



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 347**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02733095 .0**  
86 Fecha de presentación : **08.03.2002**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1368054**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.2003**

54 Título: **Uso de proteínas de la cadena neural para tratar tumores.**

30 Prioridad: **08.03.2001 US 273957 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2008**

73 Titular/es: **Nymox Pharmaceutical Corporation**  
**Suite 306, 9900 Cavendish Boulevard**  
**St. Laurent, Quebec H4M 2V2, CA**

72 Inventor/es: **Averback, Paul**

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

Uso de proteínas de la cadena neural para tratar tumores.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se dirige al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la cadena neural para la producción de una composición para tratar tumores. La composición se puede administrar por vía intramuscular, oral, intravenosa, intratecal, intratumoral, intranasal, tópica, transdérmica, etc., bien sola bien conjugada con un soporte.

**Antecedentes de la invención**

La esencia de muchos tratamientos y procedimientos médicos implica la eliminación o destrucción de tejido dañino o no querido. Los ejemplos de tales tratamientos importantes incluyen la eliminación quirúrgica de neoplasias cancerosas, la destrucción de tumores metastáticos a través de quimioterapia, y la reducción de la hiperplasia glandular (por ejemplo, de próstata). Otros ejemplos incluyen la eliminación del vello facial no deseado, la eliminación de verrugas, y la eliminación de tejido graso no deseado.

Existe una necesidad evidente de un agente eficaz que destruya y por lo tanto facilite la eliminación de o inhiba el crecimiento adicional de células tumorales dañinas o no deseadas pero que tenga principalmente efectos locales y toxicidad sistémica mínima o ausente.

Las proteínas de la cadena neural y sus moléculas relacionadas son tales agentes.

25 *Cáncer e hiperplasias benignas*

El cáncer es una anomalía en los mecanismos reguladores internos de una célula que da como resultado un crecimiento incontrolado y la reproducción de la célula. Las células normales forman tejidos, y cuando estas células pierden su capacidad de comportarse como una unidad especificada, controlada y coordinada (desdiferenciación) el defecto produce desorden entre la población de células. Cuando esto sucede, se forma un tumor.

Las hiperplasias benignas de tejidos son anomalías en las que es deseable eliminar células de un organismo. Los tumores benignos son proliferaciones celulares que no se metastatizan por todo el cuerpo pero, sin embargo, producen síntomas de la enfermedad. Tales tumores pueden ser letales si están situados en áreas inaccesibles en órganos tales como el cerebro. Hay tumores benignos de órganos incluyendo pulmón, cerebro, piel, glándula pituitaria, tiroides, corteza y médula adrenal, ovario, útero, testículo, tejido conjuntivo, músculo, intestinos, oído, nariz, garganta, amígdalas, boca, hígado, vesícula biliar, páncreas, próstata, corazón, y otros órganos.

40 *Tratamientos del cáncer*

La cirugía es normalmente el primer paso en el tratamiento del cáncer. El objetivo de la cirugía varía. A veces se utiliza para eliminar tanto como es posible del tumor evidente, o al menos "reducirlo" (eliminar la mayoría de la masa del tumor de modo que hay menos que necesita ser tratado por otros medios). Dependiendo del tipo y localización del cáncer, la cirugía también puede proporcionar cierto alivio sintomático al paciente. Por ejemplo, si un cirujano puede eliminar una gran parte de un tumor cerebral en expansión, la presión en el interior del cráneo disminuirá, produciendo mejora en los síntomas del paciente.

No todos los tumores son tratables por cirugía. Algunos pueden estar localizados en partes del cuerpo que hace imposible que se eliminen completamente. Ejemplos de estos serían tumores en el tronco del encéfalo (una parte del cerebro que controla la respiración) o un tumor que ha crecido dentro y alrededor de un vaso circulatorio principal. En estos casos, el papel de la cirugía está limitado debido al alto riesgo asociado con la eliminación del tumor.

En algunos casos, la cirugía no se utiliza para reducir un tumor porque simplemente no es necesario. Un ejemplo es el linfoma de Hodgkin, un cáncer de los nódulos linfáticos que responde muy bien a combinaciones de quimioterapia y terapia de radiación. En el linfoma de Hodgkin, la cirugía raramente se necesita para alcanzar la cura, pero casi siempre se utiliza para establecer un diagnóstico.

La quimioterapia es otra forma común de tratamiento del cáncer. Esencialmente, implica el uso de medicaciones (normalmente dadas por la boca o inyección) que específicamente atacan a las células que se dividen rápidamente (como las que se encuentran en un tumor) por todo el cuerpo. Esto hace la quimioterapia útil en el tratamiento de cánceres que ya se han metastatizado, así como tumores que tienen una alta posibilidad de expandirse a través de los sistemas sanguíneo y linfático pero que no son obvios más allá del tumor primario. La quimioterapia también se puede utilizar para aumentar la respuesta de tumores localizados a la cirugía y la terapia de radiación. Este es el caso, por ejemplo, para algunos cánceres de la cabeza y el cuello.

Desgraciadamente, otras células en el cuerpo humano que también se dividen normalmente con rapidez (tal como el revestimiento del estómago y el pelo) también se ven afectadas por la quimioterapia. Por esta razón, algunos (aunque

no todos) agentes de quimioterapia inducen náusea o pérdida de pelo. Estos efectos secundarios son temporales, y los médicos tienen medicaciones que pueden proporcionar para ayudar a mitigar muchos de estos efectos secundarios. De este modo, en general, el tratamiento de quimioterapia son bien tolerados por los pacientes. Según ha aumentado el conocimiento, los investigadores han ideado agentes quimioterapéuticos más nuevos que no son solo mejores matando las células cancerosas, sino que también tienen efectos secundarios menores para el paciente.

La quimioterapia se administra a los pacientes de varios modos. Algunos son píldoras que se toman diariamente o una vez a la semana o algún otro programa y algunos se administran mediante una inyección intravenosa. Para la quimioterapia de inyección, el paciente va a la consulta del médico o al hospital para el tratamiento. Otros agentes quimioterapéuticos requieren infusión continua en la corriente sanguínea, 24 horas al día. Para estos tipos de quimioterapia, se realiza un procedimiento quirúrgico pequeño para implantar una pequeña bomba que lleva el paciente. La bomba administra entonces la medicación lentamente. En muchos casos, se coloca un puerto permanente en la vena del paciente para eliminar la exigencia de pinchazos de aguja repetidos.

La terapia de radiación es otra arma normalmente utilizada en la lucha contra el cáncer. La radiación mata el cáncer dañando el ADN en las células tumorales. La radiación se “aplica” en dos formas posibles. La primera, y más común, implica dirigir un haz de radiación al paciente de una forma altamente precisa, centrándose en el tumor. Para hacer esto, un paciente se tumba en una mesa y el haz se mueve alrededor de él/ella. Esto solo lleva un par de minutos, pero se hace cinco días a la semana durante 3-6 semanas (dependiendo del tipo de tumor), para alcanzar una “dosis” total particular prescrita.

Otro método de radiación empleado algunas veces, llamado braquiterapia, implica coger pastillas radioactivas (“semillas”) o hilos e implantarlos en el cuerpo en el área del tumor. Los implantes pueden ser temporales o permanentes. Para implantes permanentes, la radiación en las semillas “decae” o desvanece durante un período de días o semanas de modo que el paciente no está radiactivo. Para implantes temporales, la dosis entera de radiación se da normalmente en alrededor de dos días, y el paciente debe permanecer en el hospital durante este tiempo. Para ambos tipos de braquiterapia, la radiación se da generalmente a un área muy localizada para ganar control local sobre un cáncer (opuesto a tratar el cuerpo entero, como hace la quimioterapia).

Se puede remitir a algunos pacientes altamente seleccionados para trasplante de médula ósea. Este procedimiento normalmente se realiza porque un paciente tiene un cáncer que es particularmente agresivo o porque tienen un cáncer que ha reaparecido después de ser tratado con terapia convencional. El trasplante de médula ósea es un procedimiento complicado. Existen varios tipos, y varían en su potencial para producir efectos secundarios y cura. La mayoría de los trasplantes se realizan en centros especiales, y en muchos casos su uso se considera de investigación.

Existen algunas otras terapias, aunque la mayoría de ellas se está investigando todavía en ensayos clínicos y no se han constituido en cuidados estándar. Los ejemplos incluyen el uso de inmunoterapia, anticuerpos monoclonales, factores anti-angiogénesis, y terapia génica.

**Inmunoterapia:** Existen varias técnicas diseñadas para ayudar al sistema inmune del paciente a luchar contra el cáncer, bastante distante de la radiación o quimioterapia. A menudo, para alcanzar el objeto los investigadores inyectan al paciente con una vacuna especialmente derivada. La mayoría de la investigación en este área se ha realizado en melanoma, aunque ahora también se tiene como objetivo otros cánceres.

**Anticuerpos monoclonales:** Estas son proteínas pequeñas que están especialmente diseñadas para unirse a las células cancerosas (y no a las células normales) aprovechando las diferencias entre las células cancerosas y no cancerosas en sus membranas celulares. Antes de administrar los anticuerpos al paciente, normalmente se “pegan” (unen) a varios compuestos citotóxicos o se hacen radiactivos, de modo que el anticuerpo tiene como objetivo preferentemente las células cancerosas, distribuyendo de este modo el agente tóxico a las células deseadas.

**Factores de anti-angiogénesis:** Puesto que las células cancerosas se dividen rápidamente y los tumores crecen, pronto el suministro de sangre puede ser insuficiente. Para compensar por esto, algunos tumores secretan un compuesto que se ha mostrado que ayuda a inducir el crecimiento de vasos sanguíneos en su cercanía, asegurando así a las células cancerosas el suministro continuo de nutrientes. Recientemente, investigadores han estudiado formas de parar este proceso (parar el crecimiento de vasos sanguíneos).

**Terapia génica:** El cáncer es el producto de una serie de mutaciones que finalmente llevan a la producción de una célula cancerosa y su proliferación excesiva. El cáncer se puede tratar introduciendo genes en las células cancerosas que actúen para controlar o parar la proliferación del cáncer, activar en las células los mecanismos celulares programados para destruir las células, aumentar el reconocimiento inmune de la célula, o expresar una pro-droga que se convierte en un metabolito tóxico o una citoquina que inhibe el crecimiento del tumor.

### *Tratamiento de tumores benignos*

Los tumores benignos también se pueden tratar mediante varios métodos incluyendo cirugía, radioterapia, terapia con drogas, ablación térmica o eléctrica, crioterapia, y otros. Aunque los tumores benignos no se metastatizan, pueden crecer mucho y pueden reproducirse. La extirpación quirúrgica de tumores benignos tiene todas las dificultades y efectos secundarios de la cirugía en general y a menudo se debe realizar repetidamente para algunos tumores benignos, tal como para adenomas de pituitaria, meningiomas del cerebro, hiperplasia de próstata, y otros.

*Proteínas de la cadena neural*

Las proteínas de la cadena neural (NTP) son una familia nueva de proteínas de cerebro recientemente caracterizadas. Un miembro de esta familia, AD7C-NTP, es una fosfoproteína asociada a la membrana de ~41 kD con funciones relacionada con la formación de neuritas y la muerte celular (de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100: 3039-3104 (1997); de la Monte *et al.*, *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999); de la Monte SM y Wands JR, *Journal of Alzheimer's Disease*, 3: 345-353 (2001)). Se han identificado y descrito el gen y la secuencia predicha de la proteína para AD7C-NTP (de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100: 3039-3104 (1997)). Además de la especie de ~41 kD, se han identificado otras especies de proteínas de la cadena neural (~26 kD, ~21 kD, ~17 kD, y ~15 kD) y se han asociado con tumores neuroectodérmicos, astrocitomas, y glioblastomas y con lesión debido a hipoxia, isquemia, o infarto cerebral (Xu *et al.*, *Cancer Research*, 53: 3823-3829; de la Monte *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10): 1038-50 (1996); de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2): 26-35 (1996); de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 135(2): 118-125 (1996); de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100: 3039-3104 (1997); y de la Monte *et al.*, *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999)).

La proteína de la cadena neural se ha descrito y reivindicado en las patentes de EE.UU. Nos. 5948634; 5948888; y 5830670, todas para "Neural Thread Protein Gene Expression and Detection of Alzheimer's Disease" y en la patente de EE.UU. No. 6071705 para "Method of Detecting Neurological Disease or Dysfunction".

Existen evidencias convincentes que unen la AD7C-NTP con la enfermedad de Alzheimer (EA). El ARNm de AD7C-NTP está aumentado en cerebro con EA comparado con controles; los niveles de proteína AD7C-NTP en cerebro y en LCR son mayores en EA que en controles; y la inmunorreactividad de AD7C-NTP se encuentra en placas seniles, en ovillos neurofibrilares (NFT), en neuronas en degeneración, hebras de neuropilo y brotes de distrofia neurótica en cerebros con EA y síndrome de Down (Ozturk *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 419-423 (1989); de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 86(3): 1004-13 (1990); de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 113(2): 152-64 (1992); de la Monte *et al.*, *Ann. Neurol.*, 32(6): 733-42 (1992); de la Monte *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10): 1038-50 (1996); de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2): 26-35 (1996); de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 135(2): 118-125 (1996); de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100: 3039-3104 (1997); y de la Monte *et al.*, *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999)). AD7C-NTP también se ha identificado en tejido cerebral con síndrome de Down (Wands *et al.*, Publicación internacional de patente No. WO 90/06993; de la Monte *et al.*, *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999)). AD7C-NTP también se ha ligado al proceso de muerte celular en la enfermedad de Alzheimer (de la Monte y Wands, *J. Neuropathol. and Exp. Neuro.*, 60: 195-207 (2001)).

Permanece una necesidad en la técnica para tratamientos nuevos, menos tóxicos para tratar tumores. La presente invención satisface esas necesidades.

**Compendio de la invención**

La presente invención se dirige al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la cadena neural para la producción de una composición para tratar tumores. La composición se puede administrar a un mamífero en necesidad de una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de la cadena neural (NTP).

NTP se puede administrar sola o conjugada con un soporte o un anticuerpo. Además, NTP se puede utilizar conjuntamente con otras terapias para tratar tumores benignos y malignos.

Tanto la descripción general precedente como la descripción detallada que sigue son ejemplares y explicativas y se proponen proporcionar una explicación adicional de la invención como se reivindica. Otros objetos, ventajas, y características nuevas estarán en seguida claras para aquellos expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

**Breve descripción de las figuras**

Figura 1: muestra la secuencia completa de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico del gen de AD7c-NTP y de la proteína AD7c-NTP producto de ese gen (secuencias 120 y 121 de las patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888, de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100: 3039-3104 (1997); acceso a NCBI Entrez-Protein #AAC08737; PID g3002527) [SEQ ID NO: 1].

Figura 2: muestra la secuencia completa de aminoácidos de la proteína de la cadena neural de 122 aminoácidos (secuencia 40 de las patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888; Acceso a NCBI Entrez-Protein #AAE25447 PID g10048540) [SEQ ID NO: 2].

Figura 3: muestra la secuencia completa de aminoácidos de la proteína de la cadena neural de 112 aminoácidos (Acceso a NCBI Entrez-Protein #XP\_032307 PID g15928971) [SEQ ID NO: 3].

Figura 4: muestra la secuencia completa de aminoácidos de una proteína de 106 aminoácidos similar a la proteína de la cadena neural (Acceso a NCBI Entrez-Protein #AAH14951 PID g15928971) [SEQ ID NO: 4].

Figura 5: muestra la secuencia completa de aminoácidos de una proteína de 106 aminoácidos similar a la proteína de la cadena neural (Acceso a NCBI Entrez-Protein #XP\_039102 PID g18599339) [SEQ ID NO: 5].

Figura 6: muestra la secuencia completa de aminoácidos de la proteína de la cadena neural de 98 aminoácidos (secuencia 30 de las patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888; Acceso a NCBI Entrez-Protein #AAE25445, PID g10048538) [SEQ ID NO: 6].

Figura 7: muestra la secuencia completa de aminoácidos de la proteína de la cadena neural de 75 aminoácidos (secuencia 48 de las patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888; Acceso a NCBI Entrez-Protein #AAE25448 PID g10048541) [SEQ ID NO: 7].

Figura 8: muestra la secuencia completa de aminoácidos de la proteína de la cadena neural de 68 aminoácidos (secuencia 36 de las patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888; Acceso de NCBI Entrez-Protein #AAE25446 PID g10048539) [SEQ ID NO: 8].

Figura 9: muestra la secuencia completa de aminoácidos de la proteína de 61 aminoácidos similar a la proteína de la cadena neural (Acceso de NCBI Entrez-Protein #AAH02534, PID g12803421) [SEQ ID NO: 9].

Figura 10: muestra necrosis de tejido subcutáneo y músculo en el sitio de inyección de AD7C-NTP, 24 horas después de la inyección. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina y eosina, x400;

Figura 11: muestra necrosis de tejido subcutáneo y músculo en el sitio de inyección de AD7C-NTP, 24 horas después de la inyección. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina y eosina, x400;

Figura 12: muestra necrosis de tejido subcutáneo y músculo en el sitio de inyección de AD7C-NTP, 24 horas después de la inyección. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina y eosina, x400;

Figura 13: muestra necrosis de tejido subcutáneo y músculo en el sitio de inyección de AD7C-NTP, 24 horas después de la inyección. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina y eosina, x1000;

Figura 14: muestra necrosis de tejido subcutáneo y músculo en el sitio de inyección de AD7C-NTP, 24 horas después de la inyección. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina y eosina, x1000;

Figura 15: muestra necrosis tumoral 24 horas después de la inyección de AD7C-NTP. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina y eosina, x200;

Figura 16: muestra necrosis tumoral 24 horas después de la inyección de AD7C-NTP. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina y eosina, x400;

Figura 17: muestra necrosis tumoral 24 horas después de la inyección de AD7C-NTP. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina y eosina, x1000;

Figura 18: muestra necrosis tumoral 2 semanas después de la inyección de AD7C-NTP. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina y eosina, x40; y

Figura 19: muestra necrosis tumoral 2 semanas después de la inyección de AD7C-NTP. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina y eosina, x200.

## Descripción detallada de las formas de realización preferidas

### Definiciones

Los términos y frases utilizados aquí se definen como explica a continuación a menos que se especifique de otra manera.

El término “AD7c-NTP” se refiere a la proteína de ~41 kD y al gen y las secuencias de ácido nucleico que la codifican descritas en de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100: 3039-3104 (1997), en las secuencias 120 y 121 de las patentes de EE.UU. nos. 5948634, 5948888 y 5830670 y en GenBank #AF010144, secuencias de ácido nucleico y proteína que se ilustran en la Figura 1. El término “AD7c-NTP” también incluye fragmentos, variantes y derivados biológicamente activos, homólogos, péptidos miméticos, péptidos D-inversos, y enantiómeros de AD7c-NTP.

El término “NTP” o “proteína de cadena neural (neural thread protein)” se refiere a proteínas de cadena neural y moléculas relacionadas (incluyendo proteína de cadena pancreática) y a las secuencias de ácido nucleico que codifican estas proteínas, e incluye (pero no está limitado a) las siguientes proteínas y secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos para estas proteínas:

(a) AD7c-NTP;

(b) las especies de proteína de la cadena neural de ~42, ~26, ~21, ~17, ~14, y ~8 kD según se describen en las patentes de EE.UU. Nos. 5948634, 5948888, 5830670 y 6071705 y en de la Monte *et al.*, *J. Neuropathol.*

## ES 2 295 347 T3

*Exp. Neurol.*, 55(10): 1038-50 (1996), de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2): 26-35 (1996), de la Monte *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 135(2): 118-125 (1996), de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100: 3039-3104 (1997) y de la Monte *et al.*, *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999);

- (c) proteínas específicamente reconocidas por el anticuerpo monoclonal #2 en depósito con la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va, con el número de acceso HB-12546 o el anticuerpo monoclonal #5 en depósito con la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va, con el número de acceso HB-12545;
- (d) proteínas codificadas por el gen AD7c-NTP;
- (e) la proteína de la cadena neural de 122 aminoácidos descrita en la secuencia 40 de la patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888 y en la lista de NCBI Entrez-Protein con el acceso #AAE25447, PID g10048540, la secuencia de aminoácidos que se ilustra en la Figura 2;
- (f) la proteína de la cadena neural de 112 aminoácido que está en la lista NCBI Entrez-Protein con el acceso #XP\_032307, PID g14725132, la secuencia de aminoácidos que se ilustra en la Figura 3;
- (g) una proteína de 106 aminoácido similar a la proteína de la cadena neural que está en la lista NCBI Entrez-Protein con el acceso #AAH14951, PID g15928971, la secuencia de aminoácidos que se ilustra en la Figura 4;
- (h) una proteína de 106 aminoácido similar a la proteína de la cadena neural que está en la lista NCBI Entrez-Protein con el acceso #XP\_039102, PID g18599339, la secuencia de aminoácidos que se ilustra en la Figura 5;
- (i) la proteína de la cadena neural de 98 aminoácidos descrita en la secuencia 30 de las patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888 y en la lista de NCBI Entrez-Protein con el acceso #AAE25445, PID g10048538, la secuencia de aminoácidos que se ilustran en las Figura 6;
- (j) la proteína de la cadena neural de 75 aminoácidos descrita en la secuencia 48 de las patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888 y en la lista de NCBI Entrez-Protein con el acceso #AAE25448, PID g10048541, la secuencia de aminoácidos que se ilustra en la Figura 7;
- (k) la proteína de la cadena neural de 68 aminoácidos descrita en la secuencia 36 de las patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888 y en la lista de NCBI Entrez-Protein con el acceso #AAE25446, PID g10048539, la secuencia de aminoácidos que se ilustra en la Figura 8;
- (l) la proteína de 61 aminoácido similar a la proteína de la cadena neural que está en la lista NCBI Entrez-Protein con el acceso #AAH02534, PID g12803421, la secuencia de aminoácidos que se ilustra en la Figura 9;
- (m) proteína de la cadena pancreática;
- (n) la proteína neural de la cadena pancreática (nPTP) descrita en la patente de EE.UU. No. 6071705; y
- (o) proteínas específicamente reconocidas por los anticuerpos producidos por un hibridoma del grupo que consiste en HB 9934, HB 9935, y HB 9936 depositados en la Colección Americana de Cultivos Tipo.

El término "NTP" también incluye los fragmentos, variantes y derivados biológicamente activos, homólogos, péptidos miméticos, péptidos D-inversos, y enantiómeros de NTP.

El término "biólogicamente activo" se refiere a una proteína, fragmento de polipéptido, variante, derivado, homólogo, péptido D-inverso, péptido mimético, o enantiómero que tiene la capacidad de destruir y por lo tanto facilitar la eliminación de o la inhibición de crecimiento adicional de células y tejido dañinos o no deseados pero que tiene principalmente efectos locales y toxicidad sistémica mínima o ausente e incluye (pero no está limitado a) la capacidad de matar o disminuir la viabilidad de células en el ensayo de citotoxicidad de cultivo de células del Ejemplo 1 aquí, la capacidad de causar pérdida celular y/o necrosis de tejidos en el ensayo de tejidos *in vivo* en Ejemplo 2 aquí, o la capacidad de causar pérdida celular, necrosis de tejido o reducción de tumor en el ensayo tumoral del Ejemplo 3 aquí.

El término "fragmento" se refiere a una proteína o polipéptido biológicamente activo que consiste en una subsecuencia continua de la secuencia de aminoácidos de una proteína NTP o variante, derivado, homólogo, péptido D-inverso, o enantiómero de la misma e incluye fragmentos naturales tal como variantes de ajuste y fragmentos que resultan de actividad proteasa natural *in vivo*. Tal fragmento puede estar truncado en el amino terminal, el carboxi terminal, y/o internamente (tal como por ajuste natural), y puede ser una variante o un derivado de una proteína NTP. Tales fragmentos se pueden preparar con o sin una metionina amino terminal. El término "fragmento" incluye frag-

mentos, que sean idénticos o diferentes, de la misma proteína NTP o con una secuencia de aminoácidos contigua en común o no, unidos bien directamente o bien a través de un enlazador.

El término “variante” se refiere a una proteína o polipéptido biológicamente activo en el que se presentan una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos comparados con la secuencia de aminoácidos de una proteína NTP e incluye variantes alélicas naturales o variantes de ajuste alternativo de una proteína NTP. El término “variante” incluye la sustitución de uno o más aminoácidos en una secuencia peptídica con aminoácidos similares u homólogos o aminoácidos disimilares. Existen muchas escalas en las que se pueden clasificar los aminoácidos como similares u homólogos. (Gunnar von Heijne, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, p. 123-39 (Academic Press, Nueva York, NY 1987). Las variantes preferidas incluyen sustituciones de alanina en una o más posiciones de aminoácidos. Otras sustituciones preferidas incluyen sustituciones conservadoras que tienen poco o ningún efecto sobre la carga neta total, polaridad, o hidrofobicidad de la proteína. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla I a continuación.

TABLA I

*Sustituciones conservadoras de aminoácidos*

20	Básicos:	arginina
		lisina
25		histidina
	Ácidos:	ácido glutámico
		ácido aspártico
30	Polares no cargados:	glutamina
		asparagina
		serina
35		treonina
		tirosina
40	No polares:	fenilalanina
		triptófano
		cisteína
45		glicina
		alanina
		valina
50		prolina
		metionina
		leucina
55		isoleucina

## ES 2 295 347 T3

La Tabla II expone otro esquema de sustituciones de aminoácidos:

TABLA II

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Residuo original	Sustituciones
Ala	gly; ser
Arg	lys
Asn	gln; his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	ala; pro
His	asn, gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; tyr; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

Otras variantes pueden consistir en sustituciones de aminoácidos menos conservadoras, tal como seleccionar residuos que difieren más significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que tengan un efecto más significativo en la función son aquellas en las que (a) glicina y/o prolina se sustituyen por otro aminoácido o se delecciona o inserta; (b) un residuo hidrofílico, por ejemplo, seril o treonil se sustituye por (o mediante) un residuo hidrofóbico, por ejemplo, leucil, isoleucil, fenilalanil, valil o alanil; (c) un residuo de cisteína se sustituye por (o mediante) cualquier otro residuo; (d) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo lisil, arginil, o histidil, se sustituye por (o mediante) un residuo que tiene una carga electronegativa, por ejemplo, glutamil o aspartil; o (e) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo fenilalanina, se sustituye por (o mediante) uno que no tiene tal cadena lateral, por ejemplo glicina. Otras variantes incluyen aquellas diseñadas para generar un sitio(s) nuevo(s) de glicosilación y/o fosforilación, o aquellas diseñadas para deleccionar un sitio(s) existente(s) de glicosilación y/o fosforilación. Las variantes incluyen al menos una sustitución de aminoácido en un sitio de glicosilación, un sitio de rotura proteolítica y/o un residuo de cisteína. Las variantes también incluyen proteínas NTP, fragmentos, derivados, homólogos, péptidos D-inversos y antímeros con residuos adicionales de aminoácidos antes o después de la secuencia de aminoácidos de NTP en los péptidos enlazadores. Por ejemplo, se puede añadir un residuo de cisteína tanto al extremo amino como al carboxi de un fragmento de NTP para permitir la formación de un ciclo del fragmento de NTP mediante la formación de un puente disulfuro. El término “variante” también incluye variantes de fragmentos, derivados, homólogos, péptidos D-inversos y enantiómeros de NTP o AD7c-NTP.

El término “derivado” se refiere a una proteína o polipéptido biológicamente activo químicamente modificado que se ha modificado químicamente mediante un proceso natural, tal como procesamiento u otras modificaciones postraduccionales, pero también mediante técnicas de modificación química, como por ejemplo, mediante adición de una



o más moléculas de polietilenglicol, azúcares, fosfatos, y/o otras moléculas, donde la molécula o moléculas no están unidas de forma natural a las proteínas NTP salvajes. Los derivados incluyen sales. Tales modificaciones químicas están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en la voluminosa bibliografía de investigación, y son bien conocidas por los expertos en la materia. Se entenderá que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o diverso grado en varios sitios en una proteína o polipéptido dado. También, una proteína o polipéptido determinado puede contener varios tipos de modificaciones. Las modificaciones pueden suceder en cualquier lugar en una proteína o polipéptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos, y los extremos amino y carboxilo. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un grupo hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, formación de un ciclo, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de un anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a las proteínas, tal como arginilación, y ubiquitinación. Ver, por ejemplo, *Proteins-Structure And Molecular Properties*; 2ª Ed. T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1993) y Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects", páginas 1-12 en *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York (1983); Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol.* 182: 626-646 (1990) y Rattan *et al.*, "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 48-62 (1992). El término "derivados" incluye modificaciones químicas que dan como resultado que la proteína o el polipéptido se vuelvan ramificados o cíclicos, con o sin ramificaciones. Las proteínas o polipéptidos cíclicos, ramificados y ramificados circulares se pueden producir a través de procesos postraduccionales naturales y se pueden hacer también mediante métodos enteramente sintéticos. El término "derivado" también incluye derivados de fragmentos, variantes, homólogos péptidos D-inversos, péptidos miméticos, y enantiómeros.

El término "homólogo" se refiere a una proteína biológicamente activa que es al menos el 75 por ciento idéntica en su secuencia de aminoácidos a una proteína NTP o a AD7c-NTP, como puede ser el caso, según se determina mediante métodos estándar que se utilizan comúnmente para comparar la similitud en la posición de aminoácidos de dos polipéptidos. El grado de similitud o identidad entre dos proteínas se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo pero no estando limitados a aquellos descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W. ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin A.M. y Griffin, H.G. eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J. eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H. y Lipman, D. SIAM, *J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar el mayor emparejamiento entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas de ordenador disponibles públicamente. Los métodos de programas de ordenador preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, el paquete de programas de GCG (Devereux *et al.*, *Nucleic Acid Research*, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, y FASTA, Atschul, S.F. *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 215: 403-410 (1990). El programa BLAST X está disponible públicamente de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md, 20894; Altschul, S. *et al. J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990). Como ejemplo, utilizando un algoritmo de ordenador tal como GAP (Genetic Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), las dos proteínas o polipéptidos para los que el porcentaje de identidad de secuencia se va a determinar se alinean para un emparejamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos (el "tramo emparejado", según se determina mediante el algoritmo). Se utilizan una penalización de apertura de brecha (que se calcula como 3 veces la diagonal media; la "diagonal media" es la media de la diagonal de la matriz de comparación que se usa; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada aminoácido perfecto mediante la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de brecha (que es normalmente 1/10 veces de la penalización de apertura de brecha), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOUM 62 conjuntamente con el algoritmo. También se utiliza por el algoritmo una matriz de comparación estándar (ver Dayhoff *et al.* en *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, sup. 3 [1978] para la matriz de comparación PAM250; ver Henikoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10915-10919 [1992] para la matriz de comparación BLOSUM 62). Se calcula entonces el porcentaje de identidad mediante el algoritmo. Los homólogos tendrán típicamente una o más sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos cuando se comparan con NTP o AD7c-NTP.

El término "péptido mimético" se refiere a compuestos biológicamente activos que mimetizan la actividad biológica de un péptido o una proteína pero no son peptídicos en su naturaleza química, esto es, ya no contienen ningún enlace peptídico (esto es, enlaces amida entre aminoácidos). Aquí el término péptido mimético se utiliza en un sentido más amplio para incluir moléculas que ya no son completamente peptídicas en la naturaleza, tal como pseudopéptidos, semipéptidos y peptoides. Más adelante se describen ejemplos de péptidos miméticos en este sentido más amplio (donde parte de un péptido se sustituye por una estructura que carece de enlaces peptídicos). Los péptidos miméticos, ya sean completamente o parcialmente no peptídicos, según esta invención proporcionan una disposición espacial de grupos químicos reactivos que recuerda exactamente a la disposición tridimensional de los grupos activos en la proteína NTP en la que se basa el péptido mimético. Como resultado de esta geometría similar del sitio activo, el péptido mimético tiene efectos sobre sistemas biológicos que son similares a la actividad biológica del péptido. Los péptidos miméticos de esta invención son preferiblemente sustancialmente similares tanto en la forma tridimensional como en la actividad

biológica a los péptidos NTP explicados anteriormente. Los ejemplos de métodos de modificar estructuralmente un péptido conocidos en la técnica para crear péptidos miméticos incluyen la inversión de los centros quirales del esqueleto produciendo estructuras con residuos de D-aminoácidos que pueden, particularmente en el N-terminal, llevar a aumento en la estabilidad para degradación proteolítica sin afectar adversamente a la actividad. Un ejemplo se da en el artículo “Tritiated D-ala-sup.1-Peptide T Binding”, Smith C.S. *et al.*, *Drug Development Res.*, 15, pp. 371-379 (1998). Un segundo método es alterar la estructura cíclica para estabilidad, tal como imidas y lactamas intercadena de N a C (Ede *et al.*, en Smith y Rivier (Eds.) “Peptides: Chemistry and Biology”, Escom, Leiden (1991), pp. 268-270). Un ejemplo de esto se da en los compuestos similares a timopentina conformacionalmente restringidos, tal como los divulgados en la patente de EE.UU. No. 4457489 (1985), Goldstein *et al.*, la divulgación de la cual se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad. Un tercer método es sustituir enlaces peptídicos en el péptido NTP por enlaces pseudopeptídicos que confieren resistencia a proteólisis. Se han descrito varios enlaces pseudopeptídicos que en general no afectan a la estructura y actividad biológica del péptido. Un ejemplo de esta aproximación es sustituir enlaces pseudopeptídicos retro-inverso (“Biologically active retroinverso analogues of thymopentin”, Sisto A. *et al.*, en Rivier, J.E. y Marshall, G.R. (eds) “Peptides, Chemistry, Structure and Biology”, Escom, Leiden (1990), pp. 722-773) y Dalpozzo, *et al.*, (1993) *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41: 561-566. Según esta modificación, las secuencias de aminoácidos de los péptidos pueden ser idénticas a las secuencias de los péptidos NTP descritos anteriormente, excepto que uno o más de los enlaces peptídicos se sustituye por un enlace pseudopeptídico retro-inverso. Preferiblemente se sustituye el enlace peptídico más N-terminal, ya que tal sustitución conferirá resistencia a proteólisis por exopeptidasas que actúan en el N-terminal. Se pueden hacer más modificaciones sustituyendo los grupos químicos de los aminoácidos por otros grupos químicos de estructura similar. Otro enlace pseudopeptídico adecuado que se sabe que aumenta la estabilidad a la rotura enzimática sin o con poca pérdida de actividad biológica es el enlace pseudopeptídico isótero reducido (Couder *et al.*, (1993) *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41: 181-184). De este modo, las secuencias de aminoácidos de estos péptidos pueden ser idénticas a las secuencias de una proteína NTP, excepto que uno o más de los enlaces peptídicos se sustituye por un enlace pseudopeptídico isótero. Preferiblemente se sustituye el enlace peptídico más N-terminal, ya que tal sustitución conferirá resistencia a proteólisis por exopeptidasas que actúan en el N-terminal. La síntesis de péptidos con uno o más enlaces pseudopeptídicos isótero reducido es conocida en la técnica (Couder *et al.*, (1993), citado anteriormente). Otros ejemplos incluyen la introducción de enlaces cetometileno o metilsulfuro para sustituir enlaces peptídicos.

Los derivados peptoides de los péptidos NTP representan otra clase de péptido miméticos que mantienen los determinantes estructurales importantes para la actividad biológica, sin embargo eliminan los enlaces peptídicos, confiriendo de esta manera resistencia a la proteólisis (Simon *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 9367-9371). Los peptoides son oligómeros de glicinas N-sustituidas. Se han descritos varios grupos N-alquilo, cada uno correspondiente a la cadena lateral de un aminoácido natural (Simon *et al.*, (1992), citado anteriormente). Se sustituyen alguno o todos los aminoácidos de la NTP con las glicinas N-sustituidas correspondientes a los aminoácidos sustituidos.

El término “péptido D-inverso” se refiere a una proteína o péptido biológicamente activo que consiste en D-aminoácidos dispuestos en orden inverso cuando se compran con la secuencia de L-aminoácidos de una proteína NTP, fragmento, variante u homólogo. De este modo, el residuo carboxi terminal de una proteína NTP, fragmento, variante u homólogo de L-aminoácidos, se convierte en el amino terminal para el péptido de D-aminoácidos y así sucesivamente. Por ejemplo, el fragmento AD7c-NTP, HVGQAG, se convierte  $G_d A_d Q_d G_d V_d H_d$ , donde  $A_d$ ,  $G_d$ ,  $H_d$ ,  $Q_d$ , y  $V_d$  son los D-aminoácidos correspondientes a las L-aminoácidos A, G, H, Q y V respectivamente.

El término “enantiómero” se refiere a una proteína o péptido biológicamente activo donde uno o más de los residuos de L-aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de una proteína NTP, fragmento, variante u homólogo se sustituye con el correspondiente residuo(s) de D-aminoácido.

Se puede referir a los aminoácidos y residuos de aminoácidos descritos aquí según el código de una o de tres letras aceptado que se proporciona a continuación. A menos que se especifique de otra manera, estos aminoácidos o residuos de aminoácidos están en la forma natural del estereoisómero L.

TABLA III

		Símbolo de una letra	Símbolo de tres letras
5	Aminoácido		
	Alanina	A	Ala
10	Arginina	R	Arg
	Asparagina	N	Asn
	Ácido aspártico	D	Asp
15	Cisteína	C	Cys
	Glutamina	Q	Gln
	Ácido glutámico	E	Glu
20	Glicina	G	Gly
	Histidina	H	His
25	Isoleucina	I	Ile
	Leucina	L	Leu
	Lisina	K	Lys
30	Metionina	M	Met
	Fenilalanina	F	Phe
	Prolina	P	Pro
35	Serina	S	Ser
	Treonina	T	Thr
	Triptófano	W	Trp
40	Tirosina	Y	Tyr
	Valina	V	Val

#### Preparación de proteínas NTP y fragmentos

Las proteínas NTP (incluyendo AD7c-NTP, fragmentos, variantes, derivados, y homólogos) abarcadas por esta invención se pueden preparar utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia, tal como tecnología de ADN recombinante, síntesis de proteínas y aislamiento de NTP y AD7c-NTP naturales y fragmentos y variantes de las mismas.

Se puede preparar una proteína NTP utilizando métodos bien conocidos de tecnología de ADN recombinante tal como aquellos expuestos en Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1989]) y/o Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishers Inc., y Wiley and Sons, N.Y. [1994].

Un gen o ADNc que codifica una proteína NTP se puede obtener por ejemplo mediante cribado de una genoteca genómica o de ADNc, o mediante amplificación por PCR. Las sondas o cebadores útiles para el cribado de la genoteca se pueden generar basadas en información de secuencias para otros genes o fragmentos de genes conocidos de la misma o de una familia de genes relacionada, tal como, por ejemplo, motivos conservados encontrados en otras proteínas NTP. Además, en el caso de que se haya identificado un gen que codifica para una proteína NTP de una especie, se puede utilizar todo o una parte de ese gen como sonda para identificar genes homólogos de otras especies. Las sondas o cebadores se pueden utilizar para cribar genotecas de ADNc de varias fuentes de tejidos que se cree que expresan un gen NTP. Típicamente, se emplearán condiciones muy rigurosas para el cribado para minimizar el número de falsos positivos obtenidos del cribado.

Otro medio para preparar un gen que codifica una proteína NTP es emplear síntesis química utilizando métodos bien conocidos para el experto en la materia, tales como los descritos por Engels *et al.* (Angew. Chem. Intl. Ed., 28: 716-734 [1989]). Estos métodos incluyen, entre otros, los métodos de fosfotriéster, la fosforamidita, y el H-fosfonato para la síntesis de ácidos nucleicos. Un método preferido para tal síntesis química es la síntesis apoyada en polímeros utilizando química de fosforamidita estándar. Típicamente, el ADN que codifica una proteína NTP tendrá varios cientos de nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos de más de alrededor de 100 nucleótidos de longitud se pueden sintetizar en varios fragmentos utilizando estos métodos. Los fragmentos se pueden ligar después para formar la proteína NTP de longitud completa. Normalmente, el fragmento de ADN que codifica el amino terminal de la proteína tendrá un ATG, que codifica un residuo de metionina. Esta metionina puede estar o no presente en la forma madura de la proteína NTP, dependiendo de si la proteína producida en la célula huésped se diseña para ser secretada de esa célula.

El gen, ADNc, o fragmento del mismo que codifica la proteína NTP se puede insertar en un vector de expresión o amplificación apropiado utilizando técnicas de ligación estándar. El vector se selecciona típicamente para ser funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped de modo que la amplificación del gen y/o la expresión del gen puedan ocurrir). El gen, ADNc o fragmento del mismo que codifica la proteína NTP se puede amplificar/expresar en células huésped procariontes, de levaduras, de insecto (sistemas de baculovirus) y/o eucariotas. La selección de la célula huésped dependerá en parte de si la proteína NTP se tiene que glicosilar y/o fosforilar. Si es así, las células huésped de levadura, insecto o mamífero son preferibles.

Típicamente, los vectores utilizados en cualquiera de las células huésped tendrán una secuencia flanqueante en 5' (también denominada como "promotor") y otros elementos reguladores también tal como un potenciador(es), un elemento de origen de replicación, un elemento de terminación de la transcripción, una secuencia de intrón completa que contiene un sitio donante y aceptor de ajuste, una secuencia de péptido señal, un elemento de sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región múltiple de clonación para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar, y un elemento de marcador de selección. Cada uno de estos elementos se discute más adelante. Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia "etiqueta", esto es, un molécula de oligonucleótido situada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante de la proteína NTP; la molécula de oligonucleótido codifica poliHis (tal como hexaHis), u otra "etiqueta" tal como FLAG, HA (la hemaglutinina del virus de la gripe) o myc para los que existen anticuerpos disponibles comercialmente. Esta etiqueta está típicamente fusionada al polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como medio para la purificación por afinidad de la proteína NTP de la célula huésped. La purificación por afinidad se puede efectuar, por ejemplo, mediante cromatografía en columna utilizando anticuerpos contra la etiqueta como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta se puede eliminar posteriormente de la proteína NTP purificada por varios medios tal como utilizando ciertas peptidasas.

La bisagra y la región Fc de las inmunoglobulinas se podrían fusionar a cualquiera de los N-terminal o C-terminal de la proteína NTP por el experto en la materia. La proteína de fusión de Fc posterior se podría purificar mediante el uso de una columna de afinidad de Proteína A. Se sabe que Fc muestra una vida media farmacocinética larga *in vivo* y se ha determinado que las proteínas fusionadas a Fc muestran una vida media *in vivo* sustancialmente más larga que los homólogos no fusionados. Además, la fusión a la región Fc permite la dimerización/multimerización de la molécula que puede ser útil para la bioactividad de algunas moléculas.

La secuencia flanqueante en 5' puede ser homóloga (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heteróloga (esto es, de especies diferentes a la especie o cepa de la célula huésped), híbrida (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes en 5' de más de una fuente), sintética, o puede ser la secuencia flanqueante en 5' natural del gen de la proteína NTP. Como tal, la fuente de la secuencia flanqueante en 5' puede ser cualquier organismo unicelular procarionte o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante en 5' sea funcional en, y pueda ser activada por, la maquinaria de la célula huésped.

Las secuencias flanqueantes en 5' útiles en los vectores de esta invención se pueden obtener mediante cualquiera de los varios métodos bien conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias flanqueantes en 5' útiles aquí diferentes de las secuencias flanqueantes del gen de NTP se habrán identificado previamente mediante mapeo y/o mediante digestión por endonucleasas de restricción y se pueden aislar de esta forma de la fuente de tejido adecuada utilizando las endonucleasas de restricción adecuadas. En algunos casos, la secuencia completa de nucleótidos de la secuencia flanqueante en 5' puede ser conocida. Aquí, la secuencia flanqueante en 5' se puede sintetizar utilizando los métodos descritos anteriormente para la síntesis de ácidos nucleicos o clonación.

En el caso de que se conozca toda o parte de la secuencia flanqueante en 5', se puede obtener utilizando PCR y/o mediante cribado de una genoteca genómica con los oligonucleótidos adecuados y/o fragmentos de las secuencias flanqueantes en 5' de la misma u otras especies.

En el caso de que la secuencia flanqueante en 5' no sea conocida, se puede aislar un fragmento de ADN que contenga la secuencia flanqueante en 5' a partir de un trozo mayor de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento se puede llevar a cabo mediante digestión con endonucleasas de restricción utilizando una o más enzimas cuidadosamente seleccionadas para aislar el fragmento de ADN apropiado. Después de la digestión, se puede aislar el fragmento deseado mediante purificación en gel de agarosa, columna de Qiagen.RTM u otros métodos conocidos para el experto en la materia. La selección de las enzimas adecuadas para lograr este propósito será en seguida obvia para el experto en la materia.

El elemento de origen de replicación es típicamente una parte de los vectores de expresión procariotas que se adquieren comercialmente, y ayuda en la amplificación del vector en una célula huésped. La amplificación del vector hasta un cierto número de copias puede, en algunos casos, ser importante para una óptima expresión de la proteína NTP. Si el vector de elección no contiene un sitio de origen de replicación, se puede sintetizar uno químicamente basado en una secuencia conocida, y ligarlo en el vector. El elemento de terminación de la transcripción típicamente está situado en el extremo 3' de la secuencia codificante de la proteína NTP y sirve para terminar la transcripción de la proteína NTP. Normalmente, el elemento de terminación de la transcripción en células procariotas en un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia de poli T. Aunque que el elemento se clona fácilmente a partir de una genoteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también se puede sintetizar fácilmente utilizando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos tales como los descritos anteriormente.

Un elemento de un gen marcador de selección codifica una proteína necesaria para la supervivencia y crecimiento de una célula huésped en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo ampicilina, tetraciclina, o kanamicina para células procariotas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de las células; o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos. Los marcadores de selección preferidos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina, y el gen de resistencia a tetraciclina.

El elemento de unión al ribosoma, comúnmente llamado secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o secuencia Kozak (eucariotas), normalmente es necesario para la iniciación de la traducción del ARNm. El elemento está típicamente localizado en 3' respecto al promotor y 5' respecto a la secuencia codificante de la proteína NTP que se va a sintetizar. La secuencia Shine-Dalgarno varía pero es típicamente una polipurina (es decir, que tiene un alto contenido en A-G). Se han identificado muchas secuencias Shine-Dalgarno, cada una de las cuales se puede sintetizar fácilmente utilizando los métodos explicados anteriormente y ser utilizadas en un vector procariota.

En aquellos casos en los que se quiere que la proteína NTP secrete de la célula huésped, se puede utilizar una secuencia señal para dirigir la proteína NTP fuera de la célula huésped donde se sintetiza, y la parte carboxi-terminal de la proteína se puede deleccionar para prevenir el anclaje a la membrana. Típicamente, la secuencia señal se sitúa en la región codificante del gen o ADNc de NTP, o directamente en el extremo 5' de la región codificante del gen de NTP. Se han identificados muchas secuencias señal, y se puede utilizar cualquiera de ellas que sea funcional en la célula huésped seleccionada conjuntamente con el gen o ADNc de NTP. Por lo tanto, la secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga al gen o ADNc de NTP, y puede ser homóloga o heteróloga al gen o ADNc de NTP. Además, la secuencia señal se puede sintetizar químicamente utilizando los métodos expuestos anteriormente. En la mayoría de los casos, la secreción del polipéptido de la célula huésped a través de la presencia de un péptido señal resultará en la eliminación de la metionina amino terminal del polipéptido.

En muchos casos, la transcripción de un gen o ADNc de NTP aumenta por la presencia de uno o más intrones en el vector; esto es particularmente cierto en el caso de que la proteína NTP se produzca en células huéspedes eucariotas, especialmente en células de mamífero. Los intrones utilizados pueden ser naturales dentro del gen de NTP, especialmente en el caso en que el gen utilizado sea una secuencia genómica de longitud completa o un fragmento de la misma. En el caso de que el intrón no sea natural dentro del gen (como para la mayoría de los ADNc), el intrón(es) se puede obtener de otra fuente. La posición del intrón respecto a la secuencia flanqueante y el gen de NTP es en general importante, ya que el intrón se debe transcribir para ser efectivo. Como tal, en el caso de que el gen de NTP insertado en el vector de expresión sea una molécula de ADNc, la posición preferida para el intrón es de 3' respecto al sitio de inicio de la traducción, y 5' respecto a la secuencia poliA de terminación de la transcripción. Preferiblemente para el ADNc de NTP, el intrón o intrones estarán localizados a un lado u otro (esto es, 5' ó 3') del ADNc de modo que no interrumpa la secuencia codificante. Se puede utilizar cualquier intrón de cualquier fuente, incluyendo cualquier organismo viral, procariota y eucariota (planta o animal), para practicar esta invención, siempre que sea compatible con la célula huésped en la que se introduce. También se incluyen aquí intrones sintéticos. Opcionalmente, se puede utilizar en el vector más de un intrón.

En el caso de que uno o más de los elementos expuestos anteriormente no estén ya presentes en el vector que se va utilizar, se deben obtener individualmente y ligarse en el vector. Los métodos utilizados para obtener cada uno de los elementos son bien conocidos para el experto en materia y son comparables a los métodos explicados anteriormente (esto es, síntesis de ADN, cribado de genoteca, y similares).

Los vectores finales utilizados para practicar esta invención se construyen típicamente de vectores de partida tal como un vector disponible comercialmente. Tales vectores pueden contener o no alguno de los elementos que se deben incluir en los vectores completos. Si ninguno de los elementos deseados está en el vector de partida, cada elemento se debe ligar individualmente en el vector cortando el vector con la(s) endonucleasa(s) de restricción adecuada(s) de modo que los extremos del elemento que se va a ligar y los extremos del vector sean compatibles para ligación. En algunos casos, puede ser necesario "hacer romos" los extremos a ligar para obtener una ligación satisfactoria. Hacer los extremos romos se logra rellenando primero los "extremos cohesivos" utilizando ADN polimerasa de Klenow o ADN polimerasa de T4 en presencia de los cuatro nucleótidos. Este procedimiento es bien conocido en la técnica y se describe por ejemplo en Sambrook *et al.*, *supra*. Alternativamente, se pueden ligar primero entre sí dos o más de los elementos a insertar en el vector (si van a estar localizados de forma adyacente) y después se ligan en el vector.

Otro método de construir el vector es realizar todas las ligaciones de los diferentes elementos simultáneamente en una sola mezcla de reacción. Aquí, se generarán muchos vectores sin sentido o no funcionales debido a la ligación incorrecta o a la inserción de elementos, sin embargo el vector funcional se puede identificar y seleccionar mediante digestión con endonucleasas de restricción.

Los vectores preferidos para practicar esta invención son aquellos que son compatibles con células huésped bacterianas, de insecto, y de mamífero. Tales vectores incluyen, entre otros, pCRII, PCR3 y pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), pET15b (Novagen, Madison, Wis.) PGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL (BlueBacII; Invitrogen), y pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, N.Y.).

Después de que se ha construido el vector y la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína NTP de longitud completa o truncada se ha insertado en el sitio adecuado del vector, el vector completo se debe introducir en una célula huésped adecuada para amplificación y/o expresión del polipéptido. Las células huésped pueden ser células huésped procariotas (tal como *E. coli*) o células huésped eucariotas (tal como una célula de levadura, una célula de insecto, o una células de vertebrado). La célula huésped, cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, puede sintetizar la proteína NTP que se puede recoger posteriormente del medio de cultivo (si la célula huésped la secreta al medio) o directamente de la célula huésped que la produce (si no se secreta).

Después de la recogida, se puede purificar la proteína NTP utilizando métodos tales como cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad, y similares. La selección de la célula huésped para la producción de la proteína NTP dependerá en parte en si la proteína NTP se debe glicosilar o fosforilar (en cuyo caso se prefieren células huésped eucariotas), y la forma en que la células huésped es capaz de “plegar” la proteína en su estructura terciaria nativa (por ejemplo, orientación adecuada de los puentes disulfuro, etc.) de modo que se prepara una proteína biológicamente activa mediante la proteína NTP que tiene actividad biológica, la proteína NTP se puede “plegar” después de la síntesis utilizando las condiciones químicas adecuadas como se discute más adelante. Las células o líneas celulares adecuadas pueden ser células de mamífero, tal como células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK)293 o 293T, o células 3T3. La selección de células huésped de mamífero adecuadas y los métodos de transformación, cultivo, amplificación, cribado y producción y purificación del producto son conocidos en la técnica. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas son las líneas celulares de mono COS-1 y COS-7, y la línea celular CV-1. Células huésped de mamífero ejemplares adicionales incluyen líneas celulares de primates y líneas celulares de roedores, incluyendo líneas celulares transformadas. También son adecuadas células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* de tejidos primarios, así como explantes primarios. Las células candidatas pueden genotípicamente deficientes en el gen de selección, o pueden tener genes de selección que actúan de forma dominante. Otras líneas celulares de mamíferos adecuadas incluyen pero no están limitadas a, células de neuroblastoma de ratón N2A, HeLa, células de ratón L-929, líneas de 3T3 derivadas de ratones Swiss, Balb-c o NIH, líneas celulares de hámster HaK.

Similarmente útiles como células huésped adecuadas para la presente invención son las células bacterianas. Por ejemplo, las varias cepas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, DH5.alpha, DH10 y MC1061) son bien conocidas como células huésped en el campo de la biotecnología. También se pueden utilizar en este método varias cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, otras *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* y similares. Muchas cepas de células de levadura conocidas para los expertos en la materia están también disponibles como células huésped para la expresión de los polipéptidos de la presente invención.

Además, si se desea, se pueden utilizar sistemas de células de insecto en los métodos de la presente invención. Tales sistemas se describen por ejemplo en Kitts *et al.* (*Biotechniques*, 14: 810-817 [1993]), Lucklow (*Curr. Opin. Biotechnol.*, 4: 564-572 [1993]) y Lucklow *et al.* (*J. Virol.*, 67: 4566-4579 [1993]). Las células de insecto preferidas son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.).

La inserción (también denominada como “transformación” o “transfección”) del vector en la célula huésped seleccionada se puede llevar a cabo utilizando métodos como cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección o el método del DEAE-dextrano. El método seleccionado estará en parte en función del tipo de célula huésped que se va a utilizar. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos para el experto en la materia, y se explican, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las células huésped que contienen el vector (es decir, transformadas o transfectadas) se pueden cultivar utilizando medios estándar bien conocidos para el experto en la materia. Los medios contendrán normalmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células. Medios adecuados para cultivar células de *E. coli* son por ejemplo, Luria Broth (LB) y/o Terrific Broth (TB). Medios adecuados para cultivar células eucariotas son RPMI 1640, MEM, DMEM, todos ellos pueden ser suplementados con suero y/o factores de crecimiento según lo requiera la línea celular particular que se cultiva. Un medio adecuado para cultivos de insecto es medio de Grace suplementado con extracto de levadura, hidrolizado de lactoalbúmina, y/o suero fetal de ternera según sea necesario. Típicamente, solo se añade un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de las células transformadas como un suplemento al medio. El compuesto que se va a utilizar estará dictado por el elemento de marcador de selección presente en el plásmido con el que se va a transformar la célula huésped. Por ejemplo, en el caso de que el elemento de marcador de selección sea resistencia a kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina.

La cantidad de proteína NTP producida en la célula huésped se puede evaluar utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, sin limitación, análisis por inmunotransferencia, electroforesis en gel poliacrilamida con SDS, electroforesis en gel en condiciones no desnaturizantes, separación por HPLC, inmunoprecipitación, y/o ensayos de actividad tal como ensayos de desplazamiento en gel de unión de ADN.

Si la proteína NTP se ha diseñado para que se secrete de la célula huésped, la mayoría de la proteína NTP se puede encontrar en el medio de cultivo de las células. Las proteínas preparadas de esta manera típicamente no tendrán una metionina amino terminal, ya que se elimina durante la secreción de la célula. Si sin embargo, la proteína NTP no se secreta de la célula huésped, estará presente en el citoplasma y/o en el núcleo (para células huésped eucariotas) o en el citosol (para células huésped bacterias gram negativas) y puede tener una metionina amino terminal.

Para la proteína NTP situada en el citoplasma y/o núcleo de la célula huésped, típicamente las células huésped se rompen primero mecánicamente o con detergente para liberar los contenidos intracelulares a una solución tamponada. La proteína NTP se puede después aislar de esta solución.

La purificación de la proteína NTP de la solución se puede llevar a cabo utilizando varias técnicas. Si la proteína se ha sintetizado de modo que contenga una etiqueta tal como hexaHistidina (Proteína NTP/hexaHis) u otros péptidos pequeños tal como FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) o péptido de unión a calmodulina (Stratagene, La Jolla, CA) en su carboxilo o amino terminal, se puede purificar esencialmente en un proceso de un solo paso pasando la solución a través de una columna de afinidad donde la matriz de la columna tiene alta afinidad por la etiqueta o por la proteína directamente (esto es, un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la proteína NTP). Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad a níquel, zinc y cobalto de este modo se puede utilizar para la purificación de proteína NTP/poliHis la cromatografía de afinidad con el ión metálico inmovilizado que utiliza resinas de afinidad basadas en níquel (como se usan en el sistema QIAexpress de Qiagen o el sistema Xpress de Invitrogen) o resinas de afinidad basadas en cobalto (como se usan en el sistema Talon de BD Biosciences-CLONTECH). (Ver por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Sección 10.11.8, John Wiley & Sons, Nueva York [1993]).

En el caso de que la proteína NTP se prepare sin una etiqueta unida, y no haya anticuerpos disponibles, se pueden utilizar para la purificación otros procedimientos bien conocidos. Tales procedimientos incluyen, sin limitaciones, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de exclusión molecular, HPLC, electroforesis en gel nativo en combinación con elución en gel, e isoelectroenfoque preparativo (máquina/técnica "Isoprime", Hoefer Scientific). En algunos casos, se pueden combinar dos o más de estas técnicas para alcanzar un aumento en la pureza.

Si se prevé que la proteína NTP se encontrará principalmente intracelularmente, el material intracelular (incluyendo los cuerpos de inclusión para las bacterias gram negativas) se puede extraer de la célula huésped utilizando cualquier técnica estándar conocida para el experto en la materia. Por ejemplo, las células huésped se pueden lisar para liberar el contenido del citoplasma/periplasma mediante prensa francesa, homogenización, y/o sonicación seguida por centrifugación. Si la proteína NTP ha formado cuerpos de inclusión en el citosol, los cuerpos de inclusión se pueden unir con frecuencia a las membranas celulares internas y/o externas y de esta manera se encontrará principalmente en el material sedimentado después de la centrifugación. El material sedimentado se puede entonces tratar a pH extremos o con agentes caotrópicos tal como detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea, o derivados de urea en presencia de un agente reductor tal como ditiotritol a pH alcalino o tris carboxietil fosfina a pH ácido para liberar, romper, y solubilizar los cuerpos de inclusión. La proteína NTP en su ahora forma soluble se puede analizar utilizando electroforesis, inmunoprecipitación o similares. Si se desea aislar la proteína NTP, el aislamiento se puede realizar utilizando métodos estándar tal como aquellos expuestos más adelante y en Marston *et al.* (*Meth. Enz.*, 182: 264-275 [1990]). En algunos casos, la proteína NTP puede no ser biológicamente activa tras el aislamiento. Se pueden utilizar varios métodos para "replegar" o convertir el polipéptido a su estructura terciaria y generar puentes disulfuro, para restablecer su actividad biológica. Tales métodos incluyen exponer el polipéptido solubilizado a un pH normalmente por encima de 7 y en presencia de una concentración particular de un agente caotrópico. La selección del agente caotrópico es muy similar a las elecciones utilizadas para la solubilización de los cuerpos de inclusión pero normalmente a una concentración menor y no es necesariamente el mismo agente caotrópico que el que se utiliza para la solubilización. En la mayoría de los casos la solución de replegamiento/oxidación también contendrá un agente reductor o el agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial redox que permita que se produzca la reordenación de disulfuros en la formación de los puentes de cisteína de la proteína. Algunos de los pares redox utilizados incluyen cisteína/cistamina, glutatión (GSH)/ditiobis GSH, cloruro cúprico, ditiotritol (DTT)/ditiano DTT, 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. En muchos casos es necesario un cosolvente para aumentar la eficacia del replegamiento y los reactivos más comunes utilizados para este propósito incluyen glicerol, polietilenglicol de varios pesos moleculares, y arginina.

Si los cuerpos de inclusión con proteína NTP no se forman en un grado significativo en la célula huésped, la proteína NTP se encontrará principalmente en el sobrenadante después de la centrifugación del homogenado celular, y la proteína NTP se puede aislar del sobrenadante utilizando métodos como los que se explican a continuación.

En aquellas situaciones donde es preferible aislar parcial o totalmente la proteína NTP, la purificación se puede llevar a cabo utilizando métodos estándar bien conocidos para el experto en la materia. Tales métodos incluyen, sin limitación, separación mediante electroforesis seguida por electroelución, varios tipos de cromatografía (inmunoafini-

dad, exclusión molecular, y/o intercambio iónico), y/o cromatografía líquida de alta presión. En algunos casos, puede ser preferible utilizar más de uno de estos métodos para completar la purificación.

Además de preparar y purificar la proteína NTP utilizando técnicas de recombinación de ADN, las proteínas NTP y sus derivados se pueden preparar mediante métodos de síntesis química (tal como síntesis de péptidos en fase sólida) utilizando métodos conocidos en la técnica tal como aquellos expuestos por Merrifield *et al* (*J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149 [1963]), Houghten *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5132 [1985]), y Stewart y Young (*Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. [1984]). Tales polipéptidos se pueden sintetizar con o sin una metionina en el amino terminal. Las proteínas NTP sintetizadas químicamente se pueden oxidar utilizando métodos explicados en estas referencias para formar puentes disulfuro. Se espera que las proteínas NTP tengan una actividad biológica comparable a las proteínas NTP producidas de forma recombinante o purificadas de fuentes naturales, y de este modo se puedan utilizar de forma intercambiable con la proteína NTP recombinante o natural.

Las composiciones de proteína NTP modificada químicamente en las que la proteína NTP está unida a un polímero se incluyen en el ámbito de la presente invención. El polímero seleccionado es típicamente soluble en agua de modo que la proteína a la que está unido no precipita en un entorno acuoso, tal como el entorno fisiológico. El polímero seleccionado está normalmente modificado para tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación o un aldehído para alquilación, de modo que el grado de polimerización se puede controlar como se proporciona en los métodos presentes. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. Dentro del ámbito de los polímeros de proteína NTP se incluye una mezcla de polímeros.

En algunos casos, puede ser deseable preparar variantes de ácidos nucleicos y/o aminoácidos de las proteínas NTP naturales. Las variantes de ácido nucleico se pueden producir utilizando mutación dirigida, amplificación por PCR, u otros métodos apropiados, donde el/los cebador/es tienen las mutaciones puntuales deseadas (ver Sambrook *et al.*, *supra*, y Ausubel *et al.*, *supra*, para descripciones de las técnicas de mutagénesis). También se puede utilizar síntesis química usando los métodos descritos por Engels *et al.*, *supra*, para preparar tales variantes. También se pueden utilizar otros métodos conocidos por el experto en la materia.

Las variantes de ácido nucleico preferidas son aquellas que contienen sustituciones de nucleótidos que responden a la preferencia de codón en la célula huésped que se utiliza para producir la proteína NTP. Tal "optimización de codón" se puede determinar a través de algoritmos de ordenador que incorporan tablas de frecuencia de codones tal como "Ecohigh.Cod" para la preferencia de codones de genes bacterianos altamente expresados proporcionado por el paquete de la Universidad de Wisconsin Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, Wis. Otras tablas de frecuencia de codones útiles incluyen "Celegans\_high.cod", "Celegans\_low.cod", "Drosophila\_high.cod", "Human\_high.cod", "Maize\_high.cod" y "Yeast\_high.cod". Otras variantes preferidas son aquellas que codifican cambios conservadores de aminoácidos como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en donde la carga o polaridad de la cadena lateral del aminoácido natural no se altera sustancialmente mediante sustitución con un aminoácido diferente) comparado con el salvaje, y/o aquellos diseñados para generar un sitio(s) nuevo de glicosilación y/o fosforilación o aquellos diseñados para delecionar un sitio(s) existente de glicosilación y/o fosforilación.

Los fragmentos, homólogos, variantes, derivados de NTP y sales de los mismo se pueden hacer utilizando técnicas convencionales de síntesis de péptidos conocidas para los expertos en la materia. Estas técnicas incluyen métodos de acoplamiento químico (cf. Wunsch, E: "Methoden der organischen Chemie", Volumen 15, Números 1+2, *Synthese von Peptiden*, Thime Verlag, Stuttgart (1974), y Barrany, G.; Merrifield, R.B.: "The Peptides", eds. E. Gross, J. Meienhofer, Volumen 2, Capítulo 1, pp. 1-284, Academic Press (1980)), métodos de acoplamiento enzimático (cf. Widmer, F., Johansen, J.T. *Carlberg Res. Commun.*, Vol. 44, pp. 37-46 (1979), y Kullmann, W.: "Enzymatic Peptide Synthesis", CRC Pres Inc., Boca Raton, Fla (1987), y Widmer, F., Johansen, J.T. en "Synthetic Peptides in Biology and Medicines", eds. Alitalo, K., Partanen, P., Väterli, A. pp. 79-86, Elsevier, Ámsterdam (1985)), o una combinación de métodos químicos y enzimáticos si esto tiene ventajas para el proceso de diseño y economía. Los expertos en la materia son capaces de variar la secuencia peptídica de la proteína NTP para hacer un homólogo que tiene la misma o similar actividad biológica (bioactividad) que la proteína NTP original o nativa.

Existen ventajas claras para utilizar un mimético de una proteína NTP dada más que la proteína misma, porque las proteínas normalmente muestran dos propiedades indeseables: (1) biodisponibilidad baja; y (2) duración de acción corta. Los péptidos miméticos ofrecen una vía alrededor de estos dos obstáculos principales, ya que las moléculas referidas son lo suficientemente pequeñas tanto para estar disponibles más ampliamente como para tener una duración de acción larga. Además, los péptidos miméticos son mucho más baratos de producir que las proteínas y péptidos. Finalmente, existen problemas asociados con la estabilidad, almacenamiento, e inmunoreactividad para proteínas y péptidos que no se experimentan con péptido miméticos.

De esta manera los péptidos NTP descritos anteriormente tienen utilidad en el desarrollo de tales compuestos químicos pequeños con actividades biológicas similares y por lo tanto con utilidades terapéuticas similares. Se pueden desarrollar péptido miméticos de los péptidos NTP utilizando técnicas de química combinatoria y otras técnicas conocidas en la técnica (ver por ejemplo Proceedings of the 20th European Peptide Symposium, ed. G. Jung, E. Bayer, pp. 289-336, y las referencias allí).

Los ejemplos de métodos para modificar estructuralmente un péptido conocidos en la técnica para crear un péptido mimético incluyen la inversión de los centros quirales del esqueleto produciendo estructuras de D-aminoácidos que



pueden, particularmente en el N-terminal, llevar a un aumento en la estabilidad para la degradación proteolítica sin afectar negativamente a la actividad. Se da un ejemplo en el artículo "Tritiated D-ala.sup.1-Peptide T Binding", Smith C.S. et., *Drug Development Res.* 15, pp.371-379 (1998).

- 5 Un segundo método es alterar la estructura cíclica para estabilidad, tal como iminas y lactamas de intercadenas N a C (Ede *et al.*, en Smith y Rivier (Eds.) "Peptides: Chemistry and Biology", Escom, Leiden (1991), pp. 268-270). Se da un ejemplo en los compuestos similares a timopentina conformacionalmente restringidos, tales como los divulgados en la Patente de EE.UU. No. 4457489 (1985), Golstein, G. *et al.*
- 10 Un tercer método es sustituir enlaces peptídicos en el péptido NTP por enlaces pseudopeptídicos que confieren resistencia a la proteólisis. Se han descritos varios enlaces pseudopeptídicos que en general no afectan a la estructura y actividad biológica del péptido. Un ejemplo de esta aproximación es sustituir los enlaces pseudopeptídicos retro-inversos ("Biologically active retroinverso analogues of tymopentin", Sisto A. *et al.*, en Rivier, J.E. y Marshall, G.R. (eds) "Peptides, Chemistry, Structure and Biology", Escom, Leiden (1990), pp. 722-773) y Dalpozzo *et al.*, (1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41: 561-566. Según esta modificación, las secuencias de aminoácidos de los péptidos pueden ser idénticas a las secuencias de los péptidos NTP descritas anteriormente, excepto que uno o más de los enlaces peptídicos se sustituyen por un enlace pseudopeptídico retro-inverso. Preferiblemente se sustituye el enlace peptídico más N-terminal, ya que tal sustitución conferirá resistencia a la proteólisis por exopeptidasas que actúan en el N-terminal.
- 20 La síntesis de péptidos con uno o más enlaces pseudopeptídicos retro-inverso reducidos se conoce en la técnica (Sisto (1990) y Dalpozzo *et al.*, (1993), citados anteriormente). De este modo, los enlaces peptídicos se pueden sustituir por enlaces no peptídicos que permiten que el péptido mimético adopte una estructura similar, y por lo tanto actividad biológica, al péptido original. También se pueden hacer otras modificaciones cambiando grupos químicos de los aminoácidos por otros grupos químicos de estructura similar. Otro enlace pseudopeptídico que se sabe que aumenta la estabilidad a la rotura enzimática sin o con una pequeña pérdida de actividad biológica es el enlace pseudopeptídico isótero reducido (Couder *et al.*, (1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41: 181-184). De esta manera, las secuencias de aminoácidos de estos péptidos pueden ser idénticas a las secuencias de los péptidos NTP descritas anteriormente, excepto que uno o más de los enlaces peptídicos se sustituyen por un enlace pseudopeptídico isótero. Preferiblemente se sustituye el enlace peptídico más N-terminal, ya que tal sustitución conferirá resistencia a la proteólisis por exopeptidasas que actúan en el N-terminal. La síntesis de péptidos con uno o más enlaces pseudopeptídicos isóteros reducidos se conoce en la técnica (Couder *et al.*, (1993), citado anteriormente). Otros ejemplos incluyen la introducción de enlaces cetometileno o metilsulfuro para sustituir enlaces peptídicos.

- 35 Los derivados peptoides de los péptidos NTP representan otra clase de péptidos miméticos que mantienen los determinantes estructurales importantes para la actividad biológica, sin embargo eliminan los enlaces peptídicos, confiriendo de esta manera resistencia a proteólisis (Simon, *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 9367-9371). Los peptoides son oligómeros de glicinas N-sustituidas. Se han descrito varios grupos N-alquilo, cada uno correspondiente a la cadena lateral de un aminoácido natural (Simon *et al.*, (1992), citado anteriormente). Se sustituyen alguno o todos los aminoácidos del NTP con la glicina N-sustituida correspondiente al aminoácido sustituido.

- 40 Se puede ayudar al desarrollo de péptidos miméticos determinando la estructura terciaria del péptido NTP original mediante espectroscopia de RMN, cristalografía y/o modelado molecular asistido por ordenador. Estas técnicas ayudan en el desarrollo de composiciones nuevas de mayor potencia y/o mayor biodisponibilidad y/o mayor estabilidad que la del péptido original (Dean (1994), *BioEssays*, 16: 683-687; Cohen y Shatzmiller (1993), *J. Mol. Graph.*, 11: 166-173; Wiley y Rich (1993), *Med. Res. Rev.*, 13: 327-384; Moore (1994), *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 124-129; Hruby (1993), *Biopolymers*, 33: 1073-1082; Bugg *et al.*, (1993), *Sci Am.*, 269: 92-98).

- 50 Una vez que se ha identificado un compuesto péptido mimético potencial, se puede sintetizar y ensayar utilizando métodos explicados en los ejemplos posteriores para evaluar su actividad. Los compuestos péptidos miméticos obtenidos por los métodos anteriores, que tienen la actividad biológica de los péptidos NTP y estructura tridimensional similar, se abarcan en esta invención. Será en seguida obvio para el experto en la materia que un péptido mimético se puede generar a partir de cualquier péptido NTP que lleve uno o más de las modificaciones descritas anteriormente. Será además evidente que los péptidos miméticos de esta invención se pueden utilizar adicionalmente para el desarrollo de compuestos no peptídicos incluso más potentes, además de su utilidad como compuestos terapéuticos.

## 55 *Trastornos a ser tratados*

- 60 La presente invención se dirige al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la cadena neural para la producción de una composición para tratar tumores.

- Los tumores a ser tratados pueden ser tumores benignos y malignos, por ejemplo tumores de pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovario, piel, riñón, seno, colon, intestino, estómago, recto, esófago, sangre, cerebro y sus recubrimientos, médula espinal y sus recubrimientos, músculo, tejido conjuntivo, glándula suprarrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículo, pituitaria, órganos reproductores, hígado, vesícula biliar, ojo, oído, nariz, garganta, amígdalas, boca, nódulos linfáticos y sistema linfático, y otros órganos.

Como se usa aquí, el término "tumor maligno" se propone que abarque todas las formas de carcinomas, sarcomas y melanomas humanos que se dan en las formas poco diferenciada, moderadamente diferenciada y bien diferenciada.

Esta invención satisface la necesidad en la técnica para composiciones que pueden eliminar tumores benignos con menos riesgo y menos de los efectos secundarios indeseables de la cirugía. Se necesita particularmente una composición para eliminar tumores benignos en zonas quirúrgicamente dañinas tal como localizaciones profundas en el cuerpo (por ejemplo, cerebro, corazón, pulmones y otros).

La composición para tratar tumores se puede utilizar conjuntamente con métodos convencionales para tratar tales trastornos, tal como escisión quirúrgica, quimioterapia, y radiación. Se puede administrar NTP antes, durante o después de tales tratamientos convencionales.

#### Composiciones de NTP

El uso de proteínas NTP para la producción de una composición está en el ámbito de la presente invención. Tales composiciones pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína NTP mezclado con un soporte farmacéuticamente aceptable. El material de soporte puede ser agua para inyección, preferiblemente suplementada con otros materiales comunes en soluciones para la administración a mamíferos. Típicamente, una proteína NTP para uso terapéutico se administrará en forma de una composición que comprende la proteína NTP purificada conjuntamente con uno o más soportes, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. Soportes ejemplarmente apropiados son soluciones salinas neutras tamponadas o solución salina mezclada con seroalbúmina. Preferiblemente, el producto se formula como un liofilizado utilizando los excipientes apropiados (por ejemplo, sacarosa). Se pueden incluir si se desea, otros soportes, diluyentes y excipientes estándar. Otras composiciones de ejemplo comprenden tampón Tris de alrededor de pH 7.0-8.5, o tampón acetato de alrededor de pH 4.0-4.5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo.

El uso de proteínas NTP conjugadas o acopladas o unidas a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula tipo anticuerpo o una molécula con una alta afinidad para un marcador específico de tumor, tal como un receptor celular, péptido señal o enzima sobreexpresada, para dirigir al tumor también se abarca en el ámbito de la invención. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula tipo anticuerpo o molécula con una alta afinidad para un marcador específico de tumor se utilizan para dirigir el conjugado de proteína NTP a una diana celular o tejido específico. Por ejemplo, un tumor con un antígeno de superficie o antígeno expresado distintivo puede ser el blanco del anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o molécula de unión tipo anticuerpo y la proteína NTP matará las células tumorales. Tal aproximación utilizando anticuerpos dirigidos tiene las ventajas anticipadas de disminuir la dosis, aumentar la probabilidad de unión a y absorción por las células diana, y aumento en la utilidad para dirigir a y tratar tumores metastáticos y tumores de tamaño microscópico.

Esta invención también abarca el uso de las proteínas NTP conjugadas o acopladas o unidas a una proteína u otra molécula para formar una composición que, tras la rotura en o cerca de los sitios del tumor o de las células no deseadas mediante una enzima o proteasa específica de tumor o sitio o mediante un anticuerpo conjugado que tiene como diana el tumor, libera la proteína NTP en o cerca del sitio del tumor o las células no deseadas.

Esta invención también abarca el uso de proteínas NTP conjugadas o acopladas o unidas a una proteína u otra molécula para formar una composición que libera la proteína NTP o algunos fragmentos biológicamente activos de la proteína NTP tras exposición del tejido a ser tratado a la luz (como en las terapias de láser o terapia fotodinámica o fotoactivada), otras formas de radiación electromagnética tal como radiación infrarroja, radiación ultravioleta, radiación de rayos X o rayos gamma, calor localizado, radiación alpha o beta, emisiones ultrasónicas, u otras fuentes de energía localizada.

Las proteínas NTP se pueden utilizar solas, juntas, o en combinación con otras composiciones farmacéuticas, tales como citoquinas, factores de crecimiento, antibióticos, agentes inductores de apoptosis, antiinflamatorios, y/o agentes quimioterapéuticos según sea apropiado para la indicación a tratar.

Esta invención también abarca el uso de NTP para la producción de composiciones terapéuticas de NTP que utilizan dendrímeros, fulerenos, y otras moléculas sintéticas, polímeros y macromoléculas donde la proteína NTP y/o su molécula de ADN correspondiente se conjuga con, se une a o se incluye en la molécula, polímero o macromolécula, por si misma o conjuntamente con otras especies de moléculas tal como un marcador específico de tumor. Por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5714166, *Bioactive and/or Targeted Dendrimer Conjugates*, proporciona un método para preparar y utilizar, entre otros, conjugados de polímeros dendríticos compuestos de al menos un dendrímero con un director de diana y al menos un agente bioactivo conjugado al mismo.

También se abarca en el ámbito de la invención el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un gen de NTP para la producción de una composición para tratar tumores. La sobreexpresión de NTP en el tumor se puede utilizar para inducir a las células en el tumor a morir y de esta manera reducir la población de células tumorales. Se anticipa que el gen o la transferencia de un equivalente de gen de NTP para tratar el tumor tienen la ventaja de requerir dosis menores, y de que se pasan a la progenie celular los elementos celulares dirigidos, necesitando de esta manera una terapia menos frecuente y menos terapia total.

También se abarca en el ámbito de la invención el uso de conjugados recombinantes clonados de anticuerpos de NTP; conjugados recombinantes clonados de fragmentos de anticuerpos de NTP; y conjugados recombinantes clonados de proteínas similares a anticuerpos de NTP. Las ventajas de una NTP clonada combinada con un conjugado

dirigido (tal como un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula similar a anticuerpo o una molécula con alta afinidad a un receptor específico de cáncer u otros marcadores tumorales) son que tal molécula combina las ventajas de estar dirigida descritas anteriormente además de las ventajas para su fabricación y producción estandarizada de la molécula conjugada clonada.

5

#### Formas de dosis

Las formas sólidas de dosis para la administración oral incluyen pero no están limitadas a, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas sólidas de dosis, el principio activo se mezcla con al menos uno de los siguientes: (a) uno o más excipientes (o soportes) inertes, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico; (b) rellenos o extensores, tal como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; (c) aglutinantes, tal como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga; (d) humectantes, tales como glicerol; (e) agentes desintegradores, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos, y carbonato sódico; (f) retrasadores de solución, tal como parafina; (g) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (h) agentes mojadores, tal como alcohol acetílico y monoestearato de glicerol; (i) adsorbentes, tal como caolín y bentonita; y (j) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, o mezclas de los mismos. Las formas de dosis para cápsulas, comprimidos y píldoras, también pueden comprender agentes tamponadores.

Las formas líquidas de dosis para la administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los principios activos, las formas líquidas de dosis pueden comprender diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tal como agua u otros solventes, agentes solubilizadores, y emulsionantes. Emulsionantes ejemplares son alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites tales como aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de semilla de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino, y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles, ésteres de sorbitano y ácidos grasos, o mezclas de estas sustancias, y similares.

Además de tales diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes mojadores, agentes emulsionantes o suspensores, edulcorantes, aromas, y agentes perfumadores.

Los niveles reales de dosis de los principios activos en las composiciones de la invención pueden variar para obtener una cantidad de NTP que es eficaz para obtener una respuesta terapéutica deseada para una composición y método de administración particulares. Los niveles de dosis seleccionados por lo tanto dependen del efecto terapéutico deseado, la vía de administración, la duración deseada del tratamiento, y otros factores.

Con mamíferos, incluyendo humanos, las cantidades eficaces se pueden administrar en base al área de superficie corporal. La interrelación de dosis para animales de varios tamaños, especies, y humanos (basada en  $\text{mg}/\text{M}^2$  de superficie corporal) la describen E.J. Freireich *et al.*, *Cancer Chemother. Rep.*, 50(4): 219 (1966). Se puede determinar aproximadamente el área de la superficie corporal a partir de la altura y peso de un individuo (ver por ejemplo, Tablas Científicas, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N.Y. pp. 537-538 (1970)).

La dosis diaria total de la NTP administrada a un huésped puede estar en una dosis individual o dividida. Las composiciones de unidades de dosis pueden contener tal cantidad de tales submúltiplos de la misma como se puedan utilizar para preparar la dosis diaria. Se entenderá, sin embargo, que los niveles de dosis específicos para cualquier paciente particular dependerán de varios factores incluyendo el peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo y vía de administración, potencia de la droga administrada, velocidades de absorción y excreción, combinación con otras drogas y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando.

#### Métodos de administración

La composición de NTP se puede administrar de forma intramuscular, oral, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal) intracerebroventricular, intratumoral, intralesional, intradérmica, intratecal, intranasal, intraocular, intraarterial, tópica, transdérmica, a través de un aerosol, infusión, inyección intravenosa rápida, dispositivo de implantación, sistema de liberación sostenida, etc.

Otra forma de administrar la NTP es a través de una vía transdérmica o transcutánea. Un ejemplo de tal forma de realización es el uso de parche. En particular, se puede preparar un parche con una suspensión fina de NTP en, por ejemplo, dimetil sulfoxido (DMSO), o una mezcla de DMSO con aceite de semilla de algodón y ponerlo en contacto con la piel de los mamíferos que tienen el tumor lejos del sitio de localización del tumor dentro de una bolsa de la piel. Otros medios o mezclas de los mismos con otros solventes y soportes sólidos funcionarían igualmente. El parche puede contener el compuesto de NTP en forma de una solución o una suspensión. El parche se puede aplicar entonces a la piel del paciente, por ejemplo, insertándolo en una bolsa de la piel del paciente formada plegando y manteniendo la piel sujeta por medio de puntos o pinzas u otros dispositivos de sujeción. Esta bolsa debe ser empleada de tal manera que se asegure el contacto continuo con la piel sin la interferencia del mamífero. Además de utilizar una bolsa de piel, se puede utilizar cualquier dispositivo que asegure la colocación firme del parche en contacto con la piel. Por ejemplo, se podría utilizar una venda adhesiva para mantener el parche en su sitio sobre la piel.

La NTP se puede administrar en una formulación o preparación de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos con forma, por ejemplo películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, polilactidas (US 3773919, EP 58481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22: 547-556 [1983]), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 [1981] y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 [1982]), acetato de etilvinilo (Langer *et al.*, *supra*) o poli ácido D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 [1985]; EP 36676; EP 88046; y EP 143949).

Otro método de administrar la NTP es mediante infusión directa o indirecta en el tumor. Un ejemplo de tal forma de realización es la inyección directa de NTP en el tumor. El tratamiento puede consistir en una única inyección, inyecciones múltiples en una ocasión o una serie de inyecciones durante un período de horas días o meses siendo la regresión o destrucción del tumor evaluada por medio de biopsia, imágenes u otros métodos de evaluar el crecimiento del tejido. La inyección en el tumor puede ser mediante un dispositivo insertado en un orificio tal como la nariz, boca, oído, vagina, recto o uretra o a través de una incisión para alcanzar el tumor *in vivo* y se puede realizar conjuntamente con un sistema de imágenes u óptico tal como ultrasonido o fibra óptica para identificar el sitio apropiado para la inyección. Otro ejemplo de tal forma de realización es el uso de un dispositivo que pueda proporcionar una infusión constante de NTP en el tejido a lo largo del tiempo.

Otro método para administrar la NTP es conjuntamente con un procedimiento quirúrgico o similar empleado para escindir físicamente, extirpar o de otra manera matar o destruir el tumor en donde la NTP de la invención se administra en el área inmediata alrededor del área donde se eliminó el tumor para destruir o impedir el crecimiento de cualquier célula tumoral no eliminada o destruida mediante el procedimiento.

Otro método de administrar la NTP es mediante implantación de un dispositivo en el tumor. Un ejemplo de tal forma de realización es la implantación en el tumor de un disco que contiene NTP. El disco libera una dosis terapéutica de NTP al tejido a lo largo del tiempo. De forma alternativa o adicional, la composición se puede administrar localmente a través de la implantación en el área afectada de una membrana, esponja, u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido la NTP de la invención. En el caso de que se use un dispositivo de implantación, el dispositivo se puede implantar en cualquier tejido u órgano adecuado, y la distribución de la NTP de la invención puede ser directamente a través del dispositivo a través de una inyección intravenosa rápida, o a través de una administración continua, o a través de un catéter utilizando una infusión continua.

Un método alternativo de administración es introducir una o más copias del gen de NTP en la célula diana y, si es necesario, inducir la(s) copia(s) del gen a que empiecen a producir la NTP intracelularmente. Una manera en que se puede aplicar la terapia génica es utilizar el gen de NTP (cualquier ADN genómico, ADNc, y/o ADN sintético que codifica la NTP de esta invención o un fragmento, variante, o derivado de la misma) que puede estar unido operablemente a un promotor constitutivo o inducible para formar una "construcción de ADN de terapia génica". El promotor puede ser homólogo o heterólogo al gen de NTP endógeno, siempre que sea activo en el tipo de célula o tejido en el que se va a introducir la construcción. Otros componentes de la construcción de ADN de terapia génica pueden incluir opcionalmente, según se requiera, moléculas de ADN diseñadas para la integración específica en un sitio (por ejemplo secuencias flanqueantes endógenas útiles para la recombinación homóloga), promotores específicos de tejido, potenciador(es) o silenciador(es), moléculas de ADN capaces de proporcionar una ventaja selectiva sobre la célula parental, moléculas de ADN útiles como marcadores para identificar las células transformadas, sistemas de selección negativa, agentes de unión específica a células (como, por ejemplo, para células diana) factores de internalización específica de células, y factores de transcripción para aumentar la expresión mediante un vector así como factores para permitir la producción del vector.

Los medios para la distribución de genes a una célula o tejido *in vivo* o *ex vivo* incluyen (pero no están limitados a) inyección directa de ADN desnudo, métodos balísticos, transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por receptores (complejo ligando-ADN), electroporación, y precipitación con fosfato cálcico. Ver la patente de EE.UU. Nos. 4970154, WO 96/40958, patente de EE.UU. No. 5679559, patente de EE.UU. No. 5676954, y patente de EE.UU. No. 5593875. También incluyen el uso de vectores virales tales como un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, poxvirus, lentivirus, virus del papiloma o el herpes simplex virus, uso de un conjugado ADN-proteína y el uso de un liposoma. El uso de los vectores de terapia génica se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 5672344, patente de EE.UU. No. 5399346, patente de EE.UU. No. 5631236, y patente de EE.UU. No. 5635399.

El gen de NTP se puede distribuir implantando en pacientes ciertas células que se han modificado genéticamente *ex vivo*, utilizando métodos tales como aquellos descritos aquí, para expresar y secretar la NTP de esta invención o fragmentos, variantes o derivados de la misma. Tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden derivar el propio tejido del paciente o de otra fuente, humana o no humana. Opcionalmente, las células se pueden immortalizar o ser células troncales. Sin embargo, para disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, se prefiere que las células se encapsulen para evitar infiltraciones a los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente biocompatibles, cierres poliméricos semipermeables o membranas que permiten la liberación del producto proteico pero previenen la destrucción de las células por el sistema inmune del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes. Los métodos utilizados para la encapsulación de células con membranas son familiares al experto en la materia, y la preparación de células encapsuladas y su implantación en pacientes se puede llevar a

cabo sin experimentación excesiva. Ver, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 489253; 5011472; y 5106627. Se describe un sistema para encapsular células vivas en PCT WO 91/10425. Las técnicas para formular una variedad de otros medios de distribución sostenida o controlada, tal como transportadores de liposomas, partículas o bolas bio-erosionables, también son conocidas para el experto en la materia, y se describen por ejemplo en la patente de EE.UU. No. 5653975. Se pueden implantar las células, con o sin encapsulación, en tejidos u órganos corporales adecuados del paciente.

Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar la presente invención. Se debe entender, sin embargo, que la invención se está limitada a los trastornos o detalles específicos descritos en estos ejemplos.

#### Ejemplo 1

El propósito de este ejemplo fue ensayar el efecto citotóxico de NTP en células de glioma y neuroblastoma.

El neuroblastoma es un cáncer que afecta principalmente a niños. Se inicia en el tejido nervioso en el cuello, pecho, abdomen, o pelvis. Normalmente se origina en el abdomen en los tejidos de la glándula suprarrenal. Cuando se diagnostica, con frecuencia el cáncer se ha extendido, lo más comúnmente a los nódulos linfáticos, hígado, pulmones, hueso, y/o médula ósea.

Los gliomas son tumores cerebrales. Un tumor de glioma es particularmente dañino porque tiende a crecer y extenderse rápidamente en el cerebro. Cada año, aproximadamente 20.000 americanos descubren que tienen un glioma. Más de la mitad mueren en 18 meses.

#### *Cultivo de células*

Las células de glioma y neuroblastoma criopreservadas se adquirieron a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Virginia. Las células se descongelaron y se diluyeron en medio de suspensión y se centrifugaron a 700 rpm durante 7 minutos a 4°C. Los precipitados de células se resuspendieron entonces en medio CACO-2 y se cultivaron en botellas estándar de 75 o 175 cm<sup>2</sup> a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% hasta estar aproximadamente confluentes. Las células se tripsinizaron entonces y se resuspendieron en medio CACO-2 para alcanzar una densidad celular final de 1.5x10<sup>5</sup> células/ml. Se añadieron entonces alícuotas de 50 µl por muestra a pocillos de placas de 96 pocillos.

#### *Dosis*

Para el Experimento I, se añadieron a cada muestra de cultivo 50 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato) (control negativo), tamoxifeno 100 µM en solución salina tamponada con fosfato PBS (control positivo), o el artículo a ensayar.

Para el Experimento II, se diluyó el tamoxifeno 1 mM en DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración de 100 µM con medio CACO-2, y se añadieron 100 µl por pocillo a los pocillos de control positivo. Un control vehículo que consiste en DMSO al 1% en medio CACO-2 también se añadió en este experimento. Otros controles negativos consistieron en seroalbúmina humana y bovina y otros polipéptidos no tóxicos.

#### *Ensayos de MTT*

Un ensayo de MTT es un ensayo sensible para la medida de la proliferación celular basada en la reducción de la sal de tetrazolio bromuro de 3,[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Después de las incubaciones con sustancias control o a ensayar, el medio se aspiró y se añadieron a cada pocillo 100 µl de MTT. Las placas se incubaron durante 3 horas a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%. Después se sustituyó el MTT con isopropanol acidificado (HCl 4 N) y las placas se almacenaron durante la noche a 4°C, cubiertas. Las placas se agitaron entonces suavemente durante 1 minuto en un agitador rotatorio y se midió la diferencia entre la absorbancia de emisión a 570 nm y la absorbancia de fondo a 650 nm espectrofotométricamente en un lector de placas automatizado.

#### *Resultados*

##### Experimento I

Las células de neuroblastoma y glioma se incubaron durante 24 horas siguiendo el tratamiento con materiales a ensayar o soluciones control. Se añadió MTT a todos los cultivos a este tiempo. Los resultados se expresan como diferencias de absorbancia media y se representan como porcentaje del control negativo y se muestran en la Tabla 1 (citotoxicidad en células de glioma) y la Tabla 2 (citotoxicidad en células de neuroblastoma).

## ES 2 295 347 T3

TABLA 1

*Citotoxicidad en células de glioma: 24 horas*

Identificación del artículo a ensayar	Concentración	ABS 570-650			Porcentaje de células viables
		Muestra	Media	DE	
CN (PBS)		0.064	0.061	0.005	100
CN (PBS)		0.057			
VC (DMSO)		0.051	0.054	0.004	100
VC (DMSO)		0.056			
CP (tamoxifeno)	100 $\mu$ M	0.017	0.015	0.004	28
CP (tamoxifeno)	100 $\mu$ M	0.012			
AD7C-NTP	100-1000 ng/ml	0.022	0.025	0.004	41
AD7C-NTP	100-1000 ng/ml	0.028			

Abreviaturas: ABS, absorbancia; CN, control negativo

CP, control positivo; DE, desviación estándar

VC, vehículo control

TABLA 2

*Células de neuroblastoma: incubación de 24 horas*

Identificación del artículo a ensayar	Concentración				Porcentaje de células viables
		Muestra	Media	DE	
		0.089	0.096	0.009	100
CN (PBS)		0.102			
VC (DMSO)		0.073	0.070	0.004	100
VC (DMSO)		0.067			
CP (tamoxifeno)	100 $\mu$ M	0.010	0.010	0.001	14
CP (tamoxifeno)	100 $\mu$ M	0.009			
AD7C-NTP	100-1000 ng/ml	0.012	0.013	0.001	14
AD7C-NTP	100-1000 ng/ml	0.014			

Abreviaturas: ABS, absorbancia; CN, control negativo

CP, control positivo; DE, desviación estándar

VC, vehículo control

### Experimento 2

Para este experimento se utilizaron células de glioma y de neuroblastoma. Se añadió MTT a las placas siguiendo una incubación de 24 horas con las soluciones control o a ensayar. Otras placas se rellenaron con medio fresco, soluciones control o a ensayar a las 24 horas y después se leyeron 3 días más tarde. Los resultados se expresan como diferencias de absorbancia media y se representan como porcentaje del control negativo y se muestran en la Tabla 3 (células de glioma) y la Tabla 4 (células de neuroblastoma).

## ES 2 295 347 T3

TABLA 3

*Citotoxicidad en células de glioma: 4 días*

Identificación del artículo a ensayar	Concentración	ABS 570-650			Porcentaje de células viables
		Muestra	Media	DE	
CN (PBS)		0.107	0.093	0.016	100
CN (PBS)		0.790			
VC (DMSO)		0.076	0.079	0.004	100
VC (DMSO)		0.081			
CP (tamoxifeno)	100 $\mu$ M	0.018	0.015	0.003	19
CP (tamoxifeno)	100 $\mu$ M	0.012			
AD7C-NTP	100-1000 ng/ml	0.012	0.012	0.001	11
AD7C-NTP	100-1000 ng/ml	0.011			

Abreviaturas: ABS, absorbancia; CN, control negativo

CP, control positivo; DE, desviación estándar

VC, vehículo control

TABLA 4

*Efectos de citotoxicidad de los artículos a ensayar en células de neuroblastoma: incubación de 4 días*

Identificación del artículo a ensayar	Concentración				Porcentaje de células viables
		Muestra	Media	DE	
CN (PBS)		0.088	0.022	0.022	100
CN (PBS)		0.082			
VC (DMSO)		0.076	0.076	0.001	100
VC (DMSO)		0.077			
CP (tamoxifeno)	100 $\mu$ M	0.016	0.019	0.003	25
AD7C-NTP	100-1000 ng/ml	0.007	0.010	0.004	11
AD7C-NTP	100-1000 ng/ml	0.012			

Abreviaturas: ABS, absorbancia; CN, control negativo

CP, control positivo; DE, desviación estándar

VC, vehículo control

### Conclusión

Los efectos citotóxicos significativos sobre las células de glioma y neuroblastoma son aparentes a las 24 horas y a las 96 horas con AD7C-NTP

## Ejemplo 2

El propósito de este ejemplo fue determinar el efecto de NTP en tejidos en los sitios de inyección.

Se inyectaron ocho ratas normales en la piel y subcutáneamente, cada una en 3 focos diferentes, con AD7C-NTP recombinante purificada en solución salina a concentraciones de 0.1-10  $\mu\text{g/mL}$  distribuidas de jeringuillas de plástico a través de agujas de acero inoxidable de 26 gauge.

Los animales se observaron durante 24 horas y se sacrificaron sin dolor a las 24 horas. Se extirparon los 24 focos individuales de infiltración, se fijaron en formalina al 10%, se embebieron en parafina, y se tiñeron y examinaron por métodos histopatológicos estándar.

Se inyectaron grupos similares de ratas control con (1) seroalbúmina bovina al 0.1% en solución salina, (2) suero humano normal, (3) solución salina fisiológica, (4) proteínas de *E. coli* de vectores sin AD7C-NTP, purificadas utilizando métodos similares a la purificación de AD7C-NTP; (5) proteína recombinante no NTP expresada en *E. coli* y purificada y después examinada y sacrificada como anteriormente, tratando los focos de inyección extirpados como anteriormente.

*Resultados*

La inyección de AD7C-NTP en todos los ejemplos produjo necrosis aguda abundante del tejido en los sitios de la inyección (Figuras 1-5). La necrosis es evidente en tejido muscular, tejido conjuntivo subcutáneo, y dermis en los sitios en los se inyectó AD7C-NTP. A las 24 horas, las células aparecen tenues, encogidas, y necróticas, y hay infiltración con células inflamatorias. La necrosis se correlaciona con las áreas de inyección y no parece extenderse muy lejos del sitio de inyección.

Aparte de las zonas de inflamación ligera, los controles no mostraron evidencia de necrosis o pérdida celular. En contraste a las inyecciones con AD7C-NTP donde campos enteros de capas de fibras musculares estaban necróticas, los controles mostraron cambios musculares mínimos o ausentes. Las inyecciones control tuvieron inflamación aguda de ligera a mínima en los sitios de inyección y microhemorragias focales de las agujas.

## Ejemplo 3

El propósito de este ejemplo fue determinar el efecto de NTP en diferentes tumores de origen humano y no humano.

La infiltración con AD7C-NTP se ensayó en varios tumores de diferente origen humano y no humano, incluyendo carcinoma de mama, carcinoma y papiloma de piel, carcinoma de colon, glioma de cerebro, y otros en modelos de roedores. Los tumores se infiltraron directamente con AD7C-NTP como se ha descrito en el Ejemplo 2 y los animales de experimentación se observaron y se sacrificaron sin dolor después de intervalos de 24 horas a 2 semanas. Después del sacrificio, se llevó a cabo el examen histopatológico del tumor como anteriormente.

Los tumores control se ensayaron con (1) sin tratamiento, (2) infiltración con suero humano normal, (3) infiltración con seroalbúmina bovina, e (4) infiltración con solución salina.

*Resultados*

En todos los casos ensayados, hubo necrosis significativa de las células tumorales después de la infiltración con AD7C-NTP (Figuras 6-10). En los ejemplos en los que hubo dos inyecciones con 24 horas de diferencia, hubo más destrucción de tumor que después de una inyección individual. En algunos ejemplos el tumor reversionó casi completamente. En otros ejemplos después de una inyección individual, los tumores se volvieron más grandes 1-2 semanas después si no había inyecciones adicionales de AD7C-NTP. En algunos tumores tratados con una inyección de AD7C-NTP y examinados histológicamente dos semanas después, había cavidades vacías grandes donde había estado previamente el tumor, rodeadas de bordes de tumor, indicando que el tumor infiltrado tras la necrosis había formado cavidades y desaparecido. En otros tumores tratados con una inyección y examinados histológicamente dos semanas después había extensiones fibrosas en el tumor no vistas en los controles, atribuidas a la destrucción del tumor y posterior fibrosis. Los casos control mostraron solo microhemorragias e inflamación focales y deformación ocasional, pero necrosis insignificante y ninguna evidencia de la necrosis masiva ilustrada en las infusiones de AD7C-NTP.



## REIVINDICACIONES

1. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la cadena neural (NTP) para la producción de una composición para tratar tumores.

2. El uso según la reivindicación 1, en donde dicha NTP se va a administrar mediante un método seleccionado del grupo que consiste en oralmente, subcutáneamente, intradérmicamente, intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente, intranasalmente, intratumoralmente, tópicamente, y transdérmicamente.

3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicho tratamiento se va a administrar al paciente antes, durante o después del tratamiento del paciente seleccionado del grupo de tratamientos que consiste en escisión quirúrgica, trasplante, injerto, quimioterapia, inmunoterapia, vacunación, ablación térmica o eléctrica, crioterapia, terapia de láser, fototerapia, terapia génica, y radiación.

4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el tumor se selecciona del grupo que consiste en un tumor benigno o maligno de un tejido seleccionado del grupo que consiste en pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovario, piel, riñón, seno, colon, intestino, estómago, recto, esófago, corazón, bazo, glándula salivar, sangre, cerebro y sus recubrimientos, médula espinal y sus recubrimientos, músculo, tejido conjuntivo, glándula suprarrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículo, hipófisis, órganos reproductores, hígado, vesícula biliar, ojo, oído, nariz, garganta, boca, y nódulos linfáticos y sistema linfático.

5. El uso de la reivindicación 4, en donde el tejido se selecciona del grupo que consiste en piel, ojo, oído, nariz, garganta, boca, músculo, tejido conjuntivo, pelo, y mama.

6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la NTP se conjuga, acopla o une a una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y una molécula de unión semejante a anticuerpo, en donde dicha molécula tiene una afinidad mayor para unirse a un tumor que para unirse a otras células.

7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde NTP es parte de una nueva molécula recombinante individual clonada que consiste en NTP y una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, y molécula de unión semejante a anticuerpo, en donde dicha molécula tiene mayor afinidad para unirse a un tumor que para unirse a otras células.

8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha NTP se elige del grupo que consiste en AD7c-NTP (SEQ ID NO. 1), las proteínas identificadas mediante SEQ ID NOs. 2 a 9, proteína neural de la cadena pancreática y proteína de la cadena pancreática.

9. El uso la reivindicación 8, en donde dicha NTP se va a administrar mediante un método seleccionado del grupo que consiste en oralmente, subcutáneamente, intradérmicamente, intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, intracerebralmente (intraparenquimamente), intracerebroventricularmente, intraocularmente, intraarterialmente, intranasalmente, intratumoralmente, intralesionalmente, tópicamente, y transdérmicamente.

10. El uso de la reivindicación 8, en donde dicho tratamiento se va a administrar al paciente antes, durante o después del tratamiento del paciente seleccionado del grupo de tratamientos que consiste en escisión quirúrgica, trasplante, injerto, quimioterapia, inmunoterapia, vacunación, ablación térmica o eléctrica, crioterapia, terapia de láser, fototerapia, terapia génica, y radiación.

11. El uso de la reivindicación 8, donde el tumor se selecciona del grupo que consiste en un tumor benigno o maligno de un tejido seleccionado del grupo que consiste en pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovario, piel, riñón, seno, colon, intestino, estómago, recto, esófago, corazón, bazo, glándula salivar, sangre, cerebro y sus recubrimientos, médula espinal y sus recubrimientos, músculo, tejido conjuntivo, glándula suprarrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículo, hipófisis, órganos reproductores, hígado, vesícula biliar, ojo, oído, nariz, garganta, boca, y nódulos linfáticos y sistema linfático.

12. El uso de la reivindicación 11, en donde el tejido se selecciona del grupo que consiste en piel, ojo, oído, nariz, garganta, boca, músculo, conjuntivo, adiposo, pelo y mama.

13. El uso de la reivindicación 8, en donde en donde la dicha NTP se conjuga, acopla o une a una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y una molécula de unión semejante a anticuerpo, en donde dicha molécula tiene una afinidad mayor para unirse a un tumor que para unirse a otras células.

14. El uso de la reivindicación 8, en donde la dicha NTP es parte de una nueva molécula recombinante individual clonada que consiste en NTP y una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, y molécula de unión semejante a anticuerpo, en donde dicha molécula tiene mayor afinidad para unirse a un tumor que para unirse a otras células.

15. El uso de la reivindicación 8, en donde la NTP está conjugada, acoplada o unida a una proteína u otra molécula, en donde la composición se corta en o cerca de el(los) sitio(s) del tumor u otras células no deseadas mediante una enzima o proteasa específica de tumor o de sitio o mediante un anticuerpo conjugado que tiene como diana el tumor y así libera la NTP.

16. El uso de la reivindicación 8, en donde la NTP está conjugada o acoplada o unida a una proteína u otra molécula, en donde la composición libera NTP tras exposición del tejido a ser tratado a la luz (como en terapias láser u otra terapia fotodinámica o fotoactivada), otras formas de radiación electromagnética tal como radiación infrarroja, radiación ultravioleta, radiación por rayos X o rayos gamma, calor localizado, radiación alpha o beta, emisiones ultrasónicas, u otras fuentes de energía localizada.

17. El uso de la reivindicación 8, en donde la NTP se va a emplear en combinación con otras composiciones farmacéuticas, tal como citoquinas, factores de crecimiento, antibióticos, agentes inductores de apoptosis, antiinflamatorios, y/o agentes quimioterapéuticos según sea apropiado para la indicación a ser tratada.

18. El uso de la reivindicación 8, donde la NTP se va a emplear en combinación con dendrímeros, fulerenos, y otras moléculas sintéticas, polímeros y macromoléculas en donde la NTP está conjugada con, unida a, o incluida en la molécula, polímero o macromolécula, bien por si misma bien conjuntamente con una molécula con una afinidad mayor para unirse a un tumor que para unirse a otras células.

19. El uso de la reivindicación 8, en donde en donde la NTP se conjuga, acopla o une a una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y una molécula de unión semejante a anticuerpo, en donde dicha molécula tiene una afinidad mayor para unirse a un tumor que para unirse a otras células.

20. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un gen de NTP para la producción de una composición para tratar tumores.

# FIG. 1A

AD7c-NTP

Secuencia de ácido nucleico y aminoácidos

(Secuencias 120 y 121 de las Patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888; de la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997))

No. de acceso de NCBI Entrez-Protein # AAC08737; PID g3002527

```

1 tttttttttttgag ATG GAG TTT TCG CTC TTG TTG CCC AGG CTG GAG TGC AAT GGC GCA ATC 62
1      M E F S L L L P R L E C N G A I 16
      Met-Glu-Phe-Ser-Leu=Leu-Leu-Pro-Arg-Leu-Glu-Cys-Asn-Gly-Ala-Ile-

63 TCA GCT CAC CGC AAC CTC CGC CTC CCG GGT TCA AGC GAT TCT CCT GCC TCA GCC TCC CCA 122
17 S A H R N L R L P G S S D S P A S A S P 36
      Ser-Ala-His-Arg-Asn-Leu-Arg-Leu-Pro-Gly-Ser-Ser-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-

123 GTA GCT GGG ATT ACA GGC ATG TGC ACC CAC GCT CGG CTA ATT TTG TAT TTT TTT TTA GTA 182
37 V A G I T G M C T H A R L I L Y F F L V 56
      Val-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Met-Cys-Thr-His-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Leu-Val-

183 GAG ATG GAG TTT CTC CAT GTT GGT CAG GCT GGT CTC GAA CTC CCG ACC TCA GAT GAT CCC 242
57 E M E F L H V G Q A G L E L P T S D D P 76
      Glu-Met-Glu-Phe-Leu-His-Val-Gly-Gln-Ala-Gly-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-Ser-Asp-Asp-Pro-

243 TCC GTC TCG GCC TCC CAA AGT GCT AGA TAC AGG ACT GGC CAC CAT GCC CGG CTC TGC CTG 302
77 S V S A S Q S A R Y R T G H H A R L C L 96
      Ser-Val-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Arg-Tyr-Arg-Thr-Gly-His-His-Ala-Arg-Leu-Cys-Leu-

```

**FIG. 1B**

303 GCT AAT TTT TGT GGT AGA AAC AGG GTT TCA CTG ATG TGC CCA AGC TGG TCT CTT GAG CTC 362  
 97 A N P C G R N R V S L M C P S W S P E L 116  
 Ala-Asn-Phe-Cys-Gly-Arg-Asn-Arg-Val-Ser-Leu-Met-Cys-Pro-Ser-Trp-Ser-Pro-Glu-Leu-

363 AAG CAG TCC ACC TGC CTC AGC CTC CCA AAG TGC TGG GAT TAC AGG CGT GCA GCC GTG CCT 422  
 117 K Q S T C L S L P K C W D Y R R A A V P 136  
 Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-

423 GGC CTT TTT ATT TTA TTT TTT TTA AGA CAC AGG TGT CCC ACT CTT ACC CAG GAT GAA GTG 482  
 137 G L F I L F F L R H R C P T L T Q D E V 156  
 Gly-Leu-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-

483 CAG TGG TGT GAT CAC AGC TCA CTG CAG CCT TCA ACT CCT GAG ATC AAG CAT CTT CCT GCC 542  
 157 Q W C D H S S L Q P S T P E I K H P P A 176  
 Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser-Leu-Gln-Pro-Ser-Thr-Pro-Glu-Ile-Lys-His-Pro-Pro-Ala-

543 TCA GCC TCC CAA GTA GCT GGG ACC AAA GAC ATG CAC CAC TAC ACC TGG CTA ATT TTT ATT 602  
 177 S A S Q V A G T K D M H H Y T W L I P I 196  
 Ser-Ala-Ser-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Lys-Asp-Met-His-His-Tyr-Thr-Trp-Leu-Ile-Phe-Ile-

603 TTT ATT TTT AAT TTT TTG AGA CAG AGT CTC AAC TCT GTC ACC CAG GCT GGA GTG CAG TGG 662  
 197 F I F N F L R Q S L N S V T Q A G V Q W 216  
 Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu-Arg-Gln-Ser-Leu-Asn-Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-

663 CGC AAT CTT GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG TTC AAG TTA TTC TCC TGC CCC AGC 722  
 217 R N L G S L Q P L P P G F K L F S C P S 236  
 Arg-Asn-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-

723 CTC CTG AGT AGC TGG GAC TAC AGG CGC CCA CCA CGC CTA GCT AAT TTT TTT GTA TTT TTA 782  
 237 L L S S W D Y R R P P R L A N F P V P L 256  
 Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Phe-Val-Phe-Leu-

783 GTA GAG ATG GGG TTC ACC ATG TTC GCC AGG TTG ATC TTG ATC TCT GGA CCT TGT GAT CTG 842  
 257 V E M G F T M F A R L I L I S G P C D L 276  
 Val-Glu-Met-Gly-Phe-Thr-Met-Phe-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Ile-Ser-Gly-Pro-Cys-Asp-Leu-

# FIG. 1C

843 CCT GCC TCG GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA GGC GTG AGC CAC CAC GCC CGG CTT ATT 902  
 277 P A S A S Q S A G I T G V S H H A R L I 296  
 Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His-His-Ala-Arg-Leu-Ile-

903 TTT AAT TTT TGT TTG TTT GAA ATG GAA TCT CAC TCT GTT ACC CAG GCT GGA GTG CAA TGG 962  
 297 F N F C L F E M E S H S V T Q A G V Q W 316  
 Phe-Asn-Phe-Cys-Leu-Phe-Glu-Met-Glu-Ser-His-Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-

963 CCA AAT CTC GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG CTC AAG CGA TTC TCC TGT CTC AGC 1022  
 317 P N L G S L Q P L P P G L K R F S C L S 336  
 Pro-Asn-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-

1023 CTC CCA AGC AGC TGG GAT TAC GGG CAC CTG CCA CCA CAC CCC GCT AAT TTT TGT ATT TTC 1082  
 337 L P S S W D Y G H L P P H P A N F C I F 356  
 Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Ala-Asn-Phe-Cys-Ile-Phe-

1083 ATT AGA GGC GGG GTT TCA CCA TAT TTG TCA GGC TGG TCT CAA ACT CCT GAC CTC AGG tgac  
 1143  
 357 I R G G V S P Y L S G W S Q T P D L R  
 375  
 Ile-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Pro-Tyr-Leu-Ser-Gly-Trp-Ser-Gln-Thr-Pro-Asp-Leu-Arg

1144 ccacctgcctcagccttccaaagtgtgggattacagcgtagccacctcaccagccggctaatttagataaaaaaat  
 1223

1224 atgtagcaatgggggtcttgctatgttcccaggtgtgtctcaaacttctggcttcatgcaatccttccaaatgagcca  
 1303

1304 caacacccagccagtcacattttttaacagttacatctttattttagtatactagaagtaatacaataaacatgtcaa  
 1383

1384 acctgcaaattcagtagtaacagagttcttttataacttttaacaaagcttttagagca 1442

**FIG. 2**

NTP, 122 aminoácidos

(Secuencia 40 de las Patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888)

No. de acceso de NCBI Entrez-Protein #AAE25447; PID g10048540

Secuencia de aminoácidos

```

1   Met-Met-Val-Cys-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-Lys-
    M  M  V  C  W  N  R  F  G  K

11  Trp-Val-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Ile-Phe-Asn-
    W  V  Y  F  I  S  A  I  F  N

21  Phe-Gly-Pro-Arg-Tyr-Leu-Tyr-His-Gly-Val-
    F  G  P  R  Y  L  Y  H  G  V

31  Pro-Phe-Tyr-Phe-Leu-Ile-Leu-Val-Arg-Ile-
    P  F  Y  F  L  I  L  V  R  I

41  Ile-Ser-Phe-Leu-Ile-Gly-Asp-Met-Glu-Asp-
    I  S  F  L  I  G  D  M  E  D

51  Val-Leu-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Leu-Lys-Arg-
    V  L  L  N  C  T  L  L  K  R

61  Ser-Ser-Arg-Phe-Arg-Phe-Trp-Gly-Ala-Leu-
    S  S  R  F  R  F  W  G  A  L

71  Val-Cys-Ser-Met-Asp-Ser-Cys-Arg-Phe-Ser
    V  C  S  M  D  S  C  R  F  S

81  Arg-Val-Ala-Val-Thr-Tyr-Arg-Phe-Ile-Thr-
    R  V  A  V  T  Y  R  F  I  T

91  Leu-Leu-Asn-Ile-Pro-Ser-Pro-Ala-Val-Trp-
    L  L  N  I  P  S  P  A  V  W

101 Met-Ala-Arg-Asn-Thr-Ile-Asp-Gln-Gln-Val-
    M  A  R  N  T  I  D  Q  Q  V

111 Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-
    L  S  R  I  K  L  E  I  K  R

121 Cys-Leu
    C  L
  
```

**FIG. 3**

NTP, 112 aminoácidos

No. de acceso de NCBI Entrez-Protein #XP\_032307; PID  
g14725132

Secuencia de aminoácidos

```

1   Met-Ala-Gln-Ser-Arg-Leu-Thr-Ala-The-Ser-
    M  A  Q  S  R  L  T  A  T  S

11  Ala-Ser-Arg-Val-Gln-Ala-Ile-Leu-Leu-Ser-
    A  S  R  V  Q  A  I  L  L  S

21  Gln-Pro-Pro-Lys-Gln-Leu-Gly-Leu-Arg-Ala-
    Q  P  P  K  Q  L  G  L  R  A

31  Pro-Ala-Asn-Thr-Pro-Leu-Ile-Phe-Val-Phe-
    P  A  N  T  P  L  I  F  V  F

41  Ser-Leu-Glu-Ala-Gly-Phe-His-His-Ile-Cys-
    S  L  E  A  G  F  H  H  I  C

51  Gln-Ala-Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Thr-Ser-Gly-
    Q  A  G  L  K  L  L  T  S  G

61  Asp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ala-Phe-Gln-Ser-Ala-
    D  P  P  A  S  A  F  Q  S  A

71  Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His-Leu-Thr-Gln-
    G  I  T  G  V  S  H  L  T  Q

81  Pro-Ala-Asn-Leu-Asp-Lys-Lys-Ile-Cys-Ser-
    P  A  N  L  D  K  K  I  C  S

91  Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Tyr-Val-Ala-Gln-Ala-
    N  G  G  S  C  Y  V  A  Q  A

101 Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Ala-Ser-Cys-Asn-Pro-
    G  L  K  L  L  A  S  C  N  P

111 Ser-Lys
    S  K

```

## FIG. 4

NTP, 106 aminoácidos

No. de acceso de NCBI Entrez-Protein #AAH14951; PID g15928971

```

1   Met-Trp-Thr-Leu-Lys-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-
    M   W   T   L   K   S   S   L   V   L

11  Leu-Leu-Cys-Leu-Thr-Cys-Ser-Tyr-Ala-Phe-
    L   L   C   L   T   C   S   Y   A   F

21  Met-Phe-Ser-Ser-Leu-Arg-Gln-Lys-Thr-Ser-
    M   F   S   S   L   R   Q   K   T   S

31  Glu-Pro-Gln-Gly-Lys-Val-Pro-Cys-Gly-Glu-
    E   P   Q   G   K   V   P   C   G   E

41  His-Phe-Arg-Ile-Arg-Gln-Asn-Leu-Pro-Glu-
    H   F   R   I   R   Q   N   L   P   E

51  His-Thr-Gln-Gly-Trp-Leu-Gly-Ser-Lys-Trp-
    H   T   Q   G   W   L   G   S   K   W

61  Leu-Trp-Leu-Leu-Phe-Ala-Val-Val-Pro-Phe-
    L   W   L   L   F   A   V   V   P   F

71  Val-Ile-Leu-Lys-Cys-Gln-Arg-Asp-Ser-Glu-
    V   I   L   K   C   Q   R   D   S   E

81  Lys-Asn-Lys-Val-Arg-Met-Ala-Pro-Phe-Phe-
    K   N   K   V   R   M   A   P   F   F

91  Leu-His-His-Ile-Asp-Ser-Ile-Ser-Gly-Val-
    L   H   H   I   D   S   I   S   G   V

101 Ser-Gly-Lys-Arg-Met-Phe
    S   G   K   R   M   F
  
```



**FIG. 5**

NTP, 106 aminoácidos

No. de acceso de NCBI Entrez-Protein #XP\_039102; PID  
g18599339

```

1   Met-Phe-Phe-Val-Leu-Tyr-Arg-Phe-Cys-Phe-
    M  F  F  V  L  Y  R  F  C  F

11  Cys-Phe-Phe-Glu-Thr-Glu-Ser-His-Ser-Leu-
    C  F  F  E  T  E  S  H  S  L

21  Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Cys-Glu-Leu-
    T  Q  A  G  V  Q  W  C  E  L

31  Gly-Ser-Pro-Gln-Pro-Leu-Pro-Ser-Gly-Phe-
    G  S  P  Q  P  L  P  S  G  F

41  Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Leu-Ser-
    K  R  F  S  C  L  S  L  L  S

51  Ser-Trp-Asp-Tyr-Ser-His-Glu-Pro-Pro-His-
    S  W  D  Y  S  H  E  P  P  H

61  Pro-Val-Ile-Cys-Ser-Phe-Leu-Met-Glu-Lys-
    P  V  I  C  S  F  L  M  E  K

71  Cys-Leu-Ile-Leu-Tyr-Lys-Pro-Asn-Gly-Asp-
    C  L  I  L  Y  K  P  N  G  D

81  Thr-Ile-Gly-Pro-Ile-Leu-Val-Gln-Gln-Gly-
    T  I  G  P  I  L  V  Q  Q  G

91  Lys-Arg-Gln-Lys-Leu-Tyr-Ile-Ser-Ala-Asp-
    K  R  Q  K  L  Y  I  S  A  D

100 Leu-Val-His-Leu-Ile-Ala
    L  V  H  L  I  A

```

## FIG. 6

NTP, 98 aminoácidos

(Secuencia 30 de las Patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888)

No. de acceso de NCBI Entrez-Protein #AAE25445; PID g10048538

```

1   Glu-Ala-Tyr-Tyr-Thr-Met-Leu-His-Leu-Pro-
    E  A  Y  Y  T  M  L  H  L  P

11  Thr-Thr-Asn-Arg-Pro-Lys-Ile-Ala-His-Cys
    T  T  N  R  P  K  I  A  H  C

21  Ile-Leu-Phe-Asn-Gln-Pro-His-Ser-Pro-Arg-
    I  L  F  N  Q  P  H  S  P  R

31  Ser-Asn-Ser-His-Ser-His-Pro-Asn-Pro-Leu-
    S  N  S  H  S  H  P  N  P  L

41  Lys-Leu-His-Arg-Arg-Ser-His-Ser-His-Asn-
    K  L  H  R  R  S  H  S  H  N

51  Arg-Pro-Arg-Ala-Tyr-Ile-Leu-Ile-Thr-Ile-
    R  P  R  A  Y  I  L  I  T  I

61  Leu-Pro-Ser-Lys-Leu-Lys-Leu-Arg-Thr-His-
    L  P  S  K  L  K  L  R  T  H

71  Ser-Gln-Ser-His-His-Asn-Pro-Leu-Ser-Arg-
    S  Q  S  H  H  N  P  L  S  R

81  Thr-Ser-Asn-Ser-Thr-Pro-Thr-Asn-Ser-Phe-
    T  S  N  S  T  P  T  N  S  F

91  Leu-Met-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Arg
    L  M  T  S  S  K  P  R
  
```

## FIG. 7

NTP, 75 aminoácidos

(Secuencia 48 de las Patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888)

No. de acceso de NCBI Entrez-Protein #AAE25448; PID g10048541

```

1   Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-
    S  S  S  L  G  L  P  K  C  W

11  Asp-Tyr-Arg-His-Glu-Leu-Leu-Ser-Leu-Ala-
    D  Y  R  H  E  L  L  S  L  A

21  Leu-Met-Ile-Asn-Phe-Arg-Val-Met-Ala-Cys
    L  M  I  N  F  R  V  M  A  C

31  Thr-Phe-Lys-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Arg-Gln-
    T  F  K  Q  H  I  E  L  R  Q

41  Lys-Ile-Ser-Ile-Val-Pro-Arg-Lys-Leu-Cys-
    K  I  S  I  V  P  R  K  L  C

51  Cys-Met-Gly-Pro-Val-Cys-Pro-Val-Lys-Ile-
    C  M  G  P  V  C  P  V  K  I

61  Ala-Leu-Leu-Thr-Ile-Asn-Gly-His-Cys-Thr-
    A  L  L  T  I  N  G  H  C  T

71  Trp-Leu-Pro-Ala-Ser
    W  L  P  A  S

```

## FIG. 8

NTP, 68 aminoácidos

(Secuencia 36 de las Patentes de EE.UU. Nos. 5830670, 5948634 y 5948888)

No. de acceso de NCBI Entrez-Protein #AAE25446; PID g10048539

```

1   Met-Phe-Val-Phe-Cys-Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-
    M   F   V   F   C   L   I   L   N   R

11  Glu-Lys-Ile-Lys-Gly-Gly-Asn-Ser-Ser-Phe-
    E   K   I   K   G   G   N   S   S   F

21  Phe-Leu-Leu-Ser-Phe-Phe-Phe-Ser-Phe-Gln-
    F   L   L   S   F   F   F   S   F   Q

31  Asn-Cys-Cys-Gln-Cys-Phe-Gln-Cys-Arg-Thr-
    N   C   C   Q   C   F   Q   C   R   T

41  Thr-Glu-Gly-Tyr-Ala-Val-Glu-Cys-Phe-Tyr-
    T   E   G   Y   A   V   E   C   F   Y

51  Cys-Leu-Val-Asp-Lys-Ala-Ala-Phe-Glu-Cys-
    C   L   V   D   K   A   A   F   E   C

61  Trp-Trp-Phe-Tyr-Ser-Phe-Asp-Thr
    W   W   F   Y   S   F   D   T
  
```

## FIG. 9

NTP, 61 aminoácidos

No. de acceso de NCBI Entrez-Protein #AAH02534; PID g12803421

```

1   Met-Glu-Pro-His-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Gly-
    M   E   P   H   T   V   A   Q   A   G

11  Val-Pro-Gln-His-Asp-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-
    V   P   Q   H   D   L   G   S   L   Q

21  Ser-Leu-Leu-Pro-Arg-Phe-Lys-Arg-Phe-Ser-
    S   L   L   P   R   F   K   R   F   S

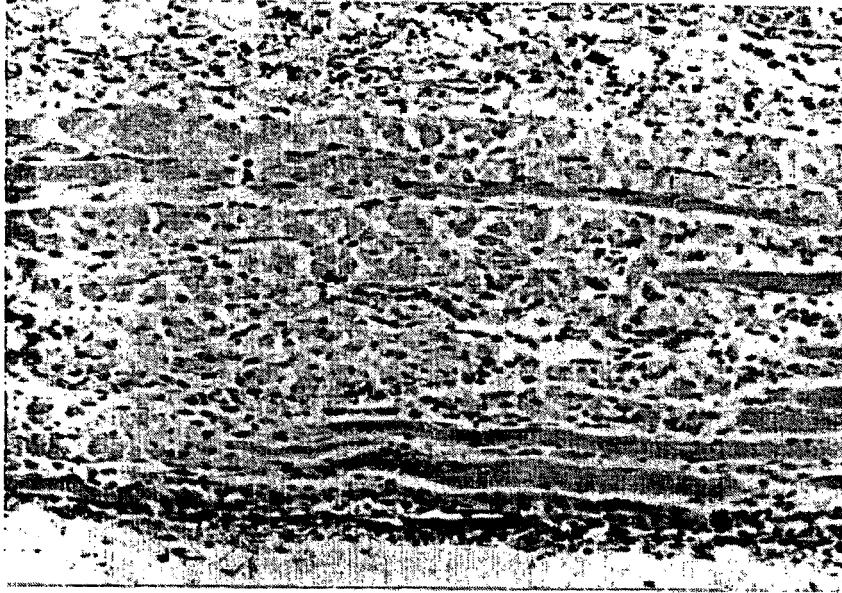
31  Cys-Leu-Ile-Leu-Pro-Lys-Ile-Trp-Asp-Tyr-
    C   L   I   L   P   K   I   W   D   Y

41  Arg-Asn-Met-Asn-Thr-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-
    R   N   M   N   T   A   L   I   K   R

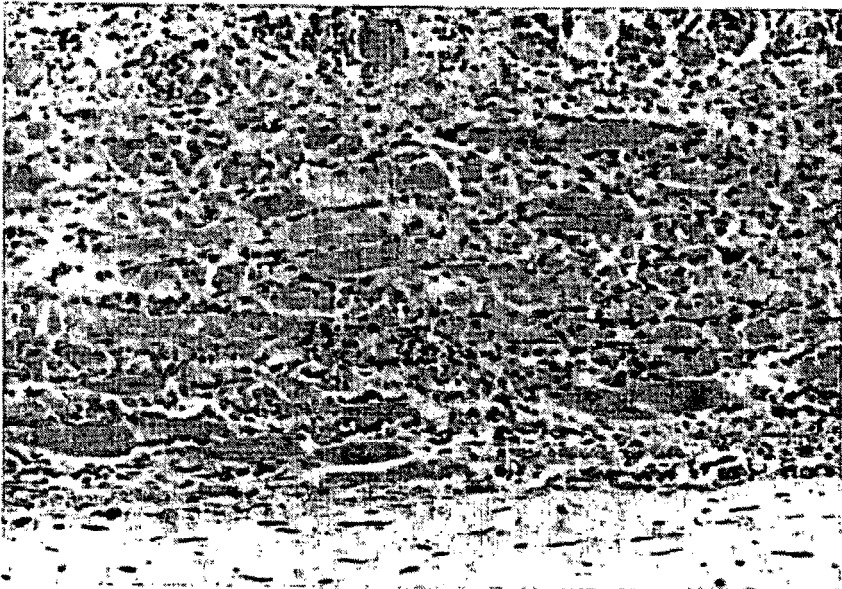
51  Asn-Arg-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-
    N   R   Y   T   P   E   T   G   R   K

61  Ser
    S
  
```

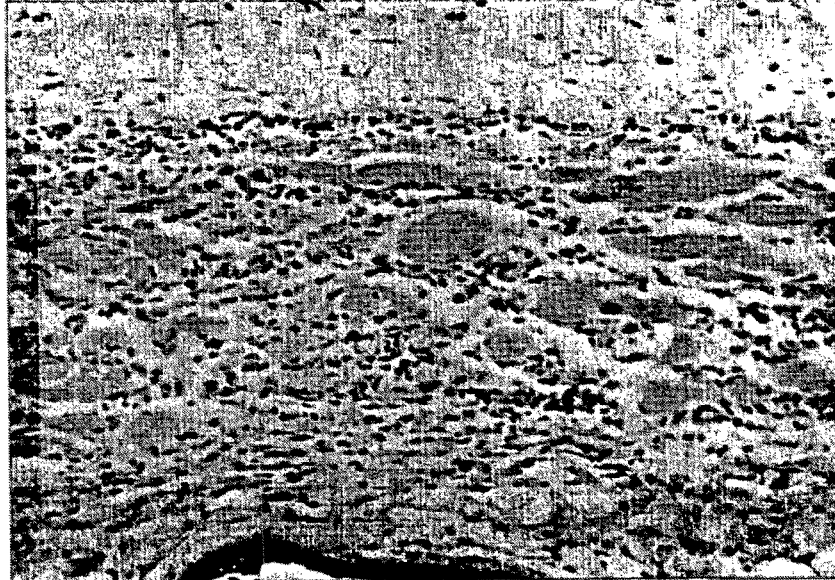
**FIG. 10**



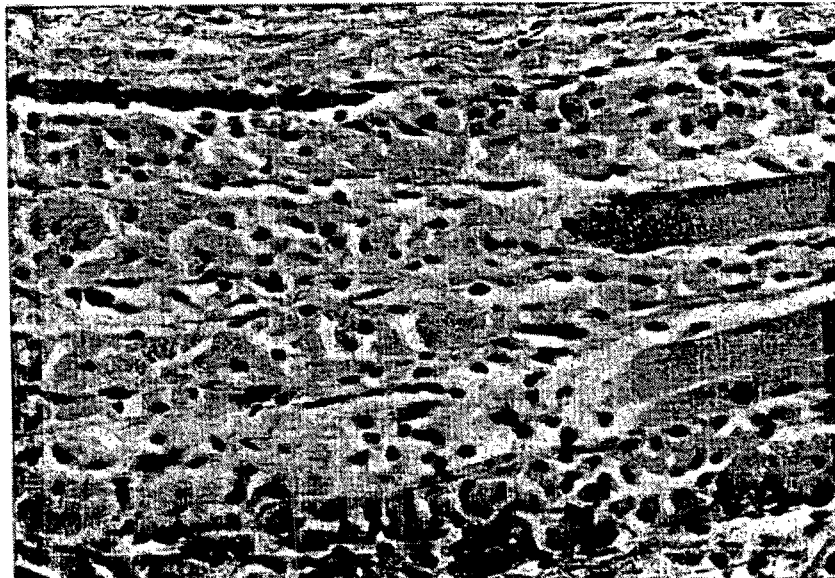
**FIG. 11**



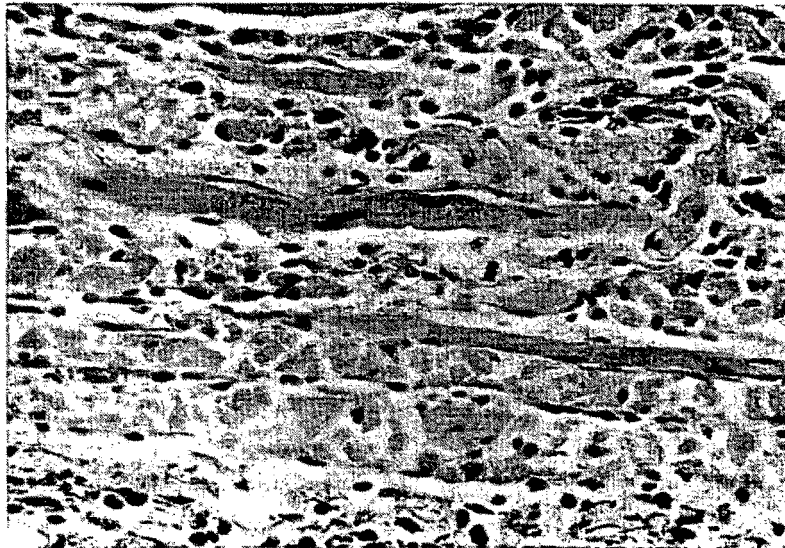
**FIG. 12**



**FIG. 13**



**FIG. 14**

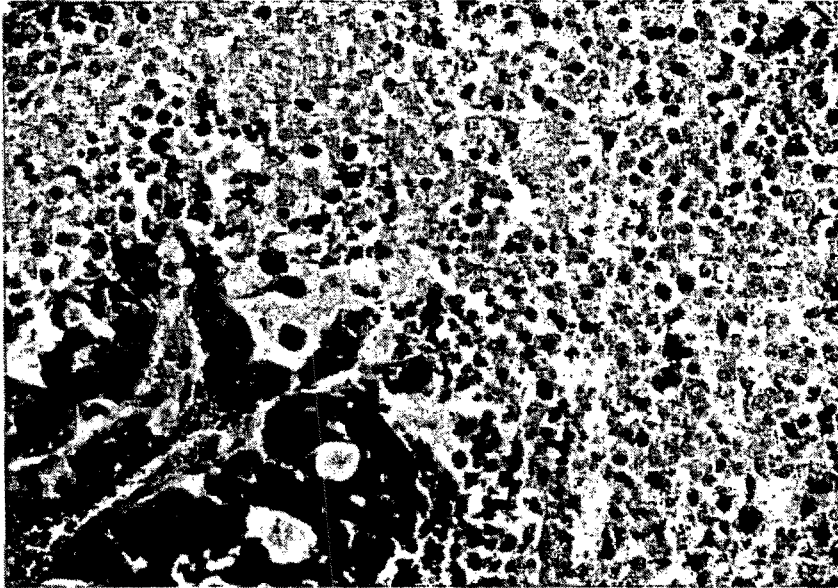


**FIG. 15**

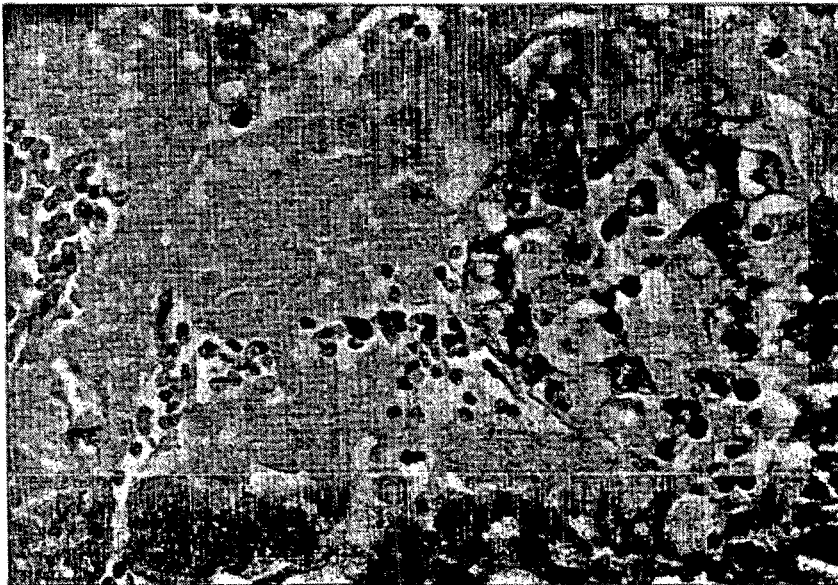




**FIG. 16**



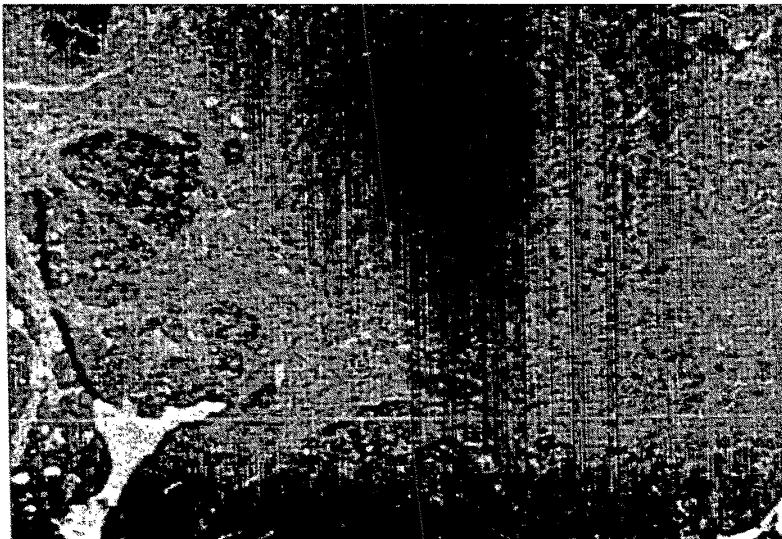
**FIG. 17**



**FIG. 18**



**FIG. 19**



# ES 2 295 347 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> NYMOX PHARMACEUTICAL CORPORATION

5 <120> MÉTODOS DE UTILIZAR PROTEÍNAS DE LA CADENA NEURAL PARA TRATAR TUMORES Y TRASTORNOS QUE REQUIEREN LA ELIMINACIÓN O DESTRUCCIÓN DE CÉLULAS

<130> 018792-0198

10 <140> PCT/US02/05103

<141> 08-03-2002

<140> 60/273,957

15 <141> 08-03-2001

<160> 11

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1442

25 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

30 <222> (15)...(1139)

<400> 1

```

35      tttttttttt tgag atg gag ttt tcg ctc ttg ttg ccc agg ctg gag tgc      50
           Met Glu Phe Ser Leu Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys
                1                5                10

40      aat ggc gca atc tca gct cac cgc aac ctc cgc ctc ccg ggt tca agc      98
      Asn Gly Ala Ile Ser Ala His Arg Asn Leu Arg Leu Pro Gly Ser Ser
                15                20                25

45      gat tct cct gcc tca gcc tcc cca gta gct ggg att aca ggc atg tgc      146
      Asp Ser Pro Ala Ser Ala Ser Pro Val Ala Gly Ile Thr Gly Met Cys
                30                35                40

50      acc cac gct cgg cta att ttg tat ttt ttt tta gta gag atg gag ttt      194
      Thr His Ala Arg Leu Ile Leu Tyr Phe Phe Leu Val Glu Met Glu Phe
                45                50                55                60

```

55

60

65

# ES 2 295 347 T3

	ctc cat gtt ggt cag gct ggt ctc gaa ctc ccg acc tca gat gat ccc	242
	Leu His Val Gly Gln Ala Gly Leu Glu Leu Pro Thr Ser Asp Asp Pro	
	65 70 75	
5	tcc gtc tgc gcc tcc caa agt gct aga tac agg act ggc cac cat gcc	290
	Ser Val Ser Ala Ser Gln Ser Ala Arg Tyr Arg Thr Gly His His Ala	
	80 85 90	
10	cgg ctc tgc ctg gct aat ttt tgt ggt aga aac agg gtt tca ctg atg	338
	Arg Leu Cys Leu Ala Asn Phe Cys Gly Arg Asn Arg Val Ser Leu Met	
	95 100 105	
15	tgc cca agc tgg tct cct gag ctc aag cag tcc acc tgc ctc agc ctc	386
	Cys Pro Ser Trp Ser Pro Glu Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu	
	110 115 120	
20	cca aag tgc tgg gat tac agg cgt gca gcc gtg cct ggc ctt ttt att	434
	Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile	
	125 130 135 140	
25	tta ttt ttt tta aga cac agg tgt ccc act ctt acc cag gat gaa gtg	482
	Leu Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val	
	145 150 155	
30	cag tgg tgt gat cac agc tca ctg cag cct tca act cct gag atc aag	530
	Gln Trp Cys Asp His Ser Ser Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Ile Lys	
	160 165 170	
35	cat cct cct gcc tca gcc tcc caa gta gct ggg acc aaa gac atg cac	578
	His Pro Pro Ala Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His	
	175 180 185	
40	cac tac acc tgg cta att ttt att ttt att ttt aat ttt ttg aga cag	626
	His Tyr Thr Trp Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln	
	190 195 200	
45	agt ctc aac tct gtc acc cag gct gga gtg cag tgg cgc aat ctt ggc	674
	Ser Leu Asn Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly	
	205 210 215 220	
50	tca ctg caa cct ctg cct ccc ggg ttc aag tta ttc tcc tgc ccc agc	722
	Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser	
	225 230 235	
55	ctc ctg agt agc tgg gac tac agg cgc cca cca cgc cta gct aat ttt	770
	Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe	
	240 245 250	
60	ttt gta ttt tta gta gag atg ggg ttc acc atg ttc gcc agg ttg atc	818
	Phe Val Phe Leu Val Glu Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile	
	255 260 265	
65	ttg atc tct gga cct tgt gat ctg cct gcc tgc gcc tcc caa agt gct	866
	Leu Ile Ser Gly Pro Cys Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala	
	270 275 280	
70	ggg att aca ggc gtg agc cac cac gcc cgg ctt att ttt aat ttt tgt	914
	Gly Ile Thr Gly Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys	
	285 290 295 300	

# ES 2 295 347 T3

5           ttg ttt gaa atg gaa tct cac tct gtt acc cag gct gga gtg caa tgg   962  
           Leu Phe Glu Met Glu Ser His Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp  
                                   305                                   310                                   315  
 10           cca aat ctc ggc tca ctg caa cct ctg cct ccc ggg ctc aag cga ttc   1010  
           Pro Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe  
                                   320                                   325                                   330  
 15           tcc tgt ctc agc ctc cca agc agc tgg gat tac ggg cac ctg cca cca   1058  
           Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro  
                                   335                                   340                                   345  
 20           cac ccc gct aat ttt tgt att ttc att aga ggc ggg gtt tca cca tat   1106  
           His Pro Ala Asn Phe Cys Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr  
                                   350                                   355                                   360  
 25           ttg tca ggc tgg tct caa act cct gac ctc agg tgacccacct gcctcagcct 1159  
           Leu Ser Gly Trp Ser Gln Thr Pro Asp Leu Arg  
                                   365                                   370                                   375  
 30           tccaaagtgc tgggattaca ggcgtgagcc acctcaccga gccggctaata ttagataaaa 1219  
           aaatatgtag caatgggggg tcttgctatg ttgcccagga tgggtctcaaa cttctggcctt 1279  
           catgcaatcc ttccaaatga gccacaacac ccagccagtc acatttttta aacagttaca 1339  
           tctttatctt agtatactag aaagtaatac aataaacatg tcaaacctgc aaattcagta 1399  
           gtaacagagt tcttttataa cttttaaaca aagctttaga gca                   1442

35 <210> 2  
     <211> 122  
     <212> PRT  
     <213> Organismo desconocido  
 40 <220>  
     <223> Descripción del organismo desconocido: proteína de la cadena neural  
 45 <400> 2

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

# ES 2 295 347 T3

Pro Ala Val Trp Met Ala Arg Asn Thr Ile Asp Gln Gln Val Leu Ser  
100 105 110

Arg Ile Lys Leu Glu Ile Lys Arg Cys Leu  
115 120

5

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

15

Met Ala Gln Ser Arg Leu Thr Ala Thr Ser Ala Ser Arg Val Gln Ala  
1 5 10 15

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

20

Asn Thr Pro Leu Ile Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Gly Phe His His  
35 40 45

Ile Cys Gln Ala Gly Leu Lys Leu Leu Thr Ser Gly Asp Pro Pro Ala  
50 55 60

25

Ser Ala Phe Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly Val Ser His Leu Thr Gln  
65 70 75 80

30

Pro Ala Asn Leu Asp Lys Lys Ile Cys Ser Asn Gly Gly Ser Cys Tyr  
85 90 95

Val Ala Gln Ala Gly Leu Lys Leu Leu Ala Ser Cys Asn Pro Ser Lys  
100 105 110

35

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

40

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

45

Met Trp Thr Leu Lys Ser Ser Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Thr Cys  
1 5 10 15

Ser Tyr Ala Phe Met Phe Ser Ser Leu Arg Gln Lys Thr Ser Glu Pro  
20 25 30

50

Gln Gly Lys Val Pro Cys Gly Glu His Phe Arg Ile Arg Gln Asn Leu  
35 40 45

Pro Glu His Thr Gln Gly Trp Leu Gly Ser Lys Trp Leu Trp Leu Leu  
50 55 60

55

Phe Ala Val Val Pro Phe Val Ile Leu Lys Cys Gln Arg Asp Ser Glu  
65 70 75 80

60

Lys Asn Lys Val Arg Met Ala Pro Phe Phe Leu His His Ile Asp Ser  
85 90 95

Ile Ser Gly Val Ser Gly Lys Arg Met Phe  
100 105

65

<210> 5

<211> 106

<212> PRT

# ES 2 295 347 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

```

5      Met Phe Phe Val Leu Tyr Arg Phe Cys Phe Cys Phe Phe Glu Thr Glu
      1          5          10          15

10     Ser His Ser Leu Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Cys Glu Leu Gly Ser
      20          25          30

15     Pro Gln Pro Leu Pro Ser Gly Phe Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser Leu
      35          40          45

15     Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Ser His Glu Pro Pro His Pro Val Ile Cys
      50          55          60

20     Ser Phe Leu Met Glu Lys Cys Leu Ile Leu Tyr Lys Pro Asn Gly Asp
      65          70          75          80

20     Thr Ile Gly Pro Ile Leu Val Gln Gln Gly Lys Arg Gln Lys Leu Tyr
      85          90          95

25     Ile Ser Ala Asp Leu Val His Leu Ile Ala
      100          105

```

<210> 6

<211> 98

<212> PRT

30 <213> Organismo desconocido

<220>

<223> Descripción del organismo desconocido: proteína de la cadena neural

35

<400> 6

```

40     Glu Ala Tyr Tyr Thr Met Leu His Leu Pro Thr Thr Asn Arg Pro Lys
      1          5          10          15

40     Ile Ala His Cys Ile Leu Phe Asn Gln Pro His Ser Pro Arg Ser Asn
      20          25          30

45     Ser His Ser His Pro Asn Pro Leu Lys Leu His Arg Arg Ser His Ser
      35          40          45

45     His Asn Arg Pro Arg Ala Tyr Ile Leu Ile Thr Ile Leu Pro Ser Lys
      50          55          60

50     Leu Lys Leu Arg Thr His Ser Gln Ser His His Asn Pro Leu Ser Arg
      65          70          75          80

50     Thr Ser Asn Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Leu Met Thr Ser Ser Lys
      85          90          95

55     Pro Arg

```

<210> 7

<211> 75

60 <212> PRT

<213> Organismo desconocido

<220>

<223> Descripción del organismo desconocido: proteína de la cadena neural

65

# ES 2 295 347 T3

<400> 7

```

5      Ser Ser Ser Leu Gly Leu Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg His Glu Leu
      1          5          10          15

      Leu Ser Leu Ala Leu Met Ile Asn Phe Arg Val Met Ala Cys Thr Phe
          20          25          30

10     Lys Gln His Ile Glu Leu Arg Gln Lys Ile Ser Ile Val Pro Arg Lys
          35          40          45

      Leu Cys Cys Met Gly Pro Val Cys Pro Val Lys Ile Ala Leu Leu Thr
          50          55          60

15     Ile Asn Gly His Cys Thr Trp Leu Pro Ala Ser
      65          70          75

```

<210> 8

20 <211> 68

<212> PRT

<213> Organismo desconocido

25 <220>

<223> Descripción del organismo desconocido: proteína de la cadena neural

<400> 8

```

30     Met Phe Val Phe Cys Leu Ile Leu Asn Arg Glu Lys Ile Lys Gly Gly
      1          5          10          15

      Asn Ser Ser Phe Phe Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ser Phe Gln Asn Cys
          20          25          30

35     Cys Gln Cys Phe Gln Cys Arg Thr Thr Glu Gly Tyr Ala Val Glu Cys
          35          40          45

40     Phe Tyr Cys Leu Val Asp Lys Ala Ala Phe Glu Cys Trp Trp Phe Tyr
          50          55          60

      Ser Phe Asp Thr
      65

```

45

<210> 9

<211> 61

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

```

55     Met Glu Pro His Thr Val Ala Gln Ala Gly Val Pro Gln His Asp Leu
      1          5          10          15

      Gly Ser Leu Gln Ser Leu Leu Pro Arg Phe Lys Arg Phe Ser Cys Leu
          20          25          30

60     Ile Leu Pro Lys Ile Trp Asp Tyr Arg Asn Met Asn Thr Ala Leu Ile
          35          40          45

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

```

65



# ES 2 295 347 T3

<210> 10

<211> 375

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

# ES 2 295 347 T3

Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln Ser Leu Asn Ser  
 195 200 205  
 Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro  
 210 215 220  
 Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser  
 225 230 235 240  
 Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe Phe Val Phe Leu  
 245 250 255  
 Val Glu Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile Leu Ile Ser Gly  
 260 265 270  
 Pro Cys Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly  
 275 280 285  
 Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys Leu Phe Glu Met  
 290 295 300  
 Glu Ser His Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Pro Asn Leu Gly  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser  
 325 330 335  
 Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro His Pro Ala Asn  
 340 345 350  
 Phe Cys Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr Leu Ser Gly Trp  
 355 360 365  
 Ser Gln Thr Pro Asp Leu Arg  
 370 375

<210> 11  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: etiqueta de 6-His  
 <400> 11

His His His His His His  
 1 5