

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 611**

51 Int. Cl.:

C07K 14/51 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2010 PCT/US2010/028540**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10111421**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2010 E 10756811 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2411406**

54 Título: **Isoforma del péptido Nell-1**

30 Prioridad:

25.03.2009 US 163297 P

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

11.07.2017

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**TING, KANG y
SOO, CHIA**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 623 611 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

ISOFORMA DEL PÉPTIDO NELL-1

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Hay muchas situaciones en las que los tratamientos requieren la formación y regeneración ósea, p.ej., injerto óseo alveolar, elongación ósea craneofacial, fusión espinal, defectos segmentarios de hueso largo.

- 10 Defectos en el proceso de formación y regeneración ósea están relacionados con el desarrollo de varias enfermedades y trastornos humanos, p.ej. osteoporosis y osteogénesis imperfecta. Fallos en los mecanismos de reparación ósea o del cartílago están también asociados con complicaciones significativas en la práctica clínica ortopédica, por ejemplo, la no consolidación fibrosa después de una fractura ósea, fallos en la interfaz de implantes y grandes fallos en aloinjertos. La vida de muchas personas mejoraría mediante el desarrollo de nuevas terapias
15 diseñadas para estimular y fortalecer el proceso de reparación de fracturas.

- Cualquier técnica nueva para estimular la reparación ósea o la reparación del cartílago sería una herramienta valiosa para el tratamiento de fracturas óseas. Una parte significativa de los huesos fracturados aún son tratados mediante enyesado, que permite que sean los mecanismos naturales los que efectúen la reparación de la. Aunque se han
20 producido avances en los últimos años en el tratamiento de fracturas, incluyendo dispositivos mejorados, el desarrollo de nuevos procesos para estimular o complementar los mecanismos de reparación de lesiones representaría un progreso significativo en esta área.

- Las técnicas de reconstrucción ósea tales como las utilizadas para reconstruir los defectos producidos como
25 resultado de un traumatismo, cirugía de cáncer o errores en el desarrollo, se mejorarían con nuevos métodos para promover la reparación ósea. Los métodos de reconstrucción actualmente empleados, tales como el uso de injertos óseos autólogos o injertos óseos adheridos a tejidos blandos y vasos sanguíneos, tienen asociados inconvenientes significativos tanto a nivel de coste como de dificultad. Por ejemplo, la recolección de una cantidad útil de hueso autólogo no se logra fácilmente, e incluso los injertos autólogos se suelen infectan o son reabsorbidos.

- 30 Un material de injerto óseo fiable y de fácil disponibilidad es esencial para muchas cirugías ortopédicas. El referente actual para el material de injerto óseo es el hueso autólogo. Sin embargo, la morbilidad asociada a la zona del donante, incluyendo dolor, trastorno de la marcha, parestesia del muslo en los donantes de la cresta ilíaca, infección, déficits neurológicos y hematomas para injertos craneales hacen que la recolección del autoinjerto esté lejos de ser
35 ideal. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar mejores alternativas en los autoinjertos.

- Los esfuerzos para influir en la reparación ósea utilizando proteínas y péptidos estimulantes óseos, p.ej., proteínas morfogénicas óseas (BMP), han tenido un éxito limitado. Mientras que BMP2 está aprobado por la FDA y ha tenido éxito clínico como una osteoinductor biológico, se han reportado efectos secundarios significativos, incluyendo
40 hinchazón cervical que puede llegar a ser mortal. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar enfoques terapéuticos mejores y más seguros.

- El cartílago es un tipo de tejido conectivo denso. Está compuesto de condrocitos que están dispersos en una matriz de gel firme. El cartílago es avascular (no contiene vasos sanguíneos) y los nutrientes se difunden a través de la
45 matriz. Hay cartílago en las articulaciones, la caja torácica, el oído, la nariz, la garganta y entre los discos intervertebrales.

- El cartílago se puede dañar por desgaste, lesiones o enfermedades. Con el envejecimiento, el contenido de agua y proteínas del cartílago del cuerpo cambia. Este cambio produce un cartílago débil, más frágil y delgado. La
50 osteoartritis es una condición común de fallo del cartílago que puede conducir a limitar el rango de movimientos, daño óseo y dolor permanente. Debido a una combinación de estrés agudo y fatiga crónica, la osteoartritis se manifiesta directamente en el desgaste de la superficie articular y, en casos extremos, el hueso puede estar expuesto en la articulación. En otro ejemplo, la pérdida del menisco protector y estabilizador conduce a una mayor laxitud articular o a movimientos anormales que conducen a la inestabilidad de las articulaciones. El movimiento
55 excesivo y el área de contacto reducida promueven cambios artríticos de manera temprana.

- Aunque se han descrito numerosos métodos para el tratamiento de problemas de cartílago, es evidente que muchos soluciones son artificiales o mecánicas que no buscan recrear la biología normal de tejido cartilaginoso. Por lo tanto, existe una necesidad de encontrar métodos para estimular la formación y reparación del cartílago.

- 60 Se han hecho esfuerzos continuados para encontrar agentes osteoinductivos mejores o alternativos y enfoques terapéuticos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con los huesos y el cartílago.

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención proporciona una isoforma del péptido Nell-1 (ISN-1) que es una proteína Nell-1 corta (sNell-1 de secuencia SEQ ID NO: 1, y métodos para fabricar la isoforma del péptido Nell-1.

5 En varias realizaciones, esta invención proporciona una composición o un injerto óseo para mejorar la formación ósea en un sujeto en el que ha sido implantado. En algunas realizaciones, la composición contiene una matriz biocompatible y un péptido ISN-1, un agente relacionado, o una combinación de los mismos. La composición puede además comprender una proteína LNell-1, un agente relacionado, o una combinación de los mismos.

10 En algunas realizaciones, la composición puede ser una composición farmacéutica que comprende un transportador o excipiente adecuado. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede formularse como una formulación adecuada para una vía de administración adecuada.

15 En algunas realizaciones, la composición puede ser un injerto óseo que contiene una matriz biocompatible y una proteína ISN-1, un agente relacionado, una célula que expresa una proteína ISN-1, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el material de injerto es reabsorbible o biodegradable. En algunas realizaciones, el material de injerto puede ser sintético o de origen natural (por ejemplo, un aloinjerto). La matriz puede incluir un polímero biodegradable. La matriz puede impregnarse con una proteína ISN-1 o un agente relacionado, una célula
20 que expresa una proteína ISN-1 o un agente relacionado, o una combinación de los mismos. El material de injerto óseo puede incluir además la proteína LNell-1 o un agente relacionado, una célula que expresa la proteína LNell-1 o un agente relacionado, o una combinación de los mismos.

En varios aspectos, esta descripción proporciona un método para aumentar la formación o regeneración ósea. El
25 método puede utilizarse para la reparación de fracturas óseas. El método comprende aumentar la concentración de un producto del gen ISN-1 en o cerca del sitio de fractura. En algunas realizaciones, el método comprende introducir una célula osteogénica o célula precursora ósea que sobreexpresa ISN-1 en el sitio de fractura. En algunos aspectos, el método comprende aumentar la expresión del producto del gen ISN-1 en una célula osteogénica o célula precursora ósea en o cerca del sitio de fractura.

30 En algunos aspectos, el sitio de fractura se pone en contacto con una proteína ISN-1 o una composición farmacéutica de la misma. El sitio de fractura puede ponerse en contacto con la proteína LNell-1 además de la proteína ISN-1.

35 En diversos aspectos, esta descripción proporciona un método para tratar la osteoporosis usando una ISN- 1, un agente relacionado, o una composición de los mismos.

En diversos aspectos, esta descripción proporciona un método para inducir la formación o reparación de cartílago usando un ISN-1, un agente relacionado, o una composición del mismo. La composición puede incluir un ISN-1 o un
40 agente relacionado, y opcionalmente al menos otro agente activo, células y material biocompatible implantado con el propósito de reparación de cartílago (es decir, cartílago hialino, cartílago elástico o fibrocartílago).

En varias realizaciones, el uso de ISN-1 puede combinarse con el uso de LNell-1.

45 En diversas realizaciones, esta invención proporciona un método para expresar un péptido ISN-1 funcional en una célula, comprendiendo dicho método proporcionar una construcción de ácido nucleico que incluye al menos un ácido nucleico que codifica al menos un péptido ISN-1 en el marco de lectura de un ácido nucleico que codifica un péptido de señal de secreción; transfectar una célula con dicha construcción de ácido nucleico; cultivar dicha célula bajo condiciones que permitan la expresión del péptido ISN-1; opcionalmente recoger el péptido ISN-1 secretado por la
50 línea celular; opcionalmente purificar sustancialmente el péptido ISN-1; y opcionalmente probar la actividad del péptido ISN-1 para inducir la formación ósea.

También se proporcionan líneas celulares y construcciones de ácidos nucleicos relacionados para expresar ISN-1.

55 En las realizaciones mencionadas arriba, la proteína ISN-1 es sNell-1 con secuencia SEQ ID NO: 1.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra una comparación esquemática entre la proteína TSP-1 con las proteínas LNell-1 y sNell-1.

60 La Figura 2 muestra la expresión de LNell-1 y sNell-1 después de la transfección de Osx y Runx2 en NMCCs. Las células primarias de ratón fueron transfectadas con plásmidos control (Con), Osx y Runx2. 48 horas después de la transfección, se extrajeron muestras de ARN para RT-PCR y se recolectó medio para el ensayo de

inmunoprecipitación (IP) usando Nell-1 Ab C-terminal unido covalentemente con perlas de proteína G. (A) Los resultados de la RT-PCR después de usar los cebadores LNell-1 o SNell-1. (B) Resultados la IP usando el anticuerpo Nell-1 C-terminal que reconoce tanto LNell-1 como SNell-1.

5 La Figura 3 muestra los efectos de LNell-1 y SNell-1 en la expresión de Runx2, Osx, Oc y en la mineralización.

La Figura 4 muestra los patrones de expresión de las proteínas LNell-1 y SNell-1 en cabezas de ratones.

La Figura 5 muestra la cicatrización de defectos en la calvaria con SNell-1.

10

La Figura 6A muestra la secuencia de la proteína SNell-1 [Homo sapiens] (SEQ ID NO: 1).

La Figura 6B muestra la secuencia del ADN de SNell-1 (CDS) [homo sapiens] (SEQ ID NO: 2).

15 La Figura 7A muestra la secuencia de la proteína LNell-1 [Homo sapiens] (SEQ ID NO: 3).

La Figura 7B muestra la secuencia del ADN de LNell-1 (CDS) [homo sapiens] (SEQ ID NO: 4).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20

La presente invención proporciona una isoforma del péptido Nell-1 (referido aquí generalmente como ISN-1) que es SNell-1 y es de secuencia SEQ ID NO: 1.

El péptido Nell-1 de 810 aminoácidos previamente descubierto aquí se denomina LNell-1.

25

Definición

Tal como se utiliza aquí, el término "ISN-1" se refiere a un péptido Nell-1 donde el dominio similar a TSP1-N [N-terminal de trombospondina-1 (TSP-1) presente en el péptido Nell-1 se elimina de manera que resulta un péptido que retiene la función de Nell-1 y que tiene un peso molecular de aproximadamente 63 kD. Las ventajas físicas de un péptido que tiene un peso molecular más bajo incluyen, por ejemplo, una mayor eficacia de suministro en una célula, facilidad en el desarrollo de procesos previos - mayor eficiencia de síntesis o secreción al medio, facilidad de desarrollo de procesos posteriores- separación, purificación, plegado más eficientes, etc. Las ventajas biológicas incluyen un aumento de la diferenciación osteogénica evidenciada por el aumento de la expresión de los marcadores de diferenciación osteoblástica Runx2, Osx y Oc (Figura 3) y la formación ósea.

30

El término "células osteogénicas" se refiere a las células capaces de mineralizar. Las células osteogénicas incluyen osteoblastos, células similares a osteoblastos, células mesenquimales, células fibroblásticas, células embrionarias fetales, células madre, células de la médula ósea, condrocitos y células condroblásticas.

Como aquí se usa, el término "células precursoras óseas" se refiere a las células que pueden diferenciarse en osteoblastos al exponerse a un factor de crecimiento óseo y pueden depositar calcio en la matriz extracelular.

Tal como se usa aquí, el término "células progenitoras óseas" se refiere a cualquiera o a todas las células que tienen la capacidad de formaren última instancia, o contribuir a la formación de nuevo tejido óseo. Esto incluye varias células en diferentes etapas de diferenciación, tales como, por ejemplo, células madre, células de la médula ósea, fibroblastos, células vasculares, osteoblastos, condroblastos, osteoclastos y similares. Las células progenitoras óseas también incluyen células que han sido aisladas y manipuladas in vitro, p.ej., sometidas a la estimulación con agentes tales como citoquinas o factores de crecimiento o incluso células modificadas genéticamente. El tipo o los tipos particulares de células progenitoras óseas que se estimulan usando los métodos y composiciones de la invención no son importantes, siempre y cuando las células sean estimuladas de tal manera que se activen y, en el contexto de realizaciones in vivo, en última instancia dar lugar a nuevo tejido óseo.

El término "osteoprogenitor" se refiere a cualquier célula capaz de formar cartílago, p.ej., células osteogénicas menos diferenciadas que son capaces de mineralizar y/o formar cartílago. Las células osteoprogenitoras incluyen osteoblastos, células similares a osteoblastos, células mesenquimales, células fibroblásticas, células embrionarias fetales, células madre, células de la médula ósea, células de la duramadre, condrocitos y células condroblásticas.

El término "osteoporosis" se refiere a un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por una masa ósea reducida y fracturas. Clínicamente, la osteoporosis se divide en tipo I y tipo II. La osteoporosis tipo I ocurre predominantemente en mujeres de mediana edad y se asocia con la pérdida de estrógeno en la menopausia, mientras que la osteoporosis de tipo II se asocia con el avanzada edad.

El término "cartílago" se refiere a todas las formas de cartílago incluyendo, pero no limitándose a, hialino, elástico y fibrocartílago.

El término "ácido nucleico" u "oligonucleótido" mencionado aquí se refiere al menos a dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. Un ácido nucleico de la presente invención es preferiblemente monocatenario o bicatenario y generalmente contiene enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se describe a continuación, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden tener cadenas principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, fosforamida, fosforotioato, fosforoditioato, enlaces O-metilfosforoamidato, y cadenas principales y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos que tienen una cadena principal positiva, una cadena principal no iónica y una cadena principal vertebral sin ribosa. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos están también incluidos dentro de la definición de ácidos nucleicos. Pueden realizarse modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato para facilitar la adición de restos adicionales tales como etiquetas, o para aumentar la estabilidad y la vida media de tales moléculas en entornos fisiológicos.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan aquí indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales.

El término "moléculas de adhesión celular" se refiere colectivamente a lamininas, fibronectina, vitronectina, moléculas de adhesión celular vascular (V-CAM) y moléculas de adhesión intercelular (I-CAM) y colágeno. Los términos "transportador", o "transportador farmacéuticamente aceptable", o "vehículo de suministro", o "vehículo" pueden usarse indistintamente.

Los términos "aumentando", "mejorando" y "facilitando" pueden usarse indistintamente.

Como aquí se utiliza, el término "péptido Nell-1" puede incluir un agente relacionado con Nell-1. Por ejemplo, un agente relacionado con el péptido Nell-1 puede incluir cualquier polipéptido con homología significativa con un péptido Nell-1 o un fragmento del mismo. Una homología significativa puede ser una homología superior a aproximadamente un 50% de homología con un péptido Nell-1, p.ej., superior a aproximadamente 60% de homología con un péptido Nell-1, superior a aproximadamente 70% de homología con un péptido Nell-1 o superior a aproximadamente 80% de homología con un péptido Nell-1. El péptido Nell-1 puede referirse aquí simplemente como péptido Nell.

Los péptidos Nell-1 pueden ser péptidos Nell-1 naturales y/o recombinantes con una secuencia de tipo salvaje no mutada o péptidos Nell-1 recombinantes con una secuencia de tipo salvaje mutada que todavía contiene homología significativa con los péptidos Nell-1. Además, los péptidos Nell-1 pueden ser derivados, pero no limitados a, un organismo tal como células humanas, bacterias, levaduras o células de insectos o plantas. En algunas realizaciones, el término "péptido Nell-1" incluye equivalentes estructurales, funcionales o conformacionales del péptido Nell-1. Tal como aquí se utiliza, un equivalente estructural de un péptido Nell-1 se refiere a una proteína o péptido que incluye una estructura equivalente o sustancialmente similar a la de un péptido Nell-1 o de un dominio funcional de un péptido Nell-1. Un equivalente funcional de un péptido Nell-1 se refiere a una proteína o péptido que tiene una función equivalente o sustancialmente similar a la de un péptido Nell o de un dominio funcional de un péptido Nell-1. Un equivalente conformacional de un péptido Nell-1 se refiere a una proteína o péptido que tiene una conformación equivalente o sustancialmente similar a la de un péptido Nell-1 o de un dominio funcional de un péptido Nell-1.

En algunas realizaciones, el péptido Nell-1 descrito aquí puede ser un derivado del péptido Nell-1. El término "derivado", tal como se usa aquí, se refiere a cualquier compuesto químico o biológico o materiales derivados de un péptido Nell-1, equivalentes estructurales de los mismos, o equivalentes conformacionales de los mismos. Por ejemplo, tal derivado puede incluir cualquier forma pro-fármaco, forma PEGilada o cualquier otra forma de un péptido Nell que hace que el péptido Nell-1 sea más estable o que tenga una mejor osteofilia o lipofilia. En algunas realizaciones, el derivado puede ser un péptido Nell-1 unido a poli(etilenglicol), un poli(aminoácido), una cadena corta de hidrocarbilo que tiene carbonos C1-C20, o un polímero biocompatible. En algunas realizaciones, el término "derivado" puede incluir un péptido Nell-1 mimético. La síntesis de miméticos de un péptido está bien documentada en la técnica.

En algunas realizaciones, el derivado de péptido aquí descrito incluye un péptido Nell-1 físicamente o químicamente modificado. El péptido modificado físicamente puede ser modificado, por ejemplo, modificando por fuerza iónica de tal modo que forme un par iónico con un contraión, modificación por enlaces de hidrógeno, modificación por modulación de pH, modulación por selección de disolvente o modificación utilizando diferentes procedimientos de plegamiento/desplegamiento, que pueden implicar la selección de la temperatura de plegamiento/desplegamiento, pH, disolvente y duración en diferentes etapas de plegamiento/desplegamiento.

En algunas realizaciones, el derivado peptídico puede incluir un péptido Nell modificado químicamente. Por ejemplo, un grupo o grupos hidrocarbonados cortos (por ejemplo, metilo o etilo) pueden unirse selectivamente a uno o múltiples sitios en la molécula de péptido Nell-1 para modificar las propiedades químicas y/o físicas del péptido. En algunas realizaciones, un grupo o grupos mono-, oligo- o poli (etilenglicol) (PEG) pueden ser unidos selectivamente a uno o múltiples sitios en la molécula de péptido Nell-1 para modificar las propiedades químicas y/o físicas del péptido mediante procedimientos comúnmente conocidos como PEGilación de proteínas (véase, p.ej., Mok, H., et al, Mol. Ther., 11 (1):66-79 (2005)).

En la misma línea, la isoforma del péptido Nell-1 puede incluir un agente relacionado o derivado de la isoforma Nell-1. Los principios descritos anteriormente son aplicables a la isoforma del péptido Nell-1.

Isoformas del péptido Nell-1

Se ha descubierto que el péptido Nell-1, un péptido de 810 aminoácidos con un peso molecular de 90 kD, tiene propiedades osteoinductivas. El Péptido Nell-1, métodos para su expresión y su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el hueso y el cartílago se han descrito en las Patentes de Estados Unidos Nos. 7,052,856 y 7,544,486. Solicitud Nos. 11/392,294, 11/594,510, 11/601,529, 11/713,366, 11/884,525, y 11/973,831.

La isoforma Nell-1 en la presente invención no incluye el Nell-1 descrito en las patentes o solicitudes de patente anteriores identificadas previamente.

La isoforma Nell-1 (aquí denominada ISN-1) es un péptido Nell-1 que carece de un dominio similar a TSP1-N [N-terminal de trombospondina-1 (TSP-1) presente en LNell-1. El ISN-1 es un Nell-1 corto (SNell-1) de secuencia SEQ ID NO. 1.

Las isoformas de péptidos Nell-1 de rata o ratón comparten una homología de aminoácidos predicha del 93% con Nell-1 humana. LNell-1 contiene varios motivos altamente conservados, incluyendo un péptido señal de secreción, un módulo similar al N-terminal de trombospondina-1 (TSP1-N) (también descrito como dominio similar a la laminina G), cinco dominios ricos en cisteína (CR) similares a la cordina (también conocidos como dominios factor de von Willebrand tipo C) y seis dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF). La LNell-1 de rata se secreta al medio como proteínas de 400 kDa que se convierten en proteínas de 130 kDa después de una desnaturalización prolongada. Se supone que los monómeros de 130 kDa se asocian formando homotrímeros ya sea a través de la región de bobina en espiral o de los dominios CR. Los dominios de tipo EGF interactúan con y son fosforilados por la proteína quinasa C (PKC) en una forma dependiente de isoforma de PKC. (Figura 1)

El LNell-1 humano contiene 810 aminoácidos con un peso molecular de 89.5 kD (120kD después de la modificación postraduccional). LNell-1 se transcribe a partir del promotor alternativo proximal (AP-L). Se predijo que SNell-1 tendría 570 aa con un peso molecular de 62.5 kD. SNell-1 se transcribe a partir de un nuevo promotor alternativo (AP-S). Tanto AP-L como AP-S contienen múltiples elementos reguladores funcionales para unirse a Runx2 (p.ej., OSE2) y Osx [p.ej., proteína de especificidad 1 (SP1)].

Runx2 promueve la expresión del mRNA/proteína de LNell-1 y SNell-1, mientras que Osx induce el mRNA/proteína de SNell-1, pero suprime la expresión del mRNA de LNell-1, lo cual indica que LNell-1 y SNell-1 juegan papeles distintos en las etapas iniciales y avanzadas, respectivamente, de la diferenciación osteoblástica. Además, LNell-1 puede regular a la baja la transcripción Osx recíprocamente, mientras que SNell-1 puede regular al alza los transcritos de Runx2 y Osx y aumenta la diferenciación osteoblástica. Al igual que LNell-1, SNell-1 se expresa durante el crecimiento esquelético y muestra potencial osteogénico in vitro e in vivo.

Ambas isoformas de Nell-1 pueden ser necesarias durante la osteogénesis. LNell-1 y SNell-1 tienen funciones distintas y no solapantes durante la osteogénesis y la condrogénesis. Se cree que SNell-1, que regula al alza tanto Runx2 como Osx, es un agente osteoinductivo aún más potente que LNell-1.

El péptido SNell-1 es de secuencia SEQ ID NO. 1. El péptido SNell-1 está codificado por una secuencia de ADN de SEQ ID NO. 2. El péptido LNell-1 es de secuencia SEQ ID NO. 3. El péptido LNell-1 está codificado por una secuencia de ADN de SEQ ID NO. 4.

Método para Incrementar la Formación y Regeneración Ósea

Esta descripción proporciona un método para aumentar la formación y regeneración ósea. El método puede utilizarse para la reparación de fracturas ósea. El método es útil en una variedad de contextos incluyendo, pero sin limitarse a, la reconstrucción ósea de defectos que ocurren como resultado de un trauma, cirugía de cáncer o errores en el desarrollo, tratamiento de la osteogénesis imperfecta, tratamiento de la osteoporosis y recuperación de fracturas óseas graves o leves.

El método para la reparación de fracturas óseas comprende aumentar la concentración de un producto del gen ISN-1 en o cerca del sitio de fractura. En algunas realizaciones, el método comprende transfectar una célula osteogénica con un vector que expresa la proteína ISN-1 o un agente relacionado en o cerca del sitio de fractura ósea. En algunos aspectos, el método comprende introducir una célula osteogénica o célula precursora de hueso que
5 sobreexpresa ISN-1 en el sitio de fractura.

En otro enfoque para la reparación de la fractura, el sitio de la fractura se pone en contacto con una proteína ISN-1. En algunas realizaciones, el sitio de fractura se pone en contacto con LNell-1 además de con una proteína ISN-1. La proteína puede ser producida por una célula (por ejemplo, introducida mediante la introducción de una célula que
10 sobreexpresa la proteína Nell-1), o mediante la administración de la proteína sola o en combinación con un excipiente farmacológico, o mediante la administración de un vector de "ADN desnudo" capaz de expresar el péptido Nell-1 o el ISN-1. La proteína ISN-1 puede ser un componente de un material de reparación ósea/injerto óseo y/o parte de un dispositivo protésico.

15 En algunos aspectos, de forma análoga a la utilización de proteínas morfogénicas óseas (p.ej., BMP-1 a BMP-24), el ISN-1 puede utilizarse para acelerar la reparación de fracturas óseas o para inducir la reparación o reemplazo óseo en circunstancias en las que la recuperación natural es limitada o inexistente. En general, tales métodos implican aumentar la cantidad de un producto del gen Nell-1 en o cerca del sitio de fractura en un hueso. La concentración del producto del gen ISN-1 puede aumentarse mediante uno o varios métodos. En uno de los enfoques posibles, las
20 células en o cerca del sitio de fractura ósea se inducen para expresar niveles elevados de ISN-1. Esto se puede conseguir in vivo, por ejemplo, mediante el uso de moduladores de expresión de Nell-1, alterando el promotor de ISN-1, o transfectando la célula con una construcción que expresa ISN-1. Esto también puede lograrse modificando dichas células para sobreexpresar Nell-1 ex vivo y luego introducirse de nuevo en el organismo en cuestión (por ejemplo, en o cerca de un sitio de fractura).

25 En diversos aspectos, esta descripción proporciona un método para facilitar la formación o regeneración ósea, comprendiendo el método de aumento de la concentración de un producto del gen ISN-1 en una célula osteogénica. El producto del gen ISN-1 puede ser un péptido ISN-1, un agente relacionado, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, la célula osteogénica puede ser un osteoblasto maduro, osteoblasto, una célula mesenquimal,
30 una célula fibroblástica, una célula embrionaria fetal, una célula madre, una célula de la médula ósea, una célula de la duramadre, un condrocito y un condroblasto.

En algunos aspectos, la concentración creciente de un producto del gen ISN-1 comprende transfectar una célula osteogénica con un vector que expresa una proteína ISN-1 o un agente relacionado. En algunos aspectos, la
35 concentración creciente de un producto génico ISN-1 comprende administrar en el sitio de fractura ósea una composición que comprende una proteína ISN-1 o un agente relacionado. La composición puede incluir además un transportador farmacéuticamente aceptable.

En varios aspectos, el uso de ISN-1 y LNell-1 puede combinarse. Se espera que ISN-1 y LNell-1 puedan trabajar en
40 sinergia y que la combinación proporcione mejoras a los enfoques existentes.

Métodos para Tratar la Osteoporosis

El uso de Nell-1 para tratar, prevenir y mejorar la osteoporosis se ha descrito en la Solicitud de Estados Unidos No.
45 11/713,366.

En varios aspectos, esta descripción proporciona un método para tratar, prevenir o mejorar la osteoporosis administrando a un tejido óseo en un sitio preseleccionado, una cantidad eficaz de un ISN-1 o de un agente
50 relacionado.

En algunos aspectos, el método puede además comprender aplicar al sitio preseleccionado una fuerza física para dispersar el ISN-1 o agente relacionado. En algunos aspectos, la fuerza física puede ser ultrasonidos.

En algunos aspectos, la etapa de administración incluye: hacer una incisión en el tejido óseo en el sitio
55 preseleccionado y administrar al tejido óseo en el sitio preseleccionado a través de la incisión.

En algunos aspectos, el ISN-1 o agente relacionado se formula en una formulación adecuada para un vía de administración seleccionado de inyección percutánea a través de piel intacta a un sitio, inyección directa a través de un sitio abierto quirúrgicamente o un sitio de trauma, implante quirúrgico, administración extravascular, inyección
60 extravascular, inyección extravascular mediante catéter, administración intravascular, inyección intravascular, inyección intravascular mediante catéter, administración intravenosa, inyección intravenosa, inyección intravenosa mediante catéter, administración intraarterial, inyección intraarterial, inyección intraarterial mediante catéter, administración intratecal, inyección intratecal, inyecciones intratecales mediante catéter, administración intraósea,

inyección intraósea, inyecciones mediante catéter, administración intracartilaginosa, inyección intracartilaginosa, inyección intracartilaginosa mediante catéter, administración intravesical, inyección intravesical, inyección intravesical mediante catéter, administración mediante una bomba mecánica con catéter percutáneo o implantable, administración mediante catéter a un área u órgano en el cuerpo, o la administración mediante dispersión expandida a través de un dispositivo que aumenta la penetración en el tejido o amplía la distribución en el tejido. En algunas realizaciones, el dispositivo proporciona ultrasonido, iontoforesis, calor o presión.

En varios aspectos, el uso de ISN-1 y LNell-1 puede combinarse. Se espera que ISN-1 y LNell-1 puedan trabajar en sinergia y que la combinación proporcione mejoras a los enfoques existentes. En diversas realizaciones, la isoforma Nell-1 puede ser SNell-1.

Método para Inducir la Formación y Regeneración de Cartílago

El uso de Nell-1 para inducir la formación y regeneración del cartílago se ha descrito en la Solicitud de Estados Unidos No. 11/594,510.

En diversos aspectos, la presente descripción proporciona agentes y métodos para inducir la formación o reparación del cartílago usando un péptido ISN-1 o un agente relacionado (denominado colectivamente "agente"). La composición puede incluir un péptido ISN-1, un agente relacionado, y opcionalmente al menos otro agente activo, células y material biocompatible implantado con el propósito de reparar el cartílago (es decir, cartílago hialino, cartílago elástico o fibrocartílago).

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona una composición que contiene una cantidad eficaz de al menos un agente para promover directa o indirectamente la generación de cartílago para tratar, prevenir o mejorar una afección médica relacionada con el cartílago. Uno de los agentes para la promoción directa de la generación del cartílago puede ser péptidos ISN-1 o terapia génica basada en ISN-1 o productos del gen ISN-1 potenciadores aplicados a células condrogénicas tales como, pero sin limitarse a, condroblastos, condrocitos o células condroprogenitoras, células madre adultas y embrionarias, células de la médula ósea, células estromales de la médula ósea, células mesenquimales, fibroblastos o células derivadas de tejido adiposo. El agente para la promoción indirecta de la generación de cartílago (p.ej., mediante la inducción de la diferenciación de condroblastos/condrocitos) puede ser, p.ej., uno de los péptidos Nell, o agonistas de receptores peptídicos Nell.

En algunos aspectos, la composición puede incluir, p.ej., uno o más inhibidores o antagonistas de receptores peptídicos ISN-1, péptidos ISN-1 de dosis alta, o combinaciones de los mismos. Tal composición es eficaz para la inhibición de la diferenciación condrogénica inhibiendo células condrogénicas potenciales o comprometidas tales como, pero sin limitarse a, osteoblastos, células osteoprogenitoras, células madre, células de la médula ósea, células fibroblásticas, células de la duramadre, células periosteales, pericitos y/o células musculares.

En varios aspectos, se puede combinar el uso de ISN-1 y LNell-1. Se espera que ISN-1 y LNell-1 puedan trabajar en sinergia y que la combinación proporcione mejoras a los enfoques existentes. La isoforma Nell-1 es SNell-1.

Composición

En diversas realizaciones, esta invención proporciona una composición útil para facilitar la formación o regeneración del hueso. La composición comprende un péptido ISN-1, un agente relacionado con ISN-1, o una combinación de los mismos.

La composición puede ser una composición farmacéutica que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable. El transportador farmacéuticamente aceptable puede ser un transportador para una vía de administración oral, administración tópica, implante in situ, administración quirúrgica, administración intravenosa, administración parenteral, administración local, inyección intraarterial, inyección en un sitio de fractura y suministro en una matriz biodegradable. En las diversas realizaciones, la composición puede comprender además proteína LNell-1, un agente relacionado, o una combinación de los mismos.

La composición farmacéutica se puede formular en una formulación adecuada para un vía de administración seleccionado de inyección percutánea a través de piel intacta a un sitio, inyección directa a través de un sitio abierto quirúrgicamente o un sitio de un trauma, implantación quirúrgica, administración extravascular, inyección extravascular, inyección extravascular mediante catéter, administración intravascular, inyección intravascular, inyección intravascular mediante catéter, administración intravenosa, inyección intravenosa, inyección intravenosa mediante catéter, administración intraarterial, inyección intraarterial, inyección intraarterial mediante catéter, administración intratecal, inyección intratecal, inyecciones intratecales mediante catéter, administración intraósea, inyección intraósea, inyección mediante catéter, administración intracartilaginosa, inyección intracartilaginosa, inyección intracartilaginosa mediante catéter, administración intravesical, inyección intravesical, inyección

intravesical mediante catéter, administración mediante una bomba mecánica con catéter percutáneo o implantable, administración mediante catéter a un área u órgano del cuerpo o administración a través de dispersión expandida a través de un dispositivo que aumenta la penetración en el tejido o que amplía la distribución en el tejido.

- 5 En diversas realizaciones, se puede combinar el uso de ISN-1 y LNell-1. ISN-1 y LNell-1 pueden usarse de la misma manera o sustancialmente de la misma manera. Se espera que ISN-1 y LNell-1 puedan trabajar en sinergia y que la combinación proporcione mejoras a los enfoques existentes. En diversas realizaciones, la isoforma Nell-1 puede ser SNell-1.

10 Injerto Óseo

En diversas realizaciones, la composición puede ser un material para injerto óseo. En diversas realizaciones, esta invención proporciona un material de injerto óseo para mejorar la formación ósea en el animal en el que se implanta.

- 15 En algunas realizaciones, el material de injerto óseo contiene una matriz biocompatible y una proteína ISN-1, un agente relacionado, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el material de injerto puede ser reabsorbible o biodegradable o bioestable. En algunas realizaciones, el material de injerto puede ser sintético o de origen natural (por ejemplo, aloinjerto). La matriz puede incluir un polímero biodegradable o un polímero bioestable y puede impregnarse con una proteína ISN-1, un agente relacionado y/o una célula que expresa una proteína ISN-1 o un agente relacionado. La matriz biocompatible puede comprender colágeno. La matriz biocompatible puede comprender un biovidrio o biocerámica. La matriz biocompatible puede comprender una molécula de adhesión celular.

- 25 En algunas realizaciones, la proteína ISN-1 es producida por una célula dentro de la matriz que expresa la proteína ISN-1 o un agente relacionado, las cuales son exógenas. En algunas realizaciones, la proteína ISN-1 se proporciona mediante una composición farmacéutica. En las realizaciones mencionadas anteriormente, el material de injerto óseo puede comprender además la proteína LNell-1, un agente relacionado, o una combinación de los mismos.

- 30 Un material de injerto óseo ejemplar comprende un colágeno conjugado que contiene (por ejemplo desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 99.999 por ciento en peso) colágeno dispersado sustancialmente y uniformemente en el mismo; y (p.ej., aproximadamente 99.999 a aproximadamente 0.001 por ciento en peso) una proteína ISN-1, un agente relacionado, y/o una célula que expresa una proteína ISN-1 o un agente relacionado. En algunas realizaciones, el material de injerto incluye colágeno y/o fragmentos óseos desmineralizados o no desmineralizados además de la proteína ISN-1 o células que expresan una proteína ISN-1.

- 35 Las células que expresan o sobreexpresan ISN-1 pueden incorporarse a dichos materiales de injerto óseo o pueden incorporarse polipéptidos ISN-1 en dichos materiales de injerto óseo. Estos materiales de injerto pueden usarse en el tratamiento de fracturas o para facilitar la sustitución/recuperación de prótesis o trasplantes óseos.

- 40 En diversas realizaciones, se puede combinar el uso de ISN-1 y LNell-1. Se espera que ISN-1 y LNell-1 puedan trabajar en sinergia y que la combinación proporcione mejoras a los enfoques existentes. La isoforma Nell-1 es SNell-1.

Método para Hacer la Isoforma del Péptido Nell-1

- 45 La expresión y purificación del péptido Nell-1 se ha descrito en la Patente de Estados Unidos No. 7,544,486 y en la Solicitud de Estados Unidos No. 11/601,529.

- 50 Esta invención proporciona métodos para la expresión y purificación de la isoforma Nell-1. En diversas realizaciones, esta invención proporciona construcciones de ácido nucleico que expresan ISN-1 y células que expresan péptidos ISN-1 que pueden ser útiles en la producción de cantidades de péptidos ISN-1. En algunas realizaciones, las construcciones de ácido nucleico que expresan ISN-1 pueden incluir además secuencias de ácido nucleico que codifican péptidos señal que pueden facilitar el tráfico de proteínas y la modificación posterior a la producción del ISN-1 en la célula huésped. En algunas realizaciones, el péptido señal puede facilitar la secreción del péptido de la célula huésped.

- 55 En diversas realizaciones, esta invención proporciona un método para expresar un péptido ISN-1 funcional en una célula, dicho método incluye: proporcionar una construcción de ácido nucleico que incluya al menos un ácido nucleico codificando al menos un péptido ISN-1 en el marco de lectura de un ácido nucleico codificando un péptido señal de secreción; transfectar una célula con dicha construcción de ácido nucleico; cultivar dicha célula bajo condiciones que permitan la expresión del péptido ISN-1; opcionalmente recolectar el péptido ISN-1 secretado por la línea celular; opcionalmente purificar sustancialmente el péptido ISN-1; y opcionalmente probar la actividad del péptido ISN-1 en la inducción de la formación ósea.

En diversas realizaciones, esta invención proporciona una construcción de ácido nucleico para expresar un péptido ISN-1 en una célula, incluyendo dicha construcción de ácido nucleico al menos un ácido nucleico codificando al menos un péptido ISN-1 en el marco de lectura de ácido nucleico codificando un péptido señal de secreción.

En diversas realizaciones, esta invención proporciona una línea celular para expresar un péptido ISN-1 funcional, incluyendo dicha línea una construcción de ácido nucleico incluyendo al menos un ácido nucleico codificando al menos un péptido ISN-1 en marco con el ácido nucleico codificando un péptido señal de secreción.

En algunas realizaciones, el péptido señal de secreción es un péptido de secreción de insecto. En algunas realizaciones, el péptido señal de secreción es una secuencia señal peptídica de Nell. En algunas realizaciones, el péptido señal de secreción se selecciona del grupo que consiste en una secuencia señal de melitina, una secuencia señal de proteína de unión a inmunoglobulina de drosophila, un péptido señal de interferon gamma equino (e1FN-gamma), un péptido señal inhibidor de la fosfolipasa A2 de serpiente, un péptido señal de lisozima humano y un péptido señal de lisozima de pollo.

En las realizaciones mencionadas anteriormente, la célula puede ser una célula de mamífero o una célula de insecto. Dicha célula de insecto puede ser una célula high five. Dicha célula de mamífero puede ser una célula COS7. En las realizaciones mencionadas anteriormente, el péptido señal de secreción puede ser una secuencia señal peptídica de Nell. En las realizaciones antes mencionadas, el péptido ISN-1 puede ser SNell-1.

La isoforma Nell-1 es SNell-1.

Las Patentes de Estados Unidos No. 7,052,856 y 7,544,486, las Solicitudes estadounidenses Nos. 11/392,294, 11/594,510, 11/601,529, 11/713,366, 11/884,525 y 11/973,831 describen el péptido Nell-1, sus composiciones, su expresión y purificación y su uso en la reparación de fracturas óseas, incluyendo facilitar la formación ósea y aumentar la mineralización ósea, tratar la osteoporosis e inducir la formación y regeneración del cartílago. Estas patentes o solicitudes representan el estado de la técnica que contribuye a posibilitarlos diversos aspectos de la presente invención.

Aspectos

El método de formación y reparación ósea generalmente implica el aumento de la concentración de proteína ISN-1 en una célula progenitora ósea o el contacto de una célula (por ejemplo, una célula progenitora ósea) con un polipéptido ISN-1 o con un vector que codifica un polipéptido ISN-1.

Esto también puede conseguirse transformando una célula precursora ósea de manera que exprese niveles elevados de ISN-1 endógeno o de manera que exprese ISN-1 a partir de un ácido nucleico ISN-1 exógeno transfectado.

Esto también se puede conseguir poniendo en contacto células precursoras óseas en o cerca del hueso, el sitio de fractura ósea o el sitio de la enfermedad del cartílago con una proteína ISN-1 o una composición de la misma o administración local de una proteína ISN-1 o una composición de la misma.

A) Transformación de Células para Incrementar la Producción de ISN-1.

En una realización más preferida, el ácido nucleico del gen que expresa ISN-1 (p.ej., cADN(s)) puede clonarse en vectores de terapia génica que son competentes para transfectar células (tales como células humanas o células de otros mamíferos) in vitro y/o in vivo. Los métodos y procedimientos de dicha clonación y transfección celular se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el No. de Serie 09/412,297, presentada el 5 de octubre de 1999.

B) Administración de ISN-1 Producido Exógenamente

1) Administración de ISN-1 a las Células Diana

Las proteínas ISN-1 o agentes relacionados pueden prepararse para administración intravenosa, parenteral, tópica, oral o local (p.ej., por aerosol o transdérmicamente). Vías de administración particularmente preferidas incluyen inyección intraarterial, inyección en sitios de fractura o administración en una matriz biodegradable. Los agentes de las proteínas ISN-1 se pueden combinar con un transportador farmacéuticamente aceptable, que puede denominarse transportador o excipiente, para formar una composición farmacológica.

Se describen diversas formulaciones farmacéuticamente adecuadas, transportadores, otros aditivos y rutas de administración en las Solicitudes de Estados Unidos Nos. 11/392,294, 11/713,366, 11/884,525 y 11/973,831

2) Materiales de Injerto Óseo

La proteína ISN-1 puede aplicarse directamente a un hueso o sitio de fractura ósea. Esto se puede llevar a cabo durante la cirugía (por ejemplo, cuando se establecen fracturas complejas, cuando se reconstruye el hueso, cuando se realizan trasplantes de huesos, etc.) o se puede conseguir mediante una inyección directa.

5 En ciertas realizaciones preferidas, en particular cuando la reconstrucción o reparación ósea se realiza quirúrgicamente, es deseable administrar la proteína ISN-1 usando un "vehículo" de administración sostenida. Los vehículos de administración sostenida incluyen, pero no se limitan a unidades de reparto biodegradables. Las unidades de reparto biodegradables son preferentemente porosas. Varias unidades de reparto se describen en las Solicitudes de Estados Unidos Nos. 11/392,294, 11/713,366, 11/884,525 y 11/973,831.

10

Otros vehículos de administración incluyen, pero no se limitan a materiales de injerto óseo. Los materiales de injerto óseo pueden derivarse de materiales naturales (p.ej., hueso o fragmentos de hueso trasplantados), materiales sintéticos (p.ej., diversos polímeros y/o cerámicas) o combinaciones de ambos. Los materiales de injerto óseo se utilizan típicamente para rellenar huecos o para reemplazar el material óseo perdido. Tales materiales de injerto
15 también se proporcionan a menudo como componentes de dispositivos protésicos (p.ej., reemplazos o soportes óseos) para facilitar una vinculación/unión/ ajustada de la prótesis con el hueso vivo. El material de injerto óseo puede incluir un polímero biodegradable o un polímero bioestable.

Los injertos óseos que utilizan vidrios bioactivos y fosfatos de calcio, colágeno, mezclas y similares tienen buena
20 biocompatibilidad y dan lugar a formación de tejido óseo e incorporación de tejido óseo en algunos casos. Varios materiales de injerto óseo se describen en las Solicitudes de Estados Unidos Nos. 11/392,294, 11/713,366, 11/884,525 y 11/973,831.

El material de injerto óseo puede incluir además proteínas morfogénicas óseas (BMP) u otros agentes bioactivos
25 tales como moléculas de adhesión celular. Los materiales de injerto particularmente adecuados incluyen, por ejemplo, secciones aisladas de hueso esponjoso mineralizado, polvos o gránulos de hueso mineralizado, secciones de hueso esponjoso desmineralizado, polvos o gránulos de hueso desmineralizado, matriz ósea desmineralizada extraída con guanidina-HCl, hueso cortical o esponjoso sinterizado, hidroxiapatita coralina vendida por Interpore
30 óseo Collagraft vendido por Zimmer, o esponjas filamentosas tales como las fabricadas de colágeno por Orquest. En diversas realizaciones, las proteínas ISN-1, BMP u otro agente bioactivo pueden unirse al sustrato de los materiales de injerto óseo.

3) ISN-1 para la Osteoporosis

35

En algunas realizaciones, la proteína ISN-1 aquí descrita puede usarse para tratar, prevenir o mejorar la osteoporosis. En esta realización, el péptido ISN-1 puede administrarse en un sitio de osteoporosis. Posteriormente, se puede aplicar una fuerza física tal como una vibración o ultrasonido al sitio de administración para dispersar el péptido ISN-1. En algunas realizaciones, el péptido ISN-1 puede administrarse al sitio de osteoporosis por los actos
40 de (a) realizar una incisión en un tejido (hueso) y (b) administrar al tejido a través de la incisión el péptido ISN-1. En algunas realizaciones, el péptido Nell-1 puede estar en un transportador farmacéuticamente aceptable para la administración sostenida.

4) ISN-1 para la Regeneración de Cartílago

45

En la presente invención, la isoforma del péptido Nell-1 puede usarse para tratar, prevenir o mejorar la degeneración del cartílago. En una realización, el péptido ISN-1 puede administrarse a un sitio de enfermedad del fibrocartílago tal como la enfermedad del disco vertebral con o sin un transportador farmacéuticamente aceptable, con o sin otros dispositivos (p.ej., dispositivo de reemplazo de núcleo de disco, dispositivo de aloinjerto o células) o factores
50 biológicos (p.ej., proteína LIM-1). En otra realización, el péptido ISN-1 puede administrarse a un sitio de enfermedad del fibrocartílago tal como menisco, con o sin un transportador farmacéuticamente aceptable, con o sin otros dispositivos (p.ej., menisco, soporte o prótesis de menisco, o células) o factores biológicos. En otra realización, el péptido SNell-1 puede administrarse a un sitio de enfermedad del cartílago hialino tal como cartílago articular de rodilla, con o sin un transportador farmacéuticamente aceptable, con o sin otros dispositivos (por ejemplo, aloinjerto
55 de cartílago o soporte o prótesis de cartílago) o factores biológicos. En otra realización, el péptido ISN-1 puede administrarse a otro sitio de enfermedad del cartílago hialino tal como cartílago traqueal (p.ej., traqueomalacia), con o sin un transportador farmacéuticamente aceptable, con o sin otros dispositivos (por ejemplo, aloinjerto de cartílago o soporte de cartílago o prótesis) o factores biológicos.

60 En otras realizaciones, el péptido ISN-1 puede administrarse a un sitio de enfermedad del cartílago elástico tal como el auricular o la epiglotis con o sin un transportador farmacéuticamente aceptable, con o sin otros dispositivos (por ejemplo, células) o factores biológicos.

Una composición aquí descrita puede formularse en formulaciones adecuadas para cualquier vía de administración/suministro adecuada a un sujeto mamífero (p.ej., un ser humano). Con las enseñanzas anteriores un experto en la materia corriente puede formular la composición descrita aquí en cualquier formulación deseable utilizando, por ejemplo, un transportador apropiado con una cantidad apropiada de un péptido ISN-1 o un agente
5 relacionado definido anteriormente.

Algunos ejemplos de administrar la composición pueden ser, p.ej., inyección percutánea a través de piel intacta a varios sitios, o inyección directa a través de piel no intacta (p.ej., sitios quirúrgicamente abiertos o sitios de trauma). En algunas realizaciones, el suministro puede ser la implantación quirúrgica de una composición aquí descrita. En
10 algunas realizaciones, la administración puede ser una administración extravascular, inyección o inyecciones mediante catéter; administración intravascular, inyección o inyecciones mediante catéter; administración intravenosa, inyección o inyecciones mediante catéter; administración intraarterial, inyección o inyecciones mediante catéter; administración intratecal, inyección o inyecciones mediante catéter; administración intraósea, inyección o inyecciones mediante catéter; administración intracartilaginosa, inyección o inyecciones mediante catéter; o
15 administración intravesical, inyección o inyecciones mediante catéter.

En algunas realizaciones, la administración de la composición aquí descrita a un sujeto mamífero puede ser administración a través de bombas mecánicas con catéteres percutáneos o implantables. En algunas realizaciones, la administración de la composición aquí descrita a un sujeto mamífero puede ser una administración mediante
20 catéter a cualquier área/órgano del cuerpo.

En algunas realizaciones, la administración de la composición aquí descrita a un sujeto mamífero puede ser administración a través de dispersión expandida mediante diversos dispositivos que promueven un aumento de la penetración en el tejido o una distribución de tejido más amplia (por ejemplo, ultrasonido, iontoforesis, calor, presión,
25 etc.)

EJEMPLOS

El siguiente ejemplo ilustra, pero no limita, la invención solicitada.
30

1. SNell-1

Se identificó un marco abierto de lectura opcional en el exón 7 dentro de los 240 aminoácidos desde el primer marco abierto de lectura (ORF) que carece del dominio similar a TSP1-N mediante la búsqueda in silico. El ATG potencial
35 sitio de inicio de la traducción para el sitio SNell-1 se localiza dentro del exón 7 de LNell-1 y las secuencias promotoras para SNell-1 se encuentran dentro del intrón 2 de LNell-1. La existencia de la forma corta prevista quedó demostrada mediante 5'RACE y los resultados de secuenciación.

El trabajo independiente de la Base de Datos de Sitios de Inicio Transcripcionales (<http://dbtss.hgc.jp>) también
40 identificó un clon con la misma forma alternativa de SNell-1 utilizando el método 5'Oligo-Capping.

El cebador 5' de SNell-1 se diseñó en base a su secuencia 5' UTR. Cuando se transfectó con Osx, el producto de PCR que usaba cebadores N-terminales (específicos para LNell-1) fue significativamente regulados a la baja (coincidiendo con el resultado del promotor), mientras que el producto de PCR usando cebadores específicos de
45 SNell-1 estaba significativamente elevado por encima del control (Figura 2). En cambio, la transfección Runx2 reguló al alza la transcripción de LNell-1 y SNell-1.

LNell-1 contiene 810 aa con un peso molecular de 89.5 kD (120 kD después de la modificación postraduccional); el tamaño previsto para SNell-1 es de 570 aa con un peso molecular de 62.5 kD.
50

Para verificar aún más la existencia de esta isoforma de menor tamaño, se recolectaron los medios de NMCCs transfectados con Osx. Se demostró que Osx reguló a la baja LNell-1 y aumentó la expresión de una proteína SNell-1 de 70 kD, lo cual es consistente con el peso no glucosilado previsto de 62.5 kD (Figura 2). Se obtuvieron resultados similares usando células Saos2.
55

2. El Papel Funcional de SNell-1 en el Desarrollo Esquelético

Se usó una línea celular ES con el gen Nell-1 modificado mediante gene-trap para generar knockouts Nell-1 específicos generales y específicos de tejido [Col1 α 1-Cre- (osteoblástico) y Col2 α 2-Cre (condrogénico)]. Se generaron ratones que sobreexpresan LNell-1 y SNell-1. Además del examen morfológico e histológico exhaustivo,
60 los niveles de expresión de Runx2 y Osx se examinaron adicionalmente en los fondos con diferentes niveles de expresión de Nell-1 mediante inmunohistoquímica.

Dada la importante labor de Runx2 y Osx durante el desarrollo esquelético, se estudió el efecto de SNell-1 sobre la expresión de SNell-1 en Runx2 y Osx. Debido a que el estado de fosforilación puede afectar a la actividad de Runx2 y Osx y debido a que se ha demostrado que LNell-1 aumenta la fosforilación y la actividad de Runx2, se estudiaron los efectos de SNell-1 sobre el estado y actividad de la fosforilación de Runx2 y Osx.

5

SNell-1 se expresa normalmente en osteoblastos de fase tardía. Exceso de SNell-1 puede inducir una apoptosis celular significativamente mayor y una mayor inhibición de la proliferación celular que LNell-1, con formación ósea acelerada en relación con ratones WT, pero una disminución de la formación ósea total en relación con ratones que sobreexpresan LNell-1.

10

En términos de condrogénesis, SNell-1 (que Runx2 y Osx regulan al alza y que recíprocamente regula al alza Runx2 y Osx mRNAs) promueve la diferenciación temprana de condrocitos, con posibles efectos inhibitorios en la diferenciación terminal de condrocitos.

15 Se examinaron los efectos diferenciales de LNell-1 vs. SNell-1 en células Saos-2. Saos-2 transfectadas con pcDNA3.1-SNell-1 mostraron una expresión aumentada de Runx2, Osx y Oc a día 6 del cultivo. En cambio, las células Saos-2 transfectadas con LNell-1 no mostraron ningún cambio en la transcripción de Runx2 (consistente con nuestros datos previos en MC3T3-E1), pero mostraron un aumento transitorio de la expresión Oc y una disminución marcada en la expresión Osx (Figura 3).

20

La Figura 3 muestra los efectos de LNell-1 y SNell-1 en la mineralización y en la expresión de Runx2, Osx, Oc. La Figura 3 (A) muestra que las células Saos2 se transfectaron con pcDNA3.1 (Control), pcDNA3.1-LNell-1 o -SNell-1 durante 24 horas y luego se expusieron a un medio de diferenciación osteogénica. La expresión mRNA de Runx2, Osx y Oc se analizó por PCR en tiempo real. *p <0.05, **p <0.01 y se comparó con los datos del día 1 dentro del mismo grupo. #p <0.05, ##p <0.01 comparado con el grupo de control del mismo tiempo. La Figura 3 (B) muestra la transfección lentiviral. Tanto LNELL-1 como SNell-1 muestran mineralización significativa en comparación con el control. #p<0.05.

25

SNell-1 se expresó durante el crecimiento esquelético (Figura 4) y hueso formado cuando se aplicó a defectos en la calvaria (Figura 5). La Figura 4 muestra los patrones de expresión de las proteínas LNell-1 y SNell-1 en cabezas de ratones. Se sabe que LNell-1 está altamente expresado en tejidos cerebrales y se expresa de forma consistente durante y después de la gestación, mientras que SNell-1 se expresa predominantemente de manera postnatal.

30

La Figura 5 muestra la recuperación de defectos en la calvaria con SNell-1. Se implantaron lentivirus SNell-1 (5M partículas de virus por sitio) embebidos en soportes PLGA revestidos con colágeno en un defecto en la calvaria de 35 3mm en ratas atímicas. Los μ CT vivos se tomaron a las 2 semanas y se tomaron μ CT de alta resolución a las 4 semanas. BV/TV y la densidad de la superficie ósea mostraron que SNell-1 indujo significativamente más formación ósea (*p<0.05).

35

Estos datos demuestran que SNell-1 exhibe una potente capacidad osteoinductiva. Se descubrió que las isoformas del péptido Nell-1 son necesarias para el desarrollo normal del esqueleto y que las isoformas del péptido Nell-1- son componentes clave en la red reguladora de Runx2 y Osx que controla la osteoblastogénesis y la diferenciación terminal de condrocitos.

40

LNell-1 puede que esté involucrada en etapas tempranas y SNell-1 etapas tardías de la osteoblastogénesis, y lo contrario en la condroblastogénesis (es decir, LNell-1 puede que esté involucrada en etapas tardías, SNell-1 en etapas tempranas). LNell-1 (regulado al alza por Runx2 y regulado a la baja por Osx) puede que promueva una diferenciación osteoblástica de fases más tempranas y una formación ósea menos madura, mientras que SNell-1 (regulada al alza por Osx y Runx2) puede que promueva la diferenciación osteoblástica en fases tardías y una formación ósea más madura.

45

50

Por el contrario, en condrocitos, LNell-1 regulado al alza por Runx2 puede que promueva la maduración terminal de los condrocitos (dado el papel conocido de Runx2 en la promoción de la hipertrofia de los condrocitos) y SNell-1 regulado al alza por Osx/Runx2 puede que tenga efectos mínimos o incluso inhibitorios sobre la diferenciación terminal de los condrocitos (dados los conocidos efectos inhibitorios de Osx sobre la hipertrofia de los condrocitos).

55

Estos datos sugieren que SNell-1 puede conducir a terapias osteoinductivas más seguras y más efectivas.

3. Efectos de la Isoformas Nell-1 en la Fosforilación y Actividad Runx2 y Osx

La regulación coordinada de la actividad de Runx2 y Osx es crucial para la formación ósea. Los estudios de los presentes inventores sugieren que LNell-1 y SNell-1 son importantes, no sólo como genes diana para llevar a cabo las funciones Runx2 y Osx, sino que LNell-1 y SNell-1 son importantes para modular la expresión y la actividad de Runx2 y Osx durante la diferenciación celular. Entender la función y el mecanismo de las isoformas de Nell-1 conducirá a mejores y más seguros enfoques terapéuticos para los problemas relacionados con la formación ósea.

60

Se examinaron los efectos de la isoforma de Nell-1 sobre el estado de fosforilación de Runx2 y se correlacionaron con la actividad de Runx2. La actividad de Runx2 se cuantificó fisiológicamente mediante la expresión de marcadores osteoblásticos, y directamente mediante sistemas reporteros de luciferasa que sirven como lecturas directas de la actividad de Runx2.

5

Debido a que LNell-1 aumenta la fosforilación de Runx2 a través de la participación de cascadas de señalización de quinasas activada por mitógenos (MAPK) y contiene un dominio de tipo TSP1-N/LG conservado que puede interactuar con integrinas de superficie celular para activar vías de MAPK, los niveles relativos de MAPK y la activación de kinasa de adhesión focal (FAK) por LNell-1 y SNell-1 también se examinaron.

10

LNell-1 y SNell-1 ejercieron efectos diferentes sobre la fosforilación y la actividad de Runx2 y Osx con los correspondientes efectos diferentes en la diferenciación osteogénica y condrogénica.

También se examinaron los efectos de las isoformas de Nell-1 individualmente o en combinación sobre el estado de fosforilación de Runx2 y Osx y las bioactividades correspondientes. La combinación de LNell-1 y SNell-1 puede incrementar sinérgicamente la actividad de Runx2 y la diferenciación osteoblástica y, por lo tanto, proporcionar terapias combinadas.

4. Los Efectos de la Isoforma Nell-1 en la Formación Ósea in Vivo

20

Se examinó la osteoinductividad de LNell-1 y SNell-1 en un modelo de defecto en la calvaria y un modelo de implante de células madre de médula ósea (BMSC).

Tanto Runx2 como Osx son conocidos por promover el compromiso y la maduración del linaje osteoblástico. Sin embargo, mientras que Runx2 promueve la diferenciación terminal de los condrocitos, Osx inhibe este proceso. SNell-1 inducida por Osx promoverá preferentemente un proceso de osteogénesis directa similar a la osificación intramembranosa (es decir, células madre mesenquimales que se diferencian en osteoblastos), mientras que LNell-1, que está específicamente regulada al alza por Runx2 y regulada a la baja por Osx, puede promover preferentemente un proceso más similar a la osificación endocondral de la osteogénesis por etapas (p.ej., células madre mesenquimales que se diferencian en condrocitos con formación de matriz calcificada, seguida de una invasión vascular y de la afluencia de nuevas células madre mesenquimales que luego se diferencian en osteoblastos).

Se espera que las terapias combinadas LNell-1 y SNell-1 sean más eficaces para el crecimiento óseo a dosis más bajas, lo que permitiría una mayor optimización de la seguridad y la eficacia de Nell-1. El estudio con BMSC también determinará cómo utilizar los dos péptidos de isoforma Nell-1 como nuevas herramientas moleculares para controlar la formación del hueso frente al cartílago en la curación de fracturas óseas de manera que el desarrollo de cartílago excesivo en el callo de la fractura pueda ser minimizado y la formación ósea directa, o por etapas, maximizada.

Para determinar las propiedades osteoinductivas y condroinductivas relativas de LNell-1 vs SNell-1 vs. la combinación LNell-1/Snell-1 en ambientes complejos in vivo, se utilizaron dos modelos: un modelo establecido de defecto en la calvaria de regeneración ósea intramembranosa que no forma hueso condroide y un modelo de implantación de BMSC que asemeja más la regeneración ósea endocondral con la formación ósea osteocondral. Se evaluó la formación ósea cuantitativa y cualitativa a niveles morfológicos totales, histológicos y moleculares.

45

Las propiedades osteoinductivas de rhLNell-1 vs. rhSNell-1 se estudiaron en un modelo de osificación intramembranosa. Datos previos indican que LNell-1 puede acelerar tanto la condrogénesis como la osteogénesis. En cambio, SNell-1, a diferencia de LNell-1, puede promover principalmente la osteoblastogénesis con un efecto mínimo (o incluso efectos inhibitorios) en la diferenciación terminal de condrocitos. Se espera que SNell-1 induzca un hueso más rápidamente y más maduro que se manifieste como un aumento de volumen/densidad ósea, una expresión aumentada o temprana de genes marcadores osteoblásticos y/o unos patrones trabeculares óseos más maduros en histología.

55

60

REIVINDICACIONES

1. Una isoforma del péptido Nell-1 (ISN-1), que es la proteína Nell-1 corta (SNell-1) y es de secuencia SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Una composición, que comprende una isoforma del péptido Nell-1 (ISN-1) de acuerdo con la reivindicación 1.
3. La composición de la reivindicación 2, que comprende además una proteína Nell-1 larga (LNell-1), un agente relacionado, o una combinación de los mismos.
- 10 4. La composición de la reivindicación 2, que comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable para una vía de administración seleccionada del grupo que consiste en administración oral, administración tópica, implante in situ, administración intravenosa, administración parenteral, administración local, inyección intraarterial, inyección en un sitio de fractura y administración en una matriz biodegradable.
- 15 5. La composición de la reivindicación 2, que está formulada como una formulación adecuada para un modo de administración seleccionado de inyección percutánea a través de piel intacta a un sitio, inyección directa a través de un sitio abierto quirúrgicamente o un sitio de trauma, implantación quirúrgica, administración extravascular, inyección extravascular, inyección extravascular mediante catéter, administración intravascular, inyección intravascular, inyección intravascular mediante catéter, administración intravenosa, inyección intravenosa, inyecciones
- 20 intravenosas mediante catéter, administración intraarterial, inyección intraarterial, inyecciones intraarteriales mediante catéter, administración intratecal, inyección intratecal, inyecciones intratecales mediante catéter, administración intraósea, inyección intraósea, inyecciones mediante catéter, administración intracartilaginosa, inyección intracartilaginosa, inyecciones intracartilaginosas mediante catéter, administración intravesical, inyección intravesical, inyección intravesical mediante catéter, administración mediante una bomba mecánica con catéter
- 25 percutáneo o implantable, administración mediante catéter a un área u órgano del cuerpo, o administración por dispersión expandida a través de un dispositivo que aumenta la penetración del tejido o una distribución más amplia del tejido.
6. La composición de la reivindicación 2, en la que la composición es un injerto óseo que comprende una matriz
- 30 biocompatible y el ISN-1, el agente relacionado, o la combinación de los mismos.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que el ISN-1 es producido por una célula dentro de la matriz que expresa el ISN-1 que es exógeno.
- 35 8. La composición de la reivindicación 6, en la que la matriz biocompatible comprende un polímero biodegradable o un polímero bioestable.
9. La composición de la reivindicación 6, en la que la matriz biocompatible comprende una molécula de adhesión celular.
- 40 10. Un método para expresar una isoforma funcional del péptido Nell-1 en una célula, en el que ISN-1 es la proteína Nell-1 corta (SNell-1) y es de secuencia SEQ ID NO: 1, dicho método comprende:
- proporcionar una construcción de ácido nucleico que incluye al menos un ácido nucleico que codifica al menos un péptido ISN-1 que es una proteína Nell-1 corta (SNell-1) y es de secuencia SEQ ID NO: 1 en el marco de
- 45 lectura de un ácido nucleico que codifica un péptido señal de secreción;
- transfectar una célula con dicha construcción de ácido nucleico;
- cultivar dicha célula bajo condiciones que permitan la expresión del péptido ISN-1; opcionalmente recolectar el péptido ISN-1 secretado por la línea celular; opcionalmente purificar sustancialmente el péptido ISN-1; y
- 50 opcionalmente probar la actividad del péptido ISN-1 en la inducción de la formación ósea,
11. El método de la reivindicación 10, en el que el péptido señal de secreción es seleccionado del grupo que consiste en una secuencia señal de melitina, una secuencia señal de proteína de unión a inmunoglobulina de drosophila, un péptido señal de interferón gamma equino (eIFN-gamma), un péptido señal de un inhibidor de fosfolipasa A2 de serpiente, un péptido señal de lisozima humana y un péptido señal de lisozima de pollo.
- 55 12. Una construcción de ácido nucleico para expresar la isoforma del péptido Nell-1 (ISN-1) según la reivindicación 1 en una célula, donde dicho constructo de ácido nucleico comprende al menos un ácido nucleico que codifica al menos un péptido ISN-1 de acuerdo con la reivindicación 1 en el marco de lectura de un ácido nucleico que codifica un péptido señal de secreción.
- 60 13. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 12, en la que el péptido señal de secreción se selecciona del grupo que consiste en una secuencia señal de melitina, una secuencia señal de proteína de unión a

inmunoglobulina de drosophila, un péptido señal de interferón gamma equino (eIFN-gamma), una fosfolipasa de serpiente A2, un péptido señal de lisozima humana y un péptido señal de lisozima de pollo.

14. El método de la reivindicación 10 o la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 12, en el que el péptido 5 señal de secreción es una secuencia señal peptídica Nell.

15. Una línea celular para expresar el péptido ISN-1 funcional de acuerdo con la reivindicación 1, incluyendo dicha línea celular una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.

10 16. El método de la reivindicación 10 o la línea celular de la reivindicación 15, en el que dicha célula es una célula de mamífero o una célula de insecto.

17. El método o línea celular de la reivindicación 16, en el que dicha célula de insecto es una célula high five y dicha célula de mamífero es una célula COS7.

15 18. Línea celular según la reivindicación 15, en la que dicha célula secreta dicho péptido ISN-1.

19. Uso de la isoforma del péptido Nell-1 (ISN-1) según la reivindicación 1 o una composición que comprende el ISN-1 de acuerdo con la reivindicación 2 en la fabricación de un medicamento para la osteoporosis, regeneración o 20 reparación ósea, o formación o reparación de cartílagos.

20. Un método, que comprende proporcionar la isoforma del péptido Nell-1 (ISN-1) según la reivindicación 1, y formar una composición que incluye el ISN-1, en el que la composición es de acuerdo con la reivindicación 2 y en la que la composición es según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9.

25

30

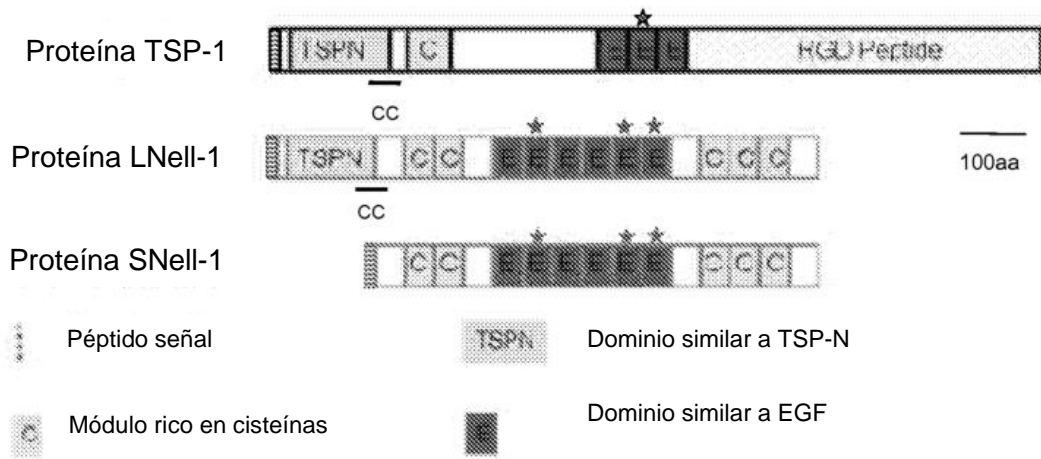


Fig. 1

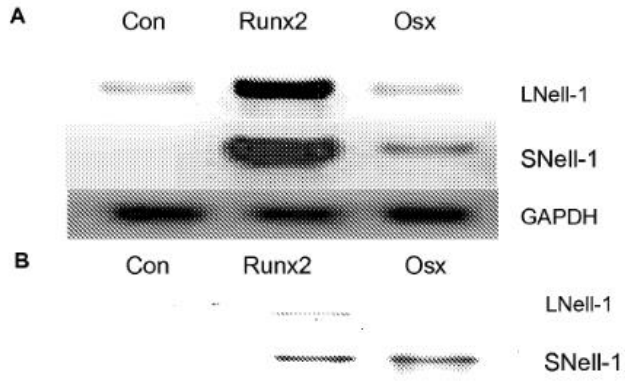


Fig. 2

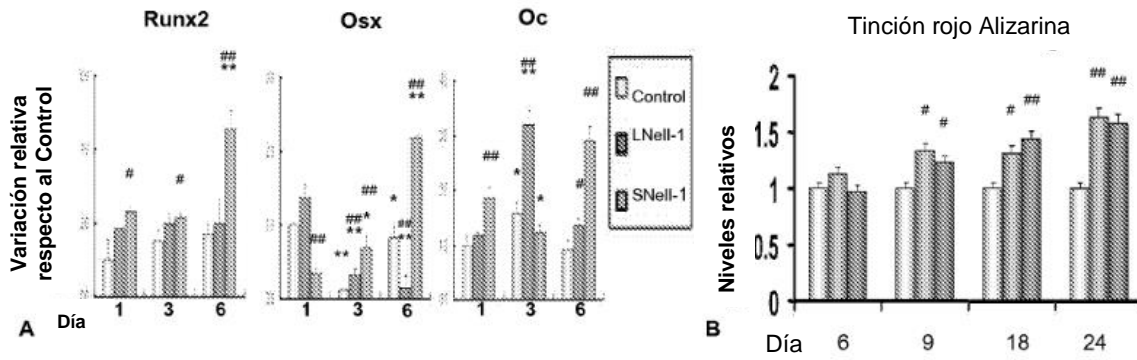


Fig. 3

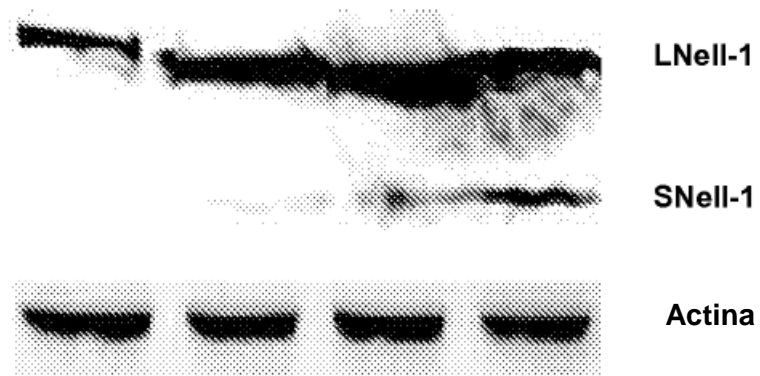


Fig. 4

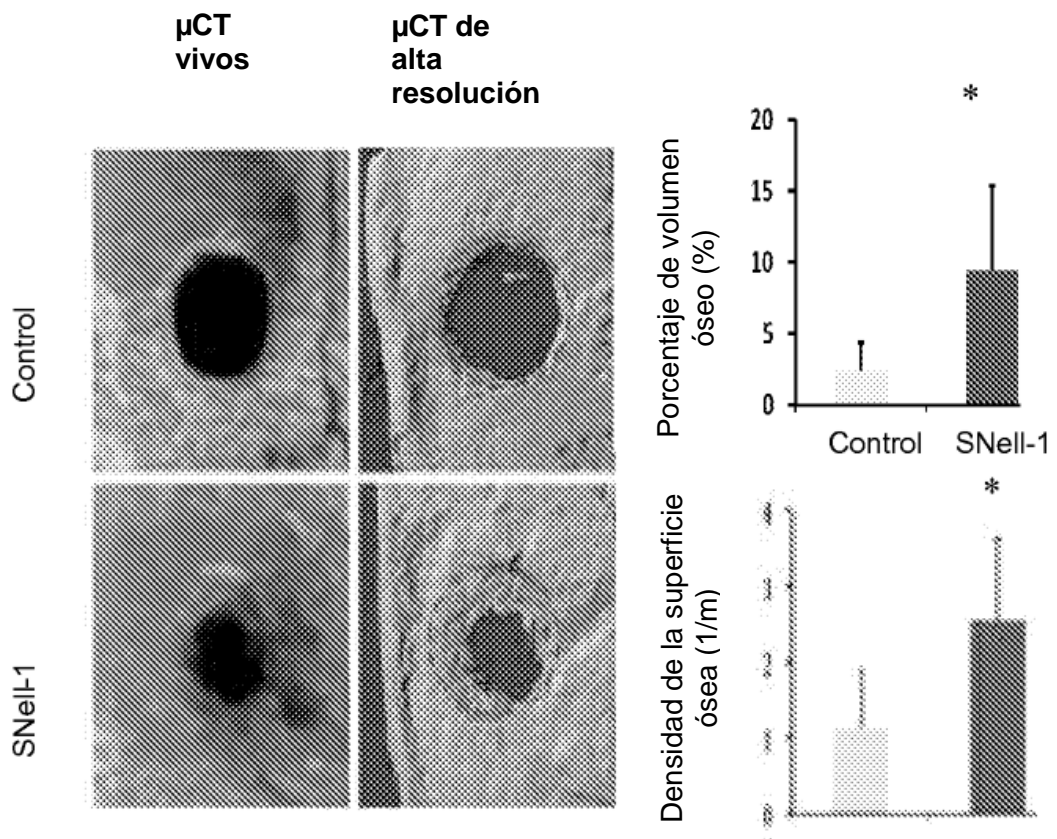


Fig. 5

Secuencia de la proteína SNELL-1 [Homo sapiens] (SEQ ID NO:1)

MDLQELLAKMTAKLNVAETRLSLENCHCEKTCQVSGLLYRDQDSWVDGDHCRNCTCKSGAVECRRMSCPPLNC
SPDSLVPVHIAGQCCKVCRPKCIYGGKVLAEQQRILTKSCRECRGGVLVKITEMCPPLNCSEKDHIIPENQCCRV
CRGHNFCAGPKCGENSECKNWNKATCECKSGYISVQGDSAYCEDIDECAAKMHYCHANTVCVNLPLGLYRDCD
VPGYIRVDDFSCTEHDECGSGQHNCDENAICTNTVQGHSCCKPGYVGNGTICRAFCEEGCRYGGTCVAPNKCV
CPSGFTGSHCEKDIDECSEGIIECHNHSRCVNLPGWYHCECRSGFHDDGTYSLSGESCIDIDECALRHTTCWND
SACINLAGGFDCPCSPGSCSGDCPHEGGLKHNGQVWTLKEDRCSVCSCKDGKIFCRRTACDCQNPSADLFCCP
ECDTRVTSQCLDQNGHKLYRSGDNWTHSCQQCRCLEGEVDCWPLTCPNLSCEYTAILEGECCPRCVSDPCLADN
ITYDIRKTCLDSYGVSRLSGVSVMAGSPCTTCKCKNGRVCCSVDFECLQNN

Figura 6A

Secuencia del DNA de SNELL-1 (CDS) [homo sapiens] (SEQ ID NO:2)

ATGGATTTACAAGAGCTTTTGGCCAAGATGACTGCAAAACTAAATTATGCAGAGACAAGACTTAGTCAATTGGA
AAACTGTCATTGTGAGAAGACTTGTCAAGTGAGTGGACTGCTCTATCGAGATCAAGACTCTGGGTAGATGGTG
ACCATTGCAGAACTGCACTTGCAAAAGTGGTGCCGTGGAATGCCGAAGGATGTCCTGTCCCCCTCTCAATTGC
TCCCCAGACTCCCTCCAGTGCACATTGCTGGCCAGTGTGTAAGGTCTGCCGACCAAAATGTATCTATGGAGG
AAAAGTTCTGCAGAAGGCCAGCGGATTTAACCAAGAGCTGTCGGGAATGCCGAGGTGGAGTTTATAGTAAAA
TTACAGAAATGTGTCCTCCTTTGAACTGCTCAGAAAAGGATCACATTCTTCTGAGAATCAGTGTGCCGTGTC
TGTAGAGGTCATAACTTTTGTGCAGAAGGACCTAAATGTGGTGAAAACCTCAGAGTGCAAAAACCTGGAATACAAA
AGCTACTTGTGAGTGCAAGAGTGGTTACATCTCTGTCCAGGGAGACTCTGCCTACTGTGAAGATATTGATGAGT
GTGCAGCTAAGATGCATTACTGTTCATGCCAATACTGTGTGTGTCAACCTTCTGGGTTATATCGCTGTGACTGT
GTCCCAGGATACATTTCGTGTGGATGACTTCTCTGTACAGAACACGATGAATGTGGCAGCGGCCAGCACAACTG
TGATGAGAATGCCATCTGCACCAACACTGTCCAGGGACACAGCTGCACCTGCAAACCGGGCTACGTGGGGAACG
GGACCATCTGCAGAGCTTTCTGTGAAGAGGGCTGCAGATACGGTGGAACGTGTGTGGCTCCCAACAAATGTGTC
TGTCATCTGGATTACAGGAAGCCACTGCGAGAAAGATATTGATGAATGTTGAGAGGGAATCATTGAGTGCCA
CAACCATTCCCGCTGCGTTAACCTGCCAGGGTGGTACCACCTGTGAGTGCAGAAGCGGTTTCCATGACGATGGGA
CCTATTCACCTGTCCGGGGAGTCCGTATTGACATTGATGAATGTGCCTTAAGAACTCACACCTGTTGGAACGAT
TCTGCCTGCATCAACCTGGCAGGGGGTTTTGACTGTCTCTGCCCTCTGGGCCCTCCTGCTCTGGTGACTGTCC
TCATGAAGGGGGGCTGAAGCACAAATGGCCAGGTGTGGACCTTGAAAAGAAGACAGGTGTTCTGTCTGCTCCTGCA
AGGATGGCAAGATATTCTGCCGACGGACAGCTTGTGATTGCCAGAATCCAAGTGTGACCTATTCTGTTGCCCA
GAATGTGACACCAGAGTCACAAGTCAATGTTTAGACAAAATGGTCACAAGCTGTATCGAAGTGGAGACAATTG
GACCCATAGCTGTGAGAGTGTGCGGTGCTGGAAGGAGAGGTAGATTGCTGGCCACTCACTTGCCCCAACTTGA
GCTGTGAGTATACAGCTATCTTAGAAGGGGAATGTTGTCCCCGCTGTGTGAGTACCCCTGCCTAGCTGATAAC
ATCACCTATGACATCAGAAAAACTTGCTGGACAGCTATGGTGTTCACGGCTTAGTGGCTCAGTGTGGACGAT
GGCTGGATCCCTGCACAACCTGTAATGCAAGAATGGAAGAGTCTGTTGTTCTGTGGATTTTGAAGTGTCTTC
AAAATAATTGA

Figura 6B

Secuencia de la proteína LNELL-1 [Homo sapiens] ((SEQ ID NO:3))

MPMDLILVVWFCVCTARTVVGFGMDPDLQMDIVTELDLVNTTLGVAQVSGMHNASKAFLFQDIEREIHAA
PHVSEKLIQLFRNKSEFTILATVQQKPSTSGVILSIRELEHSYFELESSGLRDEIRYHYIHNGKPRTEAL
PYRMADGQWHKVALSVSASHLLLHVDCNRIYERVIDPPDTNLPPGINLWLGQRNOKHGLFKGIIQDGKII
FMPNGYITQCPNLNHTCPTCSDFLSLVQGIMDLQELLAKMTAKLNYAETRLSQLENCHCEKTCQVSGLLY
RDQDSWVDGDHCRNCTCKSGAVECRRMSCPPLNCSPDSLPHVHIAGQCKVCRPKCIYGGKVLAEGRILT
KSCRECRGGVLVKITEMCPPLNCSEKDHLIPENQCCRVCRGHNFCAEGPKCGENSECKNWNTKATCECKS
GYISVQGDSAYCEDIDECAAKMHYCHANTVCVNLPLGLYRCDVPGYIRVDDFSCTEHDEC GSGQHNC DEN
AICTNTVQGHSTCKPGYVGNGTICRAFCEEGCRYGGTCVAPNKCVCPSGFTGSHCEKDI DECSEGI IEC
HNHSRCVNLPGWYHCECRSGFHDDGTYSLSGESCIDI DECALRTHTCWNDSACINLAGGFDCLCPSGPSC
SGDCPHEGGLKHNGQVWTLKEDRCSVCCKDGKIFCRRTACDCQNPSADLFCCPECDTRVTSQCLDQNGH
KLYRSGDNWTHSCQQCRCLEGEVDCWPLTCPNLSCEYTAILEGECPCRCVSDPCLADNITYDIRKTCLDS
YGVSRLSGSVWTMAGSPCTTCKCKNGRVCCSVDFECLQNN

Figura 7A

Secuencia del DNA de LNELL-1 (CDS) [homo sapiens] (SEQ ID NO:4)

ATGCCGATGGATTTGATTTTAGTTGTGTGGTTCTGTGTGTGCACTGCCAGGACAGTGGTGGGCTTTGGGATGGA
 CCCTGACCTTCAGATGGATATCGTCCACCGAGCTTGACCTTGTGAACACCACCCTTGGAGTTGCTCAGGTGTCTG
 GAATGCACAATGCCAGCAAAGCATTTTTATTTCAAGACATAGAAAAGAGAGATCCATGCAGCTCCCATGTGAGT
 GAGAAATTAATTCAGCTGTTCCAGAACAAGAGTGAATTCACCATTTTGGCCACTGTACAGCAGAAGCCATCCAC
 TTCAGGAGTGATACTGTCCATTCGAGAAGTGGAGCACAGCTATTTTGAAGTGGAGAGCAGTGGCCTGAGGGATG
 AGATTCGGTATCACTACATACACAATGGGAAGCCAAGGACAGAGGCACTTCCTTACCGCATGGCAGATGGACAA
 TGGCACAAGGTTGCAGTGTGAGTGTAGCGCCTCTCATCTCCTGCTCCATGTGACTGTAACAGGATTTATGAGCG
 TGTGATAGACCCTCCAGATACCAACCTTCCCCCAGGAATCAATTTATGGCTTGGCCAGCGCAACCAAAAAGCATG
 GCTTATTTCAAAGGGATCATCCAAGATGGGAAGATCATCTTTATGCCGAATGGATATATAACACAGTGTCCAAAT
 CTAATCACACTTGCCCAACCTGCAGTGATTTCTTAAGCCTGGTGCAAGGAATAATGGATTTACAGAGCTTTT
 GGCCAAGATGACTGCAAACTAAATTTATGCAGAGACAAGACTTAGTCAATTTGGAAAAGTGTCTTTGTGAGAAGA
 CTTGTCAAGTGAAGTGGACTGCTCTATCGAGATCAAGACTCTTGGGTAGATGGTGAACATTGCAGGAACTGCAGT
 TGCAAAAAGTGGTCCCGTGGAAATGCCGAAGGATGTCTGTCCCCCTCTCAATTGCTCCCCAGACTCCCTCCAGT
 GCACATTGCTGGCCAGTGTGTAAGTCTGCCGACCAAAATGTATCTATGGAGGAAAAGTCTTGCAGAAGGCC
 AGCGGATTTTAACCAAGAGCTGTTCGGGAATGCCGAGGTGGAGTTTGTAGTAAAAAATTACAGAAAATGTGTCTCCT
 TTGAACTGCTCAGAAAAGGATCACATTTCTTCTGAGAATCAGTGTGCGCTGTCTGTAGAGGTCATAACTTTTG
 TGCAGAAGGACCTAAATGTGGTGAAGTCTCAGAGTGCAGAACTGGAATACAAAAGCTACTTGTGAGTGCAGA
 GTGGTTACATCTCTGTCCAGGGAGACTCTGCCTACTGTGAAGATATTGATGAGTGTGCAGCTAAGATGCATTAC
 TGTCATGCCAATACTGTGTGTGTCAACCTTCTGGGTTATATCGCTGTGACTGTGTCCCAGGATACATTCGTGT
 GGATGACTTCTCTTGTACAGAACACGATGAATGTGGCAGCGGCCAGCACAACCTGTGATGAGAATGCCATCTGCA
 CCAACTGTCCAGGGACACAGCTGCACCTGCAAAACCGGGCTACGTGGGGAAACGGGACCATCTGCAGAGCTTTC
 TGTGAAGAGGGCTGCAGATACGGTGGAAACGTGTGTGGCTCCCAACAAATGTGTCTGTCCATCTGGATTACAGG
 AAGCCACTGCCAGAAAGATATTGATGAATGTTTCAAGGGAAATCATTGAGTGCCACAACCATTCCCGCTGCGTTA
 ACCTGCCAGGGTGGTACCACTGTGAGTGCAGAAGCGGTTTCCATGACGATGGGACCTATTCACTGTCCGGGGAG
 TCCTGTATTGACATTGATGAATGTGCCTTAAGAAGTACACCTGTGGAAACGATTCTGCCTGCATCAACCTGGC
 AGGGGGTTTTGACTGTCTCTGCCCTCTGGGCCCTCTGCTCTGGTGACTGTCTCATGAAGGGGGGCTGAAGC
 ACAATGGCCAGGTGTGGACCTTGAAGAAGACAGGTGTTCTGTCTGCTCCTGCAAGGATGGCAAGATATTCTGC
 CGACGGACAGCTTGTGATTGCCAGAATCCAAGTGTGACCTATTCTGTTGCCCAGAATGTGACACCAGAGTCAC
 AAGTCAATGTTTAGACCAAAATGGTCACAAGCTGTATCGAAGTGGAGACAATTGGACCCATAGCTGTGAGCAGT
 GTCGGTGTCTGGAAGGAGAGGTAGATTGCTGGCCACTCACTTGCCCCAACTTGAGCTGTGAGTATACAGCTATC
 TTAGAAGGGGAATGTTGTCCCCGCTGTGTGAGTGACCCCTGCTAGCTGATAACATCACCTATGACATCAGAAA
 AACTTGCCTGGACAGCTATGGTGTTCACGGCTTAGTGGCTCAGTGTGGACGATGGCTGGATCTCCCTGCACAA
 CCTGTAATGCAAGAAATGGAAGAGTCTGTTGTTCTGTGGATTTTGTGAGTGTCTTCAAATAATTGA

Figura 7B