

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 607**

51 Int. Cl.:

C07K 14/065 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2009** **E 09748796 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013** **EP 2350121**

54 Título: **Proteínas de fusión antiapoptóticas**

30 Prioridad:

10.11.2008 EP 08168730

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

27.06.2013

73 Titular/es:

FÄNDRICH, FRED (100.0%)
Hindenburgufer 90
24107 Kiel, DE

72 Inventor/es:

KUNZENDORF, ULRICH y
KRAUTWALD, STEFAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 409 607 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión antiapoptóticas

La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende un dominio de transducción de la proteína capaz de introducir la proteína de fusión en una célula de mamífero y una proteína antiapoptótica que comprende el aminoácido de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o una variante antiapoptóticamente activa de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 que tiene al menos 70% de identidad de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento antiapoptóticamente activo de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o de la variante definida aquí de la SEQ ID NO: 1. La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende dicha proteína de fusión, en particular para el bloqueo de la apoptosis en un paciente que requiera del mismo. La invención también proporciona un polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión, un vector de expresión que comprende el polinucleótido y una célula huésped que comprende el vector de expresión. En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de cualquiera de estos materiales para la preparación de un medicamento para el bloqueo de la apoptosis en un paciente que requiera del mismo.

Antecedentes de la invención

La regulación del número de células en organismos multicelulares es un requisito esencial tanto para el desarrollo del organismo como para el mantenimiento de sus diferentes funciones vitales. La apoptosis es un proceso mediante el cual las células que no son necesarias en una cierta etapa de desarrollo experimentan una muerte celular programada. Por ejemplo, es la interacción regulada en forma precisa de la proliferación y la apoptosis la que es responsable de formar tejidos y órganos en el embrión en desarrollo. La apoptosis es inducida por una variedad de diferentes estímulos y propagada por diferentes vías.

La vía extrínseca entre otras cosas incluye la unión de los ligandos del receptor de muerte, por ejemplo, TNF, TRAIL y CD95L, a sus respectivas moléculas receptoras en la célula, en donde la unión activa en última instancia la caspasa-8. La vía intrínseca es estimulada, por ejemplo, a través de la aplicación de los inhibidores de la topoisomerasa que daña el ADN, doxorrubicina, etopósido y estaurosporina, estimulación del TCR, irradiación UV, daños en el ADN y similares, lo que resulta en la liberación de citocromo c de la mitocondria, la activación de la caspasa-9, y la ruta dependiente de la granzima B para la activación de la caspasa. La granzima B puede procesar BID así como la caspasa-3 y -7 para iniciar la apoptosis. Estas vías están relacionadas de tal manera que se afectan entre sí. Las células que sufren la apoptosis regularmente muestran una cantidad de rasgos característicos, tales como condensación de la cromatina, encogimiento celular, aumento de la permeabilidad de la membrana y escisión de ADN internucleosomal.

Además de sus diferentes funciones durante el desarrollo, una apoptosis alterada, aumentada o defectuosa también está implicada en una cantidad de enfermedades o condiciones patológicas. Por ejemplo, la isquemia y posterior perfusión inducen la apoptosis tanto a través de la vía intrínseca como de la extrínseca lo que puede conducir a un fallo completo de tejidos u órganos cruciales cuya función es esencial para el organismo. Por ejemplo, un nivel anormalmente mayor de apoptosis puede dar lugar a insuficiencia renal y daño del tejido cerebral. Además, se ha reportado que un aumento de la apoptosis también está implicado en trastornos gastrointestinales. Por el contrario, una apoptosis anormalmente menor está implicada en diferentes formas de cáncer.

A pesar de que se han sugerido diferentes inhibidores de apoptosis en el estado del arte, ninguno de estos enfoques ha demostrado ser adecuado para la práctica clínica. Por ejemplo, se han discutido diferentes proteínas antiapoptóticas como compuestos terapéuticos. Sin embargo, el uso clínico de estas proteínas es en la actualidad únicamente posible mediante el uso de métodos de transferencia génica que implican riesgos imprevisibles para los pacientes sometidos a tal tratamiento. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar medios para un tratamiento seguro y eficiente de una apoptosis anormalmente aumentada. Este objetivo se consigue mediante una proteína de fusión que comprende un dominio de transducción de la proteína capaz de introducir la proteína de fusión en una célula de mamífero y una proteína antiapoptótica como se define adicionalmente en este documento.

El arte previo incluye J. Biol. Chem., 279, 2004, 44005 - 55011 que divulga HIV-TAT como una proteína de fusión con FLIP, donde la primera permite que la segunda cruce la membrana celular, la segunda inhibe la iniciación de la apoptosis mediada por el receptor de muerte; J. Biol. Chem., 270, 1995, 22705 - 8 que divulga la proteína CrmA, y su efecto sobre la inhibición de la citólisis mediada por CTL; y J. Biol. Chem., 270, 1995, 3255 - 3260, que divulga la proteína CrmA, y los efectos de la misma en la inhibición de apoptosis inducida por citoquina.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados de ensayos in vitro que demuestran que TAT-CrmA es capaz de bloquear la actividad de la caspasa-3, un marcador temprano de las células que experimentan apoptosis. Los lisados se derivaron a partir de células Jurkat no tratadas (A), células Jurkat tratadas con anticuerpo anti-Fas (B) o células

Jurkat tratadas con TAT-CrmA antes de la adición de anticuerpo anti-Fas (C).

La Figura 2 muestra la determinación de la apoptosis tal como se mide por el cambio en el potencial de membrana. El tratamiento de las células con proteína de fusión TAT-CrmA antes de la adición de Estaurosporina o anticuerpo anti-Fas, respectivamente, parcialmente anula la pérdida del potencial de membrana en las células inducidas por estos dos estímulos.

La Figura 3 muestra la detección de la apoptosis por análisis FACS utilizando Anexina V marcada con FITC en células Jurkat que se incubaron con TAT-CrmA y anticuerpo anti-Fas (A), en células Jurkat no tratadas (B) o en células Jurkat que se incubaron únicamente con anticuerpo anti-Fas (C). El número de células que experimentan apoptosis se reduce significativamente en las reacciones que utilizan TAT-CrmA en comparación con reacciones que utilizan sólo anticuerpo anti-Fas.

La Figura 4 describe los resultados de los estudios in vivo en ratones utilizando la proteína de fusión TAT-CrmA. La proteína de fusión protege efectivamente los ratones de la apoptosis mediada por Fas in vivo.

La Figura 5 describe los resultados de estudios in vivo en ratones que recibieron la proteína de fusión TAT-CrmA. La proteína de fusión protege efectivamente los ratones de apoptosis inducida por doxorubicina in vivo.

La Figura 6 muestra una comparación de tamaños de infartos después de reperusión de acuerdo a lo determinado por azul de Evans y coloración con TTC.

De acuerdo con la presente invención, sorprendentemente se ha encontrado ahora que el acoplamiento de la proteína modificadora A de la respuesta a citoquinas (CrmA) del virus de la viruela de las vacas a un dominio de transducción de proteína, tal como el dominio de transducción de proteína de la proteína Tat del VIH, da como resultado una proteína de fusión activa antiapoptóticamente activo que sea efectiva en el bloqueo de la apoptosis en un paciente que requiera de un tratamiento antiapoptótico, es decir, un paciente que sufra de una enfermedad caracterizada por un nivel patógeno de apoptosis en las células o tejidos del organismo.

En consecuencia, se proporciona una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión al menos los siguientes componentes:

(a) un dominio de transducción de la proteína capaz de introducir la proteína de fusión en una célula de mamífero;

(b) una proteína antiapoptótica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o una variante antiapoptóticamente activa de la SEQ ID NO: 1 que tiene al menos 70% de identidad de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento antiapoptóticamente activo de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o de la variante definida aquí de la SEQ ID NO: 1.

El uso de las proteínas o polipéptidos terapéuticamente activos se vio impedido durante mucho tiempo por la incapacidad de estas proteínas o polipéptidos para cruzar la barrera de la membrana celular. El descubrimiento de los dominios de transducción de proteínas (PTD) al igual que a partir de la proteína Tat del VIH que actúan como moléculas de transporte facilitaron la transducción de las grandes proteínas o polipéptidos en la célula objetivo. Los dominios de transducción de proteína permiten que el complejo PTD - proteína entre en una célula de una manera independiente del receptor. Varios PTD diferentes han sido identificados hasta el momento, por ejemplo, en la proteína Antennapedia de Drosophila, la proteína VP22 del virus del herpes simple y la proteína TAT del VIH tipo 1. Estos PTD generalmente consisten en aproximadamente 10 - 50 aminoácidos y comparten varias similitudes estructurales. Una característica notable de los PTD es la posesión de varios aminoácidos básicos que es indicativo de un mecanismo general mediante el cual estas moléculas entran en la célula. Se ha especulado que una interacción de las estructuras de heparán en la superficie de la célula objetivo con los aminoácidos básicos en la secuencia de DPT resulta finalmente en la transducción de toda la molécula en la célula.

Tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, el término "proteína de fusión" se refiere a una proteína híbrida de origen no natural que comprende al menos dos proteínas diferentes o fragmentos de proteínas. La proteína de fusión de la presente invención comprende un dominio de transducción de proteína que es adecuado para la introducción de la proteína de fusión en una célula, preferiblemente en una célula de mamífero de un paciente que requiere de un tratamiento antiapoptótico. Preferiblemente, el paciente es un paciente humano y las células en las que la proteína de fusión de la invención entrará a través del PTD es una célula humana, por ejemplo, una célula de un tejido de un órgano, tal como tejido renal. En principio, cualquier DPT puede ser utilizado, que no afecte adversamente el plegamiento de la proteína antiapoptótica con la cual se fusiona o bien se acopla. Esto significa, que el PTD no debe interferir con la actividad antiapoptótica de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o el fragmento antiapoptóticamente activo o variante del mismo de la invención, hasta un punto en que la actividad antiapoptótica deseada es abolida. Se entiende, sin embargo, que una pérdida de actividad de la proteína antiapoptótica del 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, o incluso hasta 80% puede ser tolerada

en los casos en que una proteína de fusión particular exhiba otras características favorables, tales como una mayor estabilidad o vida útil o propiedades farmacológicas mejoradas, tales como una disminución de la inmunogenicidad. La persona capacitada en la materia será fácilmente capaz de determinar si una proteína de fusión dada es adecuada para ser utilizada en un contexto terapéutico deseado.

5 De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, el dominio de transducción de proteína usado en la proteína de fusión se deriva o bien de la proteína Antennapedia de *Drosophila*, la proteína VP22 del virus del herpes simple o la proteína TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1. De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida, la proteína de fusión comprende un dominio de transducción de la proteína que se deriva desde el dominio de transducción de la proteína Tat del VIH tipo 1. El dominio de transducción de la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 ha sido descrito en el arte en varias publicaciones, por ejemplo, en Bhorade, R. et al. (2000), *Bioconjug. Chem.* 11: 301 - 305; Becker-Hapak, M. et al. (2001), *Methods* 24: 247 - 256; y Dietz, G. et al. (2002), *Mol. Cell Neurosci.* 21: 29 - 37. Los estudios de mutagénesis mostraron que una estructura de núcleo de 11 aminoácidos del dominio de transducción de Tat del VIH es suficiente para la transferencia eficiente de proteínas a través de la membrana celular. La estructura mínima del dominio de transducción de Tat del VIH está representado por la secuencia de 11 aminoácidos YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 3). Por lo tanto, en una realización preferida, la proteína de fusión comprende un dominio de transducción de proteína que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene de menos 80%, preferiblemente al menos 95%, de identidad con la misma.

20 La proteína de fusión de la invención también comprende, como un componente adicional, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento antiapoptóticamente activo o una variante del mismo de la invención. La secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 describe la estructura primaria de la proteína modificadora de la respuesta a citoquina A (CrmA) del virus de la viruela de las vacas. Se ha demostrado que esta proteína es una supresora eficiente de la apoptosis. Mediante el desarrollo de una proteína antiapoptótica durante la evolución, el virus de la viruela de las vacas ha ganado la capacidad de proteger a las células huésped que son utilizadas por el virus para la propagación. A diferencia de otros supresores de la apoptosis, el efecto de CrmA se basa en la inhibición simultánea de las caspasas-1 y -8 de la vía extrínseca, de la caspasa-9 de la vía intrínseca, y las caspasas-3, -6 y -7 ejecutoras. Debido a este modo de multiplicidad de acción, CrmA es un inhibidor de la apoptosis particularmente potente.

30 Varios intentos se han hecho en la técnica para el uso de la proteína CrmA para bloquear la apoptosis tanto en sistemas *in vitro* como en modelos animales. Estos intentos se basaron en la expresión heteróloga de la proteína CrmA en líneas celulares o en animales transgénicos, que tiene la desventaja fundamental de que la expresión CrmA no puede cortarse una vez que el constructo de expresión ha sido introducido en la célula objetivo. La ventaja particular de la presente invención reside en el hecho de que la inhibición de una apoptosis no deseada es factible durante un período de tiempo limitado. La proteína de fusión de la invención permite la inhibición temporal de la apoptosis en situaciones en las que se desea la supresión transitoria de la muerte celular. Se ha demostrado que las proteínas de fusión de la invención exhiben un tiempo de vida media de aproximadamente 8 horas, de modo que la extensión y la duración del tratamiento se puede ajustar fácilmente mediante la frecuencia de administración de la proteína de fusión. En otras palabras, la introducción de la proteína CrmA por medio del uso de un dominio de transducción de proteína le permite al practicante ajustar el tratamiento antiapoptótico a la situación clínica del paciente que va a ser tratado.

45 Como se apreciará por la persona capacitada en el arte, el virus de la viruela de las vacas está sujeto a modificación permanente debido a la alta tasa de mutación del genoma viral. Como consecuencia, se encuentran disponibles varias secuencias de aminoácidos en las bases de datos para la proteína CrmA que difieren en uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1. Estas variantes de CrmA están compuestas por la presente invención, siempre que tengan una actividad antiapoptótica. Como se usa en este documento, las variantes de la proteína de la SEQ ID NO: 1 son proteínas con una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la SEQ ID NO: 1 por una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos. En general, cualquier residuo de aminoácido de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 puede ser sustituido por otro aminoácido, siempre que la variante de la proteína resultante exhiba una actividad antiapoptótica. La determinación de la actividad antiapoptótica se puede realizar, por ejemplo, mediante el método descrito en Wender et al. (2000), 97 (24): 13003 - 8. En particular, se incluyen variantes de la proteína que difieren de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 en hasta 5, 10, 15, 20 o incluso hasta 25 posiciones de aminoácidos.

55 Se prefiere que las sustituciones sean sustituciones conservadoras, es decir, sustituciones de un residuo de aminoácido por otro aminoácido de una polaridad similar, que actúe como un equivalente funcional. Preferiblemente, el residuo de aminoácido usado como un sustituto se selecciona entre el mismo grupo de aminoácidos que el residuo de aminoácido que va a ser sustituido. Por ejemplo, un residuo hidrófobo puede ser sustituido con otro residuo hidrófobo, o un residuo polar puede ser sustituido con otro residuo polar que tenga la misma carga. Los aminoácidos funcionalmente homólogos que pueden ser utilizados para una sustitución conservadora comprenden, por ejemplo, aminoácidos no polares tales como glicina, valina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, prolina,

fenilalanina y triptófano. Los ejemplos de aminoácidos polares no cargados incluyen serina, treonina, glutamina, asparagina, tirosina y cisteína. Los ejemplos de aminoácidos polares cargados (básicos) incluyen histidina, arginina y lisina. Los ejemplos de aminoácidos polares cargados (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

También están comprendidas por el término "variante", secuencias de proteína que incluyen más aminoácidos que la secuencia de la SEQ ID NO: 1, es decir, secuencias de proteína en las que se han insertado uno o más aminoácidos. Tales inserciones pueden, en principio, tener lugar en cualquier posición de la proteína de la SEQ ID NO: 1. Las inserciones pueden ser tramos de aminoácidos contiguos que comprenden, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o diez aminoácidos. Del mismo modo, el término "variante" también incluye secuencias de proteína en las que se suprimen uno o más aminoácidos en comparación con la proteína de la SEQ ID NO: 1. La supresión puede implicar varios residuos de aminoácidos contiguos de la proteína de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o diez aminoácidos. Una variante preferida particular de la proteína CrmA tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. Esta variante, entre otras cosas, difiere de la proteína CrmA de la SEQ ID NO: 1 por carecer del tramo valina-serina-alanina mostrado en las posiciones 55 - 57 de la SEQ ID NO: 1. Esta supresión no afecta la actividad antiapoptótica de la variante. Las variantes de la proteína de la SEQ ID NO: 1 también pueden incluir modificaciones estructurales, por ejemplo, aminoácidos modificados, tales como los aminoácidos que han sido alterados por fosforilación, glicosilación, acetilación, tiolación, ramificación y / o ciclización.

Las variantes de la proteína CrmA de la SEQ ID NO: 1, que han sido modificadas por sustitución, adición o supresión de aminoácidos, normalmente muestran un grado considerable de homología de secuencia de aminoácidos o de identidad con la proteína CrmA de la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la homología o la identidad a nivel de aminoácidos es al menos del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% si la secuencia de la variante se alinea óptimamente con aquella de la SEQ ID NO: 1. Los métodos y programas de ordenador para determinar la homología de aminoácidos son bien conocidos en la técnica.

En el contexto de la proteína de fusión de la invención, la presente invención también contempla el uso de fragmentos de antiapoptóticamente activos, que o bien se derivan de la proteína de la SEQ ID NO: 1 o de sus variantes. Fragmentos antiapoptóticamente activos de la SEQ ID NO: 1 o sus variantes incluyen péptidos o polipéptidos que difieren de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o de sus variantes por la ausencia de uno o más aminoácidos en el extremo terminal N y/o el extremo terminal C de la proteína. Por ejemplo, el componente de CrmA de la proteína de fusión se utiliza en los siguientes ejemplos carece del residuo de metionina en la posición 1 de la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1, lo que significa que en realidad representa un fragmento de la secuencia en la SEQ ID NO: 1. La persona ordinariamente capacitada será capaz de determinar otros fragmentos activos de la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1 o sus variantes mediante la realización de los métodos de rutina descritos en gran detalle en el estado del arte.

Preferiblemente, la proteína de fusión de la invención comprende además un enlazador entre el dominio de transducción de la proteína y la proteína antiapoptótica. El enlazador puede comprender cualquier cantidad de aminoácidos, siempre y cuando la actividad antiapoptótica de la porción de CrmA se mantenga y la introducción de la proteína de fusión en la célula a través del PTD todavía se esté llevando a cabo. El enlazador comprende normalmente 5 - 30 aminoácidos, preferentemente 8 - 25 aminoácidos, y más preferiblemente de 10 - 20 aminoácidos. El enlazador incluye regularmente varios residuos de glicina, ya que es menos probable que este aminoácido afecte el plegamiento de la proteína de la porción activa de la proteína de fusión. La proteína de fusión también puede incluir componentes adicionales, por ejemplo, una etiqueta de afinidad que facilita la unión de la proteína de fusión a través de un compuesto que exhiba afinidad de unión con la etiqueta. Por ejemplo, la etiqueta de afinidad puede ser una etiqueta de poli-histidina que comprende 6 - 12 residuos de histidina que interactúa específicamente con una matriz de quelato de ión níquel. La proteína de fusión que se utilizó en los ejemplos de la presente invención (denominada TAT-CrmA) y que se representa en la SEQ ID NO: 4 comprende una etiqueta de 6 residuos de histidina para la purificación. Alternativamente, la etiqueta puede ser glutatona-S-transferasa que permite la purificación sobre una matriz de glutatona. Otras etiquetas de afinidad son bien conocidas en la técnica. Ejemplos no limitantes para pares de etiqueta de afinidad y ligando de afinidad incluyen proteína de unión a maltosa (MBP) y maltosa; avidina y biotina; Strep-tag y estreptavidina o neutravidina. Las etiquetas de afinidad pueden ser unidas a una molécula por fusión / ligación de los ADNc de la molécula de interés con la secuencia que codifica la etiqueta. Cuando la etiqueta de afinidad es un péptido o polipéptido, tal etiqueta puede expresarse convenientemente junto con la proteína de fusión de la invención como un producto de expresión único. En otras formas de realización, la etiqueta de afinidad puede estar unida por medio de reacciones de acoplamiento químico. Por ejemplo, la biotina puede ser acoplada químicamente a la proteína de fusión.

La proteína de fusión de la invención ha demostrado ser efectiva en la inhibición o el bloqueo de la apoptosis cuando se administra en la forma adecuada para el suministro de proteínas terapéuticas. En consecuencia, la proteína de fusión proporcionada por la invención es para el bloqueo de la apoptosis en un paciente que requiera del mismo. La proteína de fusión se puede utilizar, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades que implican nivel excesivo, desregulado, de la apoptosis, tal como una lesión por reperusión o un infarto de miocardio.

Preferiblemente, la proteína de fusión de la presente invención se administra como una composición farmacéutica.

Por consiguiente, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión como se definió anteriormente. La composición farmacéutica es para el bloqueo de la apoptosis en un paciente que requiera del mismo. En particular, la composición es para el tratamiento de una lesión por reperfusión, o infarto de miocardio.

- 5 La preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden una o más proteínas terapéuticas es bien conocida por aquellos que trabajan en el campo de la industria farmacéutica. Típicamente, tales composiciones se preparan para inyección ya sea como soluciones líquidas o suspensiones. El ingrediente activo (es decir, la proteína de fusión) puede ser mezclada con excipientes que sean farmacéuticamente aceptables y compatibles con la proteína de fusión cuando se utiliza en pacientes humanos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden normalmente un vehículo fisiológicamente aceptable junto con la proteína de fusión disuelta o dispersada en el mismo como un ingrediente activo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables comprenden, por ejemplo, agua, solución salina, soluciones de Ringer, o solución de dextrosa. Otros vehículos adecuados para las composiciones que contienen la proteína de fusión antiapoptótica de la invención se describen en libros de texto estándar, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co., New Jersey (1991). Además de un portador, la composición farmacéutica de la invención puede incluir también agentes humectantes, agentes amortiguadores, estabilizantes, colorantes, conservantes y similares en cualquier concentración, siempre que estos compuestos no interfieran con la actividad antiapoptótica de la proteína de fusión de la invención.

- 20 Son posibles diferentes vías de administración para proporcionar la proteína de fusión al sitio u órgano que requiera la inhibición de la apoptosis. Preferiblemente, se formula la composición farmacéutica para administración sistémica, por ejemplo, para administración parenteral. La administración parenteral puede incluir intravenosa, intradérmica, intraarterial, subcutánea, tópica, transmucosa, o administración rectal. De acuerdo con una forma de realización particular preferida, la composición farmacéutica se formula para inyección.

- 25 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección normalmente incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La composición debe además ser estable en las condiciones normales de fabricación y almacenamiento. La composición prevista para inyección debe ser estéril con el fin de evitar una reacción inmunológica severa en el paciente que recibe la inyección. Para mantener la esterilidad, la composición farmacéutica incluye normalmente conservantes, tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares, para suprimir el crecimiento microbiano en el producto. Para administración intravenosa o intraarterial, los vehículos adecuados pueden incluir solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremóforo EL TM (BASF) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS). El vehículo también puede ser un medio disolvente o dispersante que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el ingrediente activo (la proteína de fusión) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes mencionados anteriormente seguido de filtración estéril. Del mismo modo, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de la proteína de fusión en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión y, opcionalmente, otros ingredientes como se describió anteriormente. Las soluciones estériles también pueden obtenerse proporcionando la proteína de fusión en la forma de un polvo estéril mediante métodos conocidos en la técnica, tales como secado al vacío o secado por congelación, y reconstitución del polvo con un líquido estéril para producir la solución final para inyección. Alternativamente, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención también se puede administrar por infusión continua.

- 45 La administración de la composición farmacéutica también se puede lograr mediante administración transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la invención contendrá penetrantes que sean apropiados para el cruce de la barrera de la mucosa o de la piel. Tales penetrantes son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse a través del uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Preferiblemente, los compuestos se preparan en forma de supositorios, con bases convencionales para supositorios tales como manteca de cacao y otros glicéridos para administración rectal.

- 55 En una forma de realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán los péptidos contra la eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno, acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de la formulación de liberación controlada son bien conocidos en la técnica. Además, se pueden preparar composiciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada

incluyen poliésteres, hidrogeles, poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico y similares.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión antiapoptótica es típicamente una cantidad que - después de la administración - es suficiente para bloquear o inhibir de manera efectiva la apoptosis en el órgano o tejido objetivo del paciente que va a ser tratado. Típicamente, la dosis de la proteína de fusión por peso corporal varía desde aproximadamente 0,1 mg por kg de peso corporal del paciente hasta aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal del paciente, y más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 mg por kg de peso corporal del paciente hasta aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal del paciente, y aún más preferiblemente desde 1 mg por kg de peso corporal del paciente hasta aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal del paciente. El régimen de administración puede incluir una o más administraciones al día de la proteína. Se apreciará por parte de aquellos capacitados en la técnica que la cantidad concreta de la proteína de fusión que se debe administrar al paciente dependerá de varios factores, tales como la edad y el peso del paciente, así como de la naturaleza y severidad de los síntomas médicos a ser tratados. La cantidad que ejerce el efecto terapéutico deseado se puede determinar en cada caso individual mediante el uso de experimentación de rutina.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión como se definió anteriormente. Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de la invención pueden consistir en ADN o ARN. El polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención se refiere a una molécula de ADN o ARN que dirige la expresión de la proteína de fusión deseada. Un ejemplo de un polinucleótido que codifica para una proteína de fusión de la invención se representa en la SEQ ID NO: 5; este polinucleótido codifica la proteína de fusión TAT-CrmA de la SEQ ID NO: 4. Sin embargo, debe entenderse que otros polinucleótidos que codifican la proteína de la SEQ ID NO: 1, que difieren de la secuencia de la SEQ ID NO: 5 en una o más de las posiciones de los nucleótidos debido a la degeneración del código genético, son también incluidos. Del mismo modo, los polinucleótidos que codifican variantes o fragmentos de la proteína de la SEQ ID NO: 1, también se incluyen.

Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de la invención pueden ser clonados en un vector de expresión con el fin de proporcionar medios para la preparación recombinante de la proteína de fusión. En general, los vectores de expresión son constructos de ADN o ARN autoreplicantes en los que se inserta un polinucleótido de interés de tal manera que la secuencia de codificación del polinucleótido se une operativamente a elementos reguladores adecuados que permiten la expresión controlada de la secuencia codificante en una célula huésped. Los elementos específicos de control que se requieren para la expresión del polinucleótido dependerán de la célula huésped que se utiliza y pueden incluir un promotor transcripcional, un operador, un potenciador para aumentar el nivel de expresión de ARNm, un sitio de unión al ribosoma, y terminadores adecuados de transcripción y traducción. El promotor puede ser un promotor constitutivo o inducible, por ejemplo, los promotores comúnmente utilizados de galactocinasa, uridililtransferasa, fosfoglicerato quinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, o promotores virales, tales como los promotores de SV40, citomegalovirus (CMV) o virus de la leucemia murina de Molony (MMLV), y similares. Los vectores de expresión también pueden contener un origen de replicación para la replicación autónoma del vector en una célula huésped, y uno o más marcadores de selección que permiten el control de la transfección en la célula huésped.

El vector de expresión puede ser diseñado para expresar la proteína recombinante en un huésped procariota o eucariota. Preferiblemente, el vector de expresión tendrá la capacidad de replicarse de forma estable dentro de la célula huésped de modo que el número del polinucleótido que codifica la proteína de fusión de interés se incrementa dentro de la célula. Sin embargo, también es posible usar un vector de expresión que es incapaz de replicarse dentro de las células y permite únicamente la expresión transitoria de la proteína de fusión. Alternativamente, también se pueden utilizar vectores de expresión que se integran en el genoma de la célula huésped que es transducida o transfectada con el vector de expresión. Se conocen varios vectores de expresión en el estado del arte que son adecuados para la mediación de la expresión de la proteína de fusión antiapoptótica de la invención tanto en células huésped procariotas como eucariotas. Los métodos para introducir el vector de expresión en una célula huésped también se han discutido ampliamente en la literatura. Una variedad de diferentes métodos puede ser utilizada para transducir o transfectar el vector de expresión de la invención en una célula huésped, por ejemplo, electroporación, microinyección, transformación, transfección, fusión de protoplastos, bombardeo con microproyectiles y similares.

Por consiguiente, la invención también se refiere a una célula huésped que comprende un vector de expresión que alberga un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención. Las células se pueden derivar de procariotas o de eucariotas inferiores o superiores. Los procariotas adecuados que pueden ser transducidos o transfectados con un vector de expresión que codifica la proteína de fusión de la invención incluyen, por ejemplo, bacterias como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, y similares. Los eucariotas inferiores que pueden ser utilizados en los métodos de la presente invención incluyen levaduras, en particular, levaduras del género *Saccharomyces*, tales como *S. cerevisiae*, *S. baillii*, *S. bayanus*, *S. boulardii*, *S. carlsbergensis*, del género *Pichia*, tales como *P. pastoris*, *P. methanolica*, *P. stipitis*, o del género *Dictyostelium*, tales como *D. discoideum*. Los eucariotas superiores incluyen líneas de células animales, en particular líneas celulares de mamífero, por ejemplo, líneas celulares derivadas de roedores, primates y humanos. Líneas celulares útiles para el uso de acuerdo con la invención incluyen líneas de

células de ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares de riñón de rata bebé (BRK), líneas de células de riñón de canido Madin Darby (MDCK), células de mieloma NSO, células de riñón de mono COS, células 293 de riñón embrionario humano, y líneas celulares de cáncer, tales como células SKBR3, células T Jurkat o células HeLa.

- 5 Las células huésped de la invención que comprenden un polinucleótido que codifica la proteína de fusión antiapoptótica de la invención, preferiblemente en la forma de un vector de expresión adecuado para dirigir la expresión en la célula huésped respectiva, se pueden usar convenientemente para la preparación de la proteína de fusión. Preferiblemente, el vector de expresión se introduce en la célula huésped de tal manera que la expresión de la proteína de fusión se efectúa mediante la propagación de las células huésped. Por consiguiente, la invención también proporciona un método para preparar una proteína de fusión como se define aquí, que comprende el cultivo de una célula huésped que contiene el polinucleótido que codifica la proteína de fusión antiapoptótica o el vector de expresión que incluye tal polinucleótido bajo condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión.

El suministro de las proteínas de fusión de la invención permite la preparación de anticuerpos que se unen a dicha proteína de fusión. El método comprende la inmunización de un animal no humano con la proteína de fusión, y la obtención de los anticuerpos producidos en respuesta a la proteína de fusión a partir del suero de dicho animal.

- 15 Por consiguiente, la invención también se refiere al uso de una proteína de fusión como se define aquí o un polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión para la preparación de una composición farmacéutica para el bloqueo de la apoptosis en un paciente que requiera del mismo. Del mismo modo, la invención también se refiere al uso de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de la invención y a una célula huésped que comprende dicho polinucleótido o vector de expresión para la preparación de una composición farmacéutica para el bloqueo de la apoptosis en un paciente que requiera de los mismos. Preferiblemente, estos materiales son para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una lesión por perfusión o infarto de miocardio.

- 25 Por último, la invención también contempla un kit que comprende la proteína de fusión de la invención, un polinucleótido que codifica tal proteína de fusión, un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión y / o una célula huésped que comprende tal polinucleótido o vector de expresión. El kit puede comprender otros materiales que sean útiles para la preparación de una composición para la administración al paciente. Por ejemplo, el kit puede incluir amortiguadores, estabilizantes, portadores y similares para mezclar con la proteína de fusión antes de la administración. El kit comprenderá además las instrucciones para el uso de los componentes en la preparación de una composición farmacéutica para el bloqueo de la apoptosis en un paciente que sufre de un nivel mayor o desregulado de apoptosis. Por ejemplo, las instrucciones se referirán a la administración de la proteína de fusión a un paciente, por ejemplo, en los regímenes de dosificación preferidos. Si el kit comprende un vector de expresión que alberga un polinucleótido que codifica para la proteína de fusión de la invención, las instrucciones se referirán además a la introducción de dicho vector en una célula huésped adecuada y a condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína de fusión de la invención.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación y expresión de TAT-CrmA

- 40 El ARN total se aisló de una lesiones de piel humana causadas por el virus de la viruela vacuna mediante el uso de mini columnas RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Se generó ADNc mediante el uso del Sistema Thermoscript RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) con el cebador hacia adelante (5'-CCGGGTACCGATATCTTCAGGGAAA TCGCATC-3', SEQ ID NO: 6) y el cebador inverso (5'-CCGGAATTCTTAATTAGTTGTTGGAGAGCAATATCTA-3', SEQ ID NO: 7). El producto de la PCR se clonó en el vector de pTAT cortado con KpnI / EcoRI. Se construyó un vector con base en PRSE (Invitrogen). Este vector contiene una guía de 6-histidina para la purificación y un sitio de clonación múltiple. En este vector se insertó la secuencia que codifica para el dominio de transducción de la proteína TAT aminoácido 11 (véase Green, M. y Loewenstein, P. M. (1988), Cell, 55: 1179 - 1188).

- 45 El plásmido resultante de una colonia seleccionada que alberga el ADNc de TAT-CrmA se transformó en una bacteria competente E. coli T7 Express I^q (New England BioLabs), seguido por la inducción de la expresión en medio LB con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (concentración final de 0,4 mM). Después de 2 horas de inducción a 37° C, las células fueron cosechadas por centrifugación (6.500 x g, 10 min, 4° C) seguido por sonicación en amortiguador de enlazamiento (NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM, imidazol 5 mM, pH 7,9).

50 Ejemplo 2: Purificación de TAT-CrmA

Las suspensiones obtenidas de acuerdo con el Ejemplo 1 se clarificaron por centrifugación (14.000 x g, 20 min, 4° C) y los sobrenadantes que contenían las proteínas de fusión se purificaron en condiciones nativas utilizando columnas de Ni-NTA equilibradas previamente (Qiagen, Hilden, Alemania). Para eliminar un fondo elevado de proteínas bacterianas contaminantes se lavaron las columnas por medio de la adición gradual de concentraciones crecientes

de imidazol. Por último, se eluyeron las proteínas objetivo con un amortiguador de elución que contenía NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM e imidazol 100 mM (pH 7,9). La remoción de la sal se realizó utilizando una columna de desalinización desechable PD-10 (Sefadex G-25) equilibrada en medio RPMI. Las proteínas de fusión o bien fueron utilizadas inmediatamente después de la purificación o se almacenaron a 4° C o -20°.

5 Ejemplo 3: Análisis espectrofluorométrico de la actividad de la caspasa

Se cultivaron células Jurkat linfocíticas T humanas en medio RPMI suplementado con 10% de FCS y penicilina-estreptomomicina. Para los experimentos, se sembraron las células con una densidad de $1,0 \times 10^6$ células / ml. Las células o bien se dejaron sin tratar (A), se trataron con 100 ng / ml de anticuerpo anti-Fas (clon 7C11, Immunotech) solo (B) o se trataron durante 30 min con TAT-CrMA 500 nM antes de la adición del anticuerpo anti-Fas (C). La estimulación de las células se terminó por medio de la aspiración del medio y lavando las células dos veces con PBS enfriado en hielo. Las células fueron posteriormente resuspendidas en amortiguador de lisis de células frío (BD Biosciences) y se incubaron durante 30 min en hielo. Los lisados celulares fueron incubados luego con sustrato de caspasa-3 sustrato Ac-DEVD-AMC (Acaspartil-glutamil-valil-aspartil-aminometilcumarina) solo o con el sustrato y el inhibidor específico de caspasa-3 Ac-DEVD-CHO y analizados por espectrofluorometría. Para cada reacción se añadieron 5 µl de sustrato de caspasa-3 reconstituido únicamente (negro) o sustrato y el inhibidor de caspasa-3 (blanco) a 50 µl de lisado celular y se incubó durante 1 hora a 37° C. La cantidad de AMC liberado de Ac-DEVD-AMC se midió utilizando un lector de placas (Infinite M200, Tecan) con una longitud de onda de excitación de 380 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm.

Los resultados se muestran en la Figura 1. No se emitió fluorescencia en lisados de células tratadas tanto con el inhibidor Ac-DEVD-CHO como con el sustrato de caspasa-3 Ac-DEVD-AMC, lo que indica que la actividad de la caspasa-3 fue bloqueada (cajones blancos). En las células no tratadas (A), tampoco hubo ninguna fluorescencia significativa detectada en las células incubadas únicamente con Ac-DEVD-AMC pero sin inhibidor (cajón negro), lo que indica que la caspasa-3 no era activa en estas células. En contraste, las células tratadas con anticuerpo anti-Fas (B), se detectó una notable liberación de fluorescencia relacionada con aminometilcumarina en las células incubadas sólo con Ac-DEVD-AMC (cajón negro), lo que demuestra que la caspasa-3 era activa. En las células tratadas con anticuerpo anti-Fas y proteína de fusión TAT-CrMA (C), se redujo considerablemente la fluorescencia relacionada con aminometilcumarina en comparación con (B). Esto muestra que la incubación previa de las células con proteína de fusión TAT-CrMA inhibe la actividad de la caspasa-3, lo que conduce a una disminución del grado de apoptosis.

Ejemplo 4: Determinación del potencial de la membrana mitocondrial

La detección del evento de transición de permeabilidad mitocondrial, una indicación temprana de la apoptosis celular, se midió por el cambio en el potencial de membrana ($\Delta\psi$) utilizando el kit Mito-PTTM (immunochemistry Technologies, LLC). Este kit permite la distinción entre las células no apoptóticas (fluorescencia roja) y apoptóticas (fluorescencia verde) y se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se trataron 2×10^6 células T Jurkat por reacción con DMSO (células negativas, no inducidas), con estaurosporina 2,5 µM o con 100 ng / ml de anticuerpo anti-Fas (células apoptóticas, inducidas) durante 4 horas a 37° C y a continuación marcadas con solución 1x MitoPTTM durante 15 minutos. Para las células inducidas, se prepararon reacciones paralelas que se trataron mediante la adición de TAT-CrMA 500 nM antes de la adición de estaurosporina o anticuerpo anti-Fas, respectivamente. La incubación y el etiquetado se realizaron como se describió anteriormente (4 horas a 37° C, etiquetado con solución 1x MitoPTTM durante 15 minutos). Se midió el colapso de la $\Delta\psi$ mitocondrial mediante el uso de lector de placas (Infinite M200, Tecan) con una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 600 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Los resultados se muestran en la Figura 2. Se puede observar que la adición de la proteína de fusión TAT-CrMA antes de la adición de estaurosporina o anticuerpo anti-Fas, respectivamente, anuló la pérdida de potencial de membrana que se observó en las células que sólo fueron tratadas con la estaurosporina inductora de apoptosis o anticuerpo anti-Fas.

Ejemplo 5: Tinción con Anexina V

La apoptosis también se cuantificó por medio de análisis FACS utilizando Anexina V marcada con FITC. La proteína Anexina V se une a residuos de fosfatidil serina que están expuestos en la superficie de la célula en una etapa temprana de la apoptosis. Se incubaron las células Jurkat ya sea durante 30 min con TAT-CrMA 500 nM seguido por la adición de anticuerpo anti-Fas durante 4 horas a 37° C (A) o se dejaron sin tratar por incubación durante 4 horas a 37° C con vehículo (B) o se incubaron con 100 ng / ml de anticuerpo anti-Fas (clon 7C11, Immunotech) durante 4 horas a 37° C (C). Después de la estimulación se recogieron las células, se lavaron con medio RPMI suplementado con 2% de FCS y se realizó la tinción con Anexina V (ApoAlert, Anexina V-FITC, BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se analizó la fluorescencia por medio de un EPICS XL®

(Coulter, Krefeld, Alemania). Se analizaron los datos de citometría de flujo utilizando el software EPICS Sistema II.

Los gráficos representados en la Figura 3 muestran el resultado de un solo experimento representativo. Se puede observar que el número de células que experimentan apoptosis se reduce significativamente en las reacciones que utilizan anticuerpo anti-Fas y TAT-CrmA (A) en comparación con reacciones que utilizan sólo anticuerpo anti-Fas (C).

Ejemplo 6: Apoptosis mediada por anticuerpo anti-Fas in vivo

Se obtuvieron ratones Balb/c hembra de Charles River (Sulzfeld, Alemania) y se utilizaron para los experimentos a las 6 a 8 semanas de edad. Con el propósito de evaluar la vía apoptótica extrínseca in vivo, se indujo apoptosis por medio de inyección intraperitoneal de 1 mg / g de peso corporal de anticuerpo α -Fas agonístico monoclonal Jo-2 (BD Pharmingen). Este anticuerpo induce apoptosis en las células positivas para Fas y resulta en un fallo multiorgánico en los ratones. Para los estudios de supervivencia, dos grupos de ratones (10 animales / grupo) recibieron anticuerpo anti-Fas Jo-2 solo o en combinación con 7,5 mg/kg de peso corporal de TAT-CrmA. Se suministró TAT-CrmA veinte y cinco antes de la inyección de α -Fas.

Para análisis histológico, se sacrificaron los ratones 5 u 8 horas después de la aplicación de α -Fas. Se fijaron secciones con acetona, se tiñeron con hematoxilina-eosina y examinaron por medio de un microscopio de luz con un aumento de 200x y 400x. Se identificaron células apoptóticas en secciones de órganos fijadas con paraformaldehído (5 μ m) usando mellado y marcación con dUTP mediados por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL, kit de detección de muerte celular in situ, TMR rojo; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). La tinción se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se visualizaron células positivas para TUNEL por medio de microscopía de fluorescencia con un aumento de 200x y 400x. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (Dianova, Hamburgo, Alemania).

La supervivencia acumulada de ratones que recibieron anticuerpos α -Fas más TAT-CrmA fue significativamente mejor comparada con la de ratones que recibieron mAb α -Fas únicamente (Fig. 4). 90% de los ratones que recibieron mAb α -Fas y TAT-CrmA sobrevivieron más de 3 meses (se muestra el primer día) mientras que todos los ratones del grupo de α -Fas murieron durante las primeras 10 horas. Ninguno de los ratones tratados con TAT-CrmA únicamente mostró algún efecto tóxico.

Macroscópicamente, el hígado apareció de color marrón oscuro en animales tratados con α -Fas, pero el tratamiento concomitante con TAT-CrmA preservó el aspecto normal del hígado comparado con los controles. El severo daño estructural del hígado se confirmó por medio de una evaluación histológica. 5 y 8 horas después del tratamiento con α -Fas, el tejido de hígado teñido con HE exhibió una muerte severa de células hepáticas que fue evitada por medio de la adición de TAT-CrmA. La coloración con TUNEL reveló la ausencia de apoptosis en los animales tratados con TAT-CrmA. Estos resultados demuestran que la proteína de fusión de la presente invención es capaz de proteger a los ratones de apoptosis inducida por anticuerpo anti-Fas in vivo.

Ejemplo 7: Apoptosis mediada por doxorrubicina in vivo

Los ratones Balb/c hembra fueron obtenidos de Charles River (Sulzfeld, Alemania) y usados para los experimentos a las 6 a 8 semanas de edad. La apoptosis fue inducida por medio de una inyección intraperitoneal de doxorrubicina. La doxorrubicina inhibidora de la topoisomerasa que daña el ADN induce la vía intrínseca de apoptosis. Para los estudios de supervivencia se trataron dos grupos de ratones (5 animales/grupo) con una sola inyección de 15 mg/kg de peso corporal de doxorrubicina en forma intraperitoneal con y sin dos aplicaciones de 150 mg de TAT-CrmA. Se administró TAT-CrmA veinte y cinco minutos antes de la inyección de doxorrubicina.

La supervivencia después de la de otro modo letal inyección de doxorrubicina se prolongó a través de una aplicación casi diaria de TAT-CrmA durante los primeros 7 días (Fig. 5). Aunque todos los ratones tratados con doxorrubicina murieron en el lapso de 31 días, se registró una supervivencia del 40% en ratones que recibieron concomitantemente inyecciones intraperitoneales de TAT-CrmA ($n = 5$, $p < 0,05$) (Fig. 5). Se evitó la falla de los órganos de los ratones tratados con doxorrubicina por medio de TAT-CrmA. Tomados en conjunto, estos resultados proporcionan evidencia para una inhibición eficiente tanto de la vía apoptótica intrínseca como extrínseca a través de la proteína de fusión TAT-CrmA in vitro e in vivo.

Ejemplo 8: TAT-CrmA reduce el tamaño del infarto y mejora la función sistólica después de infarto de miocardio en ratones

Ya que la apoptosis es un evento patofisiológico importante en tejidos isquémicos, se probó TAT-CrmA en un modelo de ratón de infarto de miocardio. Se anestesiaron ratones C57BL/6 machos de 12 semanas de edad con clorhidrato de ketamina (100 mg/kg, en forma intraperitoneal) y xilazina (4 mg/kg, en forma intraperitoneal). Después de intubación traqueal, se mantuvo la anestesia con isoflurano al 2%. Los ratones fueron sometidos a una ligadura

transitoria de la arteria coronaria durante 1 hora seguido por reperfusión durante 24 horas. Se determinaron el área de riesgo y los tamaños de infarto por medio de coloración con TTC y azul de Evans y planimetría computarizada como se describe en Kempf, T., et al. (2006), Circ. Res. 98: 351 - 360. Se llevó a cabo una ecocardiografía transtorácica con un transductor lineal de 15 MHz en ratones sedados con isoflurano al 2%. Se registraron imágenes en eje largo [para determinar el volumen del ventrículo izquierdo al final de la diástole (LVEDV) y volumen del ventrículo izquierdo al final de la sístole (LVESV)] y trazos en modo M. Se calculó la fracción de evacuación en porcentaje como $[(LVEDV - LVESV)/LVEDV] \times 100$.

Se trataron ratones C57BL/6 con 7,5 mg/kg de peso corporal de TAT-CrmA en forma intraperitoneal antes de la ligadura de la arteria descendente anterior izquierda (LAD). La ligadura durante 1 h fue seguida por reperfusión durante 24 horas. El área en riesgo durante la oclusión coronaria fue comparable en ratones tratados con vehículo ($30,5 \pm 4,2 \text{ mm}^2$) y tratados con TAT-CrmA ($32,8 \pm 9,1 \text{ mm}^2$). En contraste, los tamaños de los infartos después de la reperfusión fueron significativamente mayores en ratones tratados con vehículo vs. TAT-CrmA ($11,6 \pm 2,8 \text{ mm}^2$ vs. $7,0 \pm 2,0 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$) de acuerdo a lo determinado por medio de la coloración con TTC y azul de Evans (Fig. 6). Como se midió por medio de la ecocardiografía, la fracción de evacuación en ratones operados en forma fingida fue de $71,0 \pm 3,7\%$. Después de la reperfusión, la fracción de evacuación en ratones tratados con TAT-CrmA ($50,7 \pm 4,9\%$) se redujo significativamente menos comparado con los ratones tratados con el vehículo ($22,6 \pm 1,7\%$, $p < 0,001$). Posteriormente, se analizó la eficacia terapéutica de TAT-CrmA cuando se aplica al momento de la reperfusión después de una hora de la isquemia en el mismo escenario. Nuevamente, se podría reducir el tamaño del infarto aproximadamente en un 40% cuando se administró TAT-CrmA con el inicio de la reperfusión (Tabla 1). Aquellos ratones que mostraron una fracción de evacuación de $39,3 \pm 4,2\%$ comparado con $23,2 \pm 4,9\%$ en ratones tratados con el vehículo, que corresponde a un volumen significativamente reducido del ventrículo izquierdo al final de la sístole en el grupo tratado con TAT-CrmA. Las secciones transversales teñidas con hematoxilina-eosina del músculo cardíaco de los ratones tratados con el vehículo mostraron la morfología típica del miocardio de infarto con formación de vacuolas de cardiomiocitos, edema, e infiltración de granulocitos y células mononucleares. Estos signos histológicos son significativamente menos pronunciados en tejido cardíaco obtenido de ratones tratados con TAT-CrmA.

En consecuencia, TAT-CrmA protege el tejido del miocardio de la muerte apoptótica de las células durante infarto isquémico agudo incluso cuando se administra simultáneamente con el inicio de la reperfusión. Se detectaron cardiomiocitos apoptóticos por medio de tinción con TUNEL, mientras que los ratones tratados con vehículo desarrollaron tamaños de infarto más grandes y más apoptosis del cardiomiocitos en la zona del borde del infarto después de lesión por isquemia-reperfusión comparado con las camadas tratadas con TAT-CrmA, lo que indica que crmA limita el daño del tejido del miocardio in vivo.

Tabla 1: Análisis de estudios de reperfusión - isquemia del miocardio

		Administración de TAT-CrmA antes de isquemia			Administración de TAT-CrmA después de isquemia		
	Operación ficticia	vehículo	TAT-CrmA	valor p	vehículo	TAT-CrmA	valor p
Número de animales analizados	3	5	5		13	13	
Peso corporal, g	23,2 ($\pm 0,8$)	22,4 ($\pm 0,5$)	22,7 ($\pm 0,3$)	0,35	24,0 ($\pm 1,1$)	24,0 ($\pm 1,1$)	0,47
Histología							
Área en riesgo (AAR), mm^2	0	32,8 ($\pm 9,1$)	305 ($\pm 4,2$)	0,34	36,9 ($\pm 2,4$)	35,4 ($\pm 2,8$)	0,33
Tamaño del infarto, mm^2	0	11,6 ($\pm 2,8$)	7,0 ($\pm 2,0$)	0,019	19,0 ($\pm 1,4$)	11,5 ($\pm 1,2$)	<0,001

(continuación)

		Administración de TAT-CrmA antes de isquemia			Administración de TAT-CrmA después de isquemia		
	Operación ficticia	vehículo	TAT-CrmA	valor p	vehículo	TAT-CrmA	valor p
Ecocardiografía							
Ritmo cardíaco, bpm	445 (±12)	414 (±46)	440 (±22)	0,32	434 (±8)	417 (±11)	0,12
Fracción de evacuación, %	71,0 (±3,7)	22,6 (±1,7)	50,7 (±4,9)	<0,001	23,2 (±4,9)	39,3 (±4,2)	0,002
LVESV, pl	15,3 (±1,1)	48,9 (±4,5)	28,0 (±2,9)	0,004	53,3 (±3,2)	39,6 (±2,8)	0,003
Ecocardiografía							
LVESV, µl	54,7 (±3,1)	62,9 (±5,1)	58,0 (±4,7)	0,22	70,5 (±2,4)	64,2 (±2,8)	0,06

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Krautwald, Stefan Kunzendorf, Ulrich
- <120> Proteínas de Fusión Antiapoptóticas
- <130> P 81499
- <160> 7
- <170> PatentIn versión 3.4
- 10 <210> 1
- <211> 344
- <212> PRT
- <213> Virus de la viruela de las vacas
- <400> 1

15

ES 2 409 607 T3

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

ES 2 409 607 T3

	165		170		175
Ala Ser Val Lys Glu Ser Phe Gly Asn Phe Ser Ile Ile Glu Leu Pro	180		185		190
Tyr Val Gly Asp Thr Ser Met Met Val Ile Leu Pro Asp Lys Ile Asp	195		200		205
Gly Leu Glu Ser Ile Glu Gln Asn Leu Thr Asp Thr Asn Phe Lys Lys	210		215		220
Trp Cys Asn Ser Leu Glu Ala Thr Phe Ile Asp Val His Ile Pro Lys	225		230		235
Phe Lys Val Thr Gly Ser Tyr Asn Leu Val Asp Thr Leu Val Lys Leu	245		250		255
Gly Leu Thr Asp Val Phe Tyr Ser Thr Gly Asp Tyr Ser Asn Met Cys	260		265		270
Asn Ser Asp Val Ser Val Asp Ala Met Ile His Lys Thr Tyr Ile Asp	275		280		285
Val Asn Glu Glu Tyr Thr Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ser Val Leu Val	290		295		300
Ala Asp Cys Ala Ser Thr Val Thr Asn Glu Phe Cys Ala Asp His Pro	305		310		315
Phe Ile Tyr Val Ile Arg His Val Asp Gly Lys Ile Leu Phe Val Gly	325		330		335
Arg Tyr Cys Ser Pro Thr Thr Asn	340				

<210> 2

<211> 341

<212> PRT

5 <213> virus de la viruela de las vacas

<400> 2

ES 2 409 607 T3

Met Asp Ile Phe Arg Glu Ile Ala Ser Ser Met Lys Gly Glu Asn Val
1 5 10 15

Phe Ile Ser Pro Pro Ser Ile Ser Ser Val Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr
 20 25 30

ES 2 409 607 T3

Gly Ala Asn Gly Ser Thr Ala Glu Gln Leu Ser Lys Tyr Val Glu Lys
 35 40 45
 Glu Ala Asp Lys Asn Lys Asp Asp Ile Ser Phe Lys Ser Met Asn Lys
 50 55 60
 Val Tyr Gly Arg Tyr Ser Ala Val Phe Lys Asp Ser Phe Leu Arg Lys
 65 70 75 80
 Ile Gly Asp Asn Phe Gln Thr Val Asp Phe Thr Asp Cys Arg Thr Val
 85 90 95
 Asp Ala Ile Asn Lys Cys Val Asp Ile Phe Thr Glu Gly Lys Ile Asn
 100 105 110
 Pro Leu Leu Asp Glu Pro Leu Ser Pro Asp Thr Cys Leu Leu Ala Ile
 115 120 125
 Ser Ala Val Tyr Phe Lys Ala Lys Trp Leu Met Pro Phe Glu Lys Glu
 130 135 140
 Phe Thr Ser Asp Tyr Pro Phe Tyr Val Ser Pro Thr Glu Met Val Asp
 145 150 155 160
 Val Ser Met Met Ser Met Tyr Gly Glu Ala Phe Asn His Ala Ser Val
 165 170 175
 Lys Glu Ser Phe Gly Asn Phe Ser Ile Ile Glu Leu Pro Tyr Val Gly
 180 185 190
 Asp Thr Ser Met Val Val Ile Leu Pro Asp Asn Ile Asp Gly Leu Glu
 195 200 205
 Ser Ile Glu Gln Asn Leu Thr Asp Thr Asn Phe Lys Lys Trp Cys Asp
 210 215 220
 Ser Met Asp Ala Met Phe Ile Asp Val His Ile Pro Lys Phe Lys Val
 225 230 235 240
 Thr Gly Ser Tyr Asn Leu Val Asp Ala Leu Val Lys Leu Gly Leu Thr
 245 250 255
 Glu Val Phe Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Ser Asn Met Cys Asn Ser Asp
 260 265 270

Val Ser Val Asp Ala Met Ile His Lys Thr Tyr Ile Asp Val Asn Glu
275 280 285

Glu Tyr Thr Glu Ala Ala Ala Ala Thr Cys Ala Leu Val Ala Asp Cys
290 295 300

Ala Ser Thr Val Thr Asn Glu Phe Cys Ala Asp His Pro Phe Ile Tyr
305 310 315 320

Val Ile Arg His Val Asp Gly Lys Ile Leu Phe Val Gly Arg Tyr Cys
325 330 335

Ser Pro Thr Thr Asn
340

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Virus de IH tipo 1

<400> 3

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 4

<211> 401

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión PTD-Crma

<220>

15 <221> característica nueva

<222> (267)..(267)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 4

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

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Ser Lys Leu Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
35 40 45

Arg Arg Gly Gly Ser Thr Met Ala Gly Thr Asp Ile Phe Arg Glu Ile
50 55 60

ES 2 409 607 T3

Ala	Ser	Ser	Met	Lys	Gly	Glu	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	65	70	75	80
Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Ile	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Ala	Asn	Gly	Ser	Thr	Ala	85	90	95	
Glu	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Asp	Lys	Asn	Lys	Val	100	105	110	
Ser	Ala	Gln	Cys	Ile	Ser	Phe	Lys	Ser	Met	Asn	Lys	Val	Tyr	Gly	Arg	115	120	125	
Tyr	Ser	Ala	Val	Phe	Lys	Asp	Ser	Phe	Leu	Gly	Lys	Ile	Gly	Asp	Lys	130	135	140	
Phe	Gln	Thr	Val	Asp	Phe	Thr	Asp	Cys	Arg	Thr	Ile	Asp	Ala	Ile	Asn	145	150	155	160
Lys	Cys	Val	Asp	Ile	Phe	Thr	Gly	Gly	Lys	Ile	Asn	Pro	Leu	Leu	Asp	165	170	175	
Glu	Pro	Leu	Ser	Pro	Asp	Thr	Cys	Leu	Leu	Ala	Ile	Ser	Ala	Val	Tyr	180	185	190	
Phe	Lys	Ala	Lys	Trp	Leu	Met	Pro	Phe	Glu	Lys	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	195	200	205	
Tyr	Pro	Phe	Tyr	Val	Ser	Pro	Thr	Glu	Met	Val	Asp	Val	Ser	Met	Met	210	215	220	
Ser	Met	Tyr	Gly	Glu	Pro	Phe	Asn	His	Ala	Ser	Val	Lys	Glu	Ser	Phe	225	230	235	240
Gly	Asn	Phe	Ser	Ile	Ile	Glu	Leu	Pro	Tyr	Val	Gly	Asp	Thr	Ser	Met	245	250	255	
Met	Val	Ile	Leu	Pro	Asp	Lys	Ile	Asp	Gly	Xaa	Glu	Ser	Ile	Glu	Gln	260	265	270	
Asn	Leu	Thr	Asp	Thr	Asn	Phe	Lys	Lys	Trp	Cys	Asn	Ser	Leu	Glu	Ala	275	280	285	
Thr	Phe	Ile	Asp	Val	His	Ile	Pro	Lys	Phe	Lys	Val	Thr	Gly	Ser	Tyr	290	295	300	

ES 2 409 607 T3

Asn Leu Val Asp Thr Leu Val Lys Leu Gly Leu Thr Asp Val Phe Tyr
305 310 315 320

Ser Thr Gly Asp Tyr Ser Asn Met Cys Asn Ser Asp Val Ser Val Asp
325 330 335

Ala Met Ile His Lys Thr Tyr Ile Asp Val Asn Glu Glu Tyr Thr Glu
340 345 350

Ala Ala Ala Ala Thr Ser Val Leu Val Ala Asp Cys Ala Ser Thr Val
355 360 365

Thr Asn Glu Phe Cys Ala Asp His Pro Phe Ile Tyr Val Ile Arg His
370 375 380

Val Asp Gly Lys Ile Leu Phe Val Gly Arg Tyr Cys Ser Pro Thr Thr
385 390 395 400

Asn

<210> 5

<211> 1206

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> ADN que codifica la proteína de fusión PTD-CrmA

<400> 5

atgcgggggtt ctcatcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa 60
atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aaggatcgat ggggatccaa gcttggttac 120
ggccgcaaga aacgccgcca gcgccgccgc ggtggatcca ccatggccgg taccgatatc 180
ttcagggaaa tcgcatcttc tatgaaagga gagaatgtat tcatttctcc agcgtcaatc 240
tcgtcagtat tgacaatact gtattatgga gctaattgat ccactgctga acagctatca 300
aaatatgtag aaaaggaggc ggacaagaat aaggttagcg ctcaagtgtat ctcatcgaag 360
tccatgaata aagtatatgg gcgatattct gccgtgttta aagattcctt tttgggaaaa 420
attggcgata agtttcaaac tgttgacttc actgattgtc gcactataga tgcaatcaac 480
aagtgtgtag atatctttac tgggtggaaa atcaatccac tattggatga accattgtct 540
cctgatacct gtctcctagc aattagtgc gtatacttta aagcaaatg gttgatgcca 600
ttcgaaaagg aattcaccag tgattatcca ttttacgtat caccgacgga aatggtagac 660
gtaagtatga tgtctatgta cggcgagcca ttaatacag catctgtaa agaatacttc 720

ggtaactttt caatcataga actgccatat gttggagata ctagtatgat ggtcattctt 780
ccagacaaga ttgatggatt rgaatccata gaacaaaatc taacagatac aaatttcaag 840
aaatgggtgta actctctgga agctacgttt atcgatgtac atattcccaa gtttaaggta 900
acaggctcgt ataactctgt ggatacgcta gtaaagttgg gactgacaga tgtgttctat 960
tcaaccggcg attatagcaa tatgtgtaat tcagatgtga gtgtcgacgc tatgatacac 1020
aaaacgtata tagatgtcaa tgaagagtat acagaagcag ctgcagcaac ttctgtacta 1080
gtggcagact gtgcatcaac agttacaaat gagttctgtg cagatcatcc gttcatctat 1140
gtgattagcg atgttgatgg caaaattctt ttcgttggtg ggtattgctc tccaacaact 1200
aatataa 1206

<210> 6

5 <211> 32

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador de PCR

10 <400> 6

ccgggtaccg atatcttcag ggaaatcgca tc

32

<210> 7

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> cebador de PCR

<400> 7

ccggaattct taattagttg ttggagagca atatcta 37

10

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión, que comprende

(a) un dominio de transducción de proteína capaz de introducir la proteína de fusión en una célula de mamífero;

5 (b) una proteína antiapoptótica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o una variante antiapoptóticamente activa de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 que tiene al menos 70% de identidad de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento antiapoptóticamente activo de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o de la variante definida aquí de la SEQ ID NO: 1.

2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde dicho dominio de transducción de proteína se deriva del dominio de transducción de la proteína Tat del virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1.

10 3. La proteína de fusión de la reivindicación 2, en donde dicho dominio de transducción de proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con la misma.

4. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde la proteína de fusión comprende además un enlazador entre el dominio de transducción de la proteína y la proteína antiapoptótica.

15 5. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 para uso en un método de tratamiento de una lesión por reperfusión o infarto de miocardio.

6. Composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4.

7. Composición farmacéutica de la reivindicación 6 para uso en un método de tratamiento de una lesión por reperfusión o infarto de miocardio.

20 8. Polinucleótido que codifica una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4.

9. Vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 8.

10. Célula huésped que comprende el polinucleótido de la reivindicación 8 o el vector de expresión de la reivindicación 9.

25 11. Método para la preparación de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, que comprende el cultivo de una célula huésped de la reivindicación 10 bajo condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión.

12. El uso de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, el polinucleótido de la reivindicación 8, el vector de expresión de la reivindicación 9, o la célula huésped de la reivindicación 10 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una lesión por reperfusión o un infarto del miocardio.

30 13. Kit que comprende la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, el polinucleótido de la reivindicación 8, el vector de expresión de la reivindicación 9, y/o la célula huésped de la reivindicación 10.

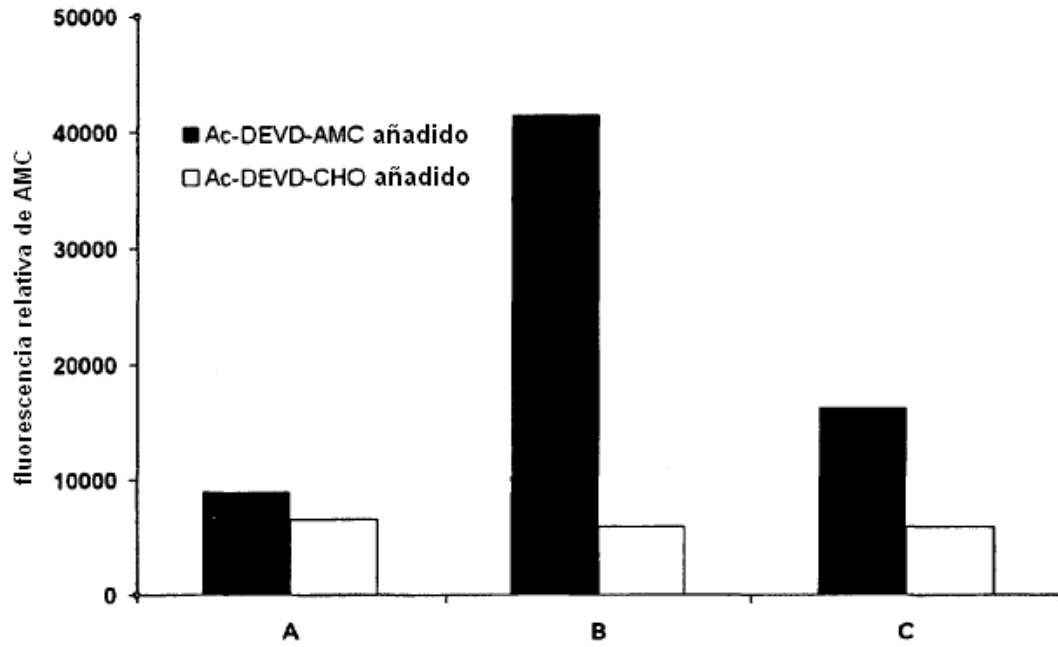


Fig. 1

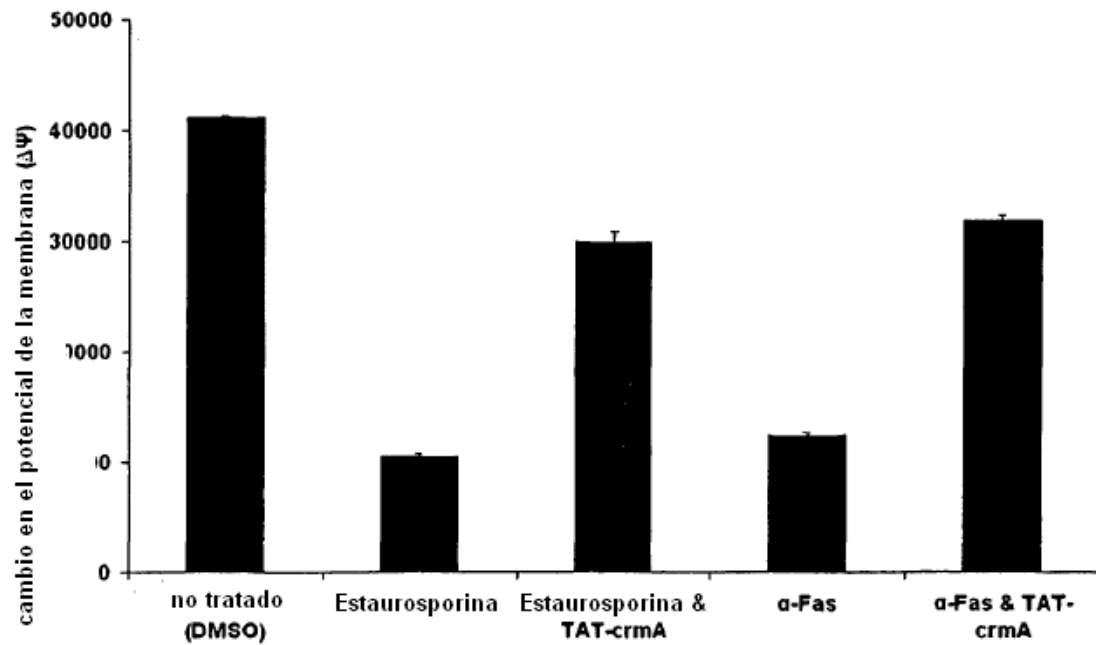


Fig. 2

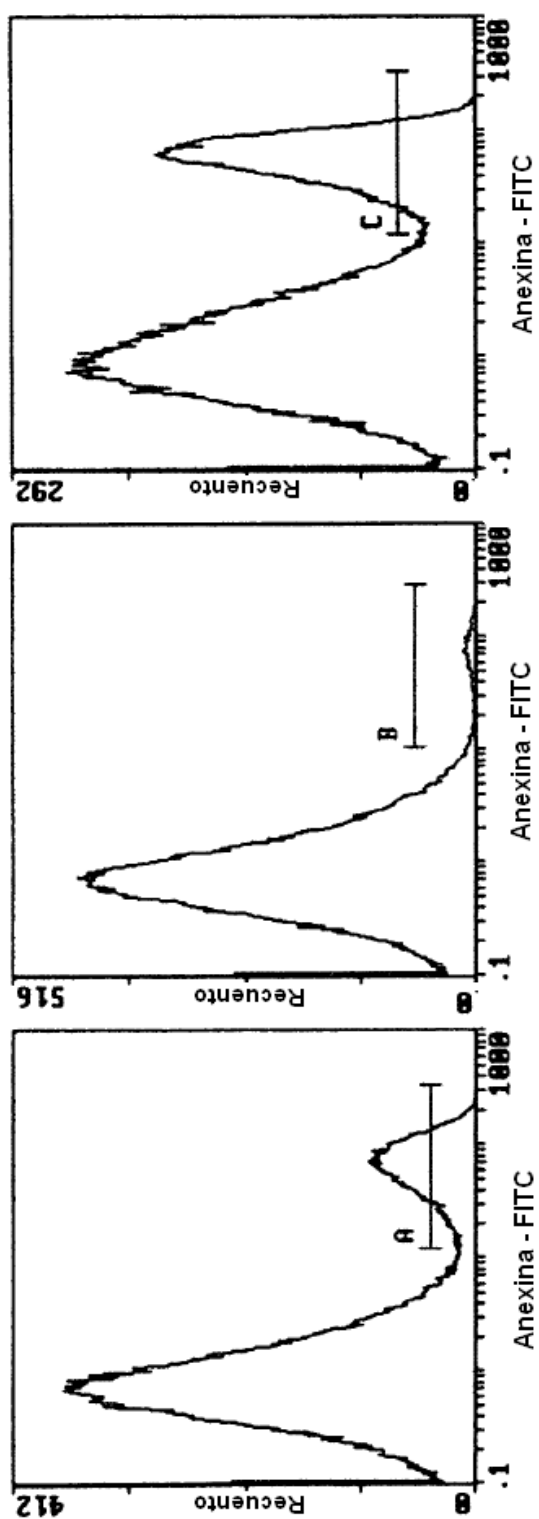


Fig. 3

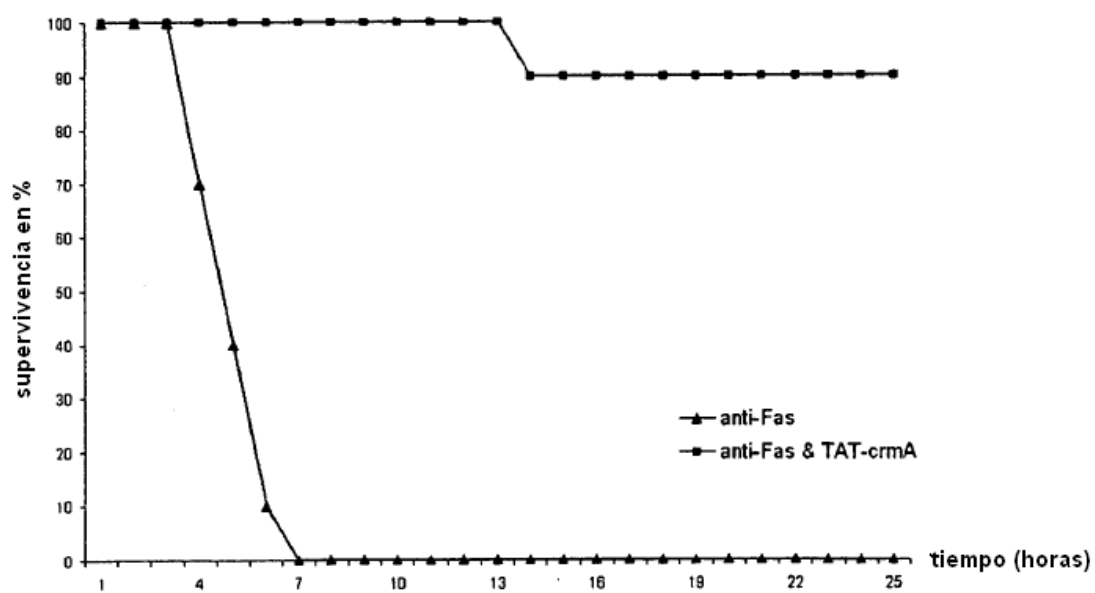


Fig. 4

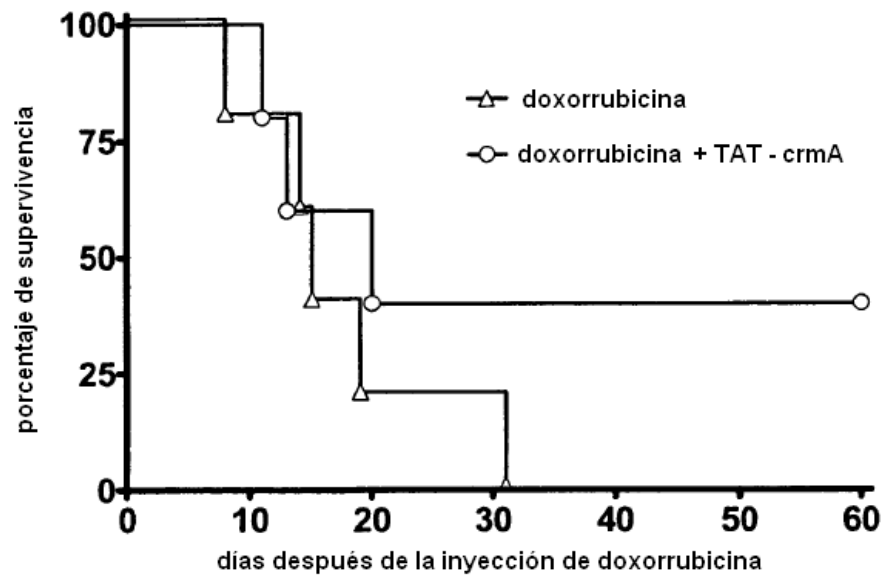


Fig. 5

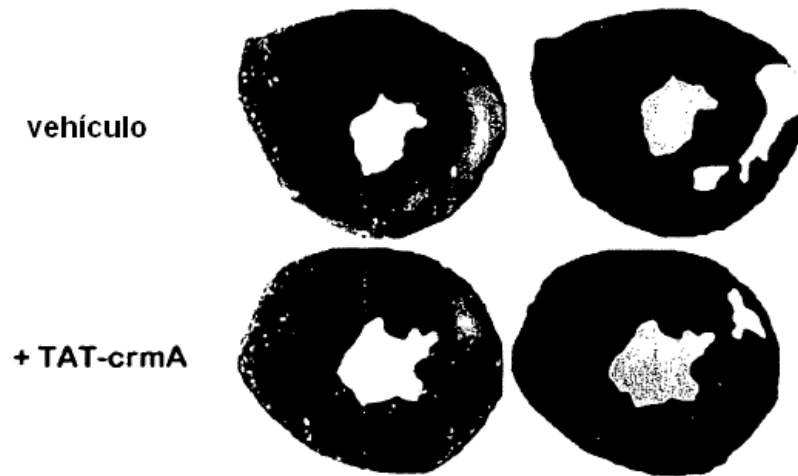


Fig. 6