de algunos genes foráneos (Armeler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2702 (1973)). Por ejemplo, en la presente invención las secuencias potenciadas de colágeno se utilizan con el promotor de colágeno 2 (I) para aumentar la expresión transgénica. Además, el elemento potenciador encontrado en los virus SV40 puede utilizarse para aumentar la expresión transgénica. Esta secuencia potenciadora consiste en una repetición de 72 pares de bases tal como se describe por Gruss *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 943 (1981); Benoist y Chambon, Nature 290: 304 (1981), y Fromm y Berg, J. Mol. Appl. Genetics, 1: 457 (1982). Esta secuencia de repetición puede aumentar la transcripción de muchos genes virales y celulares diferentes cuando está presente en serie con diversos promotores (Moreau *et al.*, Nucleic Acids Res. 9: 6047 (1981).

La expresión del transgén puede aumentarse también para una expresión estable a largo plazo utilizando citocinas para modular la actividad del promotor. Se ha informado de que varias citocinas modulan la expresión del transgén a partir de los promotores de colágeno 2 (I) y de LTR (Chua *et al.*, Connective Tissue Res., 25: 161-170 (1990); Elias *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci., 580: 233-244 (1990)); Seliger *et al.*, J. Immunol. 141: 2138-2144 (1988) y Seliger *et al.*, J. Virology 62: 619-621 (1988)). Por ejemplo, el factor de crecimiento transformante (TGF), interleucina (IL)-I, e interferón (INF) regulan por disminución la expresión de transgenes dirigidos por diversos promotores tales como LTR. El factor de necrosis tumoral (TNF) y TGF 1 regulan por incremento, y pueden utilizarse para controlar, la expresión de transgenes dirigidos por un promotor. Otras citocinas que pueden demostrar ser útiles incluyen factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF).

El promotor de colágeno con la secuencia potenciadora del colágeno (Coll (E)) también puede utilizarse para aumentar la expresión transgénica mediante la supresión adicional de cualquier respuesta inmunitaria al vector que puede generarse en un cerebro tratado a pesar de su estado inmunoprotegido. Además, los agentes anti-inflamatorios incluyendo esteroides, por ejemplo dexametasona, se pueden administrar al huésped tratado inmediatamente después de la liberación de la composición de vector y se continúa, preferiblemente, hasta que disminuye cualquier respuesta inflamatoria mediada por citocinas. Un agente de inmunosupresión tal como ciclosporina también puede administrarse para reducir la producción de interferones, que regula por disminución al promotor LTR y al promotor-potenciador de Coll (E), y reduce la expresión del transgén.

El vector puede comprender secuencias adicionales tales como una secuencia que codifica para la proteína recombinasa-Cre, y las secuencias LoxP. Una manera adicional para garantizar la expresión temporal de la neublastina es a través del uso del sistema Cre-LoxP que da como resultado la escisión de parte de la secuencia de ADN insertado después de la administración de la recombinasa-Cre a las células (Daewoong *et al.*, Nature Biotechnology 19: 929-933) o mediante la incorporación de un gen codificante para la recombinasa dentro del constructo viral (Plück, Int J Exp Path, 77: 269-278). La incorporación de un gen para la recombinasa en el constructo viral junto con los sitios

LoxP y un gen estructural (una neublastina en el presente caso) frecuentemente da como resultado la expresión del gen estructural durante un periodo de aproximadamente cinco días.

Los vectores utilizados en los métodos de la invención también pueden incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica para el marcador seleccionable que puede utilizarse para identificar células huésped transformadas de manera satisfactoria. Los marcadores seleccionables adecuados para su uso en células de mamífero cultivadas incluyen genes que confieren resistencia a fármacos, tales como neomicina, higromicina y metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable es el gen de DHFR. Otro marcador amplificable adecuado es el ADNc de DHFR (Simonsen y Levinson, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80: 2495). Marcadores seleccionables adicionales se revisan por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA). Los marcadores seleccionables adecuados pueden elegirse por cualquier experto en la técnica. Los marcadores seleccionables pueden introducirse en la célula huésped en el mismo vector que la pre-secuencia de neublastina, o como parte de un vector separado. El marcador seleccionable y la secuencia de neublastina pueden estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, produciendo la última disposición un mensaje dicistrónico. Los constructos de este tipo se conocen en la técnica (véase por ejemplo la patente estadounidense número 4.713.339).

Los vectores de expresión utilizados en los métodos de la invención también pueden codificar para etiquetas que facilitan la purificación del polipéptido de neublastina producido de manera recombinante. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vector pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, EMBO J., 2: 1791) en el que las secuencias codificantes del polipéptido de neublastina descritas en el presente documento pueden ligarse en el vector en marco con la región codificante de lac z de manera que se produce una proteína híbrida; los vectores pGEX también pueden utilizarse para expresar el polipéptido de neublastina con una etiqueta de glutatión S-transferasa (GST). Estas proteínas son habitualmente solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células mediante la adsorción a perlas de glutatión-agarosa seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores incluyen sitios de escisión (trombina o factor Xa proteasa o PreScission Protease™ (Pharmacia, Peapack, N.J.)) para la fácil eliminación de la etiqueta después de la purificación. Se conocen en la técnica otras etiquetas de fusión, por ejemplo, etiquetas de histidina, etiquetas de proteína de unión a maltosa.

Preparaciones farmacéuticas para terapia génica

Para formar una composición de neublastina para su uso en la invención; los vectores virales de expresión que codifican para neublastina pueden colocarse en una suspensión, disolución o emulsión farmacéuticamente aceptable. Los medios adecuados incluyen solución salina y preparaciones de liposomas.

Más específicamente, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir emulsiones, suspensiones y disoluciones no acuosas o acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, suspensiones, emulsiones o disoluciones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato o aceites fijos.

Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como aquellos a base de dextrosa de Ringer), y similares.

También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y gases inertes y similares. Además, una composición de transgenes de neublastina puede liofilizarse utilizando medios bien conocidos en la técnica, para su posterior reconstitución y uso según la invención.

También puede utilizarse un sistema de dispersión coloidal para la liberación génica dirigida.

Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de liberación *in vitro* e *in vivo*. Se ha mostrado que vesículas unilamelares grandes (LUV), que tienen intervalo de tamaño de desde 0,2-4,0 μm pueden encapsular un porcentaje sustancial de un tampón acuoso que contiene macromoléculas grandes. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y pueden liberarse a las células en una forma biológicamente activa (Fraley, *et al.*, Trends Biochem. Sci., 6: 77, 1981). Además de las células de mamífero, los liposomas se han utilizado para la liberación de transgenes operativamente codificantes en células vegetales, de levadura y bacterianas. Con el fin de que un liposoma sea un vehículo de transferencia génica eficaz, deben estar presentes las siguientes características: (1) encapsulación de los genes que codifican para la neublastina a una alta eficacia a la vez que no se compromete su actividad biológica; (2) unión preferencial y sustancial a una célula diana en comparación con células no diana; (3) liberación del contenido acuoso de la vesícula al citoplasma de la célula diana con una alta eficacia; y (4) expresión precisa y eficaz de la información genética (Mannino, *et al.*, Biotechniques, 6: 682, 1988).

La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, particularmente fosfolípidos con una alta temperatura de transición de fase, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol.

También pueden utilizarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Particularmente útiles son los diacilfosfatidilgliceroles, en los que el resto lipídico contiene desde 14-18 átomos de carbono, particularmente desde 16-18 átomos de carbono, y está saturado. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina.

El direccionamiento de los liposomas puede clasificarse basándose en factores anatómicos y mecánicos. La clasificación anatómica se basa en el nivel de selectividad, por ejemplo, específica de órgano, específica de célula y específica de orgánulo. El direccionamiento mecánico puede distinguirse basándose en si es pasivo o activo. El direccionamiento pasivo utiliza la tendencia natural de los liposomas para distribuirse en células del sistema retículo-endotelial (RES) en órganos que contienen capilares sinusoidales.

Por otra parte, el direccionamiento activo, implica la alteración del liposoma mediante acoplamiento del liposoma a un ligando específico tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glicolípido o proteína, o mediante el cambio de la composición o el tamaño del liposoma con el fin de lograr el direccionamiento a órganos y tipos celulares distintos de los sitios de localización que se producen de manera natural.

La superficie del sistema de liberación génica dirigida puede modificarse en una variedad de formas. En el caso de un sistema de liberación dirigida de liposomas, los grupos lipídicos pueden incorporarse en la bicapa lipídica del liposoma con el fin de mantener el ligando de direccionamiento en asociación estable con la bicapa liposomal. Pueden utilizarse diversos grupos de enlace para unir las cadenas lipídicas al ligando de direccionamiento.

Un ejemplo adicional de un sistema de liberación incluye el trasplante en la zona terapéutica de una composición de células de empaquetamiento que pueden producir partículas de vector tal como se describe en la presente invención. En la técnica se conocen métodos para la encapsulación y el trasplante de tales células, en particular a partir del documento WO 97/44065 (citoterapia). Mediante la selección de una línea celular de empaquetamiento que puede producir partículas lentivirales, se obtiene la transducción de células que no se encuentran en división en la zona terapéutica. Mediante el uso de partículas retrovirales que pueden transducir solamente las células en división, la transducción se restringe a las células diferenciadas *de novo* en la zona terapéutica.

Métodos para la liberación de la composición del vector de terapia génica

Siguiendo el protocolo definido por la invención, puede lograrse la liberación directa de una composición de neublastina por medios familiares para los expertos en la técnica, incluyendo microinyección a través de una incisión quirúrgica (véase, por ejemplo, Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980)); electroporación (véase, por ejemplo, Andreason y Evans, Biotechniques, 6: 650-660 (1988)); infusión, complejación química con una molécula de direccionamiento o co-precipitante (por ejemplo, liposoma, calcio), y bombardeo de micropartículas al tejido diana (Tang, *et al.*, Nature, 356: 152-154 (1992)).

Encapsulación de células

La terapia con células encapsuladas se basa en el concepto de aislamiento de células del sistema inmunitario del huésped receptor rodeando las células con un material biocompatible semipermeable antes del implante en el huésped. La invención incluye un dispositivo en el que las células se encapsulan en una cápsula inmunoaislante. Una "cápsula inmunoaislante" significa que la cápsula, tras el implante en un huésped receptor, minimiza los efectos nocivos del sistema inmunitario del huésped sobre las células en el núcleo del dispositivo. Las células se inmunoaislan del huésped encerrándolas en cápsulas poliméricas implantables formadas por una membrana microporosa. Este enfoque evita el contacto célula-célula entre los tejidos del huésped y los implantados, eliminando el reconocimiento antigénico a través de presentación directa. Las membranas usadas también pueden adaptarse para controlar la difusión de moléculas, tales como anticuerpo y complemento, basándose en su peso molecular (Lysaght *et al.*, 56 J. Cell Biochem. 196 (1996), Colton, 14 Trends Biotechnol. 158 (1996)). Usando técnicas de encapsulación, pueden trasplantarse células en un huésped sin rechazo inmunitario, o bien con o bien sin uso de fármacos inmunosupresores. Las cápsulas poliméricas biocompatibles útiles contienen habitualmente un núcleo que contiene células, o bien suspendidas en un medio líquido o bien inmovilizadas dentro de una matriz de inmovilización, y una región circundante o periférica de membrana o matriz de permeabilidad selectiva ("envoltura") que no contiene células aisladas, que es biocompatible y que es suficiente para proteger las células en el núcleo frente a un ataque inmunológico perjudicial. La encapsulación impide que los elementos del sistema inmunitario entren en la cápsula, protegiendo de ese modo las células encapsuladas frente a la destrucción inmunitaria. La naturaleza semipermeable de la membrana de la cápsula permite también que la molécula biológicamente activa de interés difunda fácilmente desde la cápsula hacia el interior del tejido del huésped circundante.

La cápsula puede fabricarse de un material biocompatible. Un "material biocompatible" es un material que, tras el implante en un huésped, no produce una respuesta perjudicial en el huésped suficiente como para dar como resultado el rechazo de la cápsula o convertirla en inoperable, por ejemplo por degradación. El material biocompatible es relati-

vamente impermeable para moléculas grandes, tales como componentes del sistema inmunitario del huésped, pero es permeable para moléculas pequeñas, tales como insulina, factores de crecimiento y nutrientes, mientras que permite eliminar el residuo metabólico. Una variedad de materiales biocompatibles son adecuados la liberación de factores de crecimiento mediante la composición de la invención. Se conocen numerosos materiales biocompatibles, que tienen
 5 diversas morfologías de superficie externa y otras características mecánicas y estructurales. Preferiblemente la cápsula de esta invención será similar a las descritas por las solicitudes de patente internacional PCT WO 92/19195 o WO 95/05452; o patentes estadounidenses números 5.639.275; 5.653.975; 4.892.538; 5.156.844; 5.283.187; o patente estadounidense número 5.550.050. Tales cápsulas permiten el paso de metabolitos, nutrientes y sustancias terapéuticas a la vez que minimizan los efectos perjudiciales del sistema inmunitario del huésped. Los componentes del material
 10 biocompatible pueden incluir una membrana semipermeable circundante y el almacén de soporte de células interno. Preferiblemente, las células genéticamente alteradas se siembran sobre el almacén, que se encapsula mediante la membrana de permeabilidad selectiva. El almacén de soporte de células filamentosas puede estar fabricado de cualquier material biocompatible seleccionado del grupo que consiste en material acrílico, poliéster, polietileno, polipropileno poliacetónitrilo, tereftalato de polietileno, nailon, poliamidas, poliuretanos, polibutéster, seda, algodón, quitina, carbono o metales biocompatibles. Además, pueden utilizarse estructuras de fibra unida para el implante de células (patente
 15 estadounidense número 5.512.600). Los polímeros biodegradables incluyen los compuestos comprendidos por poli(ácido láctico) PLA, poli(ácido láctico-co-glicólico) PLGA, y poli(ácido glicólico) PGA y sus equivalentes. Se han utilizado armazones de espuma para proporcionar superficies sobre las que pueden adherirse las células trasplantadas (solicitud de patente internacional PCT número de serie 98/05304). Se han usado tubos de malla tejida como injertos
 20 vasculares (solicitud de patente internacional PCT WO 99/52573). Adicionalmente, el núcleo puede estar compuesto por una matriz inmovilizante formada por un hidrogel, que estabiliza la posición de las células. Un hidrogel es una red tridimensional de polímeros hidrófilos reticulados en forma de un gel compuesto sustancialmente por agua.

Pueden usarse diversos polímeros y combinaciones de polímeros para fabricar la membrana semipermeable circundante, incluyendo poliacrilatos (que incluyen copolímeros acrílicos), polivinilidenos, copolímeros de poli(cloruro de vinilo), poliuretanos, poliestirenos, poliamidas, acetatos de celulosa, nitratos de celulosa, polisulfonas (que incluyen polietersulfonas), polifosfazenos, poliacrilonitrilos, poli(acrilonitrilo/cloruro de covinilo), así como derivados, copolímeros y mezclas de los mismos. Preferiblemente, la membrana semipermeable circundante es una membrana de fibra hueca semipermeable biocompatible. Tales membranas, y los métodos para prepararlas se dan a conocer en
 30 las patentes estadounidenses números 5.284.761 y 5.158.881. La membrana semipermeable circundante se forma a partir de una fibra hueca de polietersulfona, tal como las descritas en la patente estadounidense número 4.976.859 o la patente estadounidense número 4.968.733. Un material de membrana semipermeable circundante alternativo es poli(acrilonitrilo/cloruro de covinilo).

La cápsula puede ser de cualquier configuración apropiada para mantener la actividad biológica y proporcionar acceso para liberar el producto o la función, incluyendo por ejemplo, cilíndrica, rectangular, en forma de disco, en forma de parche, ovoide, estrellada o esférica. Además, la cápsula puede estar arrollada o enrollada en un estructura anidada o de tipo malla. Si la cápsula ha de recuperarse tras implantarse, no se prefieren las configuraciones que tienden a conducir a la migración de las cápsulas desde el sitio de implante, tales como las cápsulas esféricas lo suficientemente
 40 pequeñas como para desplazarse por los vasos sanguíneos del huésped receptor. Ciertas formas, tales como rectángulos, parches, discos, cilindros y láminas planas ofrecen una mayor integridad estructural y son preferibles cuando se desea su recuperación.

Cuando se usan macrocápsulas, se encapsulan preferiblemente entre 10^3 y 10^8 células, lo más preferiblemente se encapsulan de 10^5 a 10^7 células en cada dispositivo. La dosificación puede controlarse implantando un menor o mayor número de cápsulas, preferiblemente entre 1 y 10 cápsulas por paciente.

El almacén puede recubrirse con moléculas de matriz extracelular (MEC). Ejemplos adecuados de moléculas de matriz extracelular incluyen, por ejemplo, colágeno, laminina y fibronectina. La superficie del almacén puede
 50 modificarse también tratándola con irradiación por plasma para conferir carga para potenciar la adhesión de las células.

Puede usarse cualquier método adecuado de sellado de las cápsulas, incluyendo el uso de adhesivos poliméricos o engarce, anudamiento y termosellado. Además, también puede utilizarse cualquier método de sellado “en seco” adecuado, tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense número 5.653.687.

Los dispositivos de células encapsuladas se implantan según técnicas conocidas. Se contemplan muchos sitios de implante para los dispositivos y métodos de esta invención. Estos sitios de implante incluyen, pero no se limitan a, el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro, la médula espinal (véanse las patentes estadounidenses números 5.106.627, 5.156.844 y 5.554.148), implante intratecal, y los humores acuoso y vítreo del ojo (véase, solicitud de
 60 patente internacional PCT WO 97/34586), el espacio subretiniano, y la cápsula subtenar. En el cerebro, los dispositivos pueden implantarse en el parénquima y los ventrículos. Para liberación sistémica, el implante puede ser intramuscular, subcutáneo o intraperitoneal.

La línea celular ARPE-19 es una línea celular con una plataforma superior para tecnología de liberación basada en células encapsuladas y también es útil para tecnología de liberación basada en células no encapsuladas. La línea celular ARPE-19 es resistente (es decir, la línea celular es viable en condiciones rigurosas, tales como implante en el sistema nervioso central o el entorno intra-ocular). Las células ARPE-19 pueden modificarse genéticamente para secretar una sustancia de interés terapéutico. Las células ARPE-19 tienen una vida relativamente larga. Las células ARPE-19 son

de origen humano. Además, las células ARPE-19 encapsuladas tienen una buena viabilidad de dispositivo *in vivo*. Las células ARPE-19 pueden liberar una cantidad eficaz de factor de crecimiento. Las células ARPE-19 producen una reacción inmunitaria del huésped insignificante. Además, las células ARPE-19 son no tumorigénicas.

5 Los métodos y aparatos para implante de cápsulas en el SNC se describen en el documento US 5.487.739.

En un aspecto la invención se refiere a una cápsula biocompatible que comprende: un núcleo que comprende células de empaquetamiento vivas que secretan un vector viral para la infección de una célula diana, siendo el vector viral un vector según la invención; y una envoltura externa que rodea dicho núcleo, comprendiendo dicha envoltura
10 un material biocompatible permeable, teniendo dicho material una porosidad seleccionada para permitir el paso de vectores retrovirales de 100 nm de diámetro a través del mismo, permitiendo la liberación de dicho vector viral a partir de dicha cápsula.

Preferiblemente, el núcleo comprende adicionalmente una matriz, estando inmovilizadas las células de empaquetamiento por la matriz. Según una realización, la envoltura comprende un hidrogel o material termoplástico.

Los ejemplos de células adecuadas para líneas celulares de empaquetamiento incluyen células HEK293, NIH3T3, PG13 y ARPE-19. Las células preferidas incluyen las células PG13 y 3T3.

20 Los métodos y dispositivos para la encapsulación de células de empaquetamiento se dan a conocer en el documento US 6.027.721.

Células huésped

25 Los constructos de ácido nucleico de la invención pueden utilizarse para producir el polipéptido de neublastina. Las células eucariotas pueden transfectarse con un constructo de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de neublastina recombinante operativamente unido a una secuencia señal heteróloga. En la técnica se conocen métodos para elaborar constructos de ácido nucleico y transfectar células con los constructos. (Véase por ejemplo, Ausubel
30 *et al.*, eds., 1988, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley-Interscience: New York; Sambrook *et al.* 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY). Por ejemplo, las células pueden transfectarse utilizando electroporación, precipitación con fosfato de calcio, o infección con un vector viral. En algunas realizaciones, la célula huésped transformada es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula CHO, una célula COS, una célula HeLa, o una célula NIH 3T3.

35 Las células huésped transformadas se cultivan en un medio de crecimiento apropiado y en condiciones tales que el polipéptido de neublastina secretado se expresa y secreta a partir de la célula. Un medio de crecimiento apropiado es un medio que contiene los nutrientes requeridos para el crecimiento de las células. Los nutrientes requeridos para el crecimiento celular pueden incluir una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y factores de crecimiento. Opcionalmente, los medios pueden contener suero de ternera bovino o suero de ternera fetal. El medio de crecimiento puede diseñarse para seleccionar células que contienen el constructo de ácido nucleico. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante selección de fármacos o deficiencia en un nutriente esencial que está complementado por el marcador seleccionable en el constructo de ácido nucleico o co-transfectado con el constructo de ácido nucleico. Las células de mamífero cultivadas algunas veces se hacen crecer en medios que
40 contienen suero o libres de suero comercialmente disponibles (por ejemplo MEM, DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los factores que han de considerarse en la selección de un medio apropiado para la línea celular particular utilizada se conocen en la técnica.

Por tanto, en un aspecto la invención se refiere a células huésped aisladas transducidas o transfectadas con el vector
50 según la invención. Preferiblemente estas células son células huésped de mamífero debido a que pueden secretar y procesar la neublastina codificada correctamente.

Las especies preferidas incluyen el grupo que consiste en roedor (ratón, rata), conejo, perro, gato, cerdo, mono, ser humano.

55 Los ejemplos de cultivos primarios y líneas celulares que son buenos candidatos para la transducción con los vectores de la presente invención incluyen el grupo que consiste en CHO, HEK293, COS, PC12, HiB5, RN33b, células neuronales, células fetales, líneas celulares de RPE, ARPE-19, fibroblastos inmortalizados humanos, C2C12, HeLa, HepG2, células estriatal, neuronas, astrocitos, interneuronas.

60 Un tipo preferido de línea celular para la encapsulación y para el tratamiento con células desnudas son las células del epitelio pigmentario de la retina (células de RPE). La fuente de células de RPE es mediante el aislamiento de células primarias a partir de la retina de mamífero. Los protocolos para recoger células de RPE están bien definidos (Li y Turner, 1988, Exp. Eye Res. 47: 911-917; Lopez *et al.*, 1989, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30: 586-588) y se consideran una metodología de rutina. En la mayoría de los informes publicados del cotrasplante de células de RPE, las células se derivan de la rata (Li y Turner, 1988; Lopez *et al.*, 1989). Preferiblemente, las células de RPE se derivan de seres humanos. Además de células de RPE primarias aisladas, pueden utilizarse líneas celulares de RPE humanas cultivadas en la práctica de la invención.

Para la transducción *in vivo*, el grupo preferido de células huésped incluye células estriales, neuronas, astrocitos e interneuronas. Para terapia génica *ex vivo*, el grupo preferido de células incluye células neuronales, células precursoras neuronales, células progenitoras neuronales, células madre y células fetales. Las células madre y células precursoras neuronales tienen la ventaja de que pueden integrarse en el tejido y migrar. Para la encapsulación y para el implante de células desnudas, las células preferidas incluyen células del epitelio pigmentario de la retina, incluyendo células ARPE-19; fibroblastos inmortalizados humanos; y astrocitos inmortalizados humanos. Se prefieren particularmente ARPE-19.

En otra realización la línea celular terapéutica se selecciona del grupo que consiste en: líneas celulares de fibroblastos humanos, líneas celulares de astrocitos humanos, líneas celulares mesencefálicas humanas y líneas celulares endoteliales humanas, preferiblemente inmortalizadas con TERT, SV40T o vmyc.

El método para generar líneas celulares inmortalizadas de astrocitos humanos se ha descrito previamente (Price TN, Burke JF, Mayne LV. A novel human astrocyte cell line (A735) with astrocyte-specific neurotransmitter function. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999 Mayo; 35 (5) 279-88.). Este protocolo puede utilizarse para generar líneas celulares de astrocitos.

Las tres siguientes modificaciones de ese protocolo se realizan preferiblemente para generar líneas celulares de astrocitos humanos adicionales.

Puede utilizarse tejido cerebral fetal humano que se disecciona a partir de fetos de 5-12 semanas de edad, en lugar de tejido de 12-16 semanas de edad. Puede utilizarse el gen de inmortalización v-myc, o TERT (telomerasa) en lugar del antígeno T del SV40.

Puede utilizarse transferencia génica retroviral en lugar de transfección con plásmidos.

El polipéptido de neublastina puede expresarse también en un animal transgénico, tal como un roedor, una vaca, un cerdo, una oveja o una cabra. Un animal transgénico es un animal no humano que ha incorporado un gen foráneo en su genoma de manera que el gen foráneo pasa del padre a su descendencia. Pueden introducirse genes exógenos en embriones de una sola célula (Brinster *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4438). En la técnica se conocen métodos para la producción de animales transgénicos, (Wagner *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6376; McKnight *et al.*, 1983, Cell 34: 335; Brinster *et al.*, 1983, Nature 306: 332; Ritchie *et al.*, 1984, Nature 312: 517; Baldassarre *et al.*, 2003, Theriogenology 59: 831; Robl *et al.*, 2003, Theriogenology 59: 107; Malassagne *et al.*, 2003, Xenotransplantation 10 (3):267).

Producción in vitro de neublastina

En un aspecto separado, la invención se refiere a células de mamífero, tales como las células definidas anteriormente, que pueden secretar un polipéptido de neublastina en cantidades en exceso de 500 ng/10⁶ células/24 horas, más preferiblemente en exceso de 600 ng/10⁶ células/24 horas, más preferiblemente en exceso de 700 ng/10⁶ células/24 horas, más preferiblemente en exceso de 800 ng/10⁶ células/24 horas, más preferiblemente en exceso de 900 ng/10⁶ células/24 horas, tales como en exceso de 1000 ng/10⁶ células/24 horas.

Preferiblemente la neublastina secretada es biológicamente activa tal como se determina mediante el ensayo ELISA de RetL3 descrito en el ejemplo 1. Esto obvia la necesidad de glicosilación, escisión y replegamiento.

Las células huésped preferidas se seleccionan del grupo que consiste en células CHO, HEK293, COS, PC12, HiB5, RN33b, C2C12, HeLa, HepG2 y ARPE-19. Más preferiblemente el grupo consiste en CHO, HEK293, COS y ARPE-19.

La neublastina o un equivalente funcional de la misma puede producirse mediante el cultivo de estas células y la recuperación de la neublastina del medio de cultivo sin la necesidad de replegar o glicosilar la proteína.

Puede aumentarse la expresión incluso adicionalmente mediante la inclusión de elementos potenciadores tales como WPRE (US 6.136.597).

Matriz de soporte para las células productoras de neublastina

La presente invención comprende adicionalmente el cultivo de células productoras de neublastina *in vitro* sobre una matriz de soporte antes del implante en el sistema nervioso de mamífero. La adhesión previa de las células a los microvehículos antes del implante está diseñada para mejorar la viabilidad a largo plazo de las células trasplantadas y proporciona un beneficio funcional a largo plazo.

Para aumentar la viabilidad a largo plazo de las células trasplantadas, es decir, células secretoras de neublastina trasplantadas, pueden unirse las células que van a trasplantarse *in vitro* a una matriz de soporte antes del trasplante. Los materiales de los que puede estar compuesta la matriz de soporte incluyen aquellos materiales a los que las células

se adhieren después de la incubación *in vitro*, y sobre los que las células pueden crecer, y que pueden implantarse en el cuerpo de un mamífero sin producir una reacción tóxica, o una reacción inflamatoria que destruiría las células implantadas o interferiría de otro modo con su actividad biológica o terapéutica. Tales materiales pueden ser sustancias químicas sintéticas o naturales, o sustancias que tienen un origen biológico.

Los materiales de la matriz incluyen, pero no se limitan a, vidrio y otros óxidos de silicio, poliestireno, polipropileno, polietileno, poli(fluoruro de vinilideno), poliuretano, polialginato, polisulfona, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilonitrilo, poli(acrilamida), policarbonato, polipenteno, nailon, amilasas, gelatina natural y modificada y colágeno natural y modificado, polisacáridos naturales y modificados, incluyendo dextranos y celulosas (por ejemplo, nitrocelulosa), agar y magnetita. Pueden utilizarse o bien materiales resorbibles o bien no resorbibles. También se desean materiales de la matriz extracelular, que se conocen bien en la técnica. Los materiales de la matriz extracelular pueden obtenerse comercialmente o prepararse haciendo crecer células que secretan tal matriz, eliminando las células secretoras y permitiendo que las células que van a trasplantarse interaccionen con y se adhieran a la matriz. El material de la matriz sobre el que crecen las células que van a implantarse, o con el que están mezcladas las células, puede ser un producto propio de las células de RPE. Así, por ejemplo, el material de la matriz puede ser matriz extracelular o material de la membrana basal, que se produce y se secreta por las células de RPE que van a implantarse.

Para mejorar la adhesión, la supervivencia y la función celulares, la matriz sólida puede recubrirse opcionalmente sobre su superficie externa con factores que se sabe en la técnica que promueven la adhesión, el crecimiento o la supervivencia celulares. Tales factores incluyen moléculas de adhesión celular, matriz extracelular, tales como, por ejemplo, fibronectina, laminina, colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, o proteoglicanos o factores de crecimiento.

Alternativamente, si la matriz sólida en la que se unen las células implantadas está construida de material poroso, puede(n) incorporarse el factor o factores que promueven el crecimiento o la supervivencia en el material de la matriz, del que se liberarían lentamente tras su implante *in vivo*.

Cuando se unen al soporte según la presente invención, las células usadas para el trasplante generalmente están en la "superficie exterior" del soporte. El soporte puede ser sólido o poroso. Sin embargo, incluso en un soporte poroso, las células están en contacto directo con el medio externo sin una membrana intermedia u otra barrera. Así, según la presente invención, se considera que las células están sobre la "superficie exterior" del soporte aun cuando la superficie a la que se adhieren pueda estar en forma de pliegues o circunvoluciones internos del material de soporte poroso que no están en el exterior de la propia partícula o perla.

La configuración del soporte es preferiblemente esférica, como en una perla, pero puede ser cilíndrica, elíptica, una tira o lámina plana, una forma de aguja o alfiler, y similares. Una forma preferida de matriz de soporte es una perla de vidrio. Otra perla preferida es una perla de poliestireno.

Los tamaños de perla pueden oscilar desde aproximadamente 10 μm hasta 1 mm de diámetro, preferiblemente desde aproximadamente 90 μm hasta aproximadamente 150 μm . Para una descripción de diversas perlas de microportador, véanse, por ejemplo, Fisher Biotech Source 87-88, Fisher Scientific Co., 1987, páginas 72-75; Catálogo de cultivo celular de Sigma (Sigma Cell Culture Catalog), Sigma Chemical Co., St. Louis, 1991, páginas 162-163; Catálogo de productos de Ventrex (Ventrex Product Catalog), Ventrex Laboratories, 1989. El límite superior del tamaño de perla puede venir dictado por la estimulación de la perla de reacciones no deseadas en el huésped, que pueden interferir con la función de las células trasplantadas o producir daño al tejido circundante. El límite superior del tamaño de perla también puede venir dictado por el método de administración. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente tales limitaciones.

Polipéptido de neublastina

La invención se refiere adicionalmente a un polipéptido de neublastina que comprende un péptido señal y un polipéptido de neublastina, careciendo el polipéptido de una pro-región de neublastina, tal como un polipéptido de neublastina fusionado a un péptido señal. En particular, el péptido señal está unido a través de su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido de neublastina a través de un enlace peptídico. El péptido señal y el polipéptido de neublastina son tal como se definieron anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Transfección in vitro con el constructo IgSP-NBN

Construcción de constructos IgSP-NBN

Se generó IgSP.NBN mediante PCR solapante. En la primera etapa de amplificación, se amplificó el fragmento maduro de NBN mediante PCR a partir del vector pUbi1z.NBN.BamHI utilizando los cebadores NBNs-igSP.Flapp (5'-GGTGAATTCGGCTGGGGGCCCCGGGCAGCC-3') y NBNas+XhoI (5'-TATACTCGAGCGAGCCCTCAGCC CAGGCA-3'). En una segunda reacción de PCR, se amplificó la secuencia IgSP a partir del vector pNUT-IgSP-

CNTF (ref. documento US 6.361.741) utilizando los cebadores IgSPKozak1s+BamHI (5'-TATAGGATCCGCCAC CATGAAATGCAGCTGGGTATATC-3') e IgSPas-NBN.Fláp (5'-GGCCCCCAGCCGAATTCACCCCTGTAGAAAG-3'). En la tercera etapa, se combinaron los productos de las etapas 1 y 2 en una reacción de PCR final que genera IgSP-NBN mediante el uso de cantidades iguales de los dos productos como molde con los cebadores IgSPKo-zak1s+BamHI y NBN-as+XhoI.

Para generar un vector de expresión basado en plásmidos, se clonó el fragmento resultante en pNS1n digerido con BamHI/XhoI. En este vector, se colocó la secuencia IgSP-NBN bajo el control transcripcional del promotor de CMV (véase la figura 3). Además, el vector contiene el gen Neo que confiere resistencia a G418 cuando se expresa en células de mamífero.

Estudios de transfección transitoria

ARPE-19 es una línea celular del epitelio pigmentario de la retina de ser humano (Dunn *et al.* 1996) que se hace crecer en DMEM/Nutrient Mix F-12 con Glutamax (Invitrogen, Dinamarca) complementado con el 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich, Dinamarca) a 37°C y el 5% de CO₂. Se pasaron las células aproximadamente dos veces a la semana mediante tripsinización y resiembra (razón de división 1:5). Se sembraron las células en placas de 6 pocillos (Corning Costar, Biotech Line, Dinamarca) a una densidad de 10⁵ células/pocillo para estudios de transfección. Al día siguiente, se transfectaron las células con 3 µg de plásmido/pocillo en pocillos por duplicado utilizando Eugene6 (Roche, Alemania) según las especificaciones del fabricante. Se sometió a ensayo la actividad de NBN presente en los sobrenadantes celulares recogidos 3 días tras la transfección en un ELISA de RetL3.

ELISA de RetL3

El ELISA de RetL3 detecta la unión de un conjugado Ret-AP a un complejo de NBN unida al receptor de GFRα3 específico de NBN. Este ensayo solamente detectará las moléculas de NBN que sean funcionalmente activas. En resumen, se revistió una placa de 96 pocillos (B & W Isoplate HB, Perkin Elmer, Dinamarca) con 100 µl de anticuerpo de cabra anti-Fc humano 1 µg/ml (Jackson ImmunoResearch Laboratories, TriChem, Dinamarca) en NaHCO₃ 50 mM (pH=9,6) durante 16 horas a 4°C. Tras lavar en PBS/Tween 20 al 0,05% (PBST), se bloquearon los pocillos en I-Block al 0,2% (Tropix, Applied Biosystems, Dinamarca) en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por un lavado breve con PBST. Se diluyeron los sobrenadantes celulares o la artemina de ratón recombinante (R & D systems, RU) en DMEM/10% de FCS y posteriormente se incubaron en los pocillos con proteína de fusión GFRα3/Fc 1 µg/ml (R & D Systems, RU) en medio condicionado RET-AP (Biogen, EE.UU.) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Luego se lavaron los pocillos primero con PBST y luego con tampón AP (Tris 200 mM (pH=9,8), MgCl₂ 10 mM) seguido por incubación durante 30 minutos con potenciador Sapphire al 10% (Tropix, Applied Biosystems, Dinamarca) y 2% de CSPD (Tropix, Applied Biosystems, Dinamarca) en tampón AP. Se determinó la luminiscencia mediante el uso del contador Microbeta Trilux (Perkin Elmer, Dinamarca).

Resultados (figura 4, panel (b))

Se detectaron las actividades de NBN de 25,3-33,8 ng/ml mediante el uso del ELISA de RetL3 en sobrenadantes recogidos de células ARPE-19 transfectadas transitoriamente con el constructo pNS1n-IgSP.NBN. En cambio, se detectó una actividad de NBN aproximadamente 5 veces inferior (4,4-6,4 ng/ml) en células ARPE-19 transfectadas transitoriamente con un constructo de expresión de (pre-pro)NBN de tipo salvaje (pUbi1z.hNBN) incluido en el mismo experimento. Se detectó una actividad de NBN muy baja o indetectable en sobrenadantes celulares de ARPE-19 transfectadas transitoriamente con un constructo de expresión de EGFP (pNS1z-EGFP) confirmando la especificidad del ensayo.

Estos resultados indican que el uso de un constructo IgSP-NBN químico conduce a una liberación superior de NBN madura a partir de células de mamífero que pueden unirse y activar el complejo de receptor de NBN específico en comparación con la liberación de NBN utilizando un constructo de (pre-pro)NBN de tipo salvaje.

Ejemplo 2

Transducción in vitro con el constructo IgSP-NBN

Generación de un constructo IgSP-NBN lentiviral y stocks (soluciones madre) de virus

Para generar un constructo lentiviral, se digirió pNS1n-IgSP-NBN con BamHI-XhoI y se ligó el fragmento de PCR IgSP-hNBN (tal como se describe en el ejemplo 1) en pHsCXW digerido con BamHI/XhoI dando como resultado pHsCXW.IgSP.NBNw (figura 3). pHsCXW es un derivado de un constructo de transferencia lentiviral auto-inactivante, pHR'-SIN₁₈ que incluye un elemento WPRE (Dull *et al.*, J. Virol., 72 (11): 8463-71 (1998); Zufferey *et al.*, J. Virol., 72 (12): 9873-80 (1998); Zufferey *et al.* J. virol., 73 (4): 2886-92 (1999)) generado mediante sustitución de una gran parte no viral del constructo de transferencia por la estructura principal de pUC19. A la secuencia de pHsCXW se puede tener acceso a través de GenBank ID: AY468486.

Se generan partículas virales LV-sC.IgSP.NBN.W de replicación defectuosa mediante la cotransfección de pHsC.IgSP.NBN.W con pMD.G (vector de pseudotipificación VSV-G) y pBR8.91 (vector de empaquetamiento) (Zuferey *et al.*, Nat. Biotech., 15: 871-75 (1997)) en células 293T que proporcionan las proteínas virales requeridas en *trans*. En resumen, se siembran las células 293T cultivadas en DMEM con glucosa y glutamax 4,5 g/l (Life Technologies, 32430-027) complementadas con el 10% de FCS (Life Technologies, 10099-141) en frascos T75 (2x10⁶ células/frasco) el día antes de la transfección. Para cada frasco T75 se transfectan las células con 5 µg de pMD.G, 15 µg de pBR8.91 y 20 µg de vector de transferencia utilizando Lipofectamine+ siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recoge el sobrenadante celular que contiene virus a los 2-3 días tras la transfección, se esteriliza por filtración a través de un filtro de acetato de celulosa o polisulfónico de 0,45 µm y se concentra mediante ultracentrifugación a 50.000 xg durante 90 minutos a 4°C. Tras una segunda ronda de ultracentrifugación, se resuspende el sedimento de virus concentrado en DMEM, se divide en alícuotas y se almacena a -80°C. Para determinar el título viral, se somete a ensayo la actividad transcriptasa inversa (RT) (Cepko y Pear, Current Protocols in Molecular Biology, 9.13. 5-6, suplemento 36) y las unidades de transducción (UT)/ml calculadas a partir de la actividad RT determinada utilizando un lentivirus EGFP con actividad de transducción conocida como referencia.

Estudios de transducción

Se transdujeron células ARPE-19 con vectores de expresión de NBN. En resumen, se sembraron las células en placas de 6 pocillos (Corning Costar, Biotech Line, Dinamarca) a una densidad de 10⁵ células/pocillo. Al siguiente día, se añadieron 2x10⁵ UT de virus por pocillo (duplicado) junto con polibreno 5 µg/ml durante 4 horas. Se cambió el medio y se incubaron los cultivos durante 3 días. Entonces se recogieron los sobrenadantes celulares para realizar el ELISA de RetL3 tal como se describe en el ejemplo 2.

Resultados (figura 4, panel (c))

Se detectaron las actividades de NBN de 39 ng/ml mediante el uso del ELISA de RetL3 en sobrenadantes recogidos de células ARPE-19 transducidas con el virus LV-sC.IgSP.NBN.W. En cambio, se detectó una actividad de NBN muy baja o indetectable en células ARPE-19 transducidas con un lentivirus que contenía ADNc de (pre-pro)NBN de tipo salvaje (LV-sC-NBN. W) o un lentivirus EGFP control (LV-sCEW).

Estos resultados indican que, en contraposición a un constructo viral que contiene el ADNc de (pre-pro)NBN de tipo salvaje, el uso de un constructo viral IgSP-NBN quimérico permite una alta liberación de NBN madura a partir de células de mamífero que pueden unirse y activar el complejo receptor de NBN específico.

Ejemplo 3

Análisis de la proteína NBN expresada a partir de los constructos IgSP-NBN

Análisis de los sobrenadantes celulares por *Western-blot*

Se concentró NBN presente en los sobrenadantes celulares de cultivos celulares transfectados o transducidos mediante unión de afinidad a GFRα3-Ig antes del análisis por *Western-blot*. En resumen, se revistieron 4 pocillos de una placa Nunc MaxiSorp con 300 µl de anticuerpo de cabra anti-Fc humano 1 µg/ml (Jackson Immunoresearch Laboratories, TriChem, Dinamarca) en NaHCO₃ 50 mM (pH=9,6) durante 16 horas a 4°C. Se bloquearon los pocillos con 400 µl de BSA al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por 3 lavados con PBST. Entonces se añadieron 300 µl/pocillo de proteína de fusión GFRα3/Fc 1 µg/ml (R & D Systems, RU) y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente para maximizar la unión. Entonces se vaciaron los pocillos y se lavaron de nuevo 3 veces con PBST. Entonces se añadieron 300 µl de sobrenadante recogido de cultivos celulares transfectados o transducidos a cada uno de los 4 pocillos y se incubaron durante al menos 3 horas con agitación suave a temperatura ambiente. Entonces se lavaron los pocillos dos veces con PBST. Se añadieron 20 µl de tampón de muestra no reductor (SDS al 2%, Tris 0,4 M (pH=8,0) al primer pocillo y se agitó rápidamente la placa durante 5 minutos para eluir las proteínas unidas. Se transfirió el contenido al siguiente pocillo y se repitió el procedimiento para eluir las proteínas unidas en los pocillos restantes. Tras la adición de DTT a 10 mM, se calentaron las muestras hasta 96°C durante 5 minutos y se analizaron mediante SDS PAGE en un gel de poliacrilamida al 15% utilizando el sistema MultiPhorII según las recomendaciones del fabricante (Amersham Pharmacia, Dinamarca). Se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF (BioRad, Dinamarca) que se inmunotizaron utilizando un anticuerpo de conejo policlonal anti-NBN (nº 378) como anticuerpo de detección. Se revelaron las membranas utilizando el sistema ECL+ (Amersham Pharmacia, Dinamarca) y se sometieron a exposición a película.

Resultados

El #378 es un anticuerpo policlonal de conejo generado frente a un péptido derivado de NBN (ALRPPPGSR PVSQPC). Tal como se observa en la figura 5 panel (a), se reconoce una única banda de un peso molecular de entre 7,2 y 18,5 kDa en muestras reducidas (+DTT) que contienen NBN recombinante de rata purificada producida en *E. coli* que corresponde a NBN113 monomérica no glicosilada. Además de diversas bandas adicionales, se reconoce una banda del mismo PM en muestras reducidas a partir de clones de CHO-NBN estables establecidos mediante transfección con (pre-pro)NBN de tipo salvaje. Se han determinado las identidades de varias de estas bandas en estudios previos

ES 2 353 457 T3

utilizando desglicosilación y secuenciación del extremo N-terminal. Una banda con un peso molecular ligeramente inferior representa una versión más pequeña y no glicosilada de la NBN madura (NBN104). Además, una banda muy ancha con un PM aparente de aproximadamente 21 kDa representa versiones glicosiladas de NBN113 y NBN104. Las bandas de PM superior representan pro-NBN (glicosilada) observada ocasionalmente en muestras purificadas por afinidad a GFR α 3.

Tal como se observa en la figura 5 panel (b), se detecta la banda doble de PM entre 6,4 y 21,3 kDa que corresponde a NBN113 y NBN104 no glicosiladas en dos clones estables de células CHO-NBN. También se detecta la misma banda doble en ARPE-19 transducidas o transfectadas con constructos de expresión IgSP-NBN. Además, se observa una banda doble de PM próximo a 21 kDa que corresponde a NBN113 y NBN104 glicosiladas en todas las muestras analizadas. Estos resultados indican que el procesamiento y la modificación postraduccional son similares cuando se expresa a partir de constructos (pre-pro)NBN de tipo salvaje e IgSP-NBN.

Ejemplo 4

Secuencias de constructos virales IgSP-NBN quiméricos y predicción del péptido señal

IgSP-NBN- Secuencia de nucleótidos presente en el constructo

```
ATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGTAAGGGGCTCCCA
AGTCCCAAACCTTGAGGGTCCATAAACTCTGTGACAGTGGCAATCAC'TTTGCC'TTTCTTTC
TACAGGGGTGAATTCGGCTGGGGGCCCGGGCAGCCGCGCTCGGGCAGCGGGGGCGCGGGG
CTGCGCCTGCGCTCGCAGCTGGTGCCGGTGCGCGCGCTCGGCCTGGGGCCACCGCTCCGA
CGAGCTGGTGCGTTTCCGCTTCTGCGAGCGGCTCCTGCGCGCGCGCGCGCTCTCCACACGA
CCTCAGCCTGGCCAGCCTACTGGGCGCCGGGGCCCTGCGACCGCCCGCGGCTCCCGGCC
CGTCAGCCAGCCCTGCTGCGGACCCACGCGCTACGAAGCGGTCTCTTTCATGGACGTCAA
CAGCACCTGGAGAACCGTGGACCGCCTCTCCGCCACCGCCTGCGGCTGCCTGGGCTGA (SEQ ID NO 7)
```

IgSP-NBN es un constructo de fusión con el péptido señal de un gen de inmunoglobulina fusionado directamente a NBN madura (113).

El IgSP-NBN contiene un intrón

Predicción de intrón-exón mediante NetGene (servidor CBS-DTU):

Longitud: 478 nucleótidos

13,4% de A, 36,2% de C, 32,2% de G, 18,2% de T, 0,0% de X, 68,4% de G+C

Sitios donadores de corte y empalme, hebra directa

Pos 5'→3'	Fase	Hebra	Confianza	5'	Exón-intrón
3'					
47	2	+	0,00		GTGGTTACAG^GTAAGGGGCT
248	0	+	0,60		CGACGAGCTG^GTGCGTTTCC

Sitios donadores de corte y empalme, hebra complementaria

No hay predicciones de sitios donadores por encima del umbral

Sitios aceptores de corte y empalme, hebra directa

Pos 5'→3'	Fase	Hebra	Confianza	5'	Intrón-exón
3'					
125	1	+	0,83		CTTTCTACAG^GGGTGAATTC
153	2	+	0,18		GCCCCGGGCAG^CCGCGCTCGG
167	1	+	0,20		GCTCGGGCAG^CGGGGCGCG
199	0	+	0,42		GCGCTCGCAG^CTGGTGCCGG

ES 2 353 457 T3

Secuencia de nucleótidos del transcrito cortado y empalmado:

```

5  ATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCTGATGCCAGTGGTTACAGGGGTGAATTGGCT
   GGGGGCCCGGGCAGCCCGCTCGGGCAGCGGGGGCGCGGGGCTGCCGCTGCGCTGCGAG
   CTGGTGCCTGGTGCCTGCGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCT
   TTCTGCAGCGCTCTCTGCGCGCGCGCTCTCCACACGACCTCAGCCTGGCCAGCCTA
   CTGGGCGCCCGGGCCCTGCGACCGCCCGGGCTCCCGGCGCGTCAGCCAGCCCTGCTGC
10  CGACCCACGCGCTACGAAGCGGTCTCTTCATGGACGTCAACAGCACCTGGAGAACCCTG
   GACCGCCTCTCCGCCACCGCCTGCGGGCTGCCTGGGCTGA (SEQ ID NO 8)

```

Traducción del transcrito cortado y empalmado:

```

15
   MKCSWVIFFLMAVVTGVNSAGCPGSRARAAGARGCRLRSQLVVVRALGLGHRSDLVRF
   FCGSGCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTV
20  DRLSATACQCLG (SEQ ID NO 9)

```

Se predice que la proteína de fusión traducida contiene un péptido señal de 19 aminoácidos, que se escinde de la secuencia de NBN madura (113) utilizando Signal P (disponible en el servidor CBS DTU en www.cbs.dtu.dk). ((Identification of prokaryotic and eukaryotic peptides and prediction of their cleavage sites. H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, G. von Hejne, Protein Engineering 10, 1-6, 1997.))

Resultado de SignalP-NN (véase la figura 6a)

```

30  >Secuencia      Longitud=70
   # Medida      Posición      Valor      Límite      ¿Péptido señal?
   C max.        20            0,757      0,33        Sí
   Y max.        20            0,758      0,32        Sí
35  S max.         7            0,970      0,82        Sí
   S medio       1-19          0,906      0,47        Sí
   # Sitio de escisión más probable entre las posiciones 19 y
   20: VNS-AG
40

```

Resultado de SignalP-HMM (Véase la figura 6b)

Predicción: péptido señal

Probabilidad de péptido señal: 0,999

Probabilidad de anclaje de señal: 0,000

Probabilidad máxima de sitio de escisión: 0,660 entre las posiciones 19 y 20

Utilizando redes neurales (NN) y modelos ocultos de Markov (HMM) entrenados en eucariotas

Ejemplo 5

Predicción de las posiciones para los péptidos señal

La predicción de sitio de escisión cuando Igsp se fusiona a un polipéptido de neublastina de diversas longitudes se muestra a continuación utilizando el programa signal P 2.0 anteriormente identificado.

ES 2 353 457 T3

Sitios de escisión:

Proteína	SignalP-NN	SignalP-HMM	Observaciones
Pre-pro-NBN	39/40* (0,852)	39/40 (0,348)	Péptido señal muy largo con poca probabilidad en el extremo N-terminal
IgSP-NBN113	19/20 (0,757)	19/20 (0,660)	
IgSP-NBN106	19/20 (0,831)	22/23 (0,586)	Escisión 19/20 predicha con menos probabilidad en HMM (0,2)
IgSP-NBN104	19/20 (0,643)	22/23 (0,440)	Escisión 19/20 predicha con menos probabilidad en HMM (0,18). Además, se predice un sitio de escisión adicional 25/26 con la misma probabilidad
IgSP-NBN102	16/17 (0,643)	19/20 (0,359)	Escisión 19/20 predicha con una probabilidad de 0,5 por NN
IgSP-NBN99	19/20 (0,718)	19/20 (0,496)	

IgSP:

(19)MKCSWVIFFLMAVVTGVNS

Formas maduras de NBN:

(113)AGGPGSR(106)AR(104)AA(102)GAR(99)GCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELV

RFRFCSGSCRRARSPHDLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFM-

DVNSTWRTVDRLSATACGCLG

Ejemplo 6

Clonación de *deltapro-NBN* en *pHsCXW*

Se generó *deltapro-NBN* (SEQ. ID. NO: 82) mediante PCR solapante en tres etapas de amplificación: 1) la secuencia líder relativamente larga de 117 pb (es decir, péptido señal de 39 aminoácidos) de *preproNBN* con proyección de 5'BamHI/Kozak y superposición en 3' de 10 bases con respecto a *NBN* madura (143 pb); 2) *NBN* madura con superposición de secuencia líder de *NBN* de 10 bases en 5' y XhoI 3' (362 pb); 3) se combinaron los productos de las etapas 1 y 2 en una reacción de PCR final que generó Δ *pro-NBN* (492 pb).

La primera reacción de PCR (líder de *NBN*):

Cebadores utilizados:

BamHI+Kozak+hNBNsp, 5'-TATAGGATCCGCCACCATGGAACCTGGACTTGGAGG-3'

hNBNsp3'-matNBN FLAP como, 5'-GGCCCCAGCGGCCTCTGCGACGCTGCTCA-3'

Se utilizó el plásmido *pHsC.hNBN.W* (véase el mapa de plásmido en la figura 7a) como molde para la reacción de PCR, que se realizó utilizando polimerasa Pfu-turbo.

ES 2 353 457 T3

Condiciones de PCR:

94°C 3 min

94°C 30 s

55°C 30 s 35 ciclos

72°C 1 min

72°C 5 min

La segunda reacción de PCR (NBN madura):

Cebadores utilizados:

hNBNsp3' FLAP-matNBN s, 5' -CGCAGAGGCCGCTGGGGGCCCCGGGCAGC-3'

NBNas+XhoI, 5' -TATACTCGAGCGAGCCCTCAGCCCAGGCA-3'

Se utilizó el plásmido pHsC.hNBN.W (véase el mapa de plásmido en la figura 7a) como molde para la reacción de PCR, que se realizó utilizando polimerasa Pfu-turbo.

Condiciones de PCR:

94°C 3 min

94°C 30 s

65°C 30 s 35 ciclos

72°C 1 min

72°C 5 min

La tercera reacción de PCR (deltapro-NBN):

Cebadores utilizados:

5' -TATAGGATCCGCCACCATGGAACCTTGGACTTGGAGG-3'

NBNas+XhoI, 5' -TATACTCGAGCGAGCCCTCAGCCCAGGCA-3'

Se utilizaron los fragmentos de PCR de las dos primeras reacciones de PCR (líder de NBN y NBN madura) ambos a una dilución de 1:10 como molde para la tercera reacción de PCR, que se realizó utilizando polimerasa Pfu-turbo, y el mismo perfil de PCR que en la primera reacción de PCR.

Se cortó el fragmento de PCR de la tercera reacción de PCR con BamHI y XhoI y se clonó entre los sitios BamHI y XhoI en pHsCXW (véase el mapa de plásmido en la figura 7b).

Ejemplo 7

Transfección in vitro con los constructos IgSP-NBN y con los constructos deltaproNBN en diferentes líneas celulares

Se comparó la secreción de NBN tras la transfección transitoria con diferentes constructos de NBN, incluyendo pre-pro-NBN de tipo salvaje, delta-pro-NBN e IgSP-NBN. Se realizaron las transfecciones transitorias en células ARPE-19, HEK293, CHO e HiB5.

Líneas celulares

Se cultivaron células ARPE-19 tal como se describe en el ejemplo 1. Se hicieron crecer células HiB5 (Renfranz *et al.* 1991), HEK293 y CHO en DMEM (Invitrogen, Dinamarca) con el 10% de suero bovino fetal (Invitrogen,

ES 2 353 457 T3

Dinamarca), y se complementó adicionalmente el medio para las células CHO con L-prolina 20 mg/l. Se hicieron crecer las células ARPE-19, HEK293 y CHO a 37°C y las células HiB5 a 33°C en el 5% de CO₂. Se pasaron las células aproximadamente dos veces a la semana mediante tripsinización y resiembra (razón de división 1:5).

Secreción de NBN tras la transfección transitoria

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos (Corning Costar, Biotech Line, Dinamarca) a una densidad de aproximadamente 10⁵ células/pocillo. Al día siguiente, se transfectaron las células con pHsC.hNBN.W, pHsC.IgSP.hNBN.W y pHsC.deltapro-hNBN.W, respectivamente. Se transfectaron las células ARPE-19 en pocillos por triplicado utilizando Eugene6 tal como se describió en el ejemplo 1, mientras que las otras tres líneas celulares se transfectaron utilizando 2 µg de plásmido/pocillo en pocillos por triplicado utilizando Lipofectamine Plus (Invitrogen, Dinamarca) según las instrucciones del fabricante. Al día siguiente, se añadió medio de crecimiento nuevo a los pocillos y se incubaron las células durante 24 horas adicionales antes de recoger el medio condicionado. Se garantizó una eficacia de transfección adecuada mediante la evaluación de la expresión de EGFP en pocillos transfectado en paralelo con pHsC.EGFP.W. Se midió la actividad de unión de NBN en medio condicionado utilizando el ELISA de RetL3, tal como se describió en el ejemplo 1. El ELISA de RetL3 detecta la unión de un conjugado Ret-AP a un complejo de NBN unido al receptor de GFRα3 específico de NBN. Se calcularon los valores como ng de NBN/ml/24 h y ng de NBN/10⁵ células/24 h y se ajustaron con respecto a la liberación relativa de NBN con valores de las células transfectadas con el constructo de NBN de tipo salvaje fijada en 1. Los datos en la figura 8 representan estos tres cálculos y se expresan como media ± EEM (n=3). En el panel A, * indica una diferencia significativa de las células transfectadas con el constructo de NBN de tipo salvaje (P < 0,05, ANOVA de una vía, método LSD de Fisher).

Resultados

Tal como se muestra en la tabla a continuación y en la figura 8A, las cuatro líneas celulares sometidas a prueba mostraron un aumento en la liberación de NBN cuando se utiliza el constructo deltapro-NBN, en comparación con el constructo de NBN de tipo salvaje (liberación de NBN 9-17 veces superior, dependiendo de la línea celular). Cuando se transfectaron las cuatro líneas celulares con el constructo pHsC.IgSP.hNBN, la secreción de NBN se potenció adicionalmente (liberación de NBN 28-91 veces superior en comparación con NBN de tipo salvaje). Se detectó una actividad muy baja o indetectable de NBN en los sobrenadantes celulares de ARPE-19 transfectada transitoriamente con el constructo de expresión de EGFP (pHsC.EGFP.W) confirmando la especificidad del ensayo.

	HEK 293		ARPE- 19		HiB5		CHO	
Constructo	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
NBN	1,0	0,2	1,0	0,3	1,0	0,2	1,0	0,1
IgSP-NBN	28,0	4,7	48,6	12,9	42,7	5,4	91,2	15,1
dpro-NBN	12,4	0,6	17,2	5,5	13,1	1,0	9,2	0,5

El panel B de la figura 8B muestra concentraciones de NBN en medio condicionado (24 horas) de líneas celulares transfectadas transitoriamente. La mayor concentración (1240 ± 54 ng NBN/ml) se encontró en el medio condicionado de células HEK293 transfectadas con el constructo IgSP-NBN. El panel C de la figura 8 muestra la liberación de NBN por 10⁵ células por 24 horas. Las células ARPE-19 transfectadas con IgSP-NBN muestran la mayor liberación de NBN (133 ± 35 ng/10⁵ células/24 horas).

Los presentes resultados indican que el uso de un constructo IgSP-NBN quimérico y del constructo deltapro-NBN con el fin de aumentar la secreción de NBN madura a partir de células de mamífero es aplicable en diferentes tipos de células.

Ejemplo 8

Predicción utilizando SignalP 3.0

- 5 Predicción de las posiciones para los péptidos señal utilizando la versión 3.0. Se realizaron las predicciones en deltapro NBNs e IgSP-NBNs de las siguientes secuencias.

Moléculas de NBN quiméricas con NBN-SP (deltapro NBNs):

10

NBN-SP (SEQ ID NO: 24)
MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALLSSVAEA

15

deltaproNBN140 (SEQ ID NO: 25)
MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALLSSVAEAPPPPQSRPAPPPPPAPPSALPR-
GGRAARAGGPGSRARAAGARGCRLRSQVLPVVRALGLGHRSEDELVRFRFCSGSCRRARSPH-
DLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGCLG

20

deltaproNBN113 (SEQ ID NO: 26)
MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALLSSVAEAAGGPGSRARAAGARGCRLR-
SQVLPVVRALGLGHRSEDELVRFRFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQP-
CCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGCLG

25

deltaproNBN106 (SEQ ID NO: 27)
MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALLSSVAEAARAAGARGCRLRSQVLPVVRAL-
GLGHRSEDELVRFRFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRP-
TRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGCLG

30

deltaproNBN104 (SEQ ID NO: 28)
MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALLSSVAEAAAGARGCRLRSQVLPVVRALGL-
GHRSEDELVRFRFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVS-
FMDVNSTWRTVDRLSATAACGCLG

35

deltaproNBN102 (SEQ ID NO: 29)
MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALLSSVAEAGARGCRLRSQVLPVVRALGL-
GHRSEDELVRFRFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVS-
FMDVNSTWRTVDRLSATAACGCLG

40

deltaproNBN99 (SEQ ID NO: 30)
MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALLSSVAEAGCRLRSQVLPVVRALGLGHR-
SDELVRFRFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDV-
NSTWRTVDRLSATAACGCLG

45

50

55

60

65

IGSP (SEQ ID NO: 4)
MKCSWVIFFLMAVVTGVNS

IgSP-NBN140 (SEQ ID NO: 31)
MKCSWVIFFLMAVTGVNSPPPPQPSRPAPPPPPAPPSPALPRGGRAARAGGPGSRARAAGAR-
GCRLRSQLVPRALGLGHRSDDELVRFRCSGSCRRARSPHDSLALSLGAGALRPPPGSRPVSQCRCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

IgSP-NBN113 (SEQ ID NO: 32)

IgSP-NBN106 (SEQ ID NO: 33)
MKCSWVIFFLMAVTVGVNSARNAAGRCRLSQLVFVRAALGLGHRSDLVRFRCQSGCR-
RARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGLG

IgSP-NBN104 (SEQ ID NO: 34)
MKCSWVIFFLMAVTGVNSAAGARGCRLRSQLVPRALGLGHRSDLVRFRCGSGCR-
RARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

IgSP-NBN102 (SEQ ID NO: 35)
MKCSWVIFFLMAVWTGVNSGARGCRLRSQLPVRAALGLGHRSDLELVRFRFCSGSCR-
RARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRFVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

IgSP-NBN99 (SEQ ID NO: 36)
MKCSWVIFFLMAVTGVNSGCHLSQLVPVRALGLGRSDBLVRFRCSGSCRRARSPH-
DLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

Moléculas de NBN quiméricas con SP de albúmina de rata (AlbSP-NBNs):

AlbSP (SEQ ID NO: 37)
MKWTFLLLLFISGSAFS

AlbSP-NBN140 (SEQ ID NO: 38)
MKWTFLLLLFISGSAFSPPQSPRPAPPAPPALPRGGRAARGPGSRARAAGARG-
CRLRSQLVVVRALGLGHRSDLVRFRCGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

AlbSP-NBN113 (SEQ ID NO: 39)
MKWTFLLLLFISGSAFSAGGPGSRARAAGCRLRSQLVVVRALGLGHRSDLVRF-
CSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

AlbSP-NBN106 (SEQ ID NO: 40)
MKWTFLLLLFISGSAFSARAAGCRLRSQLVVVRALGLGHRSDLVRFRCGSCR-
RARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

AlbSP-NBN104 (SEQ ID NO: 41)
MKWTFLLLLFISGSAFSAAGCRLRSQLVVVRALGLGHRSDLVRFRCGSCRRAR-
SPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

AlbSP-NBN102 (SEQ ID NO: 42)
MKWTFLLLLFISGSAFSGARGCRLRSQLVVVRALGLGHRSDLVRFRCGSCRRARSPH-
DLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

AlbSP-NBN99 (SEQ ID NO: 43)
MKWTFLLLLFISGSAFSGCRLRSQLVVVRALGLGHRSDLVRFRCGSCRRARSPHDL-
SLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Moléculas de NBN químéricas con SP de albúmina de rata modificado (ModAlbSP-NBNs):

ModAlbSP (SEQ ID NO: 44)
MKWVTFLLFLFISGDAFA

ModAlbSP-NBN140 (SEQ ID NO: 45)
MKWVTFLLFLFISGDAFAAPPQPSRPAPPAPPALPRGGRAARAGGPGSRARAAARG-
CRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRCSGSCRRARSPHDLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATA CGCLG

ModAlbSP-NBN113 (SEQ ID NO: 46)
MKWVTFLLFLFISGDAFAAGGPGSRARAAAGCRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRC-
CSGSCRRARSPHDLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATA CGCLG

ModAlbSP-NBN106 (SEQ ID NO: 47)
MKWVTFLLFLFISGDAFAARAAGCRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRCSGSCR-
RARS PHDLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATA CGCLG

ModAlbSP-NBN104 (SEQ ID NO: 48)
MKWVTFLLFLFISGDAFAAAGCRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRCSGSCRRAR-
SPHDLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATA CGCLG

ModAlbSP-NBN102 (SEQ ID NO: 49)
MKWVTFLLFLFISGDAFAGCRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRCSGSCRRARSP-
HDLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATA CGCLG

ModAlbSP-NBN99 (SEQ ID NO: 50)
MKWVTFLLFLFISGDAFAGCRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRCSGSCRRARSPH-
DLASLLGAGALRPPPGSRPVSPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATA CGCLG

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Moléculas de NBN quiméricas con SP de hormona de crecimiento humana (GHSP-NBNs):

GHSP (SEQ ID NO: 51)
MATGSRSTSLLLAFGLLCLSWLQEGSA

GHSP-NBN140 (SEQ ID NO: 52)
MATGSRSTSLLLAFGLLCLSWLQEGSAPPPQPSRPAPPPAPPSPALPRGGRAARAGGPGSRA-
RAAGARGCRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

GHSP-NBN113 (SEQ ID NO: 53)
MATGSRSTSLLLAFGLLCLSWLQEGSAGGPGSRARAAGARGCRLRSQLVFVRALGLGHRSD-
DELVRFRFCSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

GHSP-NBN106 (SEQ ID NO: 54)
MATGSRSTSLLLAFGLLCLSWLQEGSAARAAGARGCRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRC-
CSGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

GHSP-NBN104 (SEQ ID NO: 55)
MATGSRSTSLLLAFGLLCLSWLQEGSAAAGARGCRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRC-
GSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

GHSP-NBN102 (SEQ ID NO: 56)
MATGSRSTSLLLAFGLLCLSWLQEGSAGARGCRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRC-
GSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

GHSP-NBN99 (SEQ ID NO: 57)
MATGSRSTSLLLAFGLLCLSWLQEGSAGCRLRSQLVFVRALGLGHRSDLVRFRCGSGCR-
RARS PHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATACGCLG

Las predicciones del péptido señal se muestran a continuación en las tablas:

Predicciones del péptido señal para proteínas con péptido señal NBN¹ (deltapro)

Proteína	Signal P 3.0 - NN		SignalP - HMM		Observaciones		
	S media	D	C máx.	Sitio de escisión		Probabilidad de sitio de escisión	Sitio de escisión
Pre-pro-NBN	0,5	0,551	0,451	39/40	0,993	0,573	39/40
deltaproNBN140	0,437	0,569	0,711	39/40	0,993	0,845	39/40
deltaproNBN113	0,492	0,616	0,693	39/40	0,998	0,675	39/40
deltaproNBN106	0,505	0,564	0,495	39/40	0,998	0,415	39/40
deltaproNBN104	0,509	0,500	0,305*	(39/40)	0,998	0,278*	(39/40)
deltaproNBN102	0,492	0,508	0,352	39/40	0,996	0,514	39/40
deltaproNBN99	0,497	0,555	0,478	39/40	0,991	0,724	39/40
Valores límite	0,48	0,43	0,32	0,5			

¹MELGLGLSTLSHCPWRRQPALWPTLAALALLSSVAEA - 39 aminoácidos

* Por debajo de los valores límite

Predicciones del péptido señal para proteínas con IgSP²

Proteína	Signal P 3.0 - NN			SignalP-HMM			Observaciones
	S media	D	C máx.	Sitio de escisión	Probabilidad de SP	Probabilidad de sitio de escisión	
IgSP-NBN140	0,853	0,844	0,906	19/20	0,999	0,823	19/20
IgSP-NBN113	0,927	0,893	0,901	19/20	1,000	0,877	19/20
IgSP-NBN106	0,935	0,847	0,803	19/20	1,000	0,557	Sitio de escisión en 19/20 predicho con menor probabilidad que 22/23 por HMM
IgSP-NBN104	0,941	0,819	0,654	19/20	1,000	0,446*	(22/23) Sitio de escisión en 19/20 predicho con menor probabilidad que 22/23 por HMM
IgSP-NBN102	0,915	0,814	0,692	19/20	0,999	0,585	19/20
IgSP-NBN99	0,906	0,833	0,798	19/20	0,998	0,722	19/20
Valores límite 0,48 0,43 0,32 0,5							

²MKCSWVIFFLMAVVTGVNS - 19 aminoácidos

* Por debajo de los valores límite

Predicciones del péptido señal para proteínas con ModAlbSP⁴

Proteína	Signal P 3.0 - NN			SignalP-HMM			Observaciones
	S media	D	C máx.	Sitio de escisión	Probabilidad de SP	Probabilidad de sitio de escisión	
ModAlbSP-NBN140	0,930	0,918	0,961	19/20	1,000	0,708	19/20
ModAlbSP-NBN113	0,955	0,929	0,971	19/20	1,000	0,747	19/20
ModAlbSP-NBN106	0,959	0,901	0,939	19/20	1,000	0,474*	(19/20)
ModAlbSP-NBN104	0,960	0,877	0,822	19/20	1,000	0,308*	Sitio de escisión en 19/20 predicho con casi la misma probabilidad que 23/24 por HMM
ModAlbSP-NBN102	0,947	0,871	0,818	19/20	1,000	0,373*	Sitio de escisión en 19/20 predicho con casi la misma probabilidad que 23/24 por HMM
ModAlbSP-NBN99	0,931	0,878	0,911	19/20	1,000	0,634	19/20
Valores límite	0,48	0,43	0,32			0,5	

⁴MKQWTFLLFLFISGDAFA- 19 aminoácidos

* Por debajo de los valores límite

Predicciones del péptido señal para las proteínas con AlbSP³

Proteína	Signal P 3.0 - NN			SignalP - HMM			Observaciones
	S media	D	C máx.	Sitio de escisión	Proba-bilidad de SP	Proba-bilidad de sitio de escisión	
AlbSP-NBN140	0,947	0,870	0,830	16/17	1,000	0,485*	Sitio de escisión entre 18/19 predicho con casi la misma probabilidad que 16/17 por NN y HMM
AlbSP-NBN113	0,954	0,847	0,681	18/19	1,000	0,500	
AlbSP-NBN106	0,960	0,786	0,575	18/19	1,000	0,283*	Sitio de escisión entre 18/19 predicho con casi la misma probabilidad que 21/22 por HMM
AlbSP-NBN104	0,872	0,749	0,585	22/23	1,000	0,423*	Sitio de escisión en 18/19 predicho con menor probabilidad que 22/23 por NN
AlbSP-NBN102	0,831	0,777	0,896	22/23	1,000	0,684	Sitio de escisión en 18/19 predicho con menor probabilidad que 22/23 por NN
AlbSP-NBN99	0,965	0,810	0,612	16/17	1,000	0,334*	Sitio de escisión en 18/19 predicho con casi la misma probabilidad que 16/17 por NN y HMM

Valores límite 0,48 0,43 0,32 0,5

³MKWTFLLLLFISGSAFS - 18 aminoácidos - * Por debajo de los valores límite

Predicciones del péptido señal para proteínas con GHSP⁵

Proteína	Signal P 3.0 - NN			SignalP HMM			Observaciones
	S	D	C máx.	Sitio de escisión	Probabilidad de SP	Probabilidad de sitio de escisión	
GHSP-NBN140	0,874	0,815	0,702	26/27	0,999	0,784	
GHSP-NBN113	0,912	0,845	0,721	26/27	1,000	0,542	
GHSP-NBN106	0,914	0,793	0,566	26/27	1,000	0,373*	
GHSP-NBN104	0,920	0,721	0,340	26/27	1,000	0,266*	Sitio de escisión en 26/27 predicho con casi la misma probabilidad que 27/28 por HMM y NN
GHSP-NBN102	0,904	0,724	0,380	26/27	0,999	0,296*	Sitio de escisión en 26/27 predicho con casi la misma probabilidad que 27/28 por HMM y NN
GHSP-NBN99	0,888	0,754	0,516	26/27	0,999	0,526	

Valores límite 0,48 0,43 0,32 0,5

⁵MATGSRSTSLLAFLGLICLSWLQEGSA- 26 aminoácidos

* Por debajo de los valores límite

Ejemplo 9

Optimización de la secuencia del gen de neublastina

- 5 Se examinó la secuencia del gen de neublastina nativa humana para determinar el uso de codones para optimizar la expresión de la neublastina humana en células CHO. Se analizaron los codones más frecuentemente utilizados en células CHO basándose en los datos actuales hasta 2002 utilizando un método conocido en la técnica (Nakamura *et al.*, 1999, Nucleic Acids Res., 27(1): 292). El uso de codones para *Cricetulus griseus* se basa en lo presentado en la tabla a continuación.

10

TABLA

Frecuencia de uso de codones en Cricetulus normalizado para 1.000 codones

15

20

25

30

35

(Phe)	UUU	19,2	(Ser)	UCU	16,0	(Tyr)	UAU	12,7	(Cys)	UGU	8,5
(Phe)	UUC	22,2	(Ser)	UCC	17,2	(Tyr)	UAC	16,1	(Cys)	UGC	10,0
(Leu)	UUA	6,0	(Ser)	UCA	10,2	(***)	UAA	0,5	(***)	UGA	1,0
(Leu)	UUG	14,2	(Ser)	UCG	3,5	(***)	UAG	0,5	(Trp)	UGG	12,9
(Leu)	CUU	13,3	(Pro)	CCU	17,5	(His)	CAU	9,5	(Arg)	CGU	5,7
(Leu)	CUC	18,2	(Pro)	CCC	17,7	(His)	CAC	12,7	(Arg)	CGC	9,5
(Leu)	CUA	7,5	(Pro)	CCA	15,4	(Gln)	CAA	10,4	(Arg)	CGA	7,0
(Leu)	CUG	39,0	(Pro)	CCG	4,1	(Gln)	CAG	33,2	(Arg)	CGG	10,4
(Ile)	AUU	17,5	(Thr)	ACU	14,5	(Asn)	AAU	17,7	(Ser)	AGU	11,5
(Ile)	AUC	25,5	(Thr)	ACC	21,2	(Asn)	AAC	21,1	(Ser)	AGC	16,5
(Ile)	AUA	6,6	(Thr)	ACA	15,6	(Lys)	AAA	24,5	(Arg)	AGA	9,5
(Met)	AUG	23,4	(Thr)	ACG	4,4	(Lys)	AAG	39,1	(Arg)	AGG	9,8
(Val)	GUU	11,3	(Ala)	GCU	22,5	(Asp)	GAU	23,9	(Gly)	GGU	13,2
(Val)	GUC	16,0	(Ala)	GCC	26,6	(Asp)	GAC	27,6	(Gly)	GGC	22,1
(Val)	GUA	8,0	(Ala)	GCA	16,7	(Glu)	GAA	27,8	(Gly)	GGA	15,9
(Val)	GUG	29,9	(Ala)	GCG	4,3	(Glu)	GAG	40,7	(Gly)	GGG	13,5

- 40 La secuencia de nucleótidos nativa humana que codifica para el fragmento de 104 aminoácidos C-terminales (Ro-seblad *et al.*, 2000, Mol. Cell Neurosci. 15 (2): 199; Baloh *et al.*, Neuron 21: 1291) y la secuencia de nucleótidos del gen sintético están alineadas en la figura 9 con los nucleótidos cambiados indicados. Las dos secuencias son idénticas al 83,33%.

45

Ejemplo 10

Clonación del gen de neublastina

- 50 Se sintetizó una forma en 3' de 100 codones (300 nucleótidos) del gen de neublastina y se clonó en un plásmido de expresión para facilitar la inserción de diversas secuencias de péptido señal unidas a los codones en 5' de neublastina. Se ensambló la forma de 100 codones del gen de neublastina mediante la combinación de 40 pmol de oligonucleótidos KD3-464 a KD3-469 (tabla 2) en 200 μ l de tampón (KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-Cl 20 mM, MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%, pH 8,8) que contenía la polimerasa Deep Vent (New England BioLabs, Beverly, MA). Se calentó el contenido hasta 95°C durante 4 minutos y se sometió a ciclado veinte veces tal como sigue: 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, seguido por una extensión a 72°C durante cuatro minutos. Se prepararon los extremos mediante digestión secuencial con Sall y NheI. El fragmento de 330 pares de bases, que incluía una región no codificante de 30 pares de bases que flanqueaba al gen de neublastina, se purificó en gel y se ligó en el plásmido pFRT/dhfr-1 (un derivado de pcDNA/FRT (Invitrogen, Carlsbad, CA) con el gen de higromicina sustituido por un gen de dihidrofolato reductasa) que se había purificado en gel y digerido con NheI y XhoI. El plásmido resultante se denominó pNBN026-35. La secuencia de neublastina dentro de pNBN026-35 se presenta en la Figura 10.

- 65 La tabla a continuación identifica los oligonucleótidos utilizados en PCR y el ensamblaje de la secuencia sintética para generar genes de fusión péptido señal-neublastina. Todas las secuencias se indican en la orientación de 5' a 3'.

ES 2 353 457 T3

TABLA

Nombre del oligo-nucleótido	Secuencia del oligonucleótido
KD3-464	AAGCTTGCTAGCATGAATTCATCTCGAGGCTGCCGGCTGCGGTCC CAGCTGGTGCCTGTGCGGGCCCTGGGCCTGGGCCAC (SEQ ID NO: 71)
KD3-465	TTCTGCTCCGGCTCCTGCCGGCGGGCCCGGTCCCCTCACGACCT GTCCCTGGCCTCCCTGCTGGGCGCCGGCGCCCTGCGG (SEQ ID NO: 72)
KD3-466	CAGCCTTGCTGCCGGCCTACCCGGTACGAGGCCGTGTCCTTCAT GGACGTGAACCTCACCTGGCGGACCGTGGACCGGCTG (SEQ ID NO: 73)
KD3-467	GGCCCGCCGGCAGGAGCCGGAGCAGAACCAGGAACCGCACAGC TCGTCCGACCGGTGGCCAGGCCAGGGCCCGCACAGG (SEQ ID NO: 74)
KD3-468	GTACCGGGTAGGCCGGCAGCAAGGCTGGGACACAGGCCGGGAG CCAGGAGGAGGCCGCAGGGCGCCGGCGCCAGCAGGGA (SEQ ID NO: 75)
KD3-469	CTTGGAAATTGTCGACGGATCCTCAGCCCAGGCAGCCGCAGGCGG TGGCGGACAGCCGGTCCACGGTCCGCCAGGTGGA (SEQ ID NO: 76)
KD3-471	AAGCTTAGCTAGCGGATCCATGAAGTGGGTGACCTTCCTGCTGCT GCTGTTTCATC (SEQ ID NO: 77)
KD3-472	GGCAGCCTCGAGCGCCGGCGGCGGAGAAGGCGGAGCCGGAGAT GAACAGCAGCAGCAGGAA (SEQ ID NO: 78)
KD3-477	AAGCTTAGCTAGCGGATCCATGGCTACAGGTAAGC (SEQ ID NO: 79)
KD3-479	AAGCTTAGCTAGCGGATCCATGGAGCTGGGCCTGGGCGGCCTGT CCACCCTGTC (SEQ ID NO: 80)
KD3-480	GGCGGCAGCCTGCCCTGTGGCCTACCCTGGCCGCCCTGGCCCT GCTGTCCTCCGT (SEQ ID NO: 81)

Ejemplo 11

Construcción de la fusión péptido señal-neublastina

Se sometieron a prueba las secuencias que codificaban para cuatro péptidos señal diferentes. Estos incluían las secuencias señal para Neublastina, albúmina de rata y hormona de crecimiento humana. Adicionalmente, una secuencia señal sintética que resultó de dos mutaciones de marco de lectura durante la amplificación por PCR para generar el péptido señal de Neublastina. Se sintetizaron las fusiones utilizando o bien ensamblaje de oligonucleótidos o bien PCR. Se ligaron los fragmentos de ADN en pNBN026. Se confirmó la secuencia de ADN relevante de cada una de las cuatro moléculas descritas mediante análisis de la secuencia de ADN.

Se sintetizó la secuencia señal sintética mediante amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos KD3-487, KD3-479, KD3-480, KD3-481, y KD3-482 (tabla) y polimerasa puReTaq (Pharmacia, Peapack, NJ.). Las condiciones de PCR incluyeron calentamiento de la reacción hasta 95°C durante 4 minutos y luego ciclado veinte veces a 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, seguido por una extensión a 72°C durante cuatro minutos. Se prepararon los extremos mediante digestión con PstI y XhoI. Se purificó en gel el fragmento de 330 pares de bases y se ligó en el plásmido pNBN026 que también se purificó en gel y se digirió con PstI y XhoI. El plásmido resultante se denominó pNBN030. Hubo dos mutaciones de marco de lectura espontáneas no predichas ni codificadas por los oligonucleótidos que se compensaron entre sí y mantuvieron la proteína traducida en marco. Se muestran las secuencias de ADN y proteína en la Figura 11.

Se sintetizó la secuencia señal de neublastina mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos KD3-513 y KD3-514 (tabla). La polimerasa utilizada fue puReTaq (Pharmacia, Peapack, NJ.). Las condiciones de PCR incluyeron calentamiento hasta 95°C durante 4 minutos y ciclado tres veces a 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, seguido por una extensión a 72°C durante cuatro minutos. Se prepararon los extremos mediante digestión con NheI y XhoI. Se purificó en gel el fragmento de 330 pares de bases y se ligó en el plásmido pNBN030 que se purificó en gel y se digirió con NheI y XhoI. El plásmido resultante se denominó pNBN038. Se muestran las secuencias de ADN y proteína en la Figura 12.

Se sintetizó la secuencia señal de albúmina mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos KD3-487, KD3-471 y KD3-472 (tabla). La polimerasa utilizada fue puReTaq (Pharmacia, Peapack, NJ.). Las condiciones de PCR incluyeron calentamiento hasta 95°C durante 4 minutos y ciclado veinte veces a 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, seguido por una extensión a 72°C durante cuatro minutos. Se prepararon los extremos mediante digestión con PstI y XhoI. Se purificó en gel el fragmento de 330 pares de bases y se ligó en el plásmido pNBN026 que se purificó en gel y se digirió con PstI y XhoI. El plásmido resultante se denominó pNBN029. Se muestran las secuencias de ADN y proteína en la Figura 13.

Se sintetizó la secuencia señal de la hormona de crecimiento humana mediante amplificación por PCR del plásmido pV30 (un plásmido basado en pUC que contiene la copia genómica del extremo 5' del gen de la hormona de crecimiento humana) con los oligonucleótidos KD3-487, KD3-477 y KD3-485 (tabla 2). La polimerasa utilizada fue puReTaq (Pharmacia, Peapack, NJ.). Las condiciones de PCR incluyeron calentamiento hasta 95°C durante 4 minutos y ciclado veinte veces a 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, seguido por una extensión a 72°C durante cuatro minutos. Se prepararon los extremos mediante digestión con PstI y XhoI. Se purificó en gel el fragmento de 330 pares de bases y se ligó dentro del plásmido pNBN026 que se purificó en gel y se digirió con PstI y XhoI. El plásmido resultante se denominó pNBN031. Se muestran las secuencias de ADN y de proteína en la Figura 14.

Ejemplo 12

Transfecciones de células CHO

Se transformaron previamente células CHO-DG44 con secuencias de ADN que contenían la diana de recombinación Flp (frr) (células A1). Esta línea celular huésped A1 no contiene el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) y por tanto es DHFR-negativo. Cada uno de los plásmidos descritos codifica para el gen de DHFR, el gen de fusión de neublastina, más el sitio frr. El plásmido pOG44 codifica para el gen de Flp recombinasa. La cotransfección de estos plásmidos en células A1 dio como resultado la inserción de una copia única de los genes de fusión péptido señal-neublastina y DHFR en el cromosoma. Se sometieron a electroporación las células A1 con el plásmido de interés más el plásmido pOG44 en condiciones compatibles con las descritas por el fabricante (es decir, cubeta de 0,4 mm, 280 voltios, 950 microFaradios) (BioRad, Hercules, California). Se seleccionaron las células transformadas que expresaban DHFR por su capacidad para crecer en medio alfa-negativo Minimal Essential Medium-Alpha sin nucleósidos (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con el 10% de suero bovino fetal dializado (Hyclone, Logan, UT). Aproximadamente dos semanas después, se aislaron las colonias y se expandieron en recipientes más grandes en el mismo medio de selección. Los cultivos celulares se cambiaron a medio libre de suero y se analizaron.

Ejemplo 13

Análisis de las líneas celulares transfectadas

Se examinaron las líneas celulares candidatas para determinar su capacidad para expresar neublastina. Se centrifugaron alícuotas de cultivos celulares en suspensión para separar las células del medio condicionado. Se eliminó el medio condicionado del sedimento celular y se procesaron tanto los medios como el sedimento celular para electroforesis reductora y desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 16% tal como se describe generalmente (Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente). Tras la finalización de la electroforesis, se sometieron a electroinmunotransferencia las proteínas sobre una membrana de PVDF y se examinaron con sonda con antisuero policlonal de conejo generado frente a neublastina. Se detectó el complejo anticuerpo-neublastina mediante el uso de un antisuero de cabra policlonal anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (BioRad, Hercules, California).

La proteína expresada a partir de plásmidos que codifican para los péptidos señal de neublastina, sintéticos, de albúmina y de hormona de crecimiento humana expresó cada uno neublastina inmunorreactiva en la fracción de sedimento celular. Sin embargo, solamente los péptidos señal de albúmina y de hormona de crecimiento humana expresaron niveles detectables de neublastina en medio condicionado. La movilidad electroforética de todos los polipéptidos de neublastina expresados fue compatible con una forma de neublastina de 11 kD, de 104 aminoácidos.

Ejemplo 14

Secuencia de neublastina producida en células CHO

5 Se purificó la neublastina a partir de medio condicionado utilizando una columna de inmutafinidad, generalmente tal como se describió (Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente). Se determinó la secuencia amino-terminal de la proteína purificada de líneas celulares que contenían los péptidos señal de albúmina y de hormona de crecimiento. Se aplicó la neublastina sobre un microfiltro TFA (Applied Biosystems, Foster City, CA) y se sometió a química de degradación de Edman automatizada. Se realizó la secuenciación del extremo amino-terminal en un secuenciador

10 ABI Procise 494. Se separaron los aminoácidos de PTH resultantes utilizando un sistema de microgradiente ABI 140C equipado con una columna PTH C18 de fase inversa y se analizaron utilizando un detector de absorbancia ABI 7785A. Para ambos constructos, la secuencia de proteína primaria empezaba con el primer residuo del fragmento C-terminal de 104 aminoácidos de neublastina de longitud completa (es decir, alanina). La preparación de neublastina expresada con el péptido señal de hormona de crecimiento también incluyó un fragmento C-terminal de neublastina de

15 103 aminoácidos que carecía del residuo de alanina amino-terminal. La forma de 103 aminoácidos de la neublastina empezaba con una alanina. En ambos casos, el péptido señal funcionó tal como se anticipó, es decir, se secretó el polipéptido de neublastina de la célula y se escindió el péptido señal por la célula.

Ejemplo 15

Espectrometría de masas de neublastina recombinante

Se analizó la neublastina purificada a partir del medio condicionado de las líneas celulares que contenían constructos que codificaban para los péptidos señal de albúmina y de hormona de crecimiento mediante espectrometría de masas intacta en un espectrómetro de masas ZMD (Waters, Milford, MA) tal como se describe generalmente por el fabricante. Para ambos constructos, el pico principal de las muestras deglicosiladas correspondía a un polipéptido de neublastina de 104 aminoácidos (figura 15). Estos dos péptidos señal funcionaron tal como se anticipó, es decir, se secretó el polipéptido de neublastina de la célula y se escindió el péptido señal por la célula. Adicionalmente, la

30 neublastina glicosilada secretada de células transfectadas con los constructos que codificaban para los péptidos señal de neublastina y de hormona de crecimiento contenía diversas glicoformas.

Ejemplo 16

35 *Detección de la actividad de neublastina en medios de células CHO transfectadas con constructos que codifican para neublastina y secuencias señal heterólogas*

Se evaluó la actividad biológica utilizando un ELISA de activación del receptor cinasa (KIRA). El método se ha descrito previamente (Sadick *et al.*, 1996, Anal. Biochem., 1996, 235(2):207. En resumen, se sembraron en placa células NB41A3-mRL3, una línea celular de neuroblastoma murino adherente que expresa Ret y GFR α 3, a 2×10^5 células por pocillo en placas de 24 pocillos en medio eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado con el 10% de suero bovino fetal, y se cultivaron durante 18 horas a 37°C y el 5% de CO₂.

45 Se lavaron las células con PBS y se trataron con diluciones en serie de neublastina en 0,25 ml de DMEM durante 10 minutos a 37°C y el 5% de CO₂. Se analizó cada muestra por duplicado. Se lavaron las células con 1 ml de PBS y se lisaron durante 1 hora a 4°C con 0,30 ml de Tris HCl 10 mM, pH 8,0, Nonidet P40 al 0,5%, desoxicolato de sodio al 0,2%, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM mientras que se agitaban suavemente las placas. Se agitaron adicionalmente los lisados mediante pipeteo repetido y se transfirieron 0,25 ml de la muestra a una

50 placa ELISA de 96 pocillos que se había revestido con 5 µg/ml de A α anti-Ret (AA.GE7.3) (Upstate Biotechnology, Waltham, MA) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6 a 4°C durante 18 horas y luego se bloqueó a temperatura ambiente durante una hora con tampón de bloqueo (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1% (TBST) que contenía el 1% de suero normal de ratón y el 3% de albúmina sérica bovina).

55 Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos 6 veces con TBST. Se lavó la placa de nuevo antes de la adición de diclorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. Tras la producción de color por la reacción, se leyeron los valores de absorbancia a 450 nm a partir de los pocillos tratados con lisado o solamente con tampón de lisis, y se representó gráficamente la señal corregida con el nivel de fondo como una función de la concentración de ligando utilizado para la estimulación.

60 Se sometió a prueba una serie de diluciones de medio condicionado, y se detectó neublastina funcional con un perfil similar a un lote previamente demostrado de neublastina expresada, purificada y replegada a partir de *E. coli* (figura 16).

65

ES 2 353 457 T3

Ejemplo 17

Neublastina madura expresada con un péptido señal heterólogo

- 5 Pueden producirse los oligonucleótidos apropiados según el método descrito en el ejemplo 9, para clonar una secuencia de ADN que codifica para una neublastina madura (es decir, un fragmento 113 C-terminal de neublastina de longitud completa). Puede fusionarse una secuencia de ADN que codifica para un péptido señal de albúmina de rata o de hormona de crecimiento humana a la secuencia de ADN que codifica para un polipéptido de neublastina madura, tal como se describió en el ejemplo 10. Puede transfectarse la secuencia de ADN en una célula eucariota, por ejemplo, una célula CHO, para producir una neublastina madura secretada.

Secuencias

15	SEQ ID NO	TIPO	DESCRIPCIÓN
	1	P	IgSP humano
	2	P	IgSP de mono
20	3	P	IgSP de tití
	4	P	IgSP de ratón
	5	P	IgSP de cerdo
25	6	P	IgSP de rata
	7	N	Secuencia de nucleótidos del constructo quimérico de IgSP de ratón - 113 NBN humana
30	8	N	Transcrito cortado y empalmado de SEQ ID No 7
	9	P	Proteína quimérica codificada por SEQ ID No 8 y 7)
	10	P	Pre-pro-neublastina humana
35	11	P	Pre-pro-neublastina de ratón
	12	P	Pre-pro-neublastina de rata
	13	P	Neublastina de 116 aminoácidos (aa) madura humana
40	14	P	Neublastina de 113 aa madura humana
	15	P	Neublastina de 119 aa madura de ratón
	16	P	Neublastina de 116 aa madura de ratón
45	17	P	Neublastina de 116 aa madura de rata
	18	P	Neublastina de 113 aa madura de rata
	19	P	Neublastina de 104 aa N-truncada humana
50	20	P	Neublastina de 99 aa N-truncada humana
	21	P	Neublastina de 140 aa N-truncada humana
	22	P	Neublastina de 106 aa N-truncada humana
55	23	P	Neublastina de 102 aa N-truncada humana
	24	P	NBN-SP humano
	25	P	DeltaproNBN140
60	26	P	DeltaproNBN113
	27	P	DeltaproNBN106
	28	P	DeltaproNBN104
65	29	P	DeltaproNBN102

ES 2 353 457 T3

	30	P	DeltaproNBN99
	31	P	Proteína quimérica IgSP de ratón-140NBN humana
5	32	P	Proteína quimérica IgSP de ratón-113NBN humana
	33	P	Proteína quimérica IgSP de ratón-106NBN humana
	34	P	Proteína quimérica IgSP de ratón-104NBN humana
10	35	P	Proteína quimérica IgSP de ratón-102NBN humana
	36	P	Proteína quimérica IgSP de ratón-99NBN humana
	37	P	Péptido señal de albúmina de rata
15	38	P	Proteína quimérica AlbSP de rata-140NBN humana
	39	P	Proteína quimérica AlbSP de rata-113NBN humana
	40	P	Proteína quimérica AlbSP de rata-106NBN humana
20	41	P	Proteína quimérica AlbSP de rata-104NBN humana
	42	P	Proteína quimérica AlbSP de rata-102NBN humana
	43	P	Proteína quimérica AlbSP de rata-99NBN humana
25	44	P	Péptido señal de albúmina de rata modificado
	45	P	Proteína quimérica ModAlbSP-140NBN humana
	46	P	Proteína quimérica ModAlbSP-113NBN humana
30	47	P	Proteína quimérica ModAlbSP-106NBN humana
	48	P	Proteína quimérica ModAlbSP-104NBN humana
	49	P	Proteína quimérica ModAlbSP-102NBN humana
35	50	P	Proteína quimérica ModAlbSP-99NBN humana
	51	P	Péptido señal de hormona de crecimiento humana
	52	P	Proteína quimérica GHSP-140NBN humana
40	53	P	Proteína quimérica GHSP-113NBN humana
	54	P	Proteína quimérica GHSP-106NBN humana
	55	P	Proteína quimérica GHSP-104NBN humana
45	56	P	Proteína quimérica GHSP-102NBN humana
	57	P	Proteína quimérica GHSP-99NBN humana
	58	N	Secuencia de nucleótidos de 104NBN humana
50	59	N	Secuencia de nucleótidos de 104NBN sintética
	60	N	Secuencia de neublastina dentro del plásmido pNBN026-35
55	61	N	Secuencia de nucleótidos quimérica de SP sintético-104NBN sintética
	62	P	Proteína quimérica de SP sintético-104NBN sintética
60	63	N	Secuencia de nucleótidos quimérica de NBNSP-104NBN sintética
65	64	P	Proteína quimérica NBNSP-104NBN sintética
	65	N	Secuencia de nucleótidos quimérica de AlbSP-104NBN sintética

ES 2 353 457 T3

	66	P	Proteína quimérica AlbSP-104NBN sintética
	67	N	Secuencia de nucleótidos quimérica de GHSP con
5			intrón-104NBN sintética
	68	P	Proteína quimérica GHSP-104NBN sintética
	69	N	Secuencia de nucleótidos quimérica de ModAlbSP-
10			104NBN sintética
	70	P	Proteína quimérica ModAlbSP-104NBN sintética
	71	N	Cebador KD3-464
15	72	N	Cebador KD3-465
	73	N	Cebador KD3-466
	74	N	Cebador KD3-467
20	75	N	Cebador KD3-468
	76	N	Cebador KD3-469
	77	N	Cebador KD3-471
25	78	N	Cebador KD3-472
	79	N	Cebador KD3-477
	80	N	Cebador KD3-479
30	81	N	Cebador KD3-480
	82	N	Secuencia de nucleótidos de deltapronBN113

Realizaciones

1. Método para producir un polipéptido de neublastina biológicamente activo, que comprende cultivar una célula que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal y un polipéptido de neublastina, en el que dicha secuencia de nucleótidos no codifica para una pro-región de neublastina.
2. Método según la realización 1, en el que el péptido señal es un péptido señal heterólogo.
3. Método según la realización 1, en el que el péptido señal es un péptido señal de mamífero.
4. Método según la realización 3, en el que el péptido señal es un péptido señal humano, un péptido señal de rata, un péptido señal de ratón, un péptido señal porcino, un péptido señal de simio, un péptido señal canino, un péptido señal felino, un péptido señal bovino o un péptido señal equino.
5. Método según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el péptido señal se selecciona del grupo que consiste en un péptido señal de factor de crecimiento, un péptido señal de hormona, un péptido señal de citocina y un péptido señal de inmunoglobulina.
6. Método según la realización 5, en el que el péptido señal se selecciona del grupo de consiste en péptidos señal de TGF β , péptidos señal de GDF, péptidos señal de IGF, péptidos señal de BMP, péptidos señal de neurotrofina, péptido señal de PDGF y péptido señal de EGF.
7. Método según la realización 5, en el que el péptido señal se selecciona de un péptido señal de hormona, seleccionándose dicha hormona del grupo que consiste en hormona de crecimiento, insulina, ADH, LH, FSH, ACTH, MSH, TSH, T3, T4 y DHEA.
8. Método según la realización 5, en el que el péptido señal es un péptido señal de interleucina.
9. Método según la realización 5, en el que el péptido señal se selecciona del grupo de consiste en péptido señal de neurturina, péptido señal de GDNF, péptido señal de persefina y péptido señal de NGF.

ES 2 353 457 T3

10. Método según la realización 1, en el que el péptido señal se selecciona del grupo de consiste en péptido señal de albúmina, péptido señal de albúmina modificado y péptido señal de hormona de crecimiento.
- 5 11. Método según la realización 10, en el que el péptido señal se selecciona del grupo de consiste en péptido señal de albúmina de rata, péptido señal de albúmina de rata modificado y péptido señal de hormona de crecimiento humana, tal como péptido señal de albúmina de rata y péptido señal de hormona de crecimiento humana.
- 10 12. Método según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el péptido señal es un péptido señal sintético, tal como un péptido señal que comprende la SEQ ID NO: 70.
13. Método según la realización 1, en el que el péptido señal es un péptido señal de inmunoglobulina.
- 15 14. Método según la realización 13, en el que el péptido señal se selecciona del grupo que consiste en IgSP de ratón (SEQ ID NO 4), IgSP de rata (SEQ ID NO 6), IgSP porcino (SEQ ID NO 5), IgSP de simio (SEQ ID NO 2 ó 3) e IgSP humano (SEQ ID NO 1).
15. Método según la realización 13, en el que el IgSP es IgSP de ratón (SEQ ID NO 4).
- 20 16. Método según la realización 13, en el que el IgSP es IgSP humano (SEQ ID NO 1).
17. Método según la realización 1, en el que el péptido señal es un péptido señal de neublastina nativa.
- 25 18. Método según la realización 17, en el que el péptido señal es un péptido señal de neublastina nativa humana.
- 30 19. Método según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el polipéptido de neublastina se selecciona del grupo que consiste en NBN madura seleccionada de neublastina que tiene una secuencia identificada por los aminoácidos 1-140 de SEQ ID No 10, o los aminoácidos 1-144 de SEQ ID No 11 ó 12, SEQ ID No 13, 14, 15, 16, 17 ó 18, NBN troncada en el extremo N-terminal, NBN mutada, o NBN mutada y N-troncada.
- 35 20. Método según la realización 19, en el que el polipéptido de neublastina es una NBN madura seleccionada del grupo que consiste en neublastina que tiene una secuencia identificada por SEQ ID No 13, 14, 15, 16, 17 ó 18.
- 40 21. Método según la realización 20, en el que el polipéptido de neublastina es 113NBN madura humana (SEQ ID No 14).
- 45 22. Método según cualquiera de las realizaciones anteriores 1-19, en el que el polipéptido de neublastina se selecciona del grupo que consiste en los 116 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 115 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 114 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 113 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 112 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 111 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 110 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 109 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 108 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 107 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 106 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 105 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 104 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 103 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 102 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 101 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 100 aminoácidos C-terminales de neublastina humana y los 99 aminoácidos C-terminales de neublastina humana.
- 50 23. Método según la realización 1, en el que el polipéptido de neublastina se selecciona del grupo que consiste en neublastina troncada en el extremo N-terminal con los 106, 104, 102 ó 99 aminoácidos C-terminales de SEQ ID NO 10.
- 55 24. Método según la realización 1, en el que el polipéptido de neublastina se selecciona del grupo que consiste en los 116 aminoácidos C-terminales de neublastina humana, los 113 aminoácidos C-terminales de neublastina humana y los 104 aminoácidos C-terminales de neublastina humana y los 116 aminoácidos C-terminales de neublastina humana.
- 60 25. Método según la realización 1, en el que la neublastina troncada en el extremo N-terminal tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 19.
- 65 26. Método según la realización 1, en el que la neublastina troncada en el extremo N-terminal contiene los 99 aminoácidos de SEQ ID NO 20.

ES 2 353 457 T3

27. Método según la realización 1, en el que el polipéptido de neublastina comprende una secuencia de aminoácidos derivada de los aminoácidos 8-113 de SEQ ID No. 14, en el que el polipéptido variante de neublastina incluye una o más de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: un aminoácido distinto de arginina en la posición 14 en la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido variante, un aminoácido distinto de arginina en la posición 39 en la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido variante, un aminoácido distinto de arginina en la posición 68 de dicho polipéptido variante y un aminoácido distinto de asparagina en la posición 95 de dicho polipéptido variante, en el que las posiciones de dichos aminoácidos están numeradas según la secuencia polipeptídica de SEQ ID No. 14.
28. Método según la realización 27, en el que dicha sustitución en la posición 14, 39 ó 68 es lisina.
29. Método según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el vector es un plásmido.
30. Método según cualquiera de las realizaciones anteriores 1-28, en el que el vector es un vector viral.
31. Método según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el vector es un vector de expresión en mamíferos.
32. Método según la realización 30, en el que el vector es una partícula de lentivirus de replicación defectuosa.
33. Método según la realización 32, en el que dicha partícula de vector se produce a partir de un vector lentiviral que comprende una LTR lentiviral en 5', un sitio de unión a ARNt, una señal de empaquetamiento, un promotor operativamente unido a una señal polinucleotídica que codifica para dicho péptido señal y dicho péptido de neublastina, un origen de síntesis de la segunda hebra de ADN y una LTR lentiviral en 3'.
34. Método según la realización 30, en el que el vector se selecciona del grupo que consiste en retrovirus, tales como VIH, VIS, VIF, VAIE, VAA, adenovirus, herpesvirus y VLMMo.
35. Método según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el promotor se selecciona del grupo que consiste en: promotor de ubiquitina, promotor de CMV, promotor de JeT, promotor de SV40, promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1-alfa), beta actina de pollo, PGK y MT-1.
36. Método según la realización 34, en el que el promotor es un promotor inducible/represible, tal como: Tet-On, Tet-Off, promotor inducible por rapamicina, Mx1 y RU486.
37. Método según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la célula es una célula huésped de mamífero.
38. Método según la realización 37, en el que dicho mamífero se selecciona del grupo que consiste en roedor, conejo, perro, gato, cerdo, mono, ser humano.
39. Método según la realización 37, seleccionándose dicha célula del grupo que consiste en CHO, HEK293, COS, PC12, HiB5, RN33b, células neuronales, células fetales, ARPE-19, células de fibroblastos inmortalizados, C2C12, HeLa, HepG2, células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), células estriatales, neuronas, astrocitos e interneuronas.
40. Método según la realización 30, en el que la célula es una célula CHO.
41. Ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica para un péptido señal y un polipéptido de neublastina, en el que dicha secuencia polinucleotídica no codifica para una pro-región de neublastina, siendo dicho péptido señal y dicho polipéptido de neublastina tal como se definieron en cualquiera de las realizaciones 1-40.
42. Ácido nucleico según la realización 41, que comprende a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 64, 66 ó 68, o b) una secuencia de nucleótidos que codifica para los polipéptidos de SEQ ID NO: 65, 67 ó 69.
43. Ácido nucleico según la realización 41 ó 42, en el que la secuencia de nucleótidos se ha optimizado para su expresión en un huésped mamífero.
44. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las realizaciones 41-43.
45. Composición farmacéutica que comprende el vector según la realización 44 y uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
46. Célula huésped aislada transducida o transfectada con el vector según la realización 44.

ES 2 353 457 T3

47. Célula según la realización 46, siendo la célula una célula de mamífero.
48. Célula de mamífero según la realización 47, en la que la célula es capaz de secretar neublastina o un equivalente funcional de la misma en cantidades en exceso de 500 ng/10⁶ células/24 horas.
- 5 49. Célula de mamífero según la realización 47, seleccionándose del grupo que consiste en CHO, HEK293 COS, PC12, HiB5, RN33b, células de fibroblastos inmortalizados, C2C12, HeLa, HepG2, líneas celulares de RPE y células ARPE-19.
- 10 50. Célula de mamífero según la realización 48, seleccionándose del grupo que consiste en CHO, HEK293, COS y ARPE-19.
51. Célula de mamífero según la realización 47, seleccionándose del grupo que consiste en células de RPE, células neuronales, células precursoras neuronales, células madre y células fetales.
- 15 52. Célula de mamífero según la realización 47, estando unida a una matriz de soporte.
53. Línea celular de empaquetamiento capaz de producir una partícula de vector infecciosa, comprendiendo dicha partícula de vector un genoma derivado de retrovirus que comprende una LTR retroviral en 5', un sitio de unión a ARNt, una señal de empaquetamiento, un promotor operativamente unido a una secuencia polinucleotídica que codifica para un péptido señal y un polipéptido de neublastina, en la que dicha secuencia de nucleótidos no codifica para una pro-región de neublastina y siendo dicho péptido señal y péptido de neublastina según cualquiera de las realizaciones 1-40, y un origen de síntesis de la segunda hebra de ADN y una LTR retroviral en 3'.
- 20 54. Línea celular de empaquetamiento según la realización 53, en la que la partícula de vector es de replicación defectuosa.
55. Línea celular de empaquetamiento según la realización 53, en la que el genoma se deriva de lentivirus y las LTR son lentivirales.
- 30 56. Mamífero transgénico no humano que comprende al menos una célula que se transduce o transfecta con el vector según la realización 44.
- 35 57. Mamífero según la realización 56, en el que la al menos una célula traducida o transfectada comprende el genoma del mamífero.
58. Dispositivo implantable de cultivo celular, comprendiendo el dispositivo:
 - 40 i. una membrana semipermeable que permite la difusión de un factor de crecimiento a su través; y
 - ii. al menos una célula huésped aislada según la realización 46.
59. Dispositivo según la realización 56, en el que la membrana semipermeable es inmunoaislante.
- 45 60. Dispositivo según la realización 56, en el que la membrana semipermeable es microporosa.
61. Dispositivo según la realización 56, comprendiendo el dispositivo adicionalmente una matriz dispuesta dentro de la membrana semipermeable.
- 50 62. Dispositivo según la realización 56, comprendiendo el dispositivo adicionalmente un punto de anclaje.
63. Uso del vector según la realización 44 o el dispositivo según cualquiera de las realizaciones 56 a 60 como medicamento.
- 55 64. Uso del vector según la realización 44, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso.
65. Uso según la realización 64, en el que el trastorno del sistema nervioso se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica incluyendo dolor neuropático, lesión de la médula espinal, avulsión de la raíz espinal, tic doloroso y causalgia.
- 60 66. Uso según la realización 63, en el que el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad ocular, tal como heridas y úlceras corneales, y retinopatías.
- 65 67. Uso del vector según la realización 44, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno del SNC.

ES 2 353 457 T3

68. Uso según la realización 67, en el que el trastorno del SNC es una enfermedad neurodegenerativa.
69. Uso según la realización 64, en el que la enfermedad neurodegenerativa es neuropatía periférica incluyendo dolor neuropático.
- 5 70. Método de tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso, comprendiendo dicho método administrar a un individuo que necesita del mismo:
- 10 i. una cantidad terapéuticamente eficaz del vector según la realización 44; o
- ii. una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica según la realización 45.
71. Método según la realización 70, en el que el vector se administra por vía intramuscular, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal.
- 15 72. Método según la realización 70, en el que el vector o la composición se administra a una zona del cuerpo implicada en la transmisión de la sensación de dolor.
73. Método según la realización 70, en el que el vector o la composición se administra por vía intratecal o a la médula espinal.
- 20 74. Método según la realización 70, en el que el vector se administra al cerebro, incluyendo el parénquima, y los ventrículos.
75. Método según la realización 70, en el que el vector se administra en el ojo, incluyendo el humor vítreo, el espacio subretiniano y la cápsula sub-tenar.
- 25 76. Método según la realización 70, en el que la enfermedad del sistema nervioso se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica incluyendo dolor neuropático, lesión de médula espinal, avulsión de la raíz espinal, tic doloroso, causalgia, heridas corneales y retinopatías.
- 30 77. Método de tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso, comprendiendo dicho método trasplantar a un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de las células de la realización 46.
- 35 78. Método según la realización 77, en el que el trasplante comprende un trasplante autólogo, un trasplante alogénico o un trasplante xenogénico.
79. Método según la realización 77, en el que dichas células se administran por vía intratecal o a la médula espinal.
- 40 80. Método según la realización 77, en el que las células se administran al cerebro, incluyendo el parénquima y los ventrículos.
81. Método según la realización 77, en el que las células se administran en el ojo, incluyendo el humor vítreo, el espacio subretiniano y la cápsula sub-tenar.
- 45 82. Método según la realización 77, en el que la enfermedad del sistema nervioso se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica incluyendo dolor neuropático, lesión de la médula espinal, avulsión de la raíz espinal, tic doloroso, causalgia, heridas corneales y retinopatías.
- 50 83. Método de tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso, comprendiendo dicho método transplantar a un individuo que lo necesita un dispositivo implantable según la realización 56.
- 55 84. Método según la realización 77, en el que el trasplante comprende un trasplante autólogo, un trasplante alogénico o un trasplante xenogénico.
85. Método según la realización 83, en el que dicho dispositivo se implanta por vía intratecal o a la medula espinal.
- 60 86. Método según la realización 83, en el que el dispositivo se implanta/administra al cerebro, incluyendo el parénquima, y los ventrículos.
87. Método según la realización 83, en el que el dispositivo se implanta/administra en el ojo, incluyendo el humor vítreo, el espacio subretiniano y la cápsula sub-tenar.
- 65

ES 2 353 457 T3

88. Método según la realización 83, en el que la enfermedad del sistema nervioso se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica incluyendo dolor neuropático, lesión de la médula espinal, avulsión de la raíz espinal, tic doloroso, causalgia, heridas corneales y retinopatías.
- 5 89. Método según cualquiera de las realizaciones 72-80, para el tratamiento de dolor neuropático que comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector según la realización 44, o una composición de células según cualquiera de las realizaciones 46-50, o un dispositivo celular según 56.
- 10 90. Polipéptido de neublastina que comprende un péptido señal y un polipéptido de neublastina, en el que el polipéptido carece de la pro-región de neublastina.
91. Polipéptido según la realización 90, en el que el polipéptido de neublastina se fusiona al péptido señal.
- 15 92. Polipéptido según la realización 91, en el que el péptido señal se une a través de su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido de neublastina a través de un enlace peptídico.
93. Polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 90-92, en el que el péptido señal es un péptido señal heterólogo.
- 20 94. Polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 90-93, en el que el péptido señal es según cualquiera de las realizaciones 1-40.
95. Polipéptido según la realización 94, en el que el péptido señal se selecciona del grupo de péptidos señal seleccionados de péptido señal de albúmina de rata nativo, péptido señal de albúmina de rata modificado y péptido señal de hormona de crecimiento humana.
- 25 96. Polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 90-94, en el que el péptido señal es un péptido señal de neublastina.
- 30 97. Polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 90-94, en el que el péptido señal es un IgSP.

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica para un polipéptido que comprende un polipéptido de neublastina y un péptido señal seleccionado del grupo que consiste en un péptido señal de albúmina y un péptido señal de hormona de crecimiento, en el que el polipéptido carece de la pro-región de neublastina y el polipéptido de neublastina es distinto de NBN104 (SEQ ID NO. 19).
2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el péptido señal es péptido señal de albúmina de rata.
3. Ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el péptido señal es péptido señal de hormona de crecimiento humana.
4. Ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido de neublastina es al menos el 85% idéntico a la SEQ ID NO: 20, preferiblemente al menos el 90% idéntico a la SEQ ID NO: 20, más preferiblemente al menos el 95% idéntico a la SEQ ID NO: 20.
5. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Célula aislada que comprende el ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el vector según la reivindicación 5.
7. Célula según la reivindicación 6, siendo la célula una célula de mamífero, seleccionada del grupo que consiste en células de ovario de hámster chino (CHO), células HEK293, células COS, células PC12, células HiB5, células RN33b, células de fibroblastos inmortalizados, células C2C12, células HeLa, células HepG2, líneas celulares de RPE, células ARPE-19, células RPE, células neuronales, células precursoras neuronales, células madre y células fetales.
8. Dispositivo implantable de cultivo celular, comprendiendo el dispositivo:
- una membrana semipermeable que permite la difusión de un factor de crecimiento a su través; y
 - al menos una célula huésped aislada según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7.
9. Dispositivo según la reivindicación 8, en el que la membrana semipermeable es inmunoaislante.
10. Dispositivo según la reivindicación 8, en el que el dispositivo comprende además una matriz dispuesta dentro de la membrana semipermeable.
11. Dispositivo según la reivindicación 8, en el que el dispositivo comprende además un punto de anclaje.
12. Método de expresión de un polipéptido de neublastina, comprendiendo el método cultivar la célula según la reivindicación 6 ó 7 en un medio de cultivo celular en condiciones para que el polipéptido de neublastina se exprese y secrete en el medio de cultivo celular.
13. Método según la reivindicación 12, que comprende además recuperar dicho polipéptido de neublastina de dicho medio de cultivo celular.
14. Ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o vector según la reivindicación 5, o célula según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, o dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para uso como medicamento.
15. a) Ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o
- b) vector según la reivindicación 5, o
- c) célula según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, o
- d) dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11,
- para uso en un método de tratamiento de un trastorno del sistema nervioso.
16. Ácido nucleico, vector, célula o dispositivo según la reivindicación 15, en el que el trastorno del sistema nervioso se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica incluyendo dolor neuropático, lesión de la médula espinal, avulsión de la raíz espinal, tic doloroso y causalgia.

ES 2 353 457 T3

17. a) Ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o

b) vector según la reivindicación 5, o

5 c) célula según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, o

d) dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11,

10 para uso en un método de tratamiento de una enfermedad ocular seleccionada del grupo que consiste en heridas y úlceras corneales y retinopatías.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

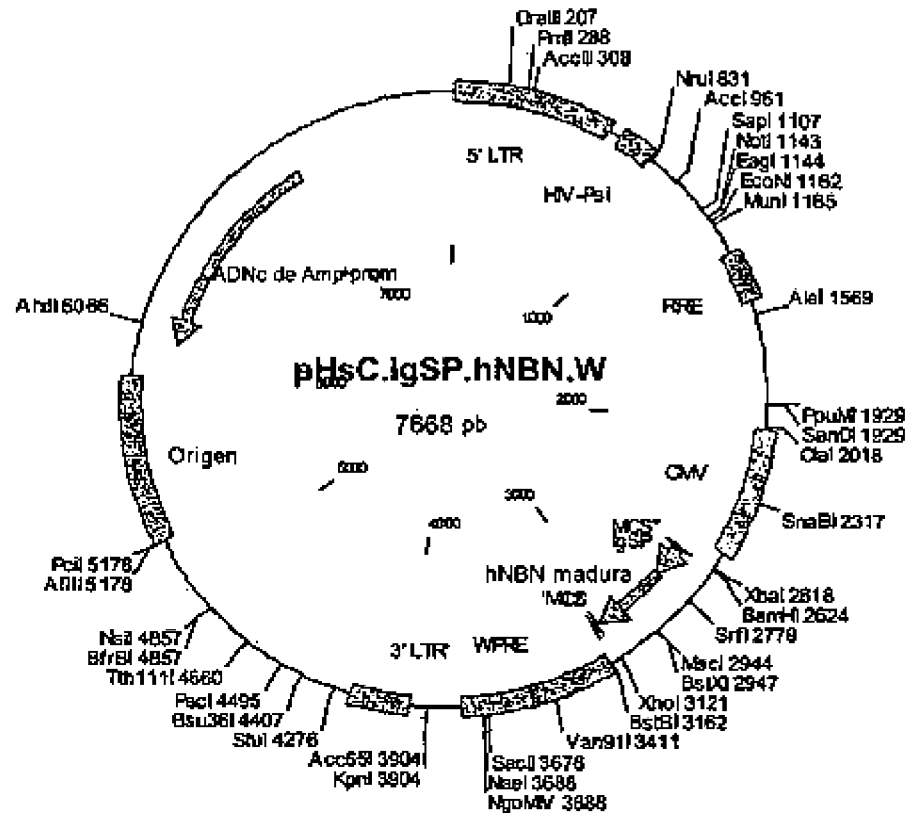
60

65

Fig. 1

IgSP humano	1	mdctgrlrfvvaagtha	SEQ ID NO 1
Mono Rhesus	1	khlfllvvaaprwl	SEQ ID NO 2
IgSP de titi	1	dwtrrflvataahs	SEQ ID NO 3
IgSP de ratón	1	pkcsivffmavvsvns	SEQ ID NO 4
IgSP de cerdo	1	efrlnwvffallqvvg	SEQ ID NO 5
IgSP de rata	1	pkcsivffmaltvns	SEQ ID NO 6

Fig. 2



BamHI
->-----
XbaI
+-----+

```

2601  ccataagaaga caccgactct agaggatccg ccaccatgaa atgcagctgg
      ggtatcttct gtggttgaga tctcttaggc ggtggtactt tacgtcgacc
      MCS'' >>.....>>
              s      r
                                >>.....IgSP.....>
                                m   k   c   s   w

2651  gttatcttct tcttgatggc agtggttaca ggtaaggggc tcccaagtcc
      caatagaaga aggactaccg tcaccaatgt ccattccccg agggttcagg
      >.....IgSP.....>
      v i f f l m a v v t      intrón

2701  caaacttgag ggtccataaa ctctgtgaca gtggcaatca ctttgccttt
      gtttgaactc ccaggtatct gagacactgt caccgttagt gaaacggaaa
      >.....IgSP.....>
              intrón
  
```

SrfI

-----+---

2751 ctttctacag ggggtgaattc ggctgggggc cggggcagcc gcgctcgggc
 gaaagatgtc cccacttaag cggaccccg ggcccgtcgg cgcgagcccg
 >.....IgSP.....>>
 intrón g v n s
 >>..... hNBN madura>
 a g g p g s r a r

2801 agcggggggcg cggggctgcc gcctgcgctc gcagctggty cgggtgcgcg
 tcgcccccg cccccgacgg cggacgcgag cgtcgaccac ggccacgcgc
 >..... hNBN madura>
 a a g a r g c r l r s q l v p v r

2851 cgctcggcct gggccaccgc tccgacgagc tgggtgcgttt ccgcttctgc
 gcgagccgga cccggtggcg aggtctgctg accacgcaa ggcgaagacg
 >..... hNBN madura>
 a l g l g h r s d e l v r f r f c

MscI

----+---

2901 agcggctect gcgcgcgcgc gcgctctcca cagcacctca gcctggccag
 tcgcccagga cggcggcgcg cgcgagaggt gtgctggagt cggaccggtc
 >..... hNBN madura>
 s g s c r r a r s p h d l s l a

BstXI

-----+---

2951 cctaactgggc gccggggccc tgcgaccgac cccgggctcc cggcccgtca
 ggatgaccgc cggccccggg acgctggcgg gggcccaggg gccgggcagt
 >..... hNBN madura>
 s l l g a g a l r p p p g s r p v

3001 gccagccctg ctgccgaccc acgcgctacg aagcggctct cttcatggac
 cggtcggggac gacggctggg tgcgcgatgc ttccgagag gaagtacctg
 >..... hNBN madura>
 s q p c c r p t r y e a v s f m d

3051 gtcaacagca cctggagaac cgtggaccgc ctctccgcca ccgcctgcgg
 cagttgtcgt ggacctcttg gcacctggcg gagaggcggg ggcggacgcc
 >..... hNBN madura>
 v n s t w r t v d r l s a t a c

XhoI

-+-----

3101 ctgcctgggc tgagggtctg ctcgagcgcc ctatagttag tcgtattatt
 gacggaccgc actcccgagc gagctcgcg gatattcactc agcataataa
 >.....>> hNBN madura
 g c l g -

'MCS >>>

e

<<.....T7.....<<
 - l s d y -

Fig. 3

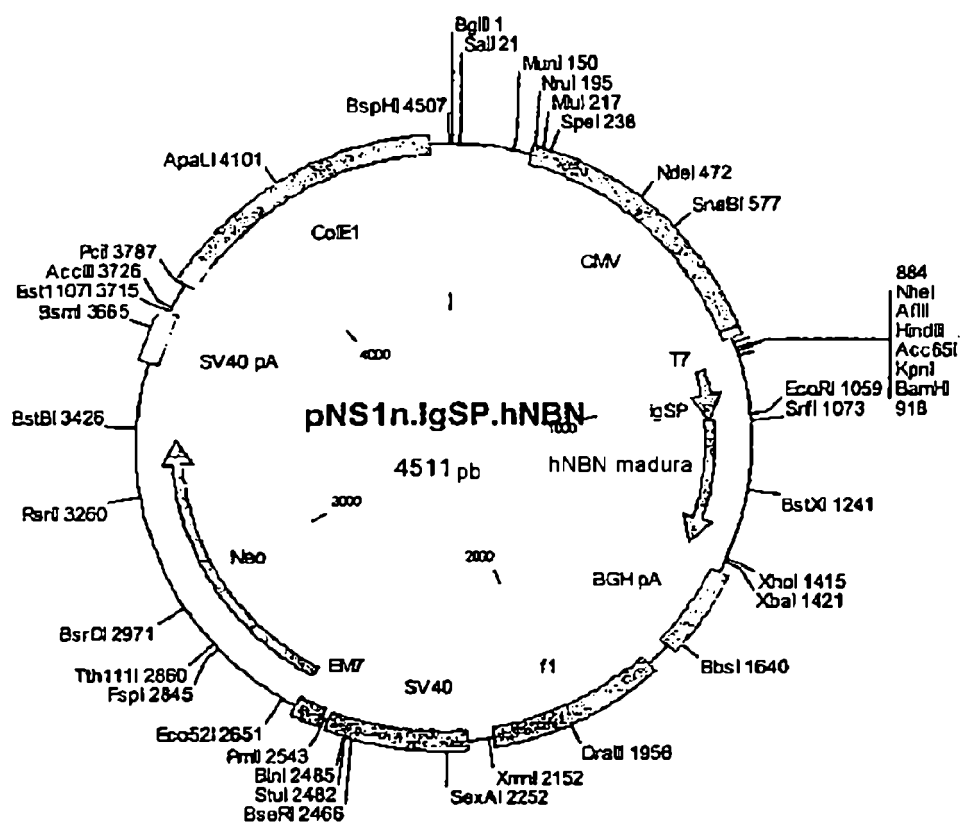


Fig. 4

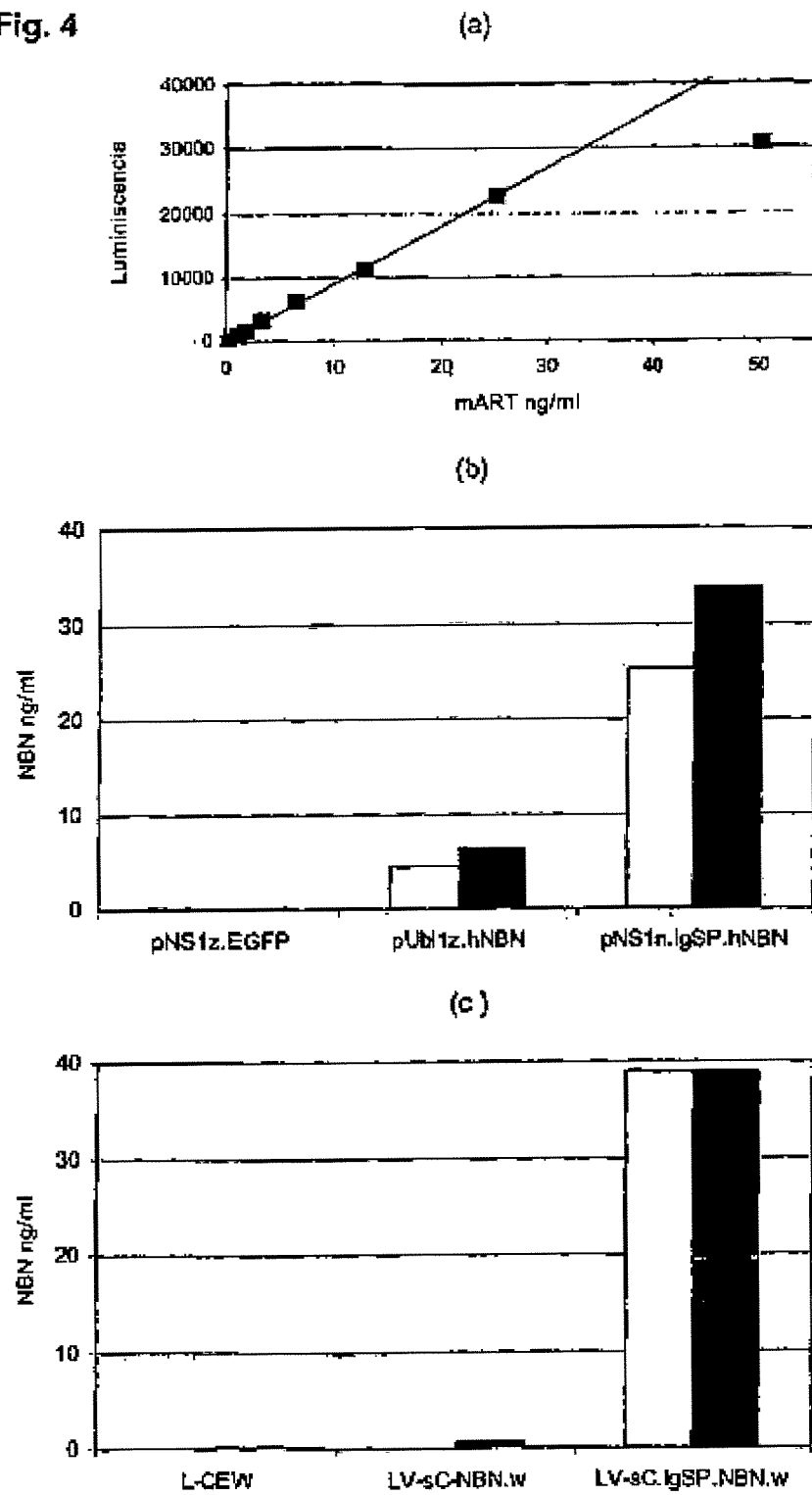


Fig. 5

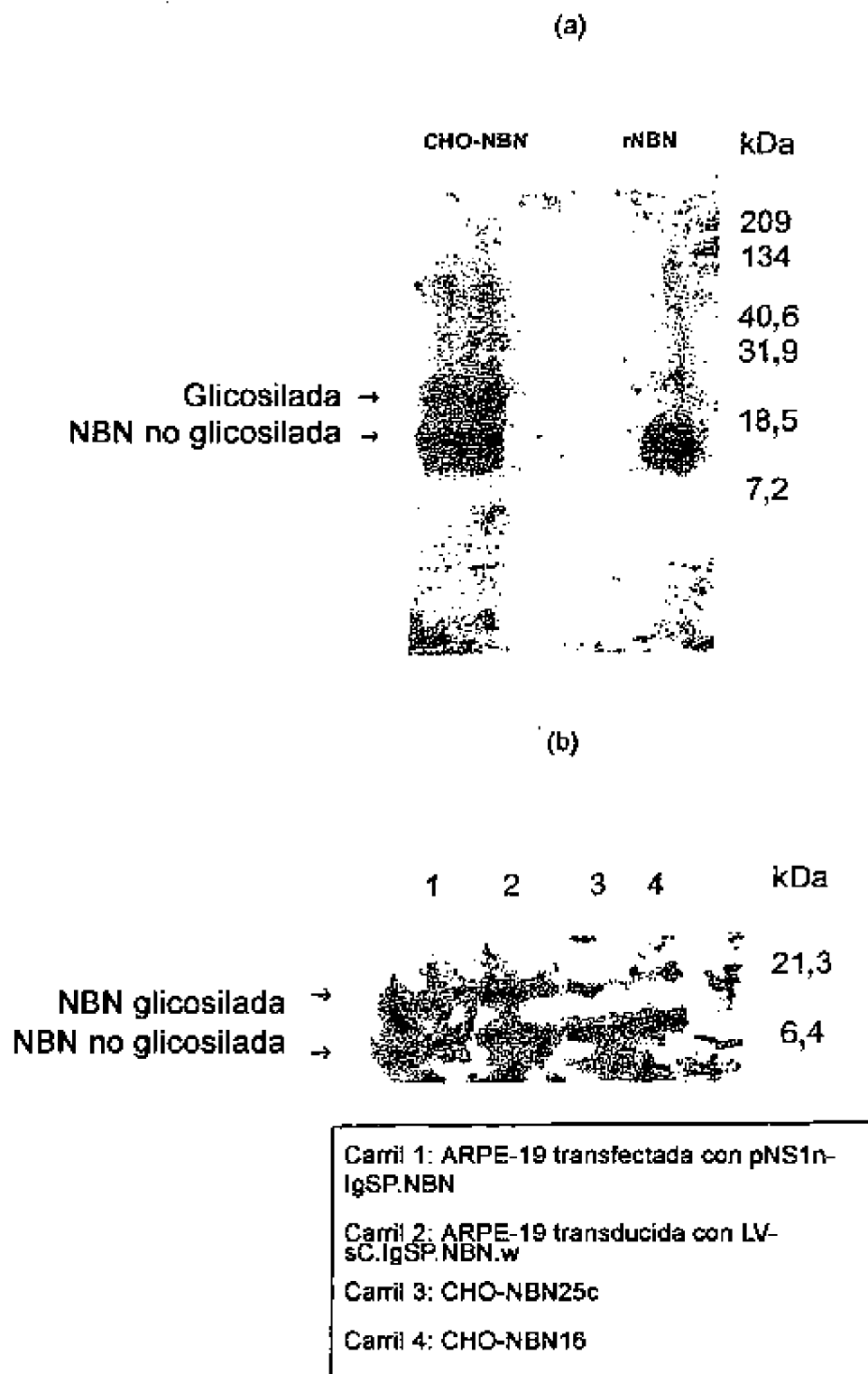


Fig. 6A

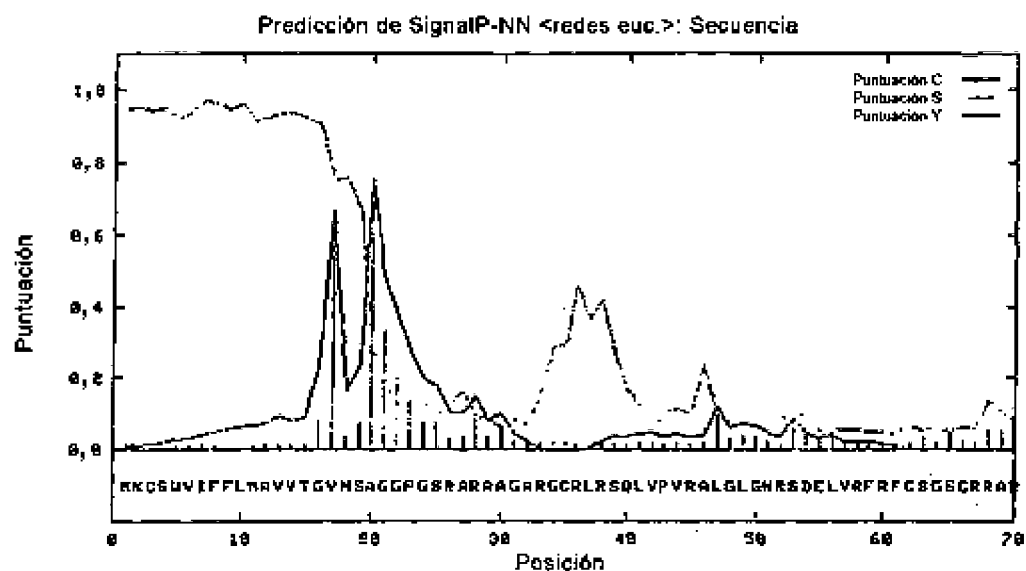


Fig. 6B

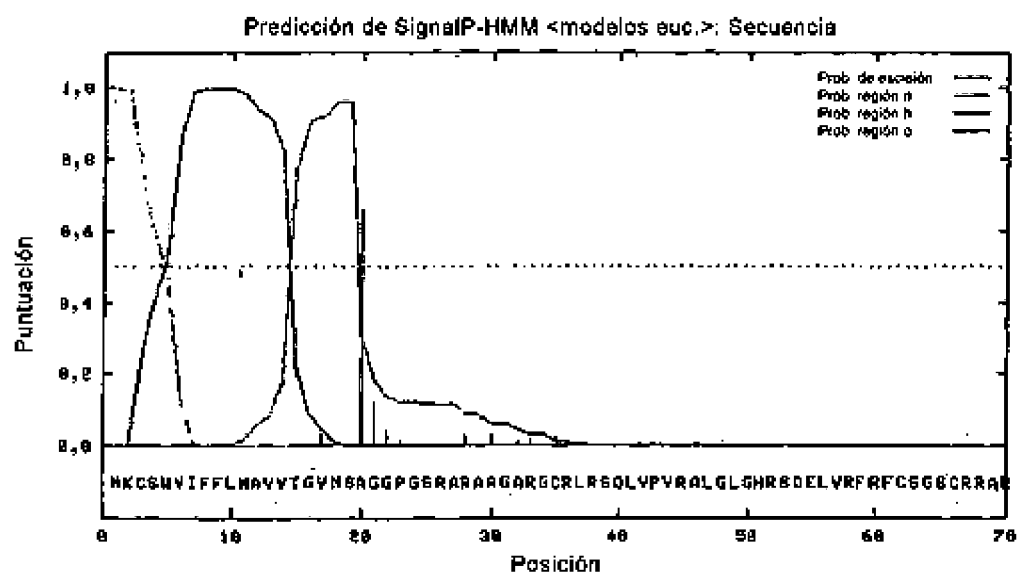


Fig. 7A

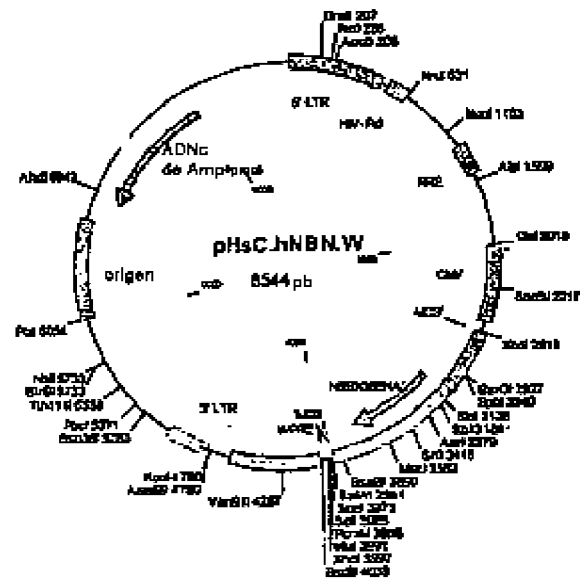


Fig. 7B

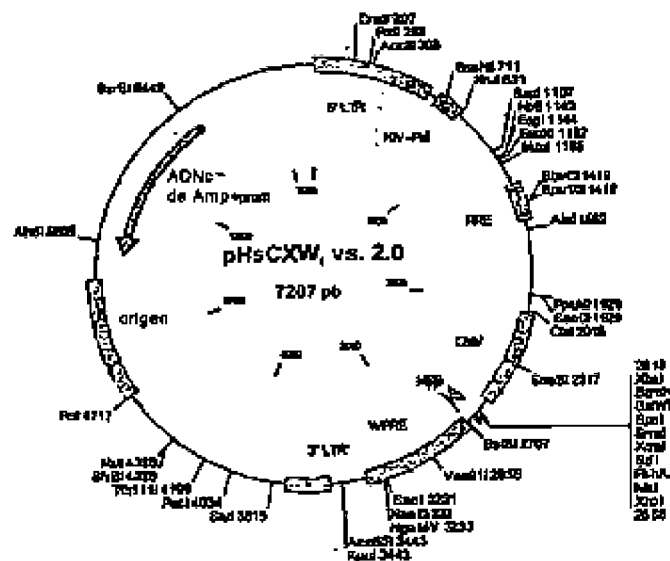


Fig 8A

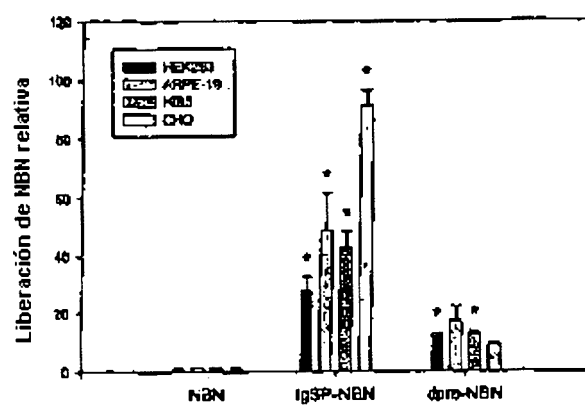


Fig. 8B

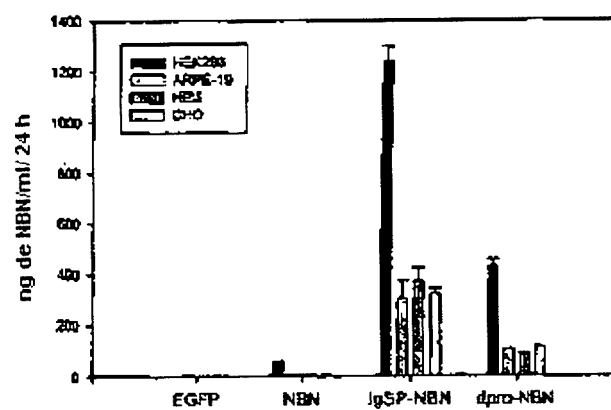


Fig. 8C

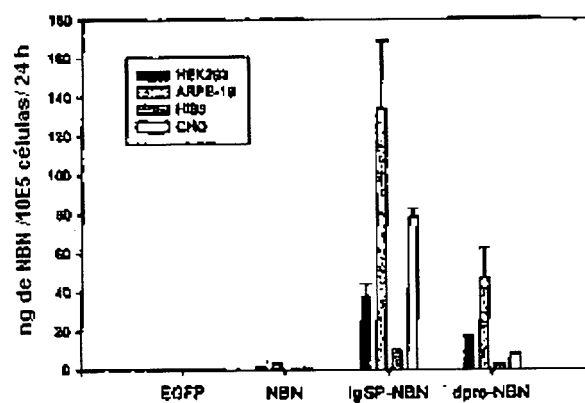


Fig. 9

Péptido	Ala	Ala	Gly	Ala	Arg	Gly	Cys	Arg	Leu	Arg	Ser	Gln	Leu	Val
Nativo	GCA	GCG	GGG	GCG	CGG	GGC	TGC	CGC	CTG	CGC	TCC	CAG	CTG	GTG
Sintético	GCC	GCC	GGC	GCT	CGA	GGC	TGC	CGG	CTG	CGG	TCC	CAG	CTG	GTG
Cambiado	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Péptido	Pro	Val	Arg	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	His	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu
Nativo	CCG	GTG	CGC	GCG	CTC	GGC	CTG	GGC	CAC	CGC	TCC	GAC	GAG	CTG
Sintético	CCT	GTG	CGG	GCC	CTG	GGC	CTG	GGC	CAC	CGG	TCC	GAC	GAG	CTG
Cambiado	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Péptido	Val	Arg	Phe	Arg	Phe	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Arg	Arg	Ala	Arg
Nativo	GTG	CGT	TTC	CGC	TTC	TGC	AGC	GGC	TCC	TGC	CGC	CGC	GCG	CGC
Sintético	GTG	CGG	TTC	CGG	TTC	TGC	TCC	GGC	TCC	TGC	CGG	CGG	GCC	CGG
Cambiado	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Péptido	Ser	Pro	His	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly
Nativo	TCT	CCA	CAC	GAC	CTC	AGC	CTG	GCC	AGC	CTA	CTG	GGC	GCC	GGG
Sintético	TCC	CCT	CAC	GAC	CTG	TCC	CTG	GCC	TCC	CTG	CTG	GGC	GCC	GGC
Cambiado	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Péptido	Ala	Leu	Arg	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Val	Ser	Gln	Pro
Nativo	GCC	CTG	CGA	CCG	CCC	CCG	GGC	TCC	CGG	CCC	GTC	AGC	CAG	CCC
Sintético	GCC	CTG	CGG	CCT	CCT	CCT	GGC	TCC	CGG	CCT	GTG	TCC	CAG	CCT
Cambiado	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Péptido	Cys	Cys	Arg	Pro	Thr	Arg	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser	Phe	Met	Asp
Nativo	TGC	TGC	CGA	CCC	ACG	CGC	TAC	GAA	GCG	GTC	TCC	TTC	ATG	GAC
Sintético	TGC	TGC	CGG	CCT	ACC	CGG	TAC	GAG	GCC	GTC	TCC	TTC	ATG	GAC
Cambiado	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Péptido	Val	Asn	Ser	Thr	Trp	Arg	Thr	Val	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Thr
Nativo	GTC	AAC	AGC	ACC	TGG	AGA	ACC	GTG	GAC	CGC	CTC	TCC	GCC	ACC
Sintético	GTG	AAC	TCC	ACC	TGG	CGG	ACC	GTG	GAC	CGG	CTG	TCC	GCC	ACC
Cambiado	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Péptido	Ala	Cys	Gly	Cys	Leu	Gly
Nativo	GCC	TGC	GGC	TGC	CTG	GGC
Sintético	GCC	TGC	GGC	TGC	CTG	GGC
Cambiado	---	---	---	---	---	---

Fig. 10

```

CGA GGC TGC CCG CTG CCG TCC CAG CTG GTG CCT GTG CCG GCC CTG GGC CTG GGC CAC
Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His

CGG TCC GAC CAG CTG CTG CCG TTC CCG TTC TGC TCC GGC TCC TGC CCG CCG GCC CCG
Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg

TCC CCT CAC GAC CTG TCC CTG GCC TCC CTG CTG GGC GCC GGC GCC CTG CCG CCT CCT
Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro

CCT GGC TCC CCG CCT GTG TCC CAG CCT TCC TGC CCG CCT ACC CCG TAC GAG GCC GTG
Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val

TCC TTC ATG GAC GTG AAC TCC ACC TGG CCG ACC GTG GAC CCG CTG TCC GCC ACC GCC
Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala

TGC GGC TGC CTG GGC TGA
Cys Gly Cys Leu Gly ...

```

Fig. 11

```

ATG AGC TGG GGC TGG GCG GCC TGT CCA CCC TGT CCC ACT GCC CTT GGC CTC GGC
Met Ser Trp Ala Trp Ala Ala Cys Pro Pro Cys Pro Thr Ala Leu Gly Leu Gly

GGC AGT GCC CTG TGG CCT ACC CTG GCC GCC CTG GCC CTG CTG TCC TCC GTG GGC
Gly Ser Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu Leu Ser Ser Val Ala

GAG GGC GGC GGC GGC GCT CGA GGC TGC CGG CTG CGG TCC CAG CTG GTG CCT GTG
Glu Ala Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val

CGG GCC CTG GGC CTG GGC CAC CGG TCC GAC GAG CTG GTG CGG TTC CGG TTC TCC
Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys

TCC GGC TCC TGC CGG CGG GCC CGG TCC CCT CAC GAC CTG TCC CTG GGC TCC CTG
Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu

CTG GGC GGC GGC GGC CTG CGG CCT CCT CCT GGC TCC CGG CCT GTG TCC CAG CCT
Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro

TCC TGC CGG CCT ACC CGG TAC GAG GCC GTG TCC TTC ATC GAC GTG AAC TCC ACC
Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr

TGG CGG ACC GTG GAC CGG CTG TCC GCC ACC GCC TCC GGC TGC CTG GGC TGA
Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly ...

```

Fig. 12

ATG GAG CTG GGC CTG GGC GGC CTG TCC ACC CTG TCC CAC TGC CCT TGG CCT CGG
 Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp Pro Arg
 CGG CAG CCT GGC CTG TGG CCT ACC CTG GGC GGC CTG GGC CTG CTG TCC TCC GTG
 Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu Leu Ser Ser Val
 GCC GAG GGC GGC GGC GGC GCT CGA GGC TGC CGG CTG CGG TCC CAG CTG GTG CCT
 Ala Glu Ala Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro
 GTG CGG GGC CTG GGC CTG GGC CAC CGG TCC GAC GAG CTG GTG CGG TTC CGG TTC
 Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe
 TGC TCC GGC TCC TGC CGG CGG GGC CGG TCC CCT CAC GAC CTG TCC CTG GGC TCC
 Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser
 CTG CTG GGC GGC GGC GGC CTG CCG CCT CCT CCT GGC TCC CGG CCT GTG TCC CAG
 Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln
 CCT TGC TGC CGG CCT ACC CGG TAC GAG GGC GTG TCC TTC ATG GAG GTG AAC TCC
 Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser
 ACC TGG CGG ACC GTG GAC CGG CTG TCC GGC ACC GGC TGC GGC TGC CTG GGC TCA
 Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly ...

Fig. 13A

```

ATG AAG TGG GTG ACC TTC CTG CTG CTG CTG TTC ATC TCC GGC TCC GCC TTC TCC
Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala Phe Ser

GCC GCC GGC GCT CGA GGC TGC CGG CTG CGG TCC CAG CTG GTG CCT GTG CGG GCC
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala

CTG GGC CTG GGC CAC CGG TCC GAC GAG CTG GTG CGG TTC CGG TTC TGC TCC GGC
Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly

TCC TGC CGG CGG GGC CGG TCC CCT CAC GAC CTG TCC CTG GCC TCC CTG CTG GGC
Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly

GCC GCC GGC CTG CGG CCT CCT CCT GGC TCC CGG CCT GTG TCC CAG CCT TGC TGC
Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys

CGG CCT ACC CGG TAC GAG GCC GTG TCC TTC ATG GAC GTG AAC TCC ACC TGG CGG
Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg

ACC GTG GAC CGG CTG TCC GCC ACC GCC TGC GGC TGC CTG GGC TGA
Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly ...

```

Fig. 13B

ATG	AAG	TGG	GTG	ACC	TTC	CTG	CTG	TTC	CTG	CTG	TTC	ATC	TCC	GGC	GAT	GCC	TTC	GCT
Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Ile	Ser	Gly	Asp	Ala	Phe	Ala
GCC	GCC	GCC	GCT	CGA	GCC	TGC	CGG	CTG	CGG	TCC	CAG	CTG	GTG	CCT	GTG	CGG	GCC	
Ala	Ala	Gly	Ala	Arg	Gly	Cys	Arg	Leu	Arg	Ser	Gln	Leu	Val	Pro	Val	Arg	Ala	
CTG	GCC	CTG	GCC	CAC	CGG	TCC	GAC	GAG	CTG	GTG	CGG	TTC	CGG	TTC	TGC	TCC	GCC	
Leu	Gly	Leu	Gly	His	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu	Val	Arg	Phe	Arg	Phe	Cys	Ser	Gly	
TCC	TCC	CGG	CGG	GCC	CGG	TCC	CCT	CAC	GAC	CTG	TCC	CTG	GCC	TCC	CTG	CTG	GCC	
Ser	Cys	Arg	Arg	Ala	Arg	Ser	Pro	His	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	
GCC	GCC	GCC	CTG	CGG	CCT	CCT	CCT	GCC	TCC	CGG	CCT	GTG	TCC	CAG	CCT	TCC	TCC	
Ala	Gly	Ala	Leu	Arg	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Cys	Cys	
CGG	CCT	ACC	CGG	TAC	GAG	GCC	GTG	TCC	TTC	ATG	GAC	CTG	AAC	TCC	ACC	TGG	CGG	
Arg	Pro	Thr	Arg	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser	Phe	Met	Asp	Val	Asn	Ser	Thr	Trp	Arg	
ACC	GTG	GAC	CGG	CTG	TCC	GCC	ACC	GCC	TGC	GCC	TCC	CTG	GCC	TGA				
Thr	Val	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	Gly	Cys	Leu	Gly	...				

Fig. 14

ATG GCT ACA G GTAAGCGCCCTAAAAATCCCTTTGGGCACAAATGTGTCTGAGGGGAGAGGCGGCGTCCGT
Met Ala Thr G

AGATGGGACGGGGGCACCTAACCCCTCAGGTTTGGGGCTTATCAATGTTAGTATCGCCATCTAAGCCACGTATTTG

GCCAACTCTCGAATGTTCTGTGTCCTCGAGGGAGGCAGAGAGAGAGAGAGAAAAAACCAGCTCCTGGAA

CAGGGAGAGCGCTGGCCCTCTTGCCTCTCCAGCTCCCTCTGTGTGCCCTCCGGTTCCTCCCCAG GC TCC CGG
ly Ser Arg

ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC CTG TCC TGG CTT CAA GAG GGC
Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly

AGT GCC GCC GCC GGC GCT CGA GGC TGC CGG CTG CCG TCC CAG CTG GTG CCT GTG
Ser Ala Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val

CGG GCC CTG GGC CTG GGC CAC CGG TCC GAC GAG CTG GTG CCG TTC CCG TTC TGC
Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys

TCC GGC TCC TGC CCG CGG GCC CGG TCC CCT CAC GAC CTG TCC CTG GCC TCC CTG
Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu

CTG GGC GCC GCC GGC GGC CTG CCG CCT CCT CCT GGC TCC CCG CCT GTG TCC CAG CCT
Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro

TGC TGC CCG CCT ACC CCG TAC GAG GCC GTG TCC TTC ATG GAC GTG AAC TCC ACC
Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr

TGG CCG ACC GTG GAC CCG CTG TCC GCC ACC GCC TGC GGC TGC CTG GGC TGA
Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly ...

Fig. 15

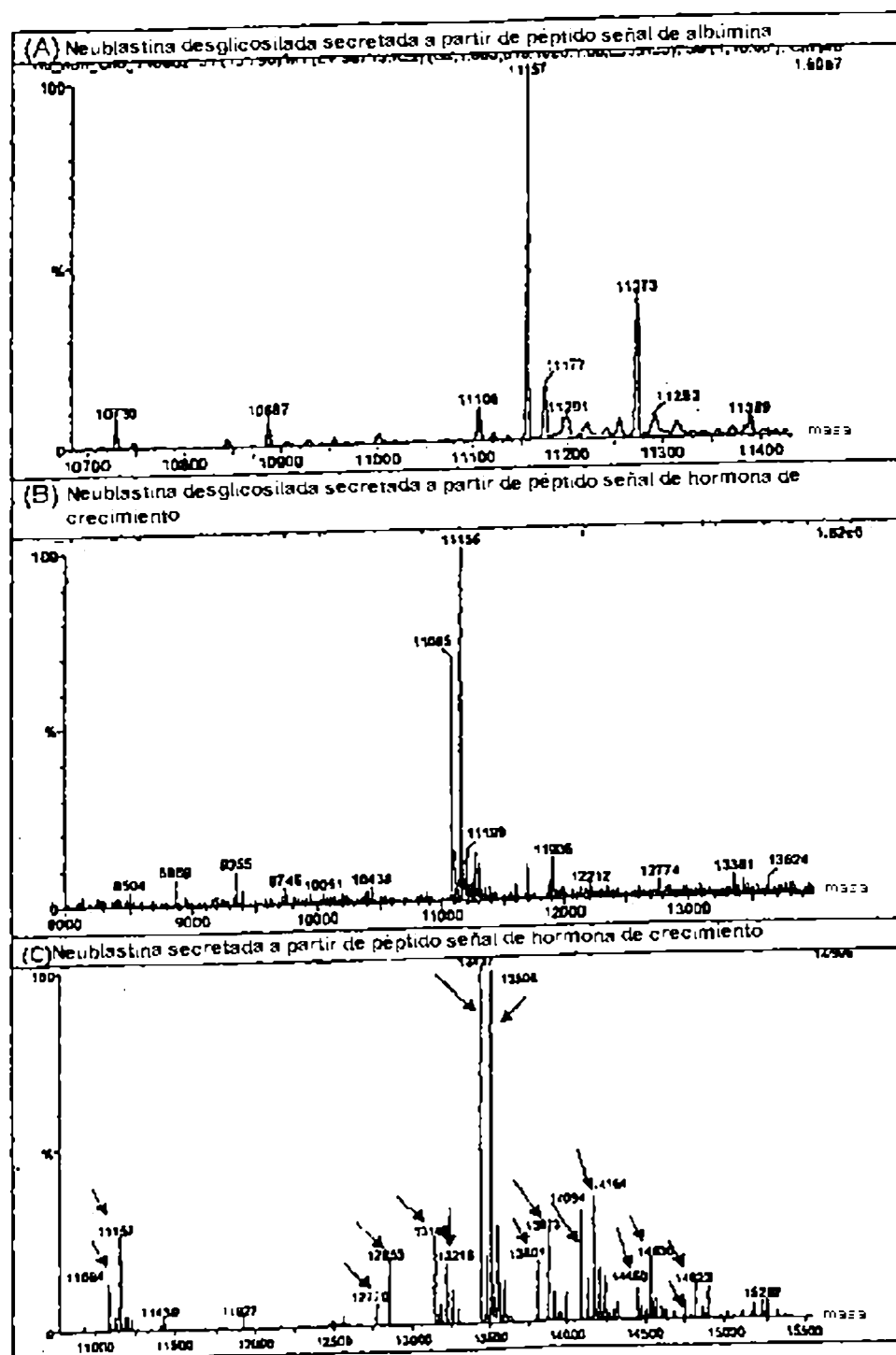


Fig. 16

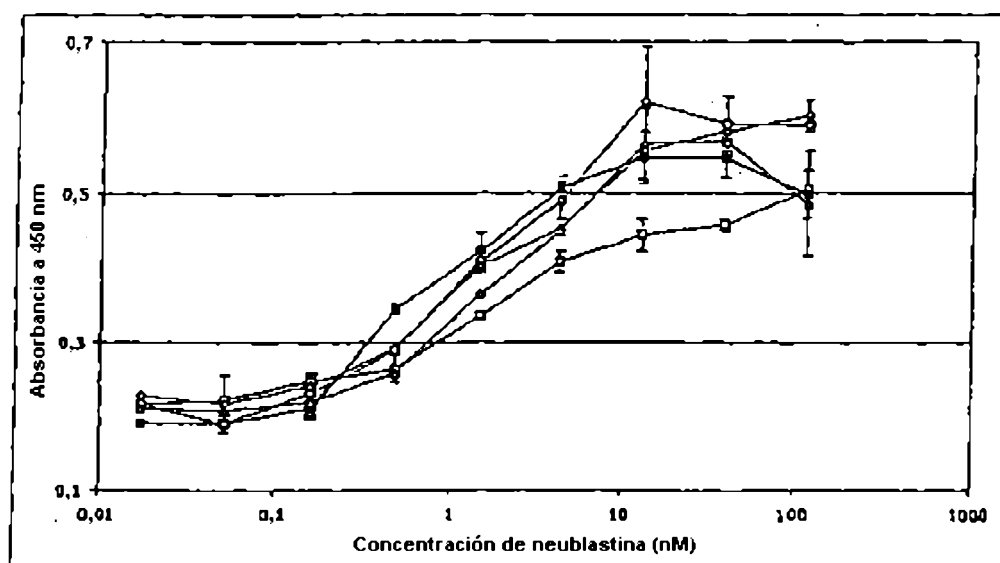


Fig. 17A

```

M E L G L G G L S T L S H C P W P R R Q P A L W P T L A A
L A L L S S V A E A S L G S A P R S P A P R E G P P P V L
A S P A G H L P G G R T A R W C S G R A R R P P P Q P S R
P A P P P P A P P S A L P R G G R A A R A G C P G S R A R
A A G A R G C R L R S Q L V P V R A L G L G H R S D E L V
R F R F C S G S C R R A R S P H D L S L A S L L G A G A L
R P P P G S R P V S Q P C C R P T R Y E A V S F M D V N S
T W R T V D R L S A T A C G C L G

```

Fig. 17B

```

M E L G L G G L S T L S H C P W P R R Q P A L W P T L A A
L A L L S S V A E A

```

Fig. 17C

```

S L G S A P R S P A P R E G P P P V L
A S P A G H L P G G R T A R W C S G R A R R P P P Q P S R
P A P P P P A P P S A L P R G G R A A R

```

ES 2 353 457 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NsGene A/S
Biogen Idec MA Inc.
5 Grønborg, Mette
Wahlberg, Lars
Tornøe, Jens
Kusk, Philip
Pederson, Nels E.
10 Sisk, William P.

<120> Secreción mejorada de neublastina

15 <130> P 951 PC00

<160> 82

20 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 19
25 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1
30
Met Asp Cys Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

35 **Thr His Ala**

<210> 2
40 <211> 19
<212> PRT
<213> *Macaca mulatta*

45 <400> 2

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

50 **Val Leu Ser**

<210> 3
55 <211> 19
<212> PRT
<213> *Callithrix jacchus*

60 <400> 3

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Phe Leu Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

65 **Ala His Ser**

ES 2 353 457 T3

<210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 4

 10 **Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly**
 1 5 10 15

 Val Asn Ser
 15

 <210> 5
 <211> 19
 20 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

 <400> 5

 25 **Met Glu Phe Arg Leu Asn Trp Val Val Leu Phe Ala Leu Leu Gln Gly**
 1 5 10 15

 Val Gln Gly
 30

 <210> 6
 <211> 19
 35 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

 <400> 6

 40 **Met Lys Cys Ser Trp Ile Ile Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Thr Gly**
 1 5 10 15

 Val Asn Ser
 45

 <210> 7
 50 <211> 478
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 55 <220>
 <223> IgSP murino - NBN113 humana
 <220>
 <221> Intrón
 60 <222> (47)..(125)
 <223>

 <220>
 65 <221> exón
 <222> (1)..(46)

ES 2 353 457 T3

<223>

<220>

5 <221> exón

<222> (126)..(478)

<223>

10 <400> 7

```

atg aaa tgc agc tgg gtt atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca g      46
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr
1      5      10      15

gtaaggggct cccaagtccc aaacttgagg gtccataaac tctgtgacag tggcaatcac    106

tttgcctttc ttctctacag gg  gtg aat tgc gct ggg ggc ccg ggc agc cgc    157
                        Gly Val Asn Ser Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg
                        20      25

gct cgg gca gcg ggg gcg cgg ggc tgc cgc ctg cgc tgc cag ctg gtg      205
Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val
30      35      40

ccg gtg cgc gcg ctc ggc ctg ggc cac cgc tcc gac gag ctg gtg cgt      253
Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg
25      45      50      55

ttc cgc ttc tgc agc ggc tcc tgc cgc cgc gcg cgc tct cca cac gac      301

Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp
30      60      65      70

ctc agc ctg gcc agc cta ctg ggc gcc ggg gcc ctg cga ccg ccc ccg      349
Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro
75      80      85      90

ggc tcc cgg ccc gtc agc cag ccc tgc tgc cga ccc acg cgc tac gaa      397
Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu
35      95      100      105

gcg gtc tcc ttc atg gac gtc aac agc acc tgg aga acc gtg gac cgc      445
Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg
40      110      115      120

ctc tcc gcc acc gcc tgc ggc tgc ctg ggc tga      478
Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
125      130

```

45 <210> 8

<211> 399

<212> ADN

50 <213> secuencia artificial

<220>

55 <223> IgSP murino - NBN113 humana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(399)

60 <223>

<220>

<221> péptido señal

65 <222> (1)..(57)

<223> IgSP murino

ES 2 353 457 T3

<220>

<221> característica diversa

<222> (58)..(396)

5 <223> Neublastina 113 humana

<400> 8

```

10      atg aaa tgc agc tgg gtt atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
      Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      1          5          10          15

      gtg aat tgc gct ggg ggc ccg ggc agc cgc gct cgg gca gcg ggg gcg      96
      Val Asn Ser Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Gly Ala
      15          20          25          30

      cgg ggc tgc cgc ctg cgc tgc cag ctg gtg ccg gtg cgc gcg ctc ggc      144

20

      Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly
      35          40          45

25      ctg ggc cac cgc tcc gac gag ctg gtg cgt ttc cgc ttc tgc agc ggc      192
      Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly
      50          55          60

      tcc tgc cgc cgc gcg cgc tct cca cac gac ctc agc ctg gcc agc cta      240
      Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu
      65          70          75          80

30      ctg ggc gcc ggg gcc ctg cga ccg ccc ccg ggc tcc cgg ccc gtc agc      288
      Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser
      85          90          95

35      cag ccc tgc tgc cga ccc acg cgc tac gaa gcg gtc tcc ttc atg gac      336
      Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp
      100          105          110

      gtc aac agc acc tgg aga acc gtg gac cgc ctc tcc gcc acc gcc tgc      384
      Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys
      115          120          125

40      ggc tgc ctg ggc tga      399
      Gly Cys Leu Gly
      130

```

45 <210> 9

<211> 132

<212> PRT

50 <213> secuencia artificial

<220>

<223> IgSP murino - NBN113 humana

55 <220>

<221> característica diversa

<222> (58)..(396)

<223> Neublastina 113 humana

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 9

	Met	Lys	Cys	Ser	Trp	Val	Ile	Phe	Phe	Leu	Met	Ala	Val	Val	Thr	Gly
	1				5					10					15	
5	Val	Asn	Ser	Ala	Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Gly	Ala
				20					25					30		
10	Arg	Gly	Cys	Arg	Leu	Arg	Ser	Gln	Leu	Val	Pro	Val	Arg	Ala	Leu	Gly
			35					40					45			
15	Leu	Gly	His	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu	Val	Arg	Phe	Arg	Phe	Cys	Ser	Gly
		50					55				60					
20	Ser	Cys	Arg	Arg	Ala	Arg	Ser	Pro	His	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu
	65					70				75						80
25	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Leu	Arg	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Val	Ser
					85					90					95	
30	Gln	Pro	Cys	Cys	Arg	Pro	Thr	Arg	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser	Phe	Met	Asp
				100					105					110		
35	Val	Asn	Ser	Thr	Trp	Arg	Thr	Val	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys
				115				120					125			
40	Gly	Cys	Leu	Gly												
				130												

<210> 10

<211> 220

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

45 <221> característica diversa

<223> Neublastina humana de longitud completa

<220>

50 <221> señal

<222> (1)..(39)

<223>

55 <220>

<221> PROPEP

<222> (40)..(80)

60 <223>

<220>

65 <221> péptido_mat

<222> (81)..()

<223>

ES 2 353 457 T3

<400> 10

5 Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
-80 -75 -70 -65

Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
-60 -55 -50

10 Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Pro Arg Ser Pro
-45 -40 -35

15 Ala Pro Arg Glu Gly Pro Pro Pro Val Leu Ala Ser Pro Ala Gly His
-30 -25 -20

Leu Pro Gly Gly Arg Thr Ala Arg Trp Cys Ser Gly Arg Ala Arg Arg
-15 -10 -5 -1

20 Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro
1 5 10 15

25 Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly
20 25 30

Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln
35 40 45

30 Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu
50 55 60

35 Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro
65 70 75 80

His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro
85 90 95

40 Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
100 105 110

45 Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val
115 120 125

50 Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
130 135 140

<210> 11

<211> 224

55 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

60 <221> SEÑAL

<222> (1)..(39)

<223>

65 <220>

<221> PROPEP

<222> (40)..(80)

ES 2 353 457 T3

<223>

<220>

5 <221> péptido_mat

<222> (81)..()

<223>

10 <400> 11

Met Glu Leu Gly Leu Ala Glu Pro Thr Ala Leu Ser His Cys Leu Arg
-80 -75 -70 -65

15 Pro Arg Trp Gln Ser Ala Trp Trp Pro Thr Leu Ala Val Leu Ala Leu
-60 -55 -50

20 Leu Ser Cys Val Thr Glu Ala Ser Leu Asp Pro Met Ser Arg Ser Pro
-45 -40 -35

25 Ala Ala Arg Asp Gly Pro Ser Pro Val Leu Ala Pro Pro Thr Asp His
-30 -25 -20

30 Leu Pro Gly Gly His Thr Ala His Leu Cys Ser Glu Arg Thr Leu Arg
-15 -10 -5 -1

35 Pro Pro Pro Gln Ser Pro Gln Pro Ala Pro Pro Pro Gly Pro Ala
1 5 10 15

40 Leu Gln Ser Pro Pro Ala Ala Leu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Ala
20 25 30

45 Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Thr Thr Asp Ala Arg Gly Cys Arg
35 40 45

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

55 Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg
65 70 75 80

60 Ala Arg Ser Gln His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly
85 90 95

65 Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser Gln Pro Cys Cys
100 105 110

70 Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr
115 120 125

75 Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
130 135 140

<210> 12

<211> 224

60 <212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

65 <221> SEÑAL

<222> (1)..(39)

ES 2 353 457 T3

<223>

<220>

5 <221> PROPEP

<222> (40)..(80)

<223>

10 <220>

<221> péptido_mat

<222> (81)..()

<223>

15

<400> 12

20

Met Glu Leu Gly Leu Gly Glu Pro Thr Ala Leu Ser His Cys Leu Arg
-80 -75 -70 -65

Pro Arg Trp Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
-60 -55 -50

25

Leu Ser Ser Val Thr Glu Ala Ser Leu Asp Pro Met Ser Arg Ser Pro
-45 -40 -35

30

Ala Ser Arg Asp Val Pro Ser Pro Val Leu Ala Pro Pro Thr Asp Tyr
-30 -25 -20

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

35

Pro Pro Pro Gln Ser Pro Gln Pro Ala Pro Pro Pro Pro Gly Pro Ala
1 5 10 15

40

Leu Gln Ser Pro Pro Ala Ala Leu Arg Gly Ala Arg Ala Ala Arg Ala
20 25 30

Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Ala Thr Asp Ala Arg Gly Cys Arg
35 40 45

45

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

50

Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg
65 70 75 80

Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Asp Ala Gly
85 90 95

55

Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser Gln Pro Cys Cys
100 105 110

Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr
115 120 125

60

Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
130 135 140

<210> 13

65

<211> 116

<212> PRT

ES 2 353 457 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

```

5      Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala
      1          5          10          15

      Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly
      20          25          30

10     Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly
      35          40          45

      Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu
      50          55          60

      Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser
      65          70          75          80

20     Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp
      85          90          95

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

25     Gly Cys Leu Gly
      115

```

30 <210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 14

```

40     Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys
      1          5          10          15

      Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His
      20          25          30

45     Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg
      35          40          45

      Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala
      50          55          60

      Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys
      65          70          75          80

55     Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser
      85          90          95

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

60     Gly

```

65 <210> 15

<211> 119

<212> PRT

ES 2 353 457 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 15

```

5      Gly Ala Arg Ala Ala Arg Ala Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Thr
      1              5              10              15

10     Thr Asp Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Ser
      20              25              30

15     Ala Leu Gly Leu Gly His Ser Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe
      35              40              45

20     Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Gln His Asp Leu Ser Leu
      50              55              60

25     Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg
      65              70              75              80

30     Pro Ile Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser
      85              90              95

35     Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala
      100             105             110

30     Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      115

```

<210> 16

<211> 116

35 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 16

```

40     Ala Ala Arg Ala Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Thr Thr Asp Ala
      1              5              10              15

45     Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Ser Ala Leu Gly
      20              25              30

50     Leu Gly His Ser Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly
      35              40              45

55     Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Gln His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu
      50              55              60

60     Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser
      65              70              75              80

65     Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp
      85              90              95

70     Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys
      100             105             110

75     Gly Cys Leu Gly
      115

```

ES 2 353 457 T3

<210> 17

<211> 116

<212> PRT

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 17

```

10      Ala Ala Arg Ala Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Ala Thr Asp Ala
      1          5          10          15

      Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Ser Ala Leu Gly
      20          25          30

15      Leu Gly His Ser Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly
      35          40          45

20      Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu
      50          55          60

      Leu Asp Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser
25      65          70          75          80

      Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp
      85          90          95

30      Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys
      100          105          110

35      Gly Cys Leu Gly
      115

```

<210> 18

<211> 113

40 <212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 18

```

45      Ala Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Ala Thr Asp Ala Arg Gly Cys
      1          5          10          15

      Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Ser Ala Leu Gly Leu Gly His
50      20          25          30

      Ser Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg
      35          40          45

55      Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Asp Ala
      50          55          60

      Gly Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser Gln Pro Cys
60      65          70          75          80

      Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser
      85          90          95

      Thr Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu
65      100          105          110

      Gly

```

<210> 19

ES 2 353 457 T3

<211> 104

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

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

10

Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg
20 25 30

15

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

20

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

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

25

Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser
85 90 95

Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
100

30

<210> 20

<211> 99

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

40

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

45

Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser
20 25 30

Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu
35 40 45

50

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

55

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

Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly
85 90 95

60

Cys Leu Gly

<210> 21

65 <211> 140

<212> PRT

ES 2 353 457 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

```

5      Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro
      1          5          10          15

10     Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly
      20          25          30

15     Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln
      35          40          45

20     Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu
      50          55          60

25     Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro
      65          70          75          80

30     His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro
      85          90          95

35     Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
      100          105          110

40     Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val
      115          120          125

45     Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      130          135          140

```

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

```

45     Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val
      1          5          10          15

50     Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg
      20          25          30

55     Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp
      35          40          45

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

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

70     Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg
      85          90          95

75     Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      100          105

```

ES 2 353 457 T3

<210> 23

<211> 102

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

```

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

      Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys
              20          25          30

15      Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala
              35          40          45

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

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

25      Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr
              85          90          95

      Ala Cys Gly Cys Leu Gly
              100

```

<210> 24

<211> 39

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

```

40      Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
       1          5          10          15

      Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
       20          25          30

      Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala
              35

```

50 <210> 25

<211> 179

<212> PRT

55 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Deltapro-NBN140 humana

60 <220>

<221> señal

<222> (1)..(39)

<223>

65

<220>

ES 2 353 457 T3

<221> péptido_mat

<222> (40)..()

<223>

5

<400> 25

10

Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
-35 -30 -25

Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
-20 -15 -10

15

Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala
-5 -1 1 5

20

Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala
10 15 20 25

Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg
30 35 40

25

Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu
45 50 55

30

Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser
60 65 70

35

Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu
75 80 85

Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln
90 95 100 105

40

Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val
110 115 120

45

Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly
125 130 135

50

Cys Leu Gly
140

55

<210> 26

<211> 152

<212> PRT

60

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Deltapro-NBN113 humana

65

<220>

<221> SEÑAL

ES 2 353 457 T3

<222> (1)..(39)

<223>

5 <220>

<221> péptido_mat

<222> (40)..()

<223>

10

<400> 26

15 Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
-35 -30 -25

Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
-20 -15 -10

20 Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg
-5 -1 1 5

25 Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val
10 15 20 25

Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg
30 30 35 40

Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser
45 45 50 55

35 Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser
60 65 70

40 Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val
75 80 85

45 Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser
90 95 100 105

Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
110

50

<210> 27

<211> 145

55 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

60 <223> Deltapro-NBN106 humana

<220>

<221> señal

65 <222> (1)..(39)

<223>

ES 2 353 457 T3

<220>
 <221> péptido_mat
 <222> (40)..()
 5 <223>

 <400> 27

 10 Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
 -35 -30 -25

 15 Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
 -20 -15 -10

 20 Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys
 -5 -1 1 5

 25 Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His
 10 15 20 25

 30 Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg
 30 35 40

 35 Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala
 45 50 55

 40 Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys
 60 65 70

 45 Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser
 75 80 85

 50 Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu
 90 95 100 105

 Gly

 55 <210> 28
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Deltapro-NBN104 humana

 65

ES 2 353 457 T3

<400> 28

```

5      Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
      1          5          10          15

      Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
      20          25          30

10     Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu
      35          40          45

15     Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser
      50          55          60

      Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala
      65          70          75          80

20     Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala
      85          90          95

25     Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg
      100         105         110

30     Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp
      115         120         125

      Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      130         135         140

```

35

<210> 29

<211> 141

40 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

45 <223> Deltapro-NBN102 humana

<220>

<221> SEÑAL

50 <222> (1)..(39)

<223>

<220>

55 <221> péptido_mat

<222> (40)..()

<223>

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 29

5 Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
-35 -30 -25

Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
-20 -15 -10

10 Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser
-5 -1 1 5

15 Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu
10 15 20 25

Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser
30 35 40

20 Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg
45 50 55

25 Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr
60 65 70

Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr
75 80 85

30 Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
90 95 100

35

<210> 30

<211> 138

40 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

45 <223> Deltapro-NBN99 humana

<220>

<221> SEÑAL

50 <222> (1)..(39)

<223>

<220>

55 <221> péptido_mat

<222> (40)..()

<223>

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 30

```

5      Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
      -35 -30 -25

      Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
      -20 -15 -10

10     Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val
      -5 -1 1 5

      Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg
      10 15 20 25

      Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp
      30 35 40

20     Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro
      45 50 55

      Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu
      60 65 70

      Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg
      75 80 85

30     Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      90 95

```

35

<210> 31

<211> 159

40 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

45 <223> IgSP murino - NBN140 humana

<220>

<221> SEÑAL

50 <222> (1)..(19)

<223>

<220>

55 <221> péptido_mat

<222> (20)..()

<223>

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 31

```

5      Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15          -10          -5

      Val Asn Ser Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro
      -1  1          5          10

10     Ala Pro Pro Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly
      15          20          25

      Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu
      30          35          40          45

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

20     Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala
      65          70          75

      Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala
      80          85          90

      Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg
      95          100          105

30     Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp
      110          115          120          125

      Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      130          135          140

```

40 <210> 32

<211> 132

<212> PRT

<213> secuencia artificial

45

<220>

<223> IgSP murino - NBN113 humana

50 <220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<223>

55

<220>

<221> péptido_mat

<222> (20)..()

<223>

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 32

```

5      Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15 -10 -5

      Val Asn Ser Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala
      -1 1 5 10

10     Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly
      15 20 25

15     Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly
      30 35 40 45

20     Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu
      50 55 60

25     Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser
      65 70 75

30     Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp
      80 85 90

35     Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys
      95 100 105

      Gly Cys Leu Gly
      110

```

<210> 33

<211> 125

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> IgSP murino - NBN106 humana

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<223>

<220>

<221> péptido_mat

<222> (20)..()

<223>

ES 2 353 457 T3

<400> 33

```

5      Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15      -10      -5

10     Val Asn Ser Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser
      -1  1      5      10

15     Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu
      15      20      25

20     Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser
      30      35      40      45

25     Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg
      50      55      60

30     Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr
      65      70      75

35     Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr
      80      85      90

40     Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      95      100      105

```

<210> 34

<211> 123

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> IgSP murino - NBN1104 humana

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<223>

<220>

<221> péptido_mat

<222> (20)..()

<223>

ES 2 353 457 T3

<400> 34

```

5      Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15      -10      -5

      Val Asn Ser Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu
      -1  1      5      10

10     Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val
      15      20      25

      Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His
      30      35      40      45

      Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro
      50      55

20     Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr
      65      70      75

      Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp
      80      85      90

      Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      95      100

```

<210> 35

<211> 121

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> IgSP murino - NBN102 humana

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<223>

<220>

<221> péptido_mat

<222> (20)..()

<223>

ES 2 353 457 T3

<400> 35

```

5      Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15      -10      -5

10     Val Asn Ser Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro
      -1  1      5      10

15     Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe
      15      20      25

20     Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu
      30      35      40      45

25     Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly
      50      55      60

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

35     Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu
      80      85      90

40     Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      95      100

```

<210> 36

35 <211> 118

<212> PRT

<213> secuencia artificial

40 <220>

<223> IgSP murino - NBN99 humana

<220>

<221> SEÑAL

45 <222> (1)..(19)

<223>

<220>

50 <221> péptido_mat

<222> (20)..()

<223>

55

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 36

```

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

```

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

<400> 37

```

Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
  1      5      10      15
Phe Ser

```

<210> 38

<211> 158

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido señal de albúmina de rata - NBN140

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(18)

<223>

<220>

<221> péptido_mat

<222> (19)..()

<223>

ES 2 353 457 T3

<400> 38

```

5      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
      -15      -10      -5

      Phe Ser Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala
      -1  1      5      10

10     Pro Pro Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly
      15      20      25      30

      Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg
      35      40      45

      Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp
      50      55      60

20     Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg
      65      70      75

      Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu
      80      85      90

      Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro
      95      100      105      110

30     Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg
      115      120      125

      Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      130      135      140

```

40 <210> 39

<211> 131

<212> PRT

<213> secuencia artificial

45 <220>

<223> Péptido señal de albúmina de rata - NBN113

<220>

50 <221> SEÑAL

<222> (1)..(18)

<223>

55 <220>

<221> péptido_mat

<222> (19)..()

60 <223>

65

ES 2 353 457 T3

<400> 39

```

5      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
      -15 -10 -5

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

10     Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu
      15 20 25 30

      Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser
      35 40 45

      Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu
      50 55 60

20     Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln
      65 70 75

      Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val
      80 85 90

30     Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly
      95 100 105 110

      Cys Leu Gly

```

```

35 <210> 40
    <211> 124
    <212> PRT
40 <213> secuencia artificial

    <220>
    <223> Péptido señal de albúmina de rata - NBN106
45 <220>
    <221> SEÑAL
    <222> (1)..(18)
    <223>
50 <220>
    <221> péptido_mat
    <222> (19)..()
55 <223>

```

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 40

```

5      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
      -15      -10      -5

      Phe Ser Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln
      -1  1      5      10

10     Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu
      15      20      25      30

      Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro
      35      40      45

      His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro
      50      55      60

20     Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
      65      70      75

      Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val
      80      85      90

      Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      95      100      105

```

<210> 41
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido señal de albúmina de rata - NBN104
 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(18)
 <223>

<220>
 <221> péptido_mat
 <222> (19)..()
 <223>

55

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 41

```

5      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
      -15      -10      -5

      Phe Ser Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val
      -1  1      5      10

10     Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg
      15      20      25      30

      Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp
      35      40      45

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

20     Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu
      65      70      75

      Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg
      80      85      90

      Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      95      100

```

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido señal de albúmina de rata - NBN102

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(18)

<223>

<220>

<221> péptido_mat

<222> (19)..()

<223>

ES 2 353 457 T3

<400> 42

5 Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
-15 -10 -5

10 Phe Ser Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val
-1 1 5 10

15 Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg
15 20 25 30

20 Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser
35 40 45

25 Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser
50 55 60

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

35 Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser
80 85 90

40 Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
95 100

<210> 43

35 <211> 117

<212> PRT

<213> secuencia artificial

40 <220>

<223> Péptido señal de albúmina de rata - NBN99

<220>

<221> SEÑAL

45 <222> (1)..(18)

<223>

<220>

50 <221> péptido_mat

<222> (19)..()

<223>

55

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 43

```

5      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
      -15                    -10                    -5

Phe Ser Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu
  -1  1                    5                    10

10    Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser
    15                    20                    25                    30

Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser
15                    35                    40                    45

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

20    Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met
    65                    70                    75

25    Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala
    80                    85                    90

Cys Gly Cys Leu Gly
95

```

<210> 44

<211> 19

35 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido señal de albúmina de rata modificado

<400> 44

```

45      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ile Ser Gly Asp
      1                    5                    10                    15

Ala Phe Ala

```

50

<210> 45

<211> 159

55 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

60 <223> Péptido señal de albúmina de rata modificado - NBN140

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

65

<223>

ES 2 353 457 T3

```

<220>
<221> péptido_mat
<222> (20)..()
5 <223>

<400> 45

10      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ile Ser Gly Asp
      -15 -10 -5

15      Ala Phe Ala Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro
      -1 1 5 10

20      Ala Pro Pro Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly
      15 20 25

25      Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu
      30 35 40 45

30      Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser
      50 55 60

35      Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala
      65 70 75

40      Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala
      80 85 90

45      Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg
      95 100 105

50      Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp
      110 115 120 125

55      Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      130 135 140

60 <210> 46
    <211> 132
    <212> PRT
    <213> secuencia artificial

65 <220>
    <223> Péptido señal de albúmina de rata modificado - NBN113
    <220>
70 <221> SEÑAL
    <222> (1)..(19)
    <223>

75 <220>
    <221> péptido_mat
    <222> (20)..()
80 <223>

```

ES 2 353 457 T3

<400> 46

```

5      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ile Ser Gly Asp
      -15 -10 -5

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

10     Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly
      15 20 25

15     Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly
      30 35 40 45

20     Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu
      50 55 60

25     Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser
      65 70 75

30     Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp
      80 85 90

35     Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys
      95 100 105

      Gly Cys Leu Gly
      110

```

<210> 47

<211> 125

40 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

45 <223> Péptido señal de albúmina de rata modificado - NBN106

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

50 <223>

<220>

55 <221> péptido_mat

<222> (20)..()

<223>

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 47

```

5      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ile Ser Gly Asp
      -15 -10 -5

10     Ala Phe Ala Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser
      -1 1 5 10

15     Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu
      15 20 25

20     Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser
      30 35 40 45

25     Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg
      50 55 60

30     Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr
      65 70 75

35     Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr
      80 85 90

40     Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      95 100 105

```

<210> 48

<211> 123

35 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido señal de albúmina de rata modificado - NBN104

<220>

<221> SEÑAL

45 <222> (1)..(19)

<223>

<220>

50 <221> péptido_mat

<222> (20)..()

<223>

55

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 48

```

5      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ile Ser Gly Asp
      -15                    -10                    -5

      Ala Phe Ala Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu
      -1  1                    5                    10

10     Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val
      15                    20                    25

15     Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His
      30                    35                    40                    45

      Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro
      50                    55                    60

20     Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr
      65                    70                    75

25     Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp
      80                    85                    90

      Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      95                    100

```

<210> 49

<211> 121

35 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido señal de albúmina de rata modificado - NBN102

<220>

<221> SEÑAL

45 <222> (1)..(19)

<223>

<220>

50 <221> péptido_mat

<222> (20)..()

<223>

55

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 49

```

5      Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ile Ser Gly Asp
      -15 -10 -5

10     Ala Phe Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro
      -1 1 5 10

15     Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe
      15 20 25

20     Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu
      30 35 40 45

25     Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly
      50 55 60

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

35     Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu
      80 85 90

40     Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      95 100

```

<210> 50

<211> 118

35 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido señal de albúmina de rata modificado - NBN99

<220>

<221> SEÑAL

45 <222> (1)..(19)

<223>

<220>

50 <221> péptido_mat

<222> (20)..()

<223>

55

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 50

5 Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ile Ser Gly Asp
-15 -10 -5

Ala Phe Ala Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala
-1 1 5 10

10 Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys
15 20 25

Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala
30 35 40 45

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

20 Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe
65 70 75

25 Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr
80 85 90

Ala Cys Gly Cys Leu Gly
95

<210> 51

<211> 26

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

40 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

45 Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala
20 25

<210> 52

<211> 166

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> SP de hormona de crecimiento humana - NBN140

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(26)

<223>

<220>

<221> péptido_mat

<222> (27)..()

ES 2 353 457 T3

<223>

<400> 52

```

5      Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
      -25                -20                -15

10     Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Pro Pro Pro Gln Pro Ser
      -10                -5                -1  1                5

15     Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro Ser Ala Leu Pro Arg Gly
              10                15                20

20     Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala
              25                30                35

25     Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala
      40                45                50

30     Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys
      55                60                65                70

35     Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala
              75                80                85

40     Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro
              90                95                100

45     Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe
              105                110                115

50     Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr
      120                125                130

55     Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      135                140

```

<210> 53

45 <211> 139

<212> PRT

<213> secuencia artificial

50 <220>

<223> SP de hormona del crecimiento humana - NBN113

<220>

<221> SEÑAL

55 <222> (1)..(26)

<223>

<220>

60 <221> péptido_mat

<222> (27)..()

<223>

65

ES 2 353 457 T3

<400> 53

```

5      Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
      -25                -20                -15

      Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser
      -10                -5                -1  1                5

10     Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu
      10                15                20

15     Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val
      25                30                35

      Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His
      40                45                50

20     Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro
      55                60                65                70

25     Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr
      75                80                85

30     Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp
      90                95                100

      Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      105                110

```

35

<210> 54

<211> 132

40 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

45 <223> SP de hormona del crecimiento humana - NBN106

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(26)

50

<223>

<220>

<221> péptido_mat

55

<222> (27)..()

<223>

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 54

```

5      Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
      -25                -20                -15

      Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ala Arg Ala Ala Gly Ala
      -10                -5                -1 1                5

10     Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly
      10                15                20

15     Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly
      25                30                35

20     Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu
      40                45                50

      Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser
      55                60                65                70

25     Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp
      75                80                85

30     Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys
      90                95                100

      Gly Cys Leu Gly
      105

```

```

35     <210> 55
      <211> 130
      <212> PRT
40     <213> secuencia artificial

```

```

      <220>
45     <223> SP de hormona del crecimiento humana - NBN104
      <220>
      <221> SEÑAL
      <222> (1)..(26)
50     <223>

      <220>
      <221> péptido_mat
55     <222> (27)..()
      <223>

```

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 55

```

5      Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
      -25          -20          -15

      Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ala Arg Gly
      -10          -5          -1  1          5

10     Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly
          10          15          20

      His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys
      25          30          35

      Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly
      40          45          50

20     Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro
      55          60          65          70

      Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn
          75          80          85

      Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys
          90          95          100

30     Leu Gly

```

```

35     <210> 56
      <211> 128
      <212> PRT
40     <213> secuencia artificial

      <220>
      <223> SP de hormona del crecimiento humana - NBN102
45     <220>
      <221> SEÑAL
      <222> (1)..(26)
      <223>
50     <220>
      <221> péptido_mat
      <222> (27)..()
55     <223>

```

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 56

```

5      Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
      -25          -20          -15

      Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg
      -10          -5          -1  1          5

10     Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg
      10          15          20

15     Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg
      25          30          35

20     Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly
      40          45          50

25     Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys
      55          60          65          70

      Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr
      75          80          85

30     Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      90          95          100

```

<210> 57

35 <211> 125

<212> PRT

<213> secuencia artificial

40 <220>

<223> SP de hormona del crecimiento humana - NBN99

<220>

<221> SEÑAL

45 <222> (1)..(26)

<223>

<220>

50 <221> péptido_mat

<222> (27)..()

<223>

55

60

65

ES 2 353 457 T3

<400> 57

```

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
  -25                -20                -15

5
Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Gly Cys Arg Leu Arg Ser
 -10                -5                -1  1                5

10
Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu
      10                15                20

15
Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser
      25                30                35

Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg
  40                45                50

20
Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr
 55                60                65                70

25
Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr
      75                80                85

Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      90                95

```

<210> 58

<211> 312

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> característica diversa

<223> Secuencia de nucleótidos de NBN104

<400> 58

```

45  gcagcggggg cgcggggctg ccgcctgcgc tcgcagctgg tgccgggtgcg cgcgctcggc      60
    ctggggccacc gctccgacga gctgggtgcgt ttccgcttct gcagcgggctc ctgccgccgc      120
    gcgcgctctc cacacgacct cagcctggcc agcctactgg gcgccggggc cctgcgaccg      180
50  cccccgggct cccggcccggt cagccagccc tgctgccgac ccacgcgcta cgaagcggtc      240
    tccttcattgg acgtcaacag cacctggaga accgtggacc gcctctccgc caccgcctgc      300
    ggctgcctgg gc                                     312

```

<210> 59

<211> 312

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de NBN104 sintética

ES 2 353 457 T3

<400> 59

	gcccgcggcg ctcgaggctg cgggctgcgg tcccagctgg tgccctgtcg ggccctgggc	60
5	ctgggccacc ggcccgacga gctgggtcgg tcccggttct gctccggctc ctgcccggg	120
	ggccgggtccc ctcccgacct gtccctggcc tccctgtctg gcgcccggcg cctgcccct	180
	cctcctggct cccggcctgt gtcccagcct tgctgcccgc ctaccggta cgaggccgtg	240
10	tccttcctgg acgtgaactc cacctggcgg accgtggacc ggctgtccgc caccgcctgc	300
	ggctgcctgg gc	312

<210> 60

15 <211> 303

<212> ADN

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia dentro de pNBN026-35 que codifica para NBN99

<400> 60

25	cgaggctgcc ggctgcggtc ccagctggtg cctgtgcggg ccctgggctt gggccaccgg	60
	tccgacgagc tgggtgcggtt ccggttctgc tccggctcct gccggcgggc ccggtccct	120
	cacgacctgt cctggcctc cctgtggtgg gccggcgccc tgccgctcc tcctggctcc	180
30	cggcctgtgt cccagccttg ctgccggcct acccggtacg aggcctgtgc ctccatggac	240
	gtgaactcca cctggcggac cgtggaccgg ctgtccgcca ccgcctgagg ctgcctgggc	300
	tga	303

35 <210> 61

<211> 426

<212> ADN

40 <213> secuencia artificial

<220>

<223> SP sintético - NBN104 sintética

45

<400> 61

	atgagctggg cctgggcggc ctgtccaccc tgtccactg cccttgacct cgccggcagt	60
50	gcccctgtgc ctaccctggc cgccttgcc ctgtgtcct ccgtggcga ggccgcggc	120
	ggcgtcagag gctgccggct gcggtcccag ctggtgacct tgccggccct ggccctgggc	180
	caccggtccg acgagctggt gcggttccgg ttctgtccg gctcctgcc gcgggcccgg	240
55	tccctcaccg acctgtccct ggcctccctg ctgggcggcg gcgcctgag gcctcctcct	300
	ggctcccggc ctgtgtccca gccttgctgc cggcctaccc ggtacgaggc cgtgtccttc	360
	atggacgtga actccacctg gcggaccgtg gacgggctgt ccgccaccgc ctgcccgtgc	420
60	ctgggc	426

<210> 62

<211> 142

<212> PRT

65 <213> secuencia artificial

ES 2 353 457 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de SP sintético - NBN104 sintética

5 <400> 62

	Met	Ser	Trp	Ala	Trp	Ala	Ala	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Thr	Ala	Leu	Gly	
	1				5					10					15		
10	Leu	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Trp	Pro	Thr	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	
				20					25					30			
	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Arg	Gly	Cys	Arg	Leu	Arg	
15			35					40					45				
	Ser	Gln	Leu	Val	Pro	Val	Arg	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	His	Arg	Ser	Asp	
		50					55					60					
20	Glu	Leu	Val	Arg	Phe	Arg	Phe	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Arg	Arg	Ala	Arg	
	65				70						75					80	
	Ser	Pro	His	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Leu	
25				85						90					95		
	Arg	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Cys	Cys	Arg	Pro	
				100					105					110			
30	Thr	Arg	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser	Phe	Met	Asp	Val	Asn	Ser	Thr	Trp	Arg	
			115					120					125				
	Thr	Val	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	Gly	Cys	Leu	Gly			
35		130					135					140					

<210> 63

<211> 432

<212> ADN

40 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido señal de NBN - NBN104 sintética

45

<400> 63

	atggagctgg	gcctgggagg	cctgtccacc	ctgtcccaact	gcccttgccc	tcggcggcag	60
50	cctgccctgt	ggcctacct	ggcgcacctg	gccctgctgt	cctccgtggc	cgaggccgcc	120
	gccggcgctc	gaggetgccg	gctgcgggtc	cagctgggtc	ctgtgcgggc	cctgggacctg	180
	ggccaccggt	ccgacgagct	ggtgcgggtc	cggttctgct	ccggctcctg	ccggcgggcc	240
55	cgggtccctc	acgacctgtc	cctggcctcc	ctgctgggcg	ccggcgccct	ggggcctcct	300
	cctgggtccc	ggcctgtgtc	ccagccttgc	tgcgggcta	ccgggtacga	ggccgtgtcc	360
	ttcatggacg	tgaactccac	ctggcggacc	gtggaccggc	tgtccggcac	cgctgcgggc	420
60	tgcctgggct	ga					432

<210> 64

<211> 143

<212> PRT

65 <213> secuencia artificial

ES 2 353 457 T3

<220>

<223> Secuencia de péptido señal de NBN - NBN104 sintética

5 <400> 64

10	Met	Glu	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Leu	Ser	Thr	Leu	Ser	His	Cys	Pro	Trp
	1			5						10				15		
15	Pro	Arg	Arg	Gln	Pro	Ala	Leu	Trp	Pro	Thr	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu
				20					25					30		
20	Leu	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Arg	Gly	Cys	Arg	Leu
			35					40					45			
25	Arg	Ser	Gln	Leu	Val	Pro	Val	Arg	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	His	Arg	Ser
	50						55					60				
30	Asp	Glu	Leu	Val	Arg	Phe	Arg	Phe	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Arg	Arg	Ala
	65					70					75					80
35	Arg	Ser	Pro	His	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala
				85					90					95		
40	Leu	Arg	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Cys	Cys	Arg
			100						105					110		
45	Pro	Thr	Arg	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser	Phe	Met	Asp	Val	Asn	Ser	Thr	Trp
			115					120					125			
50	Arg	Thr	Val	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	Gly	Cys	Leu	Gly	
	130					135						140				

<210> 65

40 <211> 369

<212> ADN

<213> secuencia artificial

45 <220>

<223> Péptido señal de albúmina - NBN104 sintética

<400> 65

50	atgaagtggg tgaccttctt gctgctgctg ttcattctccg gctccgcctt ctccgcgcgc	60
	ggcgctcgag gctgccggct gcggtcccag ctgggtgcctg tgcgggccct gggcctgggc	120
	caccgggtccg acgagctggt gcggttcccg ttctgtctccg gctcctgccg gcgggcccgc	180
55	tccccacag acctgtccct ggctccctg ctgggcgcgc gcgcctgcg gcctcctctt	240
	ggctccccgc ctgtgtccca gccttgctgc cggcctaccc ggtacgaggc cgtgtccttc	300
	atggacgtga actccacctg gcggaccgtg gaccggctgt ccgccaccgc ctgcggetgc	360
60	ctgggctga	369

<210> 66

<211> 122

65 <212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 353 457 T3

<220>

<223> Secuencia de péptido señal de albúmina - NBN104 sintética

5 <400> 66

```

Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
 1          5          10          15

Phe Ser Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val
          20          25          30

Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg
          35          40          45

Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp
 50          55          60

Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro
65          70          75          80

Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu
          85          90          95

Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg
          100          105          110

Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
          115          120

```

<210> 67

<211> 662

<212> ADN

40 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de GHSP con intrón - NBN104 sintética

45

<400> 67

```

atggctacag taagcgcccc taaaatccct ttgggcacaa tgtgtcctga ggggagagggc      60
ggcgctcctgt agatggggacg ggggcactaa ccctcagggtt tggggcttat gaatgttagt      120
atcgccatct aagcccagta tttggccaat ctccgaatgt tcttggtccc tggagggagg      180
cagagagaga gagaaaaaaaa aaaacccagc tcctggaaca gggagagcgc tggcctcttg      240
ctctccagct ccctctgttg ccctccgggtt tctccccagg ctcccgagc tccctgtctc      300
tggtcttttg cctgctctgc ctgtcctggc ttcaagaggg cagtgcgccc gccggcgctc      360
gaggctgccc gctgcggtcc cagctggtgc ctgtgcgggc cctgggcctg ggccaccggt      420
ccgacgagct ggtgcgggtc cgtttctgct ccggctcctg cggcggggcc cggteccctc      480
acgacctgtc cctggcctcc ctgtcgggcg ccggcgccct gcggcctcct cctggctccc      540
ggcctgtgtc ccagccttgc tgccggccta cccggtacga ggccgtgtcc ttcattggacg      600
tgaactccac ctggcggacc gtggaccggc tgtccgccac cgctgcggc tgcctgggct      660
ga                                           662

```

ES 2 353 457 T3

<210> 68
 <211> 130
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de GHSP-NBN104 sintética
 10
 <400> 68

 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ala Arg Gly
 20 25 30
 Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly
 35 40 45
 His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys
 50 55 60
 Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly
 65 70 75 80
 30 Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro
 85 90 95
 35 Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn
 100 105 110
 Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys
 115 120 125
 40
 Leu Gly
 130
 45 <210> 69
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia del péptido señal de albúmina modificado - secuencia sintética de NBN104
 55 <400> 69

 atgaagtggg tgaccttcct gctgttcctg ctgttcactc ccggcgatgc cttcgctgcc 60
 gccggcgctc gaggctgccg gctgcgggtc cagctgggtc ctgtgcgggc cctgggcctg 120
 60 ggccaccggg ccgacgagct ggtgcgggtc cggttctgct ccggctcctg ccggcgggcc 180
 cggccccctc acgacctgtc cctggcctcc ctgctggggc ccggcgccct ggggcctcct 240
 cctggctccc ggcctgtgtc ccagccttgc tgccggccta cccggtacga ggccgtgtcc 300
 65 ttcattggacg tgaactccac ctggcggacc gtggaccggc tgtccgccac cgcctgcggc 360
 tgctggggt ga 372

ES 2 353 457 T3

<210> 70

<211> 123

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido señal de albúmina de rata modificado - NBN104 sintética

10

<400> 70

15

Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ile Ser Gly Asp
1 5 10 15

Ala Phe Ala Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu

20

20

25

30

Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val
35 40 45

25

Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His
50 55 60

30

Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro
65 70 75 80

Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr
85 90 95

35

Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp
100 105 110

40

Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
115 120

<210> 71

<211> 81

45

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

50

<223> oligonucleótido sintético

<400> 71

55

aagcttgcta gcatgaattc atctcgaggc tgccggctgc ggtccagct ggtgcctgtg 60

cgggccctgg gcctgggcca c 81

60

<210> 72

<211> 81

<212> ADN

65

<213> secuencia artificial

<220>

ES 2 353 457 T3

	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 72	
5	ttctgtctcgg gctcctgcgg gggggcccg tccctcacc accgtgccct ggcctccctg	60
	ctggggcgcg gcgccctgcg g	81
10	<210> 73	
	<211> 81	
	<212> ADN	
15	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
20	<400> 73	
25	cagccttgct gccggcctac ccggtaccg gccgtgtcct tcatggacgt gaactccacc	60
	tggcgggaccg tggaccggct g	81
	<210> 74	
30	<211> 81	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 74	
40	ggcccgcggg caggagccgg agcagaaccg gaaccgcacc agctcgtcgg accggtggcc	60
	caggcccagg gcccgcacag g	81
45	<210> 75	
	<211> 81	
	<212> ADN	
50	<213> secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 75	
60	gtaccgggta ggccggcagc aaggctggga cacaggccgg gagccaggag gaggccgcag	60
	ggcgccggcg ccagcaggg a	81
65	<210> 76	
	<211> 78	
	<212> ADN	

ES 2 353 457 T3

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> oligonucleótido sintético

<400> 76

10	cttgggaattg tgcacggatc ctcagcccag gcagccgcag gcggtggcgg acagccggtc	60
	cacggtccgc caggtgga	78

15 <210> 77

<211> 55

<212> ADN

<213> secuencia artificial

20

<220>

<223> oligonucleótido sintético

25 <400> 77

30	aagcttagct agcggatcca tgaagtgggt gaccttcctg ctgctgctgt tcata	55
----	---	-----------

<210> 78

<211> 61

<212> ADN

35

<213> secuencia artificial

<220>

40 <223> oligonucleótido sintético

<400> 78

45	ggcagcctcg agcgcggcg gcggagaagg cggagccgga gatgaacagc agcagcagga	60
	a	61

<210> 79

50

<211> 35

<212> ADN

<213> secuencia artificial

55

<220>

<223> oligonucleótido sintético

60 <400> 79

65	aagcttagct agcggatcca tggctacagg taagc	35
----	---	-----------

<210> 80

<211> 54

ES 2 353 457 T3

	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 80	
10	aagcttagct agcggatcca tggagctggg cctggggcgc ctgtccaccc tgtc	54
15	<210> 81	
	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
25	<400> 81	
	ggcggcagcc tgcctgtgg cctaccctgg ccgcctggc cctgtgtcc tccgt	55
30	<210> 82	
	<211> 492	
	<212> ADN	
35	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia del ácido nucleico deltapro-113 humano	
40	<400> 82	
	tataggatcc gccaccatgg aacttggact tggaggcctc tccacgctgt cccactgccc	60
45	ctggcctagg cggcagcctg cctgtgtggc caccctggcc gctctggctc tgcctgagcag	120
	cgctgcagag gccgctgggg gcccgggcag ccgcgctcgg gcagcggggg cgcggggctg	180
	ccgcctgcgc tcgcagctgg tgccgggtgcg cgcgctcggc ctggggccacc gctccgacga	240
	gctggtgcgt ttccgcttct gcagcggctc ctgccgcgc gcgcgctctc cacacgacct	300
50	cagcctggcc agcctactgg gcgcgggggc cctgcgaccg cccccgggct cccggcccgt	360
	cagccagccc tgctgccgac ccacgcgcta cgaagcggtc tccttcatgg acgtcaacag	420
	cacctggaga accgtggacc gcctctccgc caccgcctgc ggctgcctgg gctgagggt	480
55	cgctcgagta ta	492
60		
65		