

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 569**

51 Int. Cl.:

C07K 14/46 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2011 E 11165329 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2386570**

54 Título: **Proteína de fusión de melusina recombinante como agente farmacológico en el tratamiento de patologías cardíacas y composiciones de la misma**

30 Prioridad:

12.05.2010 IT TO20100397

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

06.06.2014

73 Titular/es:

**TARGET HEART BIOTEC S.R.L. (100.0%)
Via Ribes, 5
10010 Colletterto Giacosa (TO), IT**

72 Inventor/es:

**ACCORNERO, FEDERICA;
BRANCACCIO, MARA;
TARONE, GUIDO;
LEMBO, GIUSEPPE y
CARNEVALE, DANIELA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 465 569 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

Proteína de fusión de melusina recombinante como agente farmacológico en el tratamiento de patologías cardíacas y composiciones de la misma

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una forma recombinante de la proteína humana melusina o partes de la misma para el tratamiento de patologías cardíacas, tales como insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía dilatada e infarto de miocardio.

10

Antecedentes de la invención

En sujetos aquejados de patologías cardiovasculares tales como estenosis aórtica, hipertensión arterial crónica, disfunción valvular, infarto de miocardio, miocarditis, cardiomiopatía idiopática, el corazón se somete a mayor carga de trabajo. La presencia de una lesión patológica induce que el corazón experimente hipertrofia, un programa de remodelación tisular dirigido a mantener la función cardíaca. Aunque la hipertrofia cardíaca es, por lo tanto, inicialmente compensatoria y beneficiosa, en condiciones de estímulos patológicos crónicos, pueden producirse acontecimientos adicionales que reducen la eficacia de la respuesta de hipertrofia o activan rutas adicionales que provocan dilatación cardíaca y que conducen progresivamente a disfunción e insuficiencia cardíaca.

15

20

Las propiedades funcionales de la melusina pueden proporcionar un enfoque altamente innovador y robusto para contrarrestar la evolución hacia la disfunción e insuficiencia cardíacas.

25

La melusina, de hecho, se expresa selectivamente en fibras de músculo esquelético y cardiomiocitos (Brancaccio *et al.*, 1999), y se requiere para activar un programa de hipertrofia cardíaca compensatoria en respuesta a condiciones de tensión tales como sobrecarga de presión crónica del ventrículo izquierdo (Brancaccio *et al.*, 2003). Dicha función requiere la activación de AKT/GSK3beta y de ERK (Brancaccio *et al.*, 2003) (De Acetis *et al.*, 2005), dos rutas de señalización bien conocidas en la hipertrofia cardíaca.

30

La expresión forzada de melusina en el corazón de ratones transgénicos protege eficazmente de la dilatación del ventrículo izquierdo e insuficiencia cuando el corazón se somete a sobrecarga de presión prolongada (De Acetis *et al.*, 2005).

35

En pacientes humanos aquejados de cardiomiopatía dilatada en respuesta a reducción de estenosis aórtica la expresión de melusina es comparable al deterioro cardíaco funcional como se mide por valores de fracción de eyección (Brokat *et al.* 2007).

40

El documento EP-A-1 800 696 desvela una proteína de fusión que comprende la proteína de unión a maltosa y melusina humana.

45

Las medicaciones principales actuales para el tratamiento de Insuficiencia Cardíaca (CHF) incluyen fármacos dirigidos a la sobrecarga hemodinámica (diuréticos y nitratos), para inhibir la actividad tanto de renina-angiotensina (inhibidores de ACE y sartanos) como del sistema nervioso simpático (beta bloqueadores). Aunque el desarrollo de estos fármacos ha conducido a un mejor tratamiento, el 50 % de los pacientes con el estadio más avanzado de insuficiencia cardíaca mueren en un periodo de un año, siendo el trasplante de corazón aún la única cura. De hecho, la mayoría de, si no todos, los fármacos disponibles se dirigen principalmente a reducir la sobrecarga hemodinámica cardíaca reduciendo la presión sanguínea y consecuencias indeseables de la insuficiencia cardíaca en diferentes órganos periféricos.

50

Por lo tanto, los enfoques terapéuticos dirigidos a corregir los defectos principales en el músculo cardíaco que forman la base de la insuficiencia cardíaca representan una necesidad médica actual importante ya que deberían proporcionar un resultado mucho más eficaz en comparación con la terapia inotrópica o dispositivos mecánicos que asistan a la función cardíaca.

55

Sumario de la invención

Teniendo en cuenta estas premisas, se siente por lo tanto una necesidad de soluciones mejoradas que permitan el tratamiento terapéutico de patologías cardíacas, tales como insuficiencia cardíaca, y cardiomiopatía provocada por estenosis aórtica, hipertensión arterial crónica, disfunción valvular, infarto de miocardio, miocarditis o cardiomiopatía idiopática, evitando las desventajas a las que se ha hecho referencia anteriormente.

60

El objetivo de la presente divulgación es proporcionar dichas soluciones mejoradas.

65

De acuerdo con la invención, el objetivo anterior se consigue gracias a la materia objeto reivindicada específicamente en las reivindicaciones posteriores, que se entiende que forma una parte integral de la presente

divulgación.

Una realización de la presente divulgación proporciona una proteína de fusión de melusina recombinante que tiene una estabilidad mejorada y una capacidad potenciada para alcanzar los compartimentos intracelulares en comparación con la melusina recombinante codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1 *in vivo*, en la que dicha proteína de fusión de melusina recombinante comprende i) una proteína melusina humana que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°:1, o un homólogo de la misma que tiene al menos 60 %, presentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1 y que tiene la función de inducción de hipertrofia cardiaca de proteína melusina nativa o una parte de melusina humana de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1 que tiene la función de inducción de hipertrofia cardiaca de la proteína melusina nativa y ii) un polipéptido que penetra en células seleccionado entre polipéptido TAT de VIH, polilisina, péptidos del homeodominio de antennapedia, péptidos de las secuencias 11-20 (Figura 6).

En una realización adicional, la proteína de fusión de melusina recombinante puede conjugarse por el extremo N terminal con una secuencia marcadora, que puede seleccionarse entre proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S-transferasa (GST), péptidos de hexahistidina (HIS), epítipo Flag, epítipo Myc, dominio Ig, proteína estafilocócica A.

En una realización adicional más divulgada en la presente solicitud, la proteína de fusión de melusina recombinante puede usarse como un medicamento, preferentemente para el tratamiento de patologías cardiacas, más preferentemente insuficiencia cardiaca y cardiomiopatía provocadas por estenosis aórtica, hipertensión arterial crónica, disfunción valvular, infarto de miocardio, miocarditis o cardiomiopatía idiopática.

La proteína de fusión de melusina recombinante objeto de la presente divulgación tiene actividad de inducción de hipertrofia cardiaca *in vivo*.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora, solamente como ejemplo, con referencia a las figuras dibujadas adjuntas, en las que:

- **Figura 1:** secuencias de nucleótidos y aminoácidos de **(A)** MBP-TAT-melusina y **(B)** MBP-melusina-TAT. La secuencia de aminoácidos de MBP está subrayada, la secuencia de TAT está en negrita, la secuencia de aminoácidos de melusina tiene doble subrayado, el sitio de escisión de proteasa de TEV está indicado por una línea de puntos. **(C)** Representación esquemática de la estrategia de clonación usada para insertar secuencias codificantes de melusina, TAT y TEV en vectores pMAL. **(D)** Tinciones de Coomassie de extractos proteicos totales de *E. coli* que producen proteínas de fusión MBP-melusina-TAT (izquierda) y MBP-TAT-melusina (derecha); flujo continuo después de la purificación de proteínas y fracción de elución que contiene las proteínas purificadas. **(E)** Cromatograma de HPLC de MBP-melusina-TAT eluida de una columna de intercambio de iones Resource Q (GE HealthCare) con un gradiente de Tris-HCl 25 mM pH 7,5 a Tris-HCl 25 mM pH 7,5 más NaCl 1 M. La proteína eluye a NaCl 140 mM.
- **Figura 2. (A) Capacidad de la proteína MBP Melusina recombinante para entrar en células eucariotas.** Se incubaron células COS cultivadas en placas de petri con 50 µg/ml de MBP-melusina-TAT recombinante, MBP-TAT-melusina o MBP-melusina durante 2 horas. Después de lavados repetidos con PBS, las células se fijaron con detergente. Después se visualizó la melusina por inmunofluorescencia con microscopía confocal usando anticuerpos monoclonales de ratón 5E1 para melusina humana (MAB-10333 Immunological Science www.immunologicalsciences.com) seguido de inmunoglobulina secundaria anti ratón marcada con RITC. Se tomaron imágenes con microscopía confocal a tiempo de exposición fijo en planos focales dentro del citoplasma como se puede visualizar por la presencia de núcleos teñidos con el colorante de Hoechst. MBP-melusina-TAT se localiza claramente en el citoplasma. La señal fue mucho menos intensa para la proteína MBP-TAT-melusina lo que indica que la proteína recombinante con secuencia TAT C terminal era más eficaz para entrar en las células. Al mismo tiempo MBP-melusina, que carecía de la secuencia TAT no era detectable dentro de las células lo que demuestra la eficacia del dominio de transducción en el suministro de la proteína recombinante dentro de la célula. **(B) Ensayo *in vitro* de la toxicidad de proteínas recombinantes.** Se sembraron células COS en placas de 6 pocillos y se incubaron en medio de cultivo sencillo (NT) o con 50 µg/ml de MBP-melusina-TAT recombinante o MBP-melusina durante 0, 1, 2, 3, 4, 5 días y se determinó el crecimiento celular por recuento celular. Las curvas de proliferación de células no cambian significativamente entre diferentes tratamientos lo que demuestra que la MBP-melusina-TAT recombinante no tiene efecto citotóxico en las células.
- **Figura 3. Farmacocinética y biodistribución de MBP-melusina-TAT recombinante.** Se realizaron estudios farmacocinéticos tanto en ratas **(A)** como en ratones **(C)** por administración intravenosa e intraperitoneal de la proteína respectivamente. Se insertaron cánulas en ratas Wistar en la vena yugular y se les infundieron 2,6 mg/kg de MBP-Melusina-TAT purificada. La concentración de proteína MBP-Melusina-TAT en plasma se evaluó tanto por ensayo de ELISA (panel derecho A) como por Transferencia de Western **(B)**. Para evaluar la semivida de la proteína después de administración intraperitoneal se inyectó a los ratones 5 mg/kg de MBP-Melusina-TAT y se evaluó la concentración de la proteína en plasma por ELISA **(C)**. La proteína MBP-Melusina-TAT

recombinante tiene una semivida de 2 h tanto cuando se administra por vía intravenosa como por vía intraperitoneal (A y C). Además la proteína es estable en circulación como se detecta por análisis de peso molecular por transferencia de Western de muestras sanguíneas (B).

La biodistribución de la proteína MBP-Melusina-TAT recombinante en ratones se evaluó después de inyección intraperitoneal con 5 mg/kg cada 4 horas tres veces. Los ratones se sacrificaron 4 horas después de la última inyección y se les perfundió PBS en el ventrículo izquierdo para retirar la proteína aún en circulación en sangre. Se recogieron diferentes órganos y se analizaron extractos proteicos por SDS-PAGE y Transferencia de Western con anticuerpos monoclonales de melusina que reaccionaban específicamente con molécula de melusina recombinante humana (MAB-10333 Immunological Science www.immunologicals-ciencias.com). La proteína presente en cada órgano se cuantificó determinando la intensidad de las bandas (**D**). Análisis de transferencia de Western de corazón de ratones a los que se inyectó, en las mismas condiciones que los anteriores, MBP-Melusina-TAT (MMT) o MBP-melusina sin TAT (MM) como control (**E**). La proteína recombinante que contiene TAT, pero no la que carece de TAT, puede detectarse en el corazón 12 horas después de la inyección de forma coherente con la capacidad de la primera para entrar en las células *in vivo*. 24 horas después de la inyección aún era detectable el nivel de melusina en el corazón (panel E inferior) aunque a menor nivel en comparación con las 12 horas. Se usaron anticuerpos de vinculina como control de carga.

- **Figura 4. La MBP-MELUSINA-TAT recombinante está farmacológicamente activa en ratones e induce hipertrofia cardiaca concéntrica compensatoria con capacidad de contracción aumentada.** Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal durante 7 días 1 mg/día/ratón de MBP-Melusina-TAT. Se evaluó la morfología y función cardiaca por ecocardiografía en cada animal tanto antes (basal) como después de 7 días del tratamiento (proteína 1 semana). Los ratones tratados con MBP-Melusina-TAT mostraron aumento del grosor del septo (IVSd), diámetro reducido de la cámara del ventrículo izquierdo (LVIDd) acompañado de capacidad de contracción aumentada como se mide por el acortamiento fraccional (% de FS). Estas características son típicas de la remodelación concéntrica definida por el grosor de la pared relativo (RWT). No se observó ningún efecto en los ratones tratados solamente con vehículo (PBS).

- **Figura 5. El tratamiento con MBP-melusina-TAT recombinante da como resultado mejor función ventricular izquierda en un modelo de insuficiencia cardiaca inducida por sobrecarga de presión.** El protocolo ilustrado en el panel A se adoptó para ensayar la eficacia de MBP-melusina-TAT en la prevención de la insuficiencia cardiaca. Se sometió a ratones C57Black/N a sobrecarga de presión por bandeo quirúrgico de la aorta transversal como se ha descrito previamente (Brancaccio *et al.*, 2003). Un día después del bandeo aórtico se trató a los ratones por inyecciones diarias con dosis crecientes de MBP-melusina-TAT o PBS como un control de vehículo. La función y morfología cardiacas se analizaron por ecocardiografía el día 1 después de la cirugía y al final del tratamiento. Después se explantaron los corazones y se examinaron al nivel histológico y bioquímico. 15 días después del bandeo aórtico los ratones tratados con vehículo (PBS) desarrollaron dilatación del ventrículo izquierdo (LVID) (columnas derechas del panel B PBS). Sin embargo, el tratamiento con MBP-melusina-TAT recombinante dio como resultado reducción de la dilatación del ventrículo izquierdo (LVID) (panel B y C) y mejora de la función sistólica (C, panel derecho). El efecto fue directamente proporcional a la dosis de MBP-melusina-TAT administrada (B, C). Se realizó análisis de transferencia de Western para evaluar la concentración de MBP-melusina-TAT en el corazón explantado. Resulta interesante que la cantidad de proteína presente en el corazón 24 horas después del último tratamiento (rombos del panel D) fue directamente proporcional a la actividad contráctil (panel D; % de EF cuadrados y % de FS triángulos).

- **Figura 6: secuencias de polipéptidos que penetran en células adecuados para la producción de proteínas de fusión de melusina recombinantes.**

45 Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción, se proporcionan numerosos detalles específicos para proporcionar un entendimiento exhaustivo de las realizaciones. Las realizaciones pueden practicarse sin uno o más de los detalles específicos, o con otros métodos, componentes, materiales, etc. En otros casos, no se muestran o describen en detalle estructuras, materiales u operaciones bien conocidos para evitar complicar aspectos de las realizaciones.

La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a “una realización” significa que se incluye un elemento, una estructura o una característica particular en relación con la realización en al menos una realización. Por lo tanto, las apariciones de la frase “en una realización” en diversos lugares a lo largo de la presente memoria descriptiva no se refieren todas necesariamente a la misma realización. Además, los elementos, las estructuras y las características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

Los encabezamientos proporcionados en el presente documento son solamente por conveniencia y no interpretan el alcance o el significado de las realizaciones.

Las proteínas recombinantes pueden ser productos biofarmacéuticos extremadamente útiles, pero su producción y posterior purificación presenta con frecuencia varias dificultades. En particular la solubilidad de la proteína recombinante es muy frecuentemente un problema grave. La proteína sintetizada en gran cantidad por bacterias o células eucariotas queda fuera de la solución debido a la desnaturalización y plegamiento incorrecto que conducen a un producto biológicamente inactivo. Cuando se producen proteínas recombinantes en forma soluble se representa un problema por su estabilidad en la célula y durante el procedimiento de purificación. De hecho, varias proteínas

recombinantes son altamente inestables y experimentan diversos grados de degradación por proteólisis dentro de la célula o descomposición durante el procedimiento de purificación debido a contaminantes traza. Estos son problemas graves que es necesario superar.

5 Las proteínas recombinantes para utilizar como agente farmacológico *in vivo* también tienen que ser altamente estables una vez inyectadas en el organismo saliente, en el que se catabolizan fácilmente y se retiran de la circulación.

10 Las proteínas, tales como melusina, que necesitan penetrar dentro de las células para ejercer su función representan un problema adicional. Puede conseguirse penetración celular por péptidos específicos que tienen capacidad de translocación de membrana, sin embargo, la eficacia de esta modificación depende estrictamente del plegamiento de la proteína y posición del péptido dentro de la secuencia proteica.

15 La presente invención supera todas las deficiencias anteriormente observadas en la técnica ya que permite la producción de proteína altamente soluble, muy estable tanto durante la purificación como después de la administración *in vivo*. Además, la proteína penetra eficazmente en células y está dotada de potente actividad *in vivo* en el corazón tanto en condiciones basales como patológicas.

20 La presente invención se refiere por lo tanto a una proteína de fusión de melusina recombinante que tiene una estabilidad mejorada y una capacidad potenciada para alcanzar compartimentos intracelulares en comparación con la melusina recombinante codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1 *in vivo*, y que tiene además actividad de inducción de hipertrofia cardíaca *in vivo*, en la que dicha proteína comprende i) una proteína de melusina humana que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1, o un homólogo de la misma que tiene al menos 60 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1 y que tiene la función de inducción de hipertrofia cardíaca de la proteína melusina nativa o una parte de melusina humana de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1 que tiene la función de inducción de hipertrofia cardíaca de la proteína melusina nativa y ii) un polipéptido que penetra en células.

30 En una realización particularmente preferida la proteína de fusión de melusina recombinante se representa por las secuencias de nucleótidos y aminoácidos expuestas en SEC ID N°: 9 (construcción de ADN) y 10, respectivamente.

35 El polipéptido que penetra en células puede seleccionarse entre polipéptido TAT de VIH, desvelado entre otros en Vives *et al.*, (1997), péptidos del homodominio de antennapedia también conocido como penetrante o pAntp desvelado entre otros en Derossi *et al.*, (1996); Derossi *et al.*, (1994); y Brugidou *et al.*, (1995); el péptido R7 desvelado en Rothbard *et al.*, (2000); el péptido KALA desvelado en Wyman *et al.*, (1997); buforina 2 desvelada en Takeshima *et al.*, (2003); MAP desvelado en Oehlke *et al.*, (1998); transportano desvelado en Pooga *et al.*, (1998); transportano 10 desvelado en Soomets *et al.*, (2000); pVEC desvelado en Elmquist *et al.*, (2001); péptido MPG desvelado en Morris *et al.*, (1997). Las secuencias correspondientes de los péptidos que penetran en células a las que se ha hecho referencia anteriormente se muestran en la Figura 6 y se exponen en SEC ID N°: 11 a 20.

45 La proteína de fusión de melusina recombinante puede, entonces, conjugarse por el extremo N terminal con un proteína marcadora, que puede seleccionarse entre proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S-transferasa (GST), péptido de hexa Histidina (HIS), epítipo Flag, epítipo Myc, dominio Ig, proteína estafilocócica A, o cualquier otra secuencia proteica adecuada para facilitar la expresión y purificación de la proteína recombinante.

50 La proteína de fusión de melusina recombinante descrita en el presente documento es adecuada para administración parenteral a un sujeto que lo necesite en una cantidad de 1 a 100 mg/día.

55 La proteína de fusión de melusina recombinante puede usarse provechosamente como un medicamento para el tratamiento de patologías cardíacas, como por ejemplo insuficiencia cardíaca, y cardiomiopatía provocada por estenosis aórtica, hipertensión arterial crónica, disfunción valvular, infarto de miocardio, miocarditis o cardiomiopatía idiopática.

60 La insuficiencia cardíaca puede originarse de muchas lesiones cardíacas, entre otras estenosis aórtica, disfunción valvular, miocarditis viral o autoinmunitaria, hipertensión crónica, infarto de miocardio y mutaciones genéticas. Todas estas lesiones generan sobrecarga de trabajo en el músculo cardíaco que a largo plazo conduce a remodelación negativa caracterizada por adelgazamiento de las paredes ventriculares, dilatación de la cámara ventricular y pérdida de función contráctil, características que normalmente definen el estado patológico conocido como insuficiencia cardíaca.

65 A la vista de los efectos terapéuticos ejercidos por la proteína de fusión recombinante melusina desvelada en el presente documento, y más específicamente al contrarrestar a) el adelgazamiento de la paredes ventriculares, b) la dilatación de la cámara ventricular y c) la pérdida de la función contráctil, es decir la actividad de inducción de hipertrofia cardíaca *in vivo*, la proteína de fusión recombinante melusina puede tener eficacia terapéutica en la

insuficiencia cardiaca generada por todas las etiologías enumeradas anteriormente.

A continuación se describirá la invención en relación con algunas realizaciones específicas, y más preferentemente con una proteína de melusina humana recombinante, que penetra en células, MBP-Melusina-TAT, sin ningún efecto limitante en el alcance de las reivindicaciones subsiguientes.

5 La presente divulgación se refiere a los protocolos de generación y purificación para una proteína de melusina humana recombinante, que penetra en células, MBP-Melusina-TAT en células procariotas. La proteína consiste en un componente marcador, concretamente proteína de unión a maltosa (MBP) que permite un plegamiento proteico eficaz y purificación de afinidad conveniente, la secuencia de melusina y el dominio de transducción celular de la proteína TAT del virus VIH, que confiere la capacidad a la proteína recombinante para entrar en las células.

10 El protocolo de purificación consiste en dos fases: una etapa de cromatografía de afinidad basada en la afinidad de la MBP por la amilosa y una cromatografía de intercambio iónico que permite purificación y eliminación adicional del componente de LPS.

15 MBP-melusina-TAT después de incubación con células en cultivo claramente entra en células y se localiza en el citoplasma. La señal fue mucho menos intensa para la proteína MBP-TAT-melusina lo que indica que la proteína recombinante con secuencia TAT C terminal era más eficaz para entrar en la membrana celular. Al mismo tiempo, la secuencia de MBP-melusina, sin TAT, no fue detectable dentro de las células lo que demuestra la eficacia del dominio de transducción para suministrar la proteína recombinante dentro de la célula (Figura 2A).

20 Las curvas de proliferación de células no tratadas no cambian significativamente con respecto a las de células tratadas con MBP-melusina-TAT lo que demuestra que la MBP-melusina-TAT recombinante no tiene efecto citotóxico en células (Figura 2B).

25 La proteína MBP-Melusina-TAT recombinante purificada está dotada de la capacidad para entrar en la célula, proporcionando de este modo un suministro intracelular eficaz de melusina.

30 La proteína MBP-Melusina-TAT recombinante purificada tiene una semivida de 2 horas cuando se administra por vía intravenosa o intraperitoneal en ratas o ratones (Figura 3A y 3C) y es estable en circulación como se detecta por análisis de transferencia de western de muestras sanguíneas a las 12 horas después de la inyección (Figura 3B).

35 La distribución de la proteína MBP-Melusina-TAT recombinante *in vivo* se evaluó después de inyección intraperitoneal con 5 mg/kg cada 4 horas tres veces. Los ratones se sacrificaron 4 horas después de la última inyección y se les perfundió PBS en el ventrículo izquierdo para retirar la proteína aún en circulación en sangre. Se recogieron diferentes órganos y se analizaron extractos proteicos por SDS-PAGE y Transferencia de Western con anticuerpos monoclonales de melusina que reaccionan específicamente con molécula de melusina recombinante humana (MAB-10333 Immunological Science www.immunologicalsciences.com) (figura 3D). La proteína presente en cada órgano se cuantificó determinando la intensidad de las bandas. El corazón de ratones a los que se inyectó MBP-Melusina-TAT (MMT) o MBP-melusina sin TAT (MM) en las mismas condiciones que los anteriores, se analizaron por SDS-PAGE y transferencia de western. La proteína recombinante que contiene TAT, pero no la que carece de TAT, puede detectarse en el corazón 12 horas después de la inyección de forma coherente con la capacidad de la primera para entrar en las células.

45 La MBP-Melusina-TAT está desprovista de actividad tóxica en ratones tratados durante 15 días con una dosis de 1 mg/día durante un periodo de 15 días.

50 Los ratones tratados con una dosis de 1 mg/día durante un periodo de 7 días con MBP-Melusina-TAT desarrollan una remodelación concéntrica del ventrículo izquierdo y aumento de la capacidad de contracción como se detecta por análisis de ecocardiografía que demuestra la actividad farmacológica de la proteína recombinante *in vivo* (Figura 4). Más específicamente, los ratones tratados con MBP-Melusina-TAT muestran aumento del grosor del septo (IVSd), diámetro reducido de la cámara del ventrículo izquierdo (LVIDd) acompañado de capacidad de contracción aumentada como se mide por acortamiento fraccional (% de FS). Estas características son típicas de la remodelación concéntrica definida por el grosor relativo de la pared (RWT). No se observó ningún efecto en ratones tratados con vehículos solamente (PBS).

55 La eficacia terapéutica de MBP-Melusina-TAT (Figura 5) se demostró en un modelo de sobrecarga de presión de insuficiencia cardiaca.

60 El protocolo ilustrado en el panel A de la Figura 5 se adoptó para ensayar la eficacia de MBP-melusina-TAT en la prevención de la insuficiencia cardiaca. Se sometió a ratones C57Black/N a sobrecarga de presión por bandedo quirúrgico de la aorta transversal como se ha descrito previamente (Brancaccio *et al.*, 2003). Solo se seleccionaron para tratamiento posterior ratones con un gradiente de presión entre 65 y 90 mm (Figura 5B). Se trató a cuatro grupos de 9 ratones cada uno respectivamente con 700 µg, 350 µg, 175 µg de MBP-melusina-TAT por día por ratón en 200 µl de PBS. Se trató un grupo de control con PBS solamente. El tratamiento se prolongó durante 15 días.

65

Se analizaron la función cardíaca y la morfología por ecocardiografía el día 1 después de cirugía y al final del tratamiento. Después se explantaron los corazones y se examinaron al nivel histológico y bioquímico. 15 días después del bandeo aórtico los ratones tratados con vehículo (PBS) desarrollaron dilatación del ventrículo izquierdo (LVID) (columnas derechas del panel B PBS de la Figura 5). Sin embargo, el tratamiento con MBP-melusina-TAT recombinante dio como resultado reducción de la dilatación del ventrículo izquierdo (LVID) (paneles B y C de la Figura 5) y mejora de la función sistólica (Figura 5C). El efecto fue directamente proporcional a la dosis de MBP-melusina-TAT administrada (B, C). Se realizó análisis de transferencia de Western para evaluar la concentración de MBP-melusina-TAT en el corazón explantado. Resulta interesante que la cantidad de proteína presente en el corazón 24 horas después del último tratamiento (rombos del panel D) fue directamente proporcional a la actividad contráctil (panel D; % de EF cuadrados y % de FS triángulos).

Ejemplos

Ejemplo I - Preparación de construcciones de pMAL y producción y purificación de proteínas recombinantes.

El ADNc de melusina humana completo (SEC ID N°: 1) se clonó en plásmido pMal-C2 (New England Biolabs) (figura 1a) en sitios de restricción EcoRI y Sall. Se insertó un oligonucleótido (TACGGCCGCAAGAAACGCCGCCAGCGCCGCCGC - SEC ID N°: 2) que codificaba 11 aminoácidos (YGRKKRRQRRR - SEC ID N°: 3) de la proteína TAT del virus VIH al comienzo de la secuencia de aminoácidos de melusina o al final de la secuencia de aminoácidos de melusina (Figura 1 A, B). Se insertó un segundo oligonucleótido bicatenario (GAAAACCTGTACTTCCAGGGG - SEC ID N°: 4) que codifica el sitio de escisión (ENLYFQG - SEC ID N°: 5) de la proteasa TEV, una proteasa altamente específica de sitio del Virus del Grabado del Tabaco, entre las secuencias de proteína de unión a maltosa (SEC ID N°: 6) y codificante de melusina (SEC ID N°: 1).

Las construcciones (las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la que se exponen en SEC ID N°: 7 a 10, y se muestran en las Figuras 1A y 1B) descritas anteriormente se transformaron en *E. coli* BL21 y se desencadenó la síntesis proteica añadiendo IPTG. En particular se sembraron células en placas LB que contenían ampicilina y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se inocularon colonias en cultivo de LB-Amp y se cultivaron durante una noche a 37 °C. Los cultivos de una noche se diluyeron 1:100 con medio LB-Amp precalentado y se cultivaron a 37 °C hasta una DO600 de 0,5-0,6. Se indujo expresión proteica con la adición de isopropiltiogalactósido 0,1 mM (IPTG; Sigma, St. Louis, MO) durante 4 horas. Las células se centrifugaron y resuspendieron en tampón en columna (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 0,2 M, ZnCl₂ 1 μM) más coctel de inhibidor de proteasa (Complete - Roche) y después se congeló a -80 °C. Las células bacterianas se descongelaron y se sonicaron 6 veces durante 10 segundos en hielo. El extracto celular se clarificó por centrifugación y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo.

Se realizó purificación de las proteínas de fusión-MBP por cromatografía de afinidad en perlas de amilosa/agarosa seguido de elución con maltosa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). El contenido proteico en las fracciones eluidas se determinó con ensayo de Bradford y la calidad proteica se evaluó por SDS-PAGE seguido de tinción con azul de coomassie (figura 1D).

La proteína de fusión tiene un peso molecular de 75 kd y su identidad se confirmó por transferencia de western tanto con anticuerpos de melusina como con anticuerpos de proteína de unión a maltosa. El grado de pureza en este estadio fue del 90 % como se determina por tinción de azul de Coomassie seguido de densitometría.

El perfil cromatográfico de la proteína MBP-TAT-melusina (panel derecho de la figura 1D) era de forma reproducible más heterogéneo con un número de bandas con peso molecular inferior al de la proteína intacta indicativo de degradación e inestabilidad de proteínas. Por otro lado la proteína de fusión que codifica la MBP-melusina-TAT generó una molécula mucho más estable con solamente una proporción menor de productos de degradación (panel izquierdo de la figura 1D).

Ejemplo II - Purificación proteica por intercambio iónico y retirada de LPS.

La proteína se dializó frente a Tris-HCl 25 mM pH 7,5 a 4 °C durante una noche y después se cargó en una columna de HPLC de intercambio iónico Resource Q de 6 ml (GE HealthCare) suficiente para aproximadamente 30-40 mg de proteína.

Después de lavar con Tris-HCl 25 mM pH 7,5, se eluyó la proteína unida con un gradiente de Tris-HCl 25 mM pH 7,5 a Tris-HCl 25 mM pH 7,5 más NaCl 1 M. La proteína eluye a NaCl 140 mM (figura 1E). La proteína se dializa después frente a PBS estéril y se concentra a 1 mg/ml o más por centrifugación Centricon para inyección animal.

Ejemplo III - Ensayo para penetración celular de proteínas de fusión.

Para investigar la capacidad de la proteína MBP-Melusina recombinante para entrar en células eucariotas los inventores trataron células COS con 50 μg/ml de MBP-melusina-TAT recombinante y otra muestra celular con MBP-melusina como control durante 2 horas. Se retiró el medio de cultivo y después de lavados repetidos con PBS, se

fijaron las células con paraformaldehído y se permeabilizaron con Triton X100 0,1 % en PBS. Las células se incubaron después con anticuerpos monoclonales de ratón 5E1 para MELUSINA humana (MAB-10333, Immunological Science www.immunologicalsciences.com) (10 µg/ml durante 1 hora) seguido de inmunoglobulina secundaria anti ratón marcada con RITC para evaluar la localización subcelular de las proteínas recombinantes. La Figura 2 muestra células COS tratadas durante 2 horas con 50 µg/ml de MBP-melusina-TAT recombinante y se analizaron con microscopía confocal en planos focales dentro del citoplasma como puede visualizarse por la presencia de núcleos teñidos con colorante de Hoechst. La MBP-melusina-TAT está claramente en el citoplasma principalmente concentrada en estructuras de tipo punto lo que sugiere una captación mediada por endocitosis. Por el contrario MBP-melusina sin la secuencia de TAT no era detectable dentro de las células lo que demuestra la eficacia del dominio de transducción en el suministro de la proteína recombinante dentro de la célula. Resulta interesante que la proteína de fusión que contiene la secuencia TAT en melusina N terminal (MBP-TAT-melusina) era significativamente menos eficaz para entrar en membranas celulares (Figura 2). Por esta razón los inventores eligieron la MBP-melusina-TAT para los siguientes experimentos.

15 **Ejemplo IV - Ensayo de toxicidad celular.**

Para ensayar la citotoxicidad del tratamiento con la MBP-melusina-TAT los inventores sembraron 50.000 células COS/pocillo en placas de 6 pocillos. Las células se trataron con 50 µg/ml de la MBP-melusina-TAT recombinante durante 0, 1, 2, 3, 4, 5 días y después se analizaron con respecto a su capacidad de proliferación y se compararon con células no tratadas. Las células se fijaron en PFA 4 %, se tiñeron con solución de violeta cristal y el colorante se recuperó y se sometió a cuantificación espectrofotométrica. Los resultados de los inventores demostraron que las curvas de proliferación obtenidas para células COS tratadas con MBP-melusina-TAT no fueron significativamente diferentes de las obtenidas para células no tratadas (figura 2B). Este experimento demuestra que la captación del medio de cultivo de la proteína MBP-melusina-TAT no tiene un efecto de citotoxicidad en células en cultivo.

25 **Ejemplo V - Estudios farmacocinéticos *in vivo***

Para establecer la semivida de la proteína en circulación se realizaron estudios farmacocinéticos *in vivo* tanto en ratas como en ratones por administración intravenosa e intraperitoneal de la proteína. Se usó el siguiente protocolo para administración intravenosa en ratas:

Se insertaron cánulas en tres ratas Wistar en la vena yugular y se infundieron 2,6 mg/kg de rata de MBP-Melusina-TAT purificada. Se recogió sangre en EDTA como anticoagulante en los siguientes puntos temporales: 5 - 15 - 30 minutos; 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 24 horas después de la inyección. La concentración de proteína MBP-Melusina-TAT en plasma se evaluó tanto por ensayo de ELISA como por Transferencia de Western.

Para evaluar la semivida de la proteína después de administración intraperitoneal se usó el siguiente protocolo: se inyectaron 5 mg/kg de MBP-Melusina-TAT en cada ratón. La sangre estaba en EDTA como anticoagulante en los siguientes puntos temporales: 0 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 horas. Se usaron cuatro ratones/cada punto. Se obtuvo evaluación de la concentración de proteína MBP-Melusina-TAT en plasma con ensayo de ELISA.

Los resultados indicaron que la proteína MBP-Melusina-TAT recombinante purificada tiene una semivida de 2 horas tanto cuando se administra por vía intravenosa como por vía intraperitoneal (Figura 3A y C). Además la proteína es estable en circulación como se detecta por análisis de peso molecular por transferencia de western de muestras sanguíneas (figura 3B, transferencia de western en el corazón).

45 **Ejemplo VI - Biodistribución de MBP-Melusina-TAT**

Para evaluar la distribución de la proteína MBP-Melusina-TAT recombinante *in vivo*, se inyectó a los ratones IP 5 mg/kg cada 4 horas tres veces alcanzando una C máx Plasmática de 50 µg/ml y una C mín de 10 µg/ml para un tiempo de exposición total de 12 horas. Se usó la MBP-melusina sin TAT (MM) como control. Después los ratones se sacrificaron y se recogió sangre en anticoagulante. Después de perfusión con PBS en el ventrículo izquierdo para retirar sangre en circulación se recogieron diferentes órganos y se prepararon extractos proteicos con tampón de TBS de Triton X100 0,5 % para cuantificar MBP-Melusina-TAT por Transferencia de Western con anticuerpo monoclonal de melusina (www.immunologicalsciences.com MAB-10333). Como se muestra en la figura 3D E, puede detectarse MBP-Melusina-TAT (MMT), pero no MBP-Melusina sin TAT (MM), en el corazón y en otros órganos 12 horas después de la inyección.

60 **Ejemplo VII – La MBP-MELUSINA-TAT recombinante está farmacológicamente activa en ratones e induce remodelación cardíaca concéntrica con capacidad de contracción aumentada.**

Para ensayar la actividad funcional *in vivo* de la melusina recombinante, se trataron ratones durante 7 días con 1 mg/día/ratón de MBP-Melusina-TAT administrada por inyección intraperitoneal. Para evaluar la morfología y función cardíaca los ratones se sometieron a ecocardiografía con aparato VEVO 770 de alta resolución equipado con la sonda cardíaca 707B. Cada animal se examinó tanto antes como después del tratamiento para comparar directamente la respuesta funcional. Como se muestra en la figura 4, los ratones tratados con MBP-Melusina-TAT

redujeron el diámetro de la cámara del ventrículo izquierdo (LVIDd) acompañado de capacidad de contracción aumentada como se mide por acortamiento fraccional (% de FS). No se observó ningún efecto en ratones a los que se inyectó solamente vehículo (PBS). Estas características, típicas de la remodelación concéntrica (RWT), demuestran la actividad farmacológica de la proteína recombinante *in vivo* (Figura 4).

5 **Ejemplo VIII - El tratamiento con melusina recombinante da como resultado mejora de la función de LV en un modelo de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.**

10 La eficacia terapéutica de MBP-Melusina-TAT se demostró en un modelo de ratón de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión. Se seleccionaron ratones C57Black/N para estos estudios basándose en su alta susceptibilidad a desarrollar dilatación del ventrículo izquierdo en respuesta a sobrecarga de presión inducida por bandedo quirúrgico de la aorta transversal. Tras un gradiente de presión medio de 80 mm, estos ratones desarrollan cardiomiopatía dilatada en un periodo de 15 días. Esta cepa de ratón representa, por lo tanto, un modelo muy bueno por dos razones principales: 1- la alta susceptibilidad a cardiomiopatía dilatada permite ensayar la eficacia de un agente terapéutico en condiciones muy rigurosas; 2- la rápida evolución a insuficiencia cardíaca permite evaluar la eficacia del tratamiento en un tiempo mucho más corto en comparación con cepas de ratones convencionales que desarrollan dilatación del ventrículo izquierdo en 8-12 semanas (De Acetis *et al.*, 2005). Los ratones que se sometieron a ligamiento quirúrgico de la aorta transversal y el grado de bandedo se controló 24 horas después por análisis de eco-Doppler. Solamente se seleccionaron para tratamiento ratones con un gradiente de presión entre 65 y 90 mm. Se trató a cuatro grupos de 9 ratones cada uno respectivamente con 700 µg, 350 µg, 175 µg de MBP-melusina-TAT por día por ratón en 200 µl de PBS. Se trató un grupo de control con PBS solamente. El tratamiento se prolongó durante 15 días. Se analizó la función y morfología cardíaca el día 1 después de la cirugía y al final del tratamiento. Después los corazones se explantaron y se examinaron al nivel histológico y bioquímico. La Figura 5 A ilustra el protocolo usado.

25 Los ratones tratados mostraron una clara mejora de la función sistólica como se mide por fracción de eyección así como nivel reducido de dilatación del ventrículo izquierdo (Figura 5B, C). El efecto fue directamente proporcional a la dosis de melusina administrada. Se realizó análisis de transferencia de Western para evaluar la concentración de MBP-melusina-TAT en el corazón explantado. Como se muestra en la figura 5D, la cantidad de proteína presente en el corazón 24 horas después del último tratamiento varió ligeramente entre ratones y fue directamente proporcional a la actividad contráctil. Todos juntos estos datos demuestran que la melusina recombinante administrada IP es terapéuticamente activa en un modelo de ratón de insuficiencia cardíaca de sobrecarga de presión.

30 Naturalmente, aunque el principio de la invención sigue siendo el mismo, los detalles de construcción y las realizaciones pueden variar ampliamente con respecto a lo que se ha descrito y se ha ilustrado únicamente como ejemplo, sin alejarse del alcance de la presente invención.

35 **Referencias**

- 40 - Brancaccio, M., *et al.* (2003). Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med* 9, 68-75.
- Brancaccio, M., *et al.* (1999). Melusin is a new muscle-specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 274, 29282-29288.
- 45 - Brigidou, J., *et al.* (1995). The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurones: a new basis for an efficient intracellular delivery system. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 685-693.
- De Acetis, M., *et al.* (2005). Cardiac overexpression of melusin protects from dilated cardiomyopathy due to long-standing pressure overload. *Circ Res* 96, 1087-1094.
- 50 - Degols, G., *et al.* (1989). Antiviral activity and possible mechanisms of action of oligonucleotides poly(L-lysine) conjugates targeted to vesicular stomatitis virus mRNA and genomic RNA. *Nucleic Acids Res* 17, 9341-9350.
- Derossi, D., *et al.* (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 271, 18188-18193.
- Derossi, D., *et al.* (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269, 10444-10450.
- 55 - Elmquist, A., *et al.* (2001). VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp Cell Res* 269, 237-244.
- Lemaitre, M., *et al.* (1987). Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 648-652.
- 60 - Leonetti, J. P., *et al.* (1988). Antiviral activity of conjugates between poly(L-lysine) and synthetic oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 72, 323-332.
- Morris, M. C., *et al.* (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 25, 2730-2736.
- Oehlke, J., *et al.* (1998). Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta* 1414, 127-139.
- 65 - Pooga, M., *et al.* (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J* 12, 67-77.

- Rothbard, J. B., *et al.* (2000). Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med* 6, 1253-1257.
- Soomets, U., *et al.* (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta* 1467, 165-176.
- Takeshima, K., *et al.* (2003). Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. *J Biol Chem* 278, 1310-1315.
- Vives, E., *et al.* (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272, 16010-16017.
- Wyman, T. B., *et al.* (1997). Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry* 36, 3008-3017.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Target Heart Biotec S.r.l.

<120> Proteína de fusión de melusina recombinante como agente farmacológico en el tratamiento de patologías cardíacas y composiciones de la misma

<130> BEP13037-CF

<150> ITT02010A000397
<151> 12-05-2010

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1041
<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

atgtctctac tctgtcgtaa caaaggctgt gggcagcact ttgaccctaa taccaacctt      60
cctgattcct gttgccatca ccctggggtc ccaatcttcc atgatgcact taagggttgg      120
tcctgtgcc gaaagcgaac tgtagatttc tctgagttct taaacatcaa gggctgtact      180
atgggaccac actgtgtctga gaagcttcct gagggccctc aacctgaagg ccctgctaca      240
agcagttcac ttcaggagca aaaacctctg aatgtgattc caaagtcagc agagaccttg      300
cgccgggaga ggcccaagtc agagttgcct ctgaagctgc tgccgctaaa tatatcccaa      360
gccctggaaa tggcattgga acagaaggaa ttagaccagg aacctggggc aggacttgac      420
agtctgatcc ggactggttc cagctgccag aaccaggat gtgatgctgt ttaccaaggc      480
cctgagagtg atgctactcc atgtacctac caccaggag caccgatt ccattgagggg      540
atgaagtctt ggagctgttg tggcatccag accctggatt ttggggcatt cttggcacia      600
ccagggtgca gagtcggtag acatgactgg ggaagcagc tcccagcatt ttgccccat      660
gattggcacc agacagattc cttagtagtg gtgactgtat atggccagat tccacttcct      720
gcgtttaact ggggtgaaggc cagtcaaact gagcttcatg tccacattgt ctttgatgg      780
aaccgtgtgt tccaagcaca gatgaagctc tgggggggtca taaacgtgga gcagagctct      840
gtcttcttga tgccatctcg ggttgaatc tccctgggtca aggctgacct aggatcctgg      900
gcccagctgg agcaccctga tgcaactagc aagaaggcta gggcaggggt tgtgttagag      960
atggatgagg aagaatctga cgattcagat gatgatctga gctggacaga ggaggaggaa     1020
gaggaggaag caatggggga a                                     1041
    
```

ES 2 465 569 T3

5 <210> 2
<211> 33
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> oligonucleótido de la proteína TAT del virus VIH

10 <400> 2
tacggccgca agaaacgccg ccagcgccgc cgc 33

15 <210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> oligopéptido codificado por la secuencia oligonucleotídica de la proteína TAT del virus VIH

20 <400> 3

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

25 <210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido que codifica el sitio de escisión de la proteasa TEV

<400> 4
gaaaacctgt acttcagg g 21

35 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> oligopéptido 1 codificado por el oligonucleótido que codifica el sitio de escisión de la proteasa de TEV

<400> 5

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

45 <210> 6
<211> 1161
<212> ADN
<213> artificial

50 <220>
<223> secuencia codificante de la proteína de unión a maltosa

55 <400> 6

ES 2 465 569 T3

atgaaaatcg aagaaggtaa actggtaatc tggattaacg gcgataaagg ctataacggt 60
 ctcgctgaag tcggtaagaa attcgagaaa gataccggaa ttaaagtcac cgttgagcat 120
 ccggataaac tggaagagaa attcccacag gttgcggcaa ctggcgatgg ccctgacatt 180
 atcttctggg cacacgaccg ctttgggtggc tacgctcaat ctggcctggt ggctgaaatc 240
 accccggaca aagcgttcca ggacaagctg tatccgttta cctgggatgc cgtacgttac 300
 aacggcaagc tgattgctta cccgatcget gttgaagcgt tategctgat ttataacaaa 360
 gatctgctgc cgaaccgcc aaaaacctgg gaagagatcc cggcgctgga taaagaactg 420
 aaagcgaaag gtaagagcgc gctgatgttc aacctgcaag aaccgtactt cacctggccg 480
 ctgattgctg ctgacggggg ttatgcgttc aagtatgaaa acggcaagta cgacattaa 540
 gacgtggggc tgataacgc tggcgcgaaa gcgggtctga cttcctggt tgacctgatt 600
 aaaaacaac acatgaatgc agacaccgat tactccatcg cagaagctgc ctttaataaa 660
 ggcgaaacag cgatgaccat caacggcccg tgggcatggt ccaacatcga caccagcaaa 720
 gtgaattatg gtgtaacggt actgccgacc ttcaagggtc aaccatccaa accgttcggt 780
 ggcgtgctga ggcaggtat taacgccgcc agtccgaaca aagagctggc aaaagagttc 840
 ctcgaaaact atctgctgac tgatgaaggt ctggaagcgg ttaataaaga caaacgctg 900
 ggtgccgtag cgctgaagtc ttacaggaa gagttggcga aagatccacg tattgccgcc 960
 actatggaaa acgcccagaa aggtgaaatc atgccgaaca tcccgcagat gtccgctttc 1020
 tggatgccg tgcgtactgc ggtgatcaac gccgccagcg gtcgtcagac tgatgatgaa 1080
 gccctgaaag acgcgagac taattcgagc tcgaacaaca acaacaataa caataacaac 1140
 aacctcggga tcgaggaag g 1161

5 <210> 7
 <211> 2256
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> MBP-TAT-MELUSINA
 <400> 7

ES 2 465 569 T3

atgaaaatcg aagaaggtaa actggtaatc tggattaacg gcgataaagg ctataacggt	60
ctcgctgaag tggtaagaa attcgagaaa gataccggaa ttaaagtcac cgttgagcat	120
ccggataaac tggaaagaaa attcccacag gttgcgcaa ctggcgatgg ccctgacatt	180
atcttctggg cacacgaccg ctttggtggc tacgctcaat ctggcctggt ggctgaaatc	240
accccgaca aagcgttcca ggacaagctg tatccgttta cctgggatgc cgtacgttac	300
aacggcaagc tgattgctta cccgatcgct gttgaagcgt tatcgctgat ttataacaaa	360
gatctgctgc cgaacccgcc aaaaacctgg gaagagatcc cggcgctgga taaagaactg	420
aaagcgaaag gtaagagcgc gctgatgttc aacctgcaag aaccgtactt cacctggccg	480
ctgattgctg ctgacggggg ttatgcgttc aagtatgaaa acggcaagta cgacattaaa	540
gacgtgggcg tggataacgc tggcgcgaaa gcgggtctga cttcctggt tgacctgatt	600
aaaaacaaac acatgaatgc agacaccgat tactccatcg cagaagctgc ctttaataaa	660
ggcgaaacag cgatgaccat caacggcccg tgggcatggt ccaacatcga caccagcaaa	720
gtgaattatg gtgtaacggt actgccgacc ttcaagggtc aaccatccaa accgttcggt	780
ggcgtgctga gcgcaggtat taacgccgcc agtccgaaca aagagctggc aaaagagttc	840
ctcgaaaact atctgctgac tgatgaaggt ctggaagcgg ttaataaaga caaacctg	900
ggtgccgtag cgctgaagtc ttacaggaa gagttggcga aagatccacg tattgccgcc	960
actatggaaa acgcccagaa aggtgaaatc atgccgaaca tcccagat gtccgcttc	1020
tggtatgccg tgcgtactgc ggtgatcaac gccgccagcg gtcgtcagac tgctgatgaa	1080
gccctgaaag acgcgagac taattcgagc tcgaacaaca acaacaataa caataacaac	1140

ES 2 465 569 T3

```

aacctcggga tcgaggggaag ggggctcgag tacggccgca agaaacgccg ccagcgccgc      1200
cgcgaattca tgtctctact ctgtcgtaac aaaggtctgtg ggcagcactt tgaccctaata      1260
accaaccttc ctgattcctg ttgccatcac cctgggggtcc caatcttcca tgatgcactt      1320
aagggttggg cctgctgccc aaagcgaact gtagatttct ctgagtcttt aaacatcaag      1380
ggctgtacta tgggaccaca ctgtgctgag aagcttctctg agggccctca acctgaaggc      1440
cctgctacaa gcagttcact tcaggagcaa aaacctctga atgtgattcc aaagtcagca      1500
gagaccttgc gccgggagag gcccaagtca gagttgcctc tgaagctgct gccgctaaat      1560
atatcccaag ccctggaaat ggcattggaa cagaaggaat tagaccagga acctggggca      1620
ggacttgaca gtctgatccg gactggttcc agctgccaga acccaggatg tgatgctggt      1680
taccaaggcc ctgagagtga tgctactcca tgtacctacc acccaggagc accccgattc      1740
catgagggga tgaagtcttg gagctgttgt ggcattccaga ccctggattt tggggcattc      1800
ttggcacaac caggggtgcag agtcggtaga catgactggg ggaagcagct cccagcatct      1860
tgccgccatg attggcacca gacagattcc ttagtagtgg tgactgtata tggccagatt      1920
ccacttctct cgtttaactg ggtgaaggcc agtcaaactg agcttcatgt ccacattgtc      1980
tttgatggta accgtgtggt ccaagcacag atgaagctct ggggggtcat aaacgtggag      2040
cagagctctg tcttcttgat gccatctcgg gttgaaatct ccctggtaa ggctgacca      2100
ggatcctggg cccagctgga gcaccctgat gcactagcta agaaggctag ggcaggggtt      2160
gtgttagaga tggatgagga agaactctgac gattcagatg atgatctgag ctggacagag      2220
gaggaggaag aggaggaagc aatgggggaa tagtga      2256

```

5 <210> 8
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de MBP-TAT-MELUSINA

<400> 8

```

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

```

ES 2 465 569 T3

				85					90				95			
Ala	Val	Arg	Tyr	Asn	Gly	Lys	Leu	Ile	Ala	Tyr	Pro	Ile	Ala	Val	Glu	
			100					105					110			
Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	Pro	Lys	
		115					120					125				
Thr	Trp	Glu	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Lys	Glu	Leu	Lys	Ala	Lys	Gly	
	130					135					140					
Lys	Ser	Ala	Leu	Met	Phe	Asn	Leu	Gln	Glu	Pro	Tyr	Phe	Thr	Trp	Pro	
145					150					155					160	
Leu	Ile	Ala	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ala	Phe	Lys	Tyr	Glu	Asn	Gly	Lys	
				165					170					175		
Tyr	Asp	Ile	Lys	Asp	Val	Gly	Val	Asp	Asn	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Gly	
			180					185					190			
Leu	Thr	Phe	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Lys	Asn	Lys	His	Met	Asn	Ala	Asp	
		195					200					205				
Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ala	Glu	Ala	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Glu	Thr	Ala	
	210					215					220					
Met	Thr	Ile	Asn	Gly	Pro	Trp	Ala	Trp	Ser	Asn	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	
225					230					235					240	
Val	Asn	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Pro	Thr	Phe	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	
				245					250					255		
Lys	Pro	Phe	Val	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Gly	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Pro	
			260					265					270			
Asn	Lys	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	Leu	Thr	Asp	
		275					280					285				
Glu	Gly	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Ala	
	290					295					300					
Leu	Lys	Ser	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Asp	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala	
305					310					315					320	
Thr	Met	Glu	Asn	Ala	Gln	Lys	Gly	Glu	Ile	Met	Pro	Asn	Ile	Pro	Gln	
				325					330					335		
Met	Ser	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ala	Val	Arg	Thr	Ala	Val	Ile	Asn	Ala	Ala	
			340					345					350			
Ser	Gly	Arg	Gln	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	Thr	Asn	
		355					360					365				

ES 2 465 569 T3

Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Leu Gly Ile
 370 375 380

Glu Gly Arg Gly Leu Glu Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
 385 390 395 400

Arg Glu Phe Met Ser Leu Leu Cys Arg Asn Lys Gly Cys Gly Gln His
 405 410 415

Phe Asp Pro Asn Thr Asn Leu Pro Asp Ser Cys Cys His His Pro Gly
 420 425

Val Pro Ile Phe His Asp Ala Leu Lys Gly Trp Ser Cys Cys Arg Lys
 435 440 445

Arg Thr Val Asp Phe Ser Glu Phe Leu Asn Ile Lys Gly Cys Thr Met
 450 455 460

Gly Pro His Cys Ala Glu Lys Leu Pro Glu Ala Pro Gln Pro Glu Gly
 465 470 475 480

Pro Ala Thr Ser Ser Ser Leu Gln Glu Gln Lys Pro Leu Asn Val Ile
 485 490 495

Pro Lys Ser Ala Glu Thr Leu Arg Arg Glu Arg Pro Lys Ser Glu Leu
 500 505 510

Pro Leu Lys Leu Leu Pro Leu Asn Ile Ser Gln Ala Leu Glu Met Ala
 515 520 525

Leu Glu Gln Lys Glu Leu Asp Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu Asp Ser
 530 535 540

Leu Ile Arg Thr Gly Ser Ser Cys Gln Asn Pro Gly Cys Asp Ala Val
 545 550 555 560

Tyr Gln Gly Pro Glu Ser Asp Ala Thr Pro Cys Thr Tyr His Pro Gly
 565 570 575

Ala Pro Arg Phe His Glu Gly Met Lys Ser Trp Ser Cys Cys Gly Ile
 580 585 590

Gln Thr Leu Asp Phe Gly Ala Phe Leu Ala Gln Pro Gly Cys Arg Val
 595 600 605

Gly Arg His Asp Trp Gly Lys Gln Leu Pro Ala Ser Cys Arg His Asp
 610 615 620

Trp His Gln Thr Asp Ser Leu Val Val Val Thr Val Tyr Gly Gln Ile
 625 630 635 640

Pro Leu Pro Ala Phe Asn Trp Val Lys Ala Ser Gln Thr Glu Leu His

ES 2 465 569 T3

			645					650				655			
Val	His	Ile	Val	Phe	Asp	Gly	Asn	Arg	Val	Phe	Gln	Ala	Gln	Met	Lys
			660					665					670		
Leu	Trp	Gly	Val	Ile	Asn	Val	Glu	Gln	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Met	Pro
		675					680					685			
Ser	Arg	Val	Glu	Ile	Ser	Leu	Val	Lys	Ala	Asp	Pro	Gly	Ser	Trp	Ala
	690					695					700				
Gln	Leu	Glu	His	Pro	Asp	Ala	Leu	Ala	Lys	Lys	Ala	Arg	Ala	Gly	Val
705					710					715					720
Val	Leu	Glu	Met	Asp	Glu	Glu	Glu	Ser	Asp	Asp	Ser	Asp	Asp	Asp	Leu
				725					730					735	
Ser	Trp	Thr	Glu	Ala	Met	Gly	Glu								
			740					745					750		

<210> 9
 <211> 2268
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> construcción de MBP-MELUSINA-TAT

10

<400> 9

atgaaaatcg	aagaaggtaa	actggtaatc	tggattaacg	gcgataaagg	ctataacggt	60
ctcgcgtgaag	tcggtaagaa	attcgagaaa	gataccggaa	ttaaagtcac	cgttgagcat	120
ccggataaac	tggaagagaa	attcccacag	gttgcgcaa	ctggcgatgg	ccctgacatt	180
atcttctggg	cacacgaccg	ctttggtggc	tacgctcaat	ctggcctggt	ggctgaaatc	240
accccgaca	aagcgttcca	ggacaagctg	tatccgttta	cctgggatgc	cgtagttac	300
aacggcaagc	tgattgctta	cccgatcgtc	gttgaagcgt	tatcgcgat	ttataacaaa	360
gatctgctgc	cgaaccgcc	aaaaacctgg	gaagagatcc	cggcgcgga	taaagaactg	420
aaagcgaaag	gtaagagcgc	gctgatgttc	aacctgcaag	aaccgtactt	cacctggccg	480
ctgattgctg	ctgacggggg	ttatgcgttc	aagtatgaaa	acggcaagta	cgacattaaa	540
gacgtgggcy	tgataaacgc	tggcgcgaaa	gcgggtctga	ccttcctggt	tgacctgatt	600
aaaaacaac	acatgaatgc	agacaccgat	tactccatcg	cagaagctgc	ctttaataaa	660
ggcgaaacag	cgatgaccat	caacggccc	tgggatggt	ccaacatcga	caccagcaaa	720
gtgaattatg	gtgtaacggt	actgccgacc	ttcaagggtc	aaccatccaa	accgttcggt	780
ggcgtgctga	gcgcaggtat	taacgccgcc	agtcgcaaca	aagagctggc	aaaagagttc	840
ctcgaaaact	atctgctgac	tgatgaaggt	ctggaagcgg	ttaataaaga	caaaccgctg	900
gggtgccgtag	cgctgaagtc	ttacgaggaa	gagttggcga	aagatccacg	tattgccgcc	960
actatggaaa	acgcccagaa	aggtgaaatc	atgccgaaca	tcccgcagat	gtccgctttc	1020

ES 2 465 569 T3

tggatgccg tgcgtactgc ggtgatcaac gccgccagcg gtcgtcagac tgtc gatgaa 1080
 gccctgaaag acgcgagac taattcgagc tcgaacaaca acaacaataa caataacaac 1140
 aacctcggga tcgaggggaag gggggaaaac ctgtacttcc agggggaatt catgtctcta 1200
 ctctgtcgta acaaaggctg tgggcagcac tttgacccta ataccaacct tcctgattcc 1260
 tgttgccatc accctggggg cccaatcttc catgatgcac ttaaggggtg gtcctgctgc 1320
 cgaaagcgaa ctgtagattt ctctgagttc ttaaacaatca agggctgtac tatgggacca 1380
 cactgtgctg agaagcttcc tgaggcccct caacctgaag gccctgctac aagcagttca 1440
 cttcaggagc aaaaacctct gaatgtgatt ccaaagtcag cagagacctt gcgccgggag 1500
 aggcccaagt cagagttgcc tctgaagctg ctgccgctaa atatatccca agccctggaa 1560
 atggcattgg aacagaagga attagaccag gaacctgggg caggacttga cagtctgatc 1620
 cggactgggt ccagctgcca gaaccagga tgtgatgctg tttaccaagg ccctgagagt 1680
 gatgctactc catgtacctt ccaccagga gcacccgat tccatgaggg gatgaagtct 1740
 tggagctggt gtggcatcca gaccctggat tttggggcat tcttggcaca accaggtgct 1800
 agagtcggta gacatgactg ggggaagcag ctcccagcat cttgccgcca tgattggcac 1860
 cagacagatt ccttagtagt ggtgactgta tatggccaga ttccacttcc tgcgtttaac 1920
 tgggtgaagg ccagtcaaac tgagcttcat gtccacattg tctttgatgg taaccgtgtg 1980
 ttccaagcac agatgaagct ctggggggtc ataaacgtgg agcagagctc tgtcttcttg 2040
 atgccatctc gggttgaaat ctccctggtc aaggctgacc caggatcctg ggcccagctg 2100
 gagcacctg atgactagc taagaaggct agggcagggg ttgtgtaga gatggatgag 2160
 gaagaatctg acgattcaga tgatgatctg agctggacag aggaggagga agaggaggaa 2220
 gcaatggggg aatacggccg caagaaacgc cgccagcgcc gccgctag 2268

<210> 10
 <211> 755
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de MBP-MELUSINA-TAT

10

<400> 10

Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys
 1 5 10
 Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr
 20 25 30
 Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe
 35 40 45
 Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala
 50 55 60
 His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile

ES 2 465 569 T3

Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn
 355 360 365

Ser Ser Ser Asn Leu Gly Ile
 370 375 380

Glu Gly Arg Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Glu Phe Met Ser Leu
 385 390 395 400

Leu Cys Arg Asn Lys Gly Cys Gly Gln His Phe Asp Pro Asn Thr Asn
 405 410 415

Leu Pro Asp Ser Cys Cys His His Pro Gly Val Pro Ile Phe His Asp
 420 425 430

Ala Leu Lys Gly Trp Ser Cys Cys Arg Lys Arg Thr Val Asp Phe Ser
 435 440 445

Glu Phe Leu Asn Ile Lys Gly Cys Thr Met Gly Pro His Cys Ala Glu
 450 455 460

Lys Leu Pro Glu Ala Pro Gln Pro Glu Gly Pro Ala Thr Ser Ser Ser
 465 470 475 480

Leu Gln Glu Gln Lys Pro Leu Asn Val Ile Pro Lys Ser Ala Glu Thr
 485 490 495

Leu Arg Arg Glu Arg Pro Lys Ser Glu Leu Pro Leu Lys Leu Leu Pro
 500 505 510

Leu Asn Ile Ser Gln Ala Leu Glu Met Ala Leu Glu Gln Lys Glu Leu
 515 520 525

Asp Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu Asp Ser Leu Ile Arg Thr Gly Ser
 530 535 540

Ser Cys Gln Asn Pro Gly Cys Asp Ala Val Tyr Gln Gly Pro Glu Ser
 545 550 555 560

Asp Ala Thr Pro Cys Thr Tyr His Pro Gly Ala Pro Arg Phe His Glu
 565 570 575

Gly Met Lys Ser Trp Ser Cys Cys Gly Ile Gln Thr Leu Asp Phe Gly
 580 585 590

Ala Phe Leu Ala Gln Pro Gly Cys Arg Val Gly Arg His Asp Trp Gly
 595 600 605

Lys Gln Leu Pro Ala Ser Cys Arg His Asp Trp His Gln Thr Asp Ser
 610 615 620

Leu Val Val Val Thr Val Tyr Gly Gln Ile Pro Leu Pro Ala Phe Asn

ES 2 465 569 T3

<223> péptido R7

<400> 13

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

5

<210> 14

<211> 30

<212> PRT

10

<213> artificial

<220>

<223> péptido KALA

15

<400> 14

Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
1 5 10 15

Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala
20 25 30

20

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Buforina 2

<400> 15

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys
20

30

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial

35

<220>

<223> MAP

<400> 16

40

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala

45

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Transportano

<400> 17

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
 20 25

5 <210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Transportano 10

<400> 18

Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Lys Lys Ile Leu
 20

15 <210> 19
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> pVEC

25 <400> 19

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
 1 5 10 15

Ser Lys

30 <210> 20
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> péptido MPG

<400> 20

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

Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión de melusina recombinante que tiene *in vivo* una estabilidad mejorada y una capacidad para alcanzar compartimentos intracelulares en comparación con la melusina recombinante codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1, en donde dicha proteína de fusión de melusina recombinante comprende
- 10 i) una proteína melusina seleccionada de
- 15 a) una proteína melusina humana que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1,
b) un homólogo de la misma que tiene al menos un 60 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1 y que tiene la función de inducción de hipertrofia cardiaca de la proteína melusina nativa,
c) una parte de melusina humana de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos como se define en SEC ID N°: 1 que tiene la función de inducción de hipertrofia cardiaca de la proteína melusina nativa
- 20 y ii) un polipéptido que penetra en células en donde dicho polipéptido que penetra en células se selecciona entre: polipéptido Tat de VIH, polilisina, péptidos del homeodominio de antennapedia, las secuencias expuestas en SEC ID N°: 11 a 20.
- 25 2. La proteína de fusión de melusina recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido que penetra en células se conjuga con el extremo C terminal de dicha proteína melusina o parte de la misma.
- 30 3. La proteína de fusión de melusina recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína melusina o parte de la misma se conjuga por el extremo N terminal con una secuencia marcadora.
- 35 4. La proteína de fusión de melusina recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha secuencia marcadora se selecciona entre proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S-transferasa (GST), péptido de hexahistidina (HIS), epítipo Flag, epítipo Myc, dominio Ig, proteína estafilocócica A.
- 40 5. La proteína de fusión de melusina recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso como un medicamento.
- 45 6. La proteína de fusión de melusina recombinante de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en el tratamiento de patologías cardiacas, preferentemente insuficiencia cardiaca y cardiomiopatía.
- 50 7. La proteína de fusión de melusina recombinante de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en la prevención de insuficiencia cardiaca y cardiomiopatía por inducción de hipertrofia cardiaca.
8. La proteína de fusión de melusina recombinante de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en la prevención de insuficiencia cardiaca.
9. La proteína de fusión de melusina recombinante de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en la prevención de insuficiencia cardiaca en un sujeto que padece sobrecarga de presión.
10. La proteína de fusión de melusina recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde dicha proteína de fusión de melusina recombinante es adecuada para administración parenteral.
11. Construcción de ADN que codifica la proteína de fusión de melusina recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

Figura 1

A) MBP-TAT-MELUSINA

M K I E E G K L V I W I N G D K G Y N G
 1 atgaaaatcgaagaaggtaaactggtaatctggattaacggcgataaaggctataacgg 60
L A E V G K K F E K D T G I K V T V E H
 61 ctcgctgaagtcggtaagaaattcgagaaagataccggaattaaagtcaccggtgagcat 120
P D K L E E K F P Q V A A T G D G P D I
 121 ccggataaactggaagagaaattcccacaggttgccgcaactggcgatggccctgacatt 180
I F W A H D R F G G Y A Q S G L L A E I
 181 atcttctgggcacacgaccgctttgggtggctacgctcaatctggcctgttggctgaaatc 240
T P D K A F Q D K L Y P F T W D A V R Y
 241 accccggacaaaagcgttccaggacaagctgtatccggtttacctgggatgccgtacgttac 300
N G K L I A Y P I A V E A L S L I Y N K
 301 aacggcaagctgattgcttaccgcatcgctggtgaagcgttatcgctgatttataacaaa 360
D L L P N P P K T W E E I P A L D K E L
 361 gatctgctgccgaaccggcaaaaaacctgggaagagatcccgcgctggataaagaactg 420
K A K G K S A L M F N L Q E P Y F T W P
 421 aaagcgaaggtgaagagcgcgctgattgttcaacctgcaagaaccgtacttcacctggccg 480
L I A A D G G Y A F K Y E N G K Y D I K
 481 ctgattgctgctgacgggggttatgcttcaagtatgaaaacggcaagtacgacattaaa 540
D V G V D N A G A K A G L T F L V D L I
 541 gacgtggcgctggataacgctggcgcgaaagcgggtctgaccttctggtgacctgatt 600
K N K H M N A D T D Y S I A E A A F N K
 601 aaaaacaaacacatgaatgcagacccgattactccatcgcaagctgaccttataataaa 660
G E T A M T I N G P W A W S N I D T S K
 661 ggcgaaacagcgtgaccatcaacggcccgtgggcatgggtccaacatcgacaccagcaaa 720
V N Y G V T V L P T F K G Q P S K P F V
 721 gtgaattatggtgtaacggctactgccgaccttcaagggtaaccatccaacccgttcgtt 780
G V L S A G I N A A S P N K E L A K E F
 781 ggcgtgctgagcgcaggtattaacggccagctccgaacaaagagctggcaaaagagttc 840
L E N Y L L T D E G L E A V N K D K P L
 841 ctcgaaaactatctgctgactgatgaaggtctggaagcggttaataaagacaaccgctg 900
G A V A L K S Y E E E L A K D P R I A A
 901 ggtgccgtagcgcgtgaagtcttacgaggaagagttggcgaaagatccacgtattgccgcc 960
T M E N A Q K G E I M P N I P Q M S A F
 961 actatggaaaacgcccagaaaaggtgaaatcatgccgaacatcccgcagatgtccgctttc 1020
W Y A V R T A V I N A A S G R Q T V D E
 1021 tggatgccgtgctactgcggtgatcaacggccagcgggtcgtcagactgctgatgaa 1080
A L K D A Q T N S S S N N N N N N N N
 1081 gccctgaaagacgcgcagactaattcgagctcgaacaacaacaataacaataacaac 1140
N L G I E G R G L E Y G R K K R R Q R R
 1141 aacctcgggatcgagggaaggggctcgagtacggccgcaagaaacggccagcggcgc 1200
R E F M S L L C R N K G C G Q H F D P N
 1201 cgcgaattcatgtctctactctgtcgtcaacaagggtgtgggcagcactttgacctaat 1260
T N L P D S C C H H P G V P I F H D A L
 1261 accaaccttctgattcctggtgccatcaccctgggggtccaatcttccatgatgcactt 1320
K G W S C C R K R T V D F S E F L N I K
 1321 aagggttggtcctgctgccgaaagcgaactgtagatttctctgagttcttaaacatcaag 1380
G C T M G P H C A E K L P E A P Q P E G
 1381 ggctgtactatgggaccacactgtgctgagaagcttctgaggcccctcaacctgaagc 1440
P A T S S S L Q E Q K P L N V I P A K S A
 1441 cctgctacaagcagttcacttcaggagcaaaaacctctgaatgtgattccaaagtcagca 1500
E T L R R E R P K S E L P L K L L P L N
 1501 gagaccttgccgggagagggcccaagtcagagttgctctgaagctgctgccgctaata 1560
I S Q A L E M A L E Q K E L D Q E P G A
 1561 atatcccaagcctggaaatggcattggaacagaaggaattagaccaggaacctggggca 1620
G L D S L I R T G S S C Q N P G C D A V

Figura 1/cont.

1621 ggacttgacagttctgatccggactggttccagctgccagaaccaggatgtgatgctgtt 1680
Y Q G P E S D A T P C T Y H P G A P R F
1681 taccaaggccctgagagtgatgctactccatgtacctaccaccaggagcaccggattc 1740
H E G M K S W S C C G I O T L D F G A F
1741 catgaggggatgaagtcttggagctgttggcatccagaccctggattttggggcattc 1800
L A Q P G C R V G R H D W G K Q L P A S
1801 ttggcacaaccaggggtgcagagtcggttagacatgactgggggaagcagctcccagcatct 1860
C R H D W H Q T D S L V V V T V Y G Q I
1861 tgccgccatgattggcaccagacagattccttagtagtggtgactgtatatggccagatt 1920
P L P A F N W V K A S Q T E L H V H I V
1921 ccacttctcgctttaactgggtgaaggccagctcaaactgagcttcatgtccacattgtc 1980
F D G N R V F Q A Q M K L W G V I N V E
1981 tttgatggtaaccgtgtgttccaagcacagatgaagctctgggggggcataaacgtggag 2040
Q S S V F L M P S R V E I S L V K A D P
2041 cagagctctgtcttcttgatgccatctcgggttgaaatctccctggcgaaggctaccca 2100
G S W A Q L E H P D A L A K K A R A G V
2101 ggatcctgggcccagctggagcaccctgatgcactagctaagaaggctagggcaggggtt 2160
V L E M D E E E S D D S D D D L S W T E
2161 gtgttagagatggatgaggaagaatctgacgattcagatgatgatctgagctggacagag 2220
E E E E E E A M G E * *
2221 gaggaggaagaggaggaagcaatgggggaatagtga

B) MBP-MELUSINA-TAT

M K I E E G K L V I W I N G D K G Y N G
1 atgaaaatcgaagaaggtaaaactggtaactctggattaacggcgataaaggctataacggt 60
L A E V G K K F E K D T G I K V T V E H
61 ctcgctgaagtcggtaagaattcgagaaagataaccggaattaaagtcaccgcttgagcat 120
P D K L E E K F P Q V A A T G D G P D I
121 ccggataaaactggaagagaaattcccacaggttgccggcaactggcgatggccctgacatt 180
I F W A H D R F G G Y A Q S G L L A E I
181 atcttctgggcacacgaccgcttgggtggctacgctcaatctggcctgttggctgaaatc 240
T P D K A A F Q D K L Y P F T W D A V R Y
241 accctggacaaagcgttccaggacaagctgtatccggttacctgggatgccgtacgttac 300
N G K L I A Y P I A V E A L S L I Y N K
301 aacggcaagctgattgcttaccgcatcgctgttgaagcgttatcgctgatttataacaaa 360
D L L P N P P K T W E E I P A L D K E L
361 gatctgctgccgaaccggccaaaaaactgggaagagatccggcgctggataaagaactg 420
K A K G K S A L M F N L Q E P Y F T W P
421 aaagcgaaaggtaagagcgcgctgatgttcaacctgcaagaaccgtacttcacctggccg 480
L I A A D G G Y A F K Y E N G K Y D I K
481 ctgattgctgctgacgggggttatgcttcaagtatgaaaacggcaagtagcattaaa 540
D V G V D N A G A K A G L T F L V D L I
541 gacgtggcgctggataacgctggcgcgaaaagcgggtctgaccttctggttgacctgatt 600
K N K H M N A D T D Y S I A E A A F N K
601 aaaaacaaacacatgaatgcagacaccgattactccatcgcagaagctgcctttaataaa 660
G E T A M T I N G P W A W S N I D T S K
661 ggcgaaacagcgatgaccatcaacggcccggtgggcatggtccaacatcgacaccagcaa 720
V N G V T V L P T F K G Q P S K P F V
721 gtgaattatggtgtaacggtactgcccaccttcaagggtcaaccatccaaaccggttctgt 780
G V L S A G I N A A S P N K E L A K E F
781 ggcgtgctgagcgcaggtattaacggcccgactccgaacaaagagctggcaaaagagttc 840
L E N Y L L T D E G L E A V N K D K P L
841 ctcgaaaactatctgctgactgatgaaggtctggaagcgggttaataaagacaaaccgctg 900

Figura 1/cont.

G A V A L K S Y E E E L A K D P R I A A
 901 ggtgccgtagcgctgaagtcttacgaggaagagttggcgaaagatccacgtattgccgcc 960
T M E N A Q K G E I M P N I P Q M S A F
 961 actatggaaaacgcccagaaaaggtgaaatcatgccgaacatcccgcagatgtccgctttc 1020
W Y A V R T A V I N A A S G R Q T V D E
 1021 tggatgccgtgctgactgcggtgatcaacgccgccagcggtcgctcagactgtcgatgaa 1080
A L K D A Q T N S S S N N N N N N N N
 1081 gccctgaaagacgcgagactaattcgagctcgaacaacaacaacaataacaataacaac 1140
N L G I E G R G E N L Y F O G E F M S L
 1141 aacctcgggatcgagggaaggggggaaaacctgtacttccagggggaattcatgtctcta 1200
L C R N K G C G Q H F D P N T N L P D S
 1201 ctctgtcgtaacaaaaggctgtgggcagcactttgaccctaataccaaccttctctgattcc 1260
C C H H P G V P I F H D A L K G W S C C
 1261 tgttgccatcacctggggtcccaatcttccatgatgcacttaaggggttggtcctgctgc 1320
R K R T V D F S E F L N I K G C T M G P
 1321 cgaagcgaactgtagatcttctgagttcttaaacatcaagggctgtactatgggacca 1380
H C A E K L P E A P Q P E G P A T S S S
 1381 cactgtgctgagaagcttctgaggccctcaacctgaaggccctgctacaagcagttca 1440
L Q E Q K P L N V I P K S A E T L R R E
 1441 cttcaggagcaaaaacctctgaatgtgattccaaagtcagcagagaccttgccggggag 1500
R P K S E L P L K L L P L N I S Q A L E
 1501 aggccaaagtccagagttgcctctgaagctgctgccgctaaatatatcccagccctggaa 1560
M A L E Q K E L D Q E P G A G L D S L I
 1561 atggcattggaacagaaggaattagaccaggaacctggggcaggacttgacagctgatc 1620
R T G S S C Q N P G C D A V Y Q G P E S
 1621 cggactggttccagctgccagaaccaggatgtgatgctgtttaccaagggccctgagagt 1680
D A T P C T Y H P G A P R F H E G M K S
 1681 gatgctactccatgtacctaccacccaggagcaccocgattccatgaggggatgaagtct 1740
W S C C G I Q T L D F G A F L A Q P G C
 1741 tggagctgttggcatccagaccctggatcttggggcattcttggcacaaccagggtgc 1800
R V G R H D W G K Q L P A S C R H D W H
 1801 agagtccgtagacatgactgggggaagcagctcccagcatcttgccgcatgattggcac 1860
Q T D S L V V V T V Y G Q I P L P A F N
 1861 cagacagattccttagtagtggtgactgtatatggccagattccacttctgctttaa 1920
W V K A S Q T E L H V H I V F D G N R V
 1921 tgggtgaagccaggtcaaaactgagcttcatgtccacattgtctttgatggtaaccgtgtg 1980
F Q A Q M K L W G V I N V E Q S S V F L
 1981 ttccaagcacagatgaagctctggggggtcataaacgtggagcagagctctgtcttcttg 2040
M P S R V E I S L V K A D P G S W A Q L
 2041 atgccatctcgggttgaatctccctggtcaaggctgaccagggatcctgggcccagctg 2100
E H P D A L A K K A R A G V V L E M D E
 2101 gagcaccctgatgcactagctaagaaggttagggcaggggttggttagagatggatgag 2160
E E S D D S D D D L S W T E E E E E E
 2161 gaagaactgacgattcagatgatgatctgagctggacagaggaggagggaagaggaggaa 2220
A M G E Y G R K K R R Q R R R *
 2221 gcaatgggggaatacggcccgaagaaacgcccagcggccgctag

Figura 1/cont.

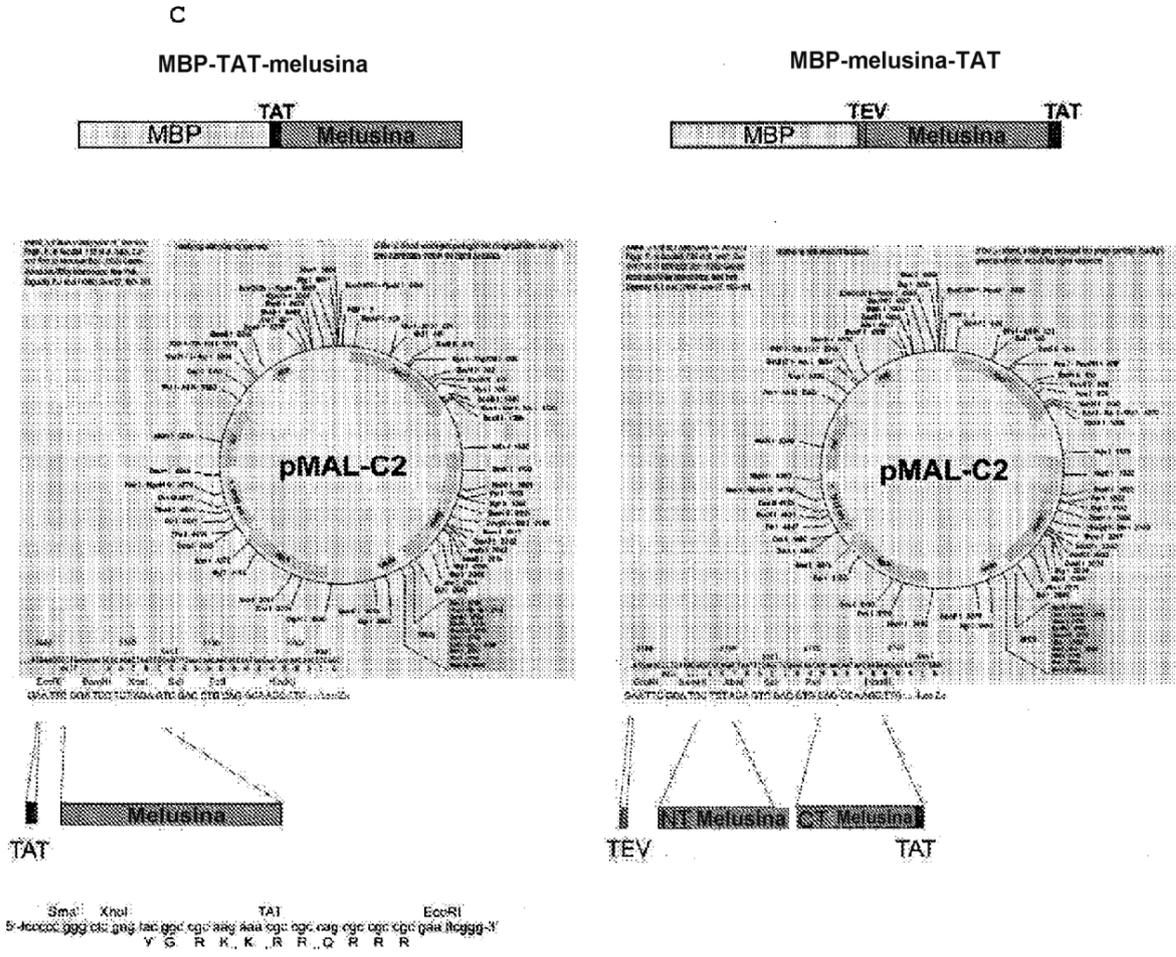
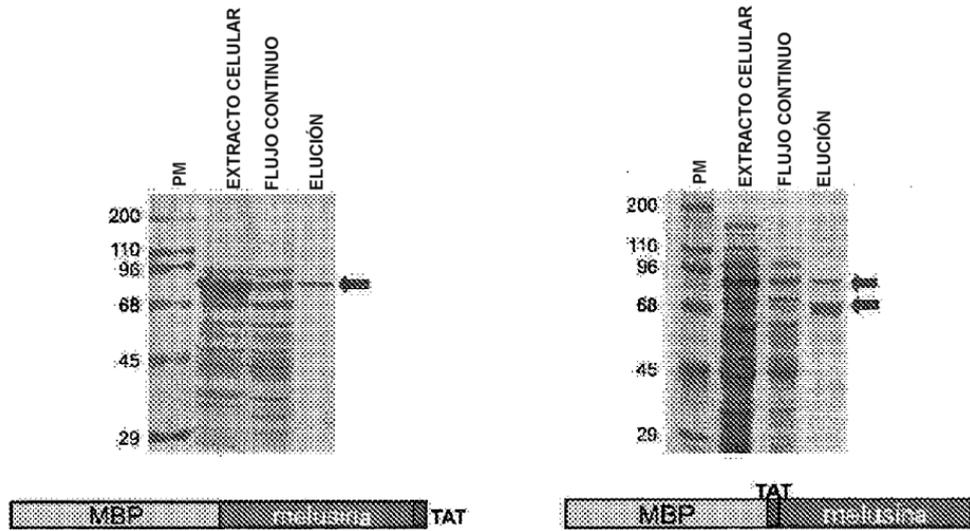


Figura 1/cont.

D



E

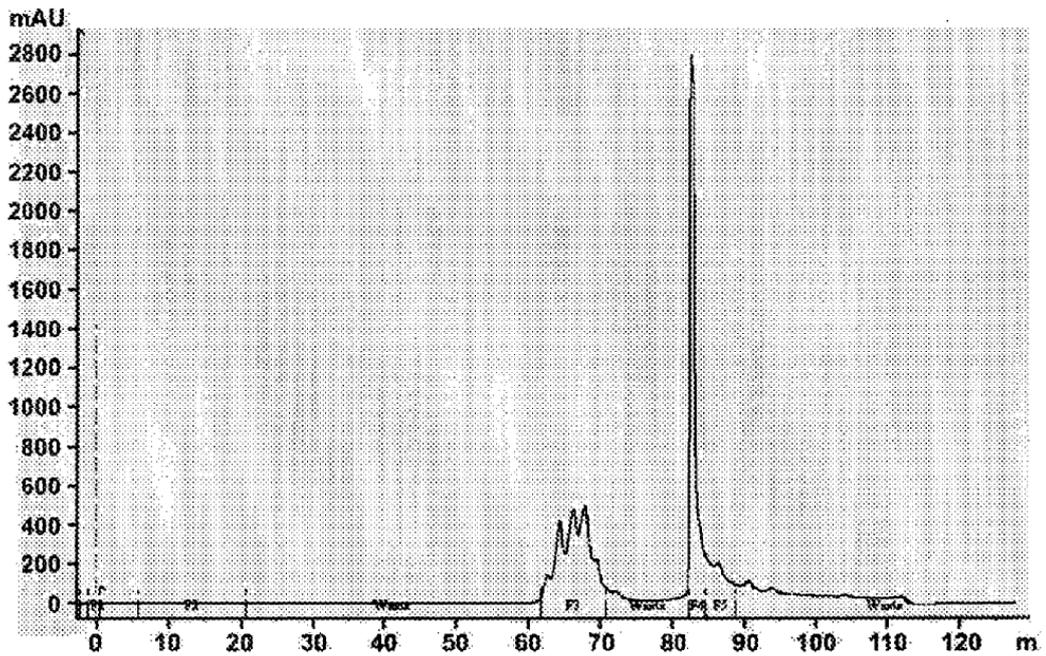
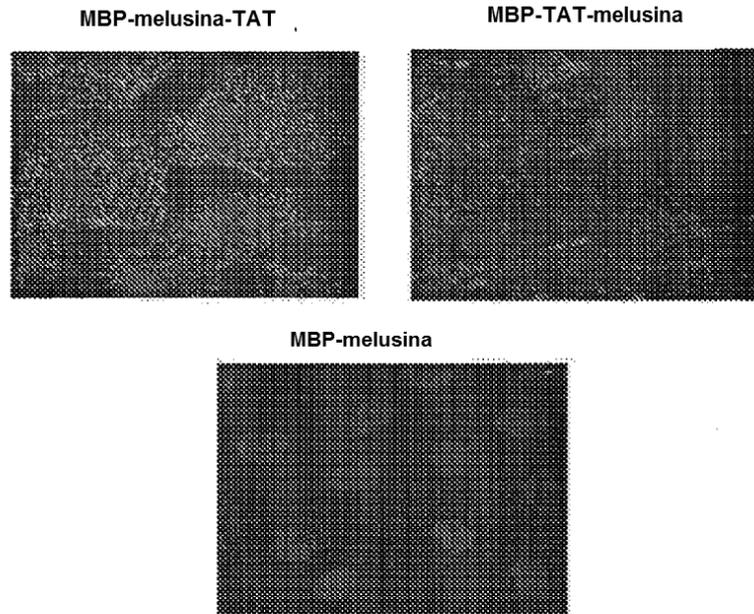


Figura 2

A



B

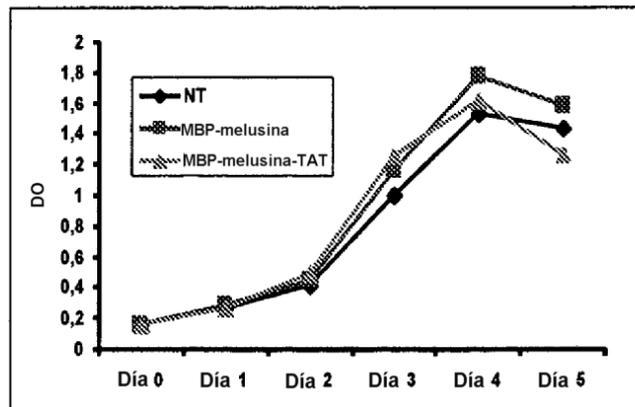
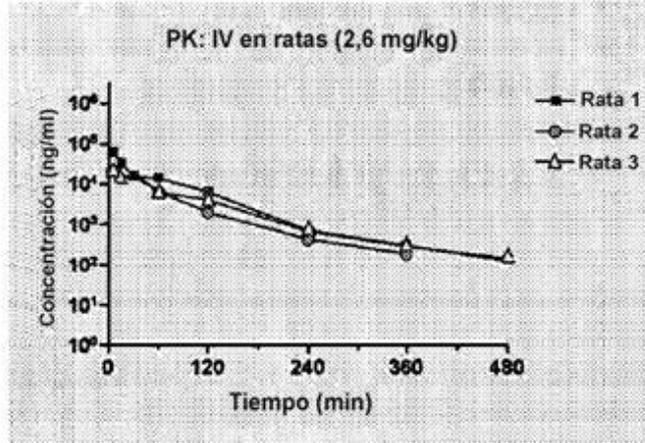


Figura 3

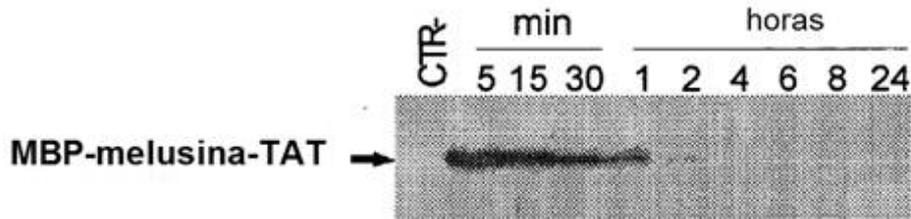
A

Datos cinéticos de la curva I.V. de rata 1:

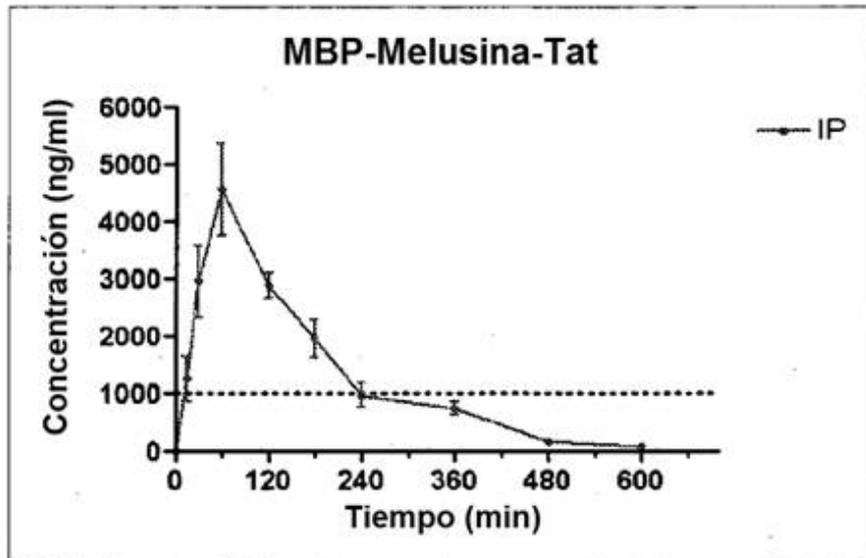
CL	1
MRT	67,68
Vss	67
K terminal	7,12E-03
T1/2 terminal	97,36
CP estimado en el tiempo más largo	129,79
Tmáx	0,00E+00
Cmáx	88900,94
AUC hasta Tfinal	2,62E+06
Tfinal	480,00
AUC extrapolado hasta tiempo infinito	2,64E+06
Porcentaje extrapolado de AUC	,69
AUMC	1,79E+08
Porcentaje extrapolado de AUMC	6,33



B



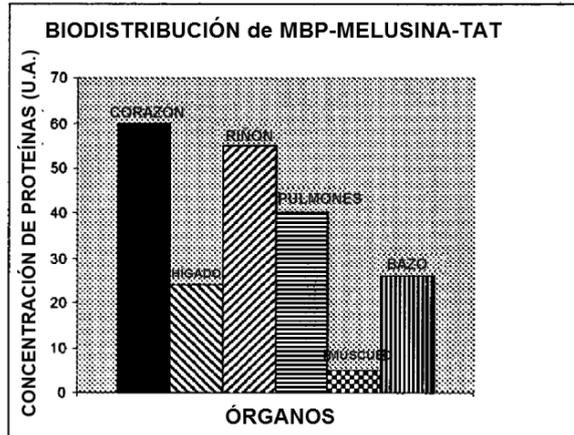
C



T1/2 terminal extrapolado = 120 min

Figura 3/cont.

D



E

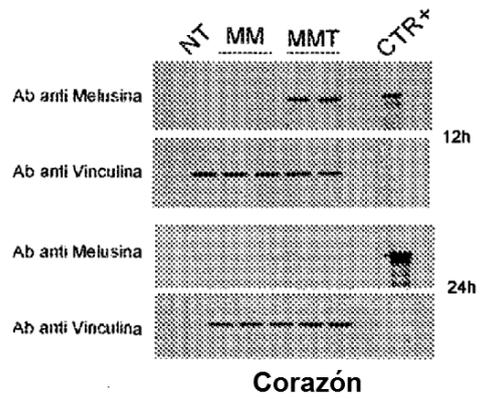


Figura 4

ensayo de T para muestras relacionadas

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

N=3

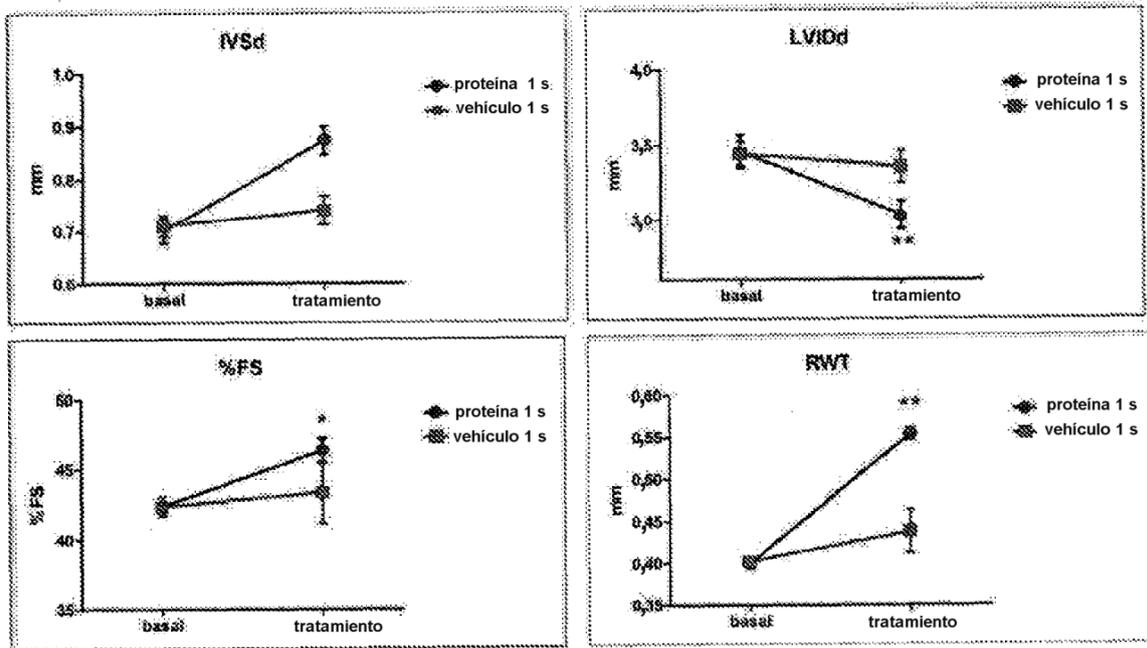
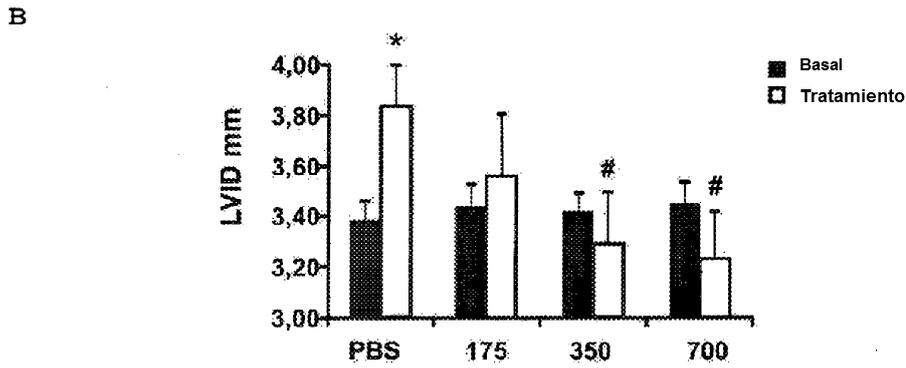
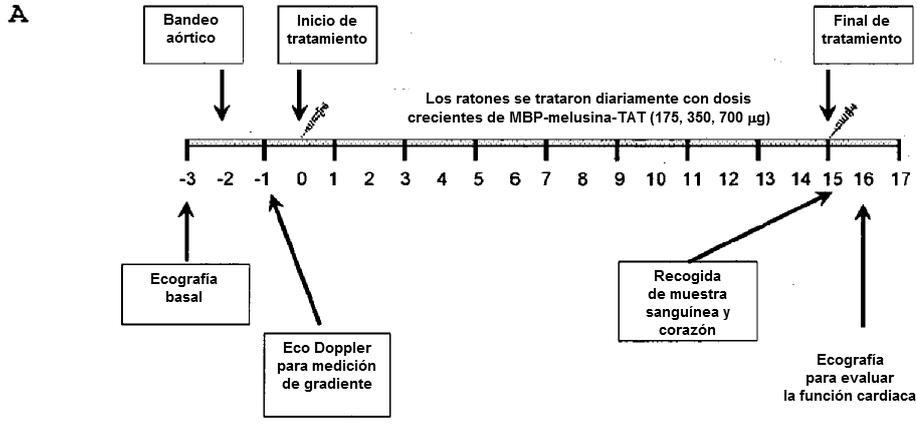


Figura 5



C
LA MELUSINA RECOMBINANTE PROTEGE DE LA DILATACIÓN Y PÉRDIDA DE CAPACIDAD DE CONTRACCIÓN

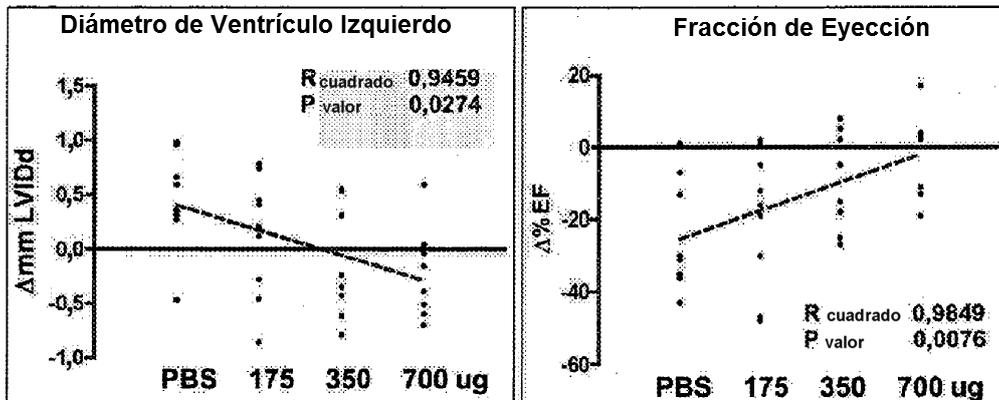
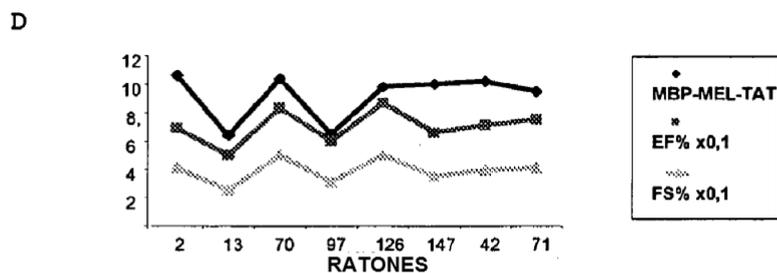


Figura 5/cont.



Basal: no sometido a TAC

Tratamiento: sometido a 15 días de TAC y tratado con vehículo(PBS)y con dosis crecientes de MBP-melusina-TAT (175, 350 y 700 µg/día/ratón).

Figura 6

Polipéptidos que penetran en células	Secuencia	SEC ID N°.
Péptido TAT de VIH	YGRKKRRQRRR	11
Penetratina (pAntp)	RQIKIWFQNRRMKWKK	12
Péptido R7	RRRRRRR	13
Péptido KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA	14
Buforina 2	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	15
MAP	KLALKLALKALKAAKLA-amida	16
Transportano	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-amida	17
Transportano 10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-amida	18
pVEC	LLIILRRRIRKQAHAAHSK-amida	19
Péptido MPG	GALFLGWLGAAGSTMGAPKKKRV-amida	20