

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 668**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2007 E 07867154 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2037737**

54 Título: **Proteínas de reparación de la membrana celular, ácidos nucleicos que las codifican y métodos de uso asociados**

30 Prioridad:

11.07.2006 US 830013 P

22.12.2006 US 876871 P

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

24.07.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF
NEW JERSEY (100.0%)
OFFICE OF PATENTS AND LICENSING 1
WORLDS FAIR DRIVE
SOMERSET, NJ 08873, US**

72 Inventor/es:

**MA, JIANJIE;
WEISLEDER, NOAH y
CAI, CHUANXI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 479 668 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de reparación de la membrana celular, ácidos nucleicos que las codifican y métodos de uso asociados

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a polipéptidos, ácidos nucleicos que los codifican, anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a los polipéptidos y métodos de uso asociados.

Antecedentes

10 En respuesta al daño externo y a la degeneración interna, las células del organismo deben reparar la membrana que rodea cada célula individual con el fin de mantener su función y la salud del organismo. Los defectos en la capacidad de la célula para reparar las membranas externas se han vinculado a muchas enfermedades y afecciones patológicas, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas (p. ej., Enfermedad de Parkinson), ataques cardíacos, insuficiencia cardíaca, distrofia muscular, úlceras de decúbito, úlceras diabéticas, daño oxidativo, y lesión tisular tal como sinusitis que se producen como efecto secundario de la administración de agentes quimioterapéuticos. Asimismo, la debilidad y la atrofia musculares asociadas con diferentes enfermedades, así como el proceso de envejecimiento normal, se han vinculado a la reparación de la membrana alterada. Con el fin de que estas células 15 reparen sus membranas en respuesta a lesiones agudas, éstas hacen uso de pequeños paquetes de membrana que están en el interior de la célula, referidos como vesículas. Estas vesículas se encuentran normalmente en el interior de la célula, pero tras la lesión de la membrana celular, estas vesículas se mueven al sitio dañado y forman un parche para mantener la integridad celular. Sin esta función esencial, la célula puede morir y el efecto acumulativo de esta lesión celular puede producir finalmente una disfunción del tejido u órgano.

20 Muchas compañías están interesadas en enfoques para mejorar la capacidad regenerativa de diversos tejidos. Por ejemplo, se espera que solo el mercado de la reparación de heridas supere los 11.000 millones de dólares en 2009. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar moduladores farmacéuticos del proceso de reparación de la membrana celular para el tratamiento de las afecciones relacionadas con la lesión celular y tisular aguda y crónica.

La invención viene definida por las reivindicaciones.

25 Compendio

La presente invención se refiere al descubrimiento sorprendente e inesperado de las proteínas implicadas en la reparación de la lesión de la membrana celular. La invención se refiere en general a ácidos nucleicos, e incluye los polipéptidos codificados a partir de los ácidos nucleicos de la invención. Más específicamente, la memoria 30 descriptiva describe composiciones, por ejemplo, ácidos nucleicos, que son útiles para inhibir la transcripción o la traducción de ácidos nucleicos diana; ácidos nucleicos que codifican polipéptidos citoplásmicos, nucleares, unidos a membrana, y secretados; así como vectores, células anfitrionas, anticuerpos, proteínas recombinantes, pseudopéptidos, proteínas de fusión, compuestos químicos, y métodos para producir los mismos.

35 En ciertos aspectos, la presente invención también se refiere a composiciones útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento y la prevención de enfermedades y trastornos. Las composiciones terapéuticas de la invención comprenden ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos de interferencia, y ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que corresponden a la proteína del SEQ ID NO. 1 (en la presente memoria, "MG53"), polipéptidos de MG53, homólogos y porciones de los mismos, pseudopéptidos de MG53, análogos peptídicos de MG53 y peptidomiméticos de MG53 que tienen una identidad de secuencia de al menos 70% con al menos uno del SEQ ID NO: 1, el SEQ ID NO: 3, el SEQ ID NO: 5 o el SEQ ID NO: 7. Los compuestos que pueden modular la actividad de 40 MG53 o las interacciones intermoleculares implican MG53, y por ejemplo, caveolina-3 (SEQ ID NO. 8). Según se describe en la presente memoria, MG53 media la reparación de la lesión de las membranas celulares, y por lo tanto, el direccionamiento y la modulación de la expresión del gen de MG53, la síntesis de polipéptidos, la actividad o las interacciones proteína a proteína representan una intervención terapéutica novedosa para la reparación de tejidos.

45 Se conocen varias secuencias de MG53 de la técnica anterior. La entrada de la base de datos Geneseq GSP:ADQ67780 Núm. de acceso de la Base de datos ADQ67780 publicada el 7 de Octubre de 2004 describe la secuencia humana. La entrada de la base de datos EMBL:AB231473 Núm. de acceso de la Base de datos AB231473 publicada el 4 de Abril de 2006 describe el ARNm de MG53 de *Oryctolagus cuniculus* para la mitsugumina 53. La entrada de la base de datos EMBL:AB231474 Núm. de acceso de la Base de datos AB231474 publicada el 4 de Abril de 2006 describe el ARNm de MG53 de *Mus musculus* para la mitsugumina 53. Dimple et al., 50 (2004) describen una proteína que tiene una función de reparación de la membrana plasmática en la distrofia muscular (Trends in Cell Biology, vol. 14, núm. 4, Abril 2004, páginas 206-213).

55 En ciertos aspectos la invención se refiere a composiciones relacionadas con el tratamiento del daño tisular. La presente memoria descriptiva describe un método relacionado con el tratamiento del daño tisular. La memoria descriptiva también describe por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz de una composición terapéutica de la invención para promover la curación de heridas; para aliviar un trauma quirúrgico, para el tratamiento y/o la prevención de deficiencias relacionadas con la edad en la reparación de tejidos que se producen como efecto

secundario natural del proceso de envejecimiento; para el tratamiento y/o la prevención de las lesiones de cualquier tipo de tejido muscular, tales como las que se producen en sujetos que padecen enfermedades cardiovasculares y/o lesiones relacionadas con el deporte; así como la reparación y la regeneración de los tejidos corporales a través de la cosmética o el uso del cuidado personal.

- 5 Además, la memoria descriptiva describe ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos de interferencia, y polipéptidos que codifican proteínas que interactúan con MG53, por ejemplo, polipéptidos de caveolina-3 (SEQ ID NO. 8) y homólogos de los mismos; pseudopéptidos y peptidomiméticos; así como compuestos que pueden modular la actividad de la caveolina-3 o sus interacciones intermoleculares con MG53. Por lo tanto, en aspectos adicionales, la presente memoria descriptiva describe métodos para dirigir la expresión del gen de caveolina-3, la actividad y/o las interacciones intermoleculares para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o un trastorno en un sujeto, por ejemplo, para promover la reparación de tejidos como se ha descrito anteriormente.

10 Se proporcionan las áreas de utilidad general precedentes a modo de ejemplo solamente y no se pretende que sean limitantes del alcance de la presente descripción y de las reivindicaciones adjuntas. Los objetos y las ventajas adicionales de la presente invención serán apreciados por un experto en la técnica a la luz de las presentes reivindicaciones, la descripción, y los ejemplos.

15 Breve descripción de los dibujos

FIG. 1: MG53 es un miembro específico de músculo de la familia de proteínas TRIM. Un alineamiento de la secuencia de proteína de MG53 de diferentes organismos (véanse los SEQ ID NO: 1, 3, 5, 9-16) revela que esta proteína es un miembro de la familia TRIM. Los dominios funcionales están recuadrados en color gris mientras las flechas indican que el dominio continúa sobre otra línea de la secuencia.

FIG. 2: Ilustra una comparación de dominios ilustrativa de algunas proteínas homólogas que contienen uno o más motivos tripartitos conservados que están presentes en MG53. MG53 es única en su capacidad para trasladarse al lugar de una lesión de la membrana celular después de múltiples formas de insulto y mediar en la reparación de la membrana dañada - una función que no muestran las otras proteínas de la familia TRIM enumeradas.

25 FIG. 3: MG53 contiene motivos TRIM y SPRY únicos y se expresa de manera predominante en células musculares. A. Diagrama de la estructura motivo de MG53. A partir de los resultados de la clonación del ADNc y las búsquedas de homología, se detectan numerosas secuencias motivo en MG53 que se muestran. Las secuencias de los ADNc de MG53 de conejo y ratón han sido depositadas en las bases de datos con los números de acceso AB231473 y AB231474, respectivamente. B. El análisis de transferencia Western muestra la expresión específica de MG53 en músculos esqueléticos y cardíacos. Se analizaron los productos lisados (20 µg de proteína total por calle) de tejidos de ratón (pulmón, riñón, músculo esquelético, hígado, corazón, cerebro) utilizando anticuerpo policlonal anti-MG53 de ratón. C. Tinción de inmunofluorescencia de las secciones transversales longitudinales de células de músculo esquelético de ratón. La barra de escala es de 125 µm.

35 FIG. 4. Inducción de estructura de tipo filopodio con expresión en exceso de MG53 en células tanto musculares como no musculares A. El análisis de transferencia Western muestra el nivel de expresión en exceso de MG53 en mioblastos C2C12 (*panel de la izquierda*) y células CHO (*panel central*), y también GFP-MG53 y MG53-GFP (*panel de la derecha*) en mioblastos C2C12 (20 g de proteína total por calle). B. Imágenes confocales típicas de CHO (*panel superior*) y mioblastos C2C12 (*panel inferior*) transfectados con GFP (*panel de la izquierda*) o GFP + MG53 (*panel de la derecha*), que revelan estructuras de tipo filopodio después de la expresión en exceso de MG53. La barra de escala es de 5 µm. C. Imágenes confocales de GFP-MG53 (*panel de la izquierda*) y MG53-GFP (*panel de la derecha*) expresado en células CHO (*panel superior*) y mioblastos C2C12 (*panel inferior*), que revelan el direccionamiento a la membrana y la distribución vesicular intracelular de MG53, así como la apariencia de la estructura de tipo filopodio. La barra de escala es de 5 µm. D. Imágenes confocales aumentadas que ilustran las vesículas intracelulares, las vesículas en gemación (*panel de la izquierda*) sobre la membrana plasmática y las vesículas extracelulares (*panel de la derecha*). La barra de escala es de 1 µm.

FIG. 5. MG53 contribuye a la miogénesis de músculo esquelético mediante la regulación de la diferenciación de mioblastos. A. El análisis de transferencia Western muestra la regulación a la baja mediada por ARNhc de MG53 en células CHO. Los productos lisados se prepararon a partir de células CHO transfectadas con un vector de expresión de MG53 y plásmidos de ARNhc o ARNhc desorganizado que dirigían MG53. La inmunotransferencia se realizó con anticuerpo policlonal anti-ratón para MG53 (*panel superior*) o anticuerpo monoclonal para la α -actina (*panel inferior*). B. Imágenes representativas de microscopio de fluorescencia de células C2C12 en diferentes días de la diferenciación (día 0, *panel superior*; Día 5, *panel central*; Día 10, *panel inferior*). Para ilustrar la ausencia de formación de miotubos en las células transfectadas con ARNhc contra MG53 (*panel de la derecha*) en comparación con el ARNhc desorganizado (*panel de la izquierda*). La barra de escala es de 50 µm. C. Análisis estadístico de la regulación de la baja de MG53 que inhibe la formación de miotubos a los 5 días o 10 días (*p <0,01 y **p <0,001 mediante la prueba t) en comparación con el control. La relación de miotubos verdes con respecto a todas las células verdes se definió como el porcentaje de miotubos. Los datos se representan como media con ETM.

FIG. 6. La interacción funcional entre el MG53 y caveolina-3 regula el proceso dinámico de gemación de la membrana en el músculo esquelético. *A.* Análisis de transferencia Western del nivel de expresión de MG53 (*panel superior*), caveolina-3 (*panel central*) y caveolina-1 (*panel inferior*) durante la diferenciación de células C2C12 en el momento indicado después de la inducción de la diferenciación (días 0, 2, 5, 8, 10). *B.* El producto lisado de células completas de músculo esquelético gastrocnemio de ratón se sometió a co-IP con anti-MG53 (anticuerpo policlonal de conejo), anti-caveolina-3 (anticuerpo monoclonal de ratón), IgG de conejo normal como control negativo y producto lisado celular como control positivo. *C.* imágenes confocales para ilustrar la desaparición de las estructuras de tipo filopodio el proceso de formación de los miotubos C2C12 (*panel de la derecha*) en comparación con los mioblastos (*panel de la izquierda*). Obsérvese que las vesículas intracelulares positivas para GFP-MG53 están todavía presentes en los miotubos C2C12 transfectados. *D.* La expresión en exceso de caveolina-3 en células de mioblastos C2C12 impide la formación de estructuras de tipo filopodio inducidas por MG53. Las células CHO (*panel superior*) o las células de mioblastos C2C12 (*panel inferior*) fueron co-transfectadas con pCADN-Cav-3 y GFP-MG53 (10:1) (*panel de la derecha*), o co-transfectadas con el vector pcADN y GFP-MG53 (10:1) como control (*panel de la izquierda*). Las imágenes confocales se tomaron 48 horas después de la transfección. La barra de escala es de 10 μ m. *E* y *F.* Análisis estadístico para *C* y *D.* La proporción de células que muestran estructuras de tipo filopodio para todas las células de color verde se definió como el porcentaje de estructura de tipo filopodio. Los datos se representan como la media con ETM. (* $p < 0,01$ mediante la prueba t).

FIG. 7. La supresión mediada por ARNhc de la expresión de la caveolina-3 afecta a la formación de miotubos. *A.* El nivel de regulación a la baja de la caveolina-3 se analizó mediante transferencia Western después de la transfección con el plásmido de ARNhc de caveolina-3 en miotubos C2C12 (6 días después de la diferenciación). Las células transfectadas con el plásmido de ARNhc desorganizado actuaron como control. *B.* La regulación a la baja de la caveolina-3 (*panel de la derecha*) por ARNdh inhibe la formación de miotubos en comparación con el ARNhc de control (*panel de la izquierda*). La fluorescencia de color rojo indica las células transfectadas. Las imágenes de microscopía de fluorescencia se tomaron 6 días después de la inducción de la diferenciación. La barra de escala es de 20 μ m. *C.* El análisis estadístico muestra que la regulación a la baja de la caveolina-3 inhibe significativamente la formación de miotubos a los 6 días (* $p < 0,001$ mediante la prueba t) en comparación con el control. La razón de miotubos fluorescentes de color rojo con respecto a todas las células fluorescentes de color rojas sirvió como el porcentaje de miotubos. Los datos se representan como media con ETM. *D.* Las imágenes confocales de los mioblastos C2C12 con expresión simultánea tanto de GFP-MG53 como del ARNhc de caveolina-3 (*panel de la derecha*) no revela ningún efecto sobre las estructuras de tipo filopodio inducidas por GFP-MG53 o sobre la distribución de GFP-MG53 en comparación con el ARNhc de control (*panel de la izquierda*). La barra de escala es de 5 μ m.

FIG. 8. El tratamiento de las células con metil- β -ciclodextrina conduce a un aumento de la exocitosis y la solubilización de GFP-MG53 en mioblastos C2C12. *A.* Imágenes confocales representativas que ilustran la fusión espontánea de vesículas y la gemación de la membrana en los momentos indicados (0 minutos, *panel de la izquierda*; 15 minutos, *panel de la derecha*). La barra de escala es de 5 μ m. *B.* Imágenes confocales que ilustran la gemación vesículas inducida por GFP-MG53 de la membrana rápidamente después del tratamiento con 10 mM de M- β CD en los momentos indicados (0 segundos, *panel de la izquierda*; 16 segundos, *panel central*; 32 segundos, *panel de la derecha*). *C.* Imágenes confocales para mostrar la solubilización de GFP-MG53 después del tratamiento prolongado con M- β CD 10 mM a temperatura ambiente durante 1 hora (*panel de la derecha*) en comparación con la misma célula antes del tratamiento (*panel de la izquierda*). La barra de escala es de 5 μ m.

FIG. 9. Los ratones con el gen de MG53 desactivado son susceptibles de lesión cardíaca. Las secciones incluidas en parafina de miocardio de ratones de tipo salvaje no ejercitados presentan una morfología normal (*izquierda*) y no presentan tinción de azul de Evans (*derecha*). En contraste, los ratones *mg53*^{-/-} presentan una infiltración de azul de Evans en los miocitos, lo que indica que hay defectos significativos en la integridad de la membrana en el corazón *mg53*^{-/-}.

FIG. 10. Se observa patología progresiva en músculo esquelético *mg53*^{-/-} debido al aumento del daños de las membranas celulares. *A.* La tinción con hematoxilina y eosina (H/E) ilustra el aumento del número de núcleos centrales (*flechas*) en el músculo *mg53*^{-/-} envejecido (10m) frente a ratones de tipo salvaje (*wt*) jóvenes (3m) o *mg53*^{-/-}. *B.* El diámetro de las fibras musculares en ratones *mg53*^{-/-} de edad avanzada (8-10 meses) (*azul*, n = 541) se redujo en comparación con controles de tipo salvaje de edad avanzada (8-10 meses) (*negro*, n = 562) mientras que no hay diferencia en músculo joven (3-5 meses) *wt* (N = 765) frente a *mg53*^{-/-} (N = 673). El porcentaje de fibras musculares que muestran núcleos centrales en músculo esquelético *mg53*^{-/-} aumenta con la edad cuando se compara con *wt*. Los datos son la media \pm etm, * $p < 0,05$ mediante ANOVA. *C.* Los registros del rastro del rendimiento contráctil del músculo sóleo intacta obtenidos de ratones sometidos a 30 minutos ejercicio consecutivo cuesta abajo se evaluaron mediante un protocolo de estimulación con voltaje *in vitro*, siguiendo los procedimientos descritos. El rastro de color negro representa el músculo *wt*, el rastro de color azul corresponde al músculo *mg53*^{-/-}. *D.* Antes de la estimulación de la fatiga (**Pre**, barras de color blanco), la fuerza tetánica máxima, normalizada en g/mg de proteína total, fue significativamente menor en el músculo *mg53*^{-/-} envejecido (*azul*) frente a *wt* (*negro*) (n = 4). A los 6 minutos de la estimulación de la fatiga (**Después**, barras de color negro), el músculo *wt* se recuperó significativamente más que el músculo *mg53*^{-/-}. * $p < 0,05$ mediante ANOVA. *E.* La amplia tinción de azul de Evans

revela daño severo en músculo esquelético *mg53*^{-/-} sometido a carrera cuesta abajo en comparación con la tinción mínima en los músculos wt. *F.* Gráfico de la cantidad de colorante azul de Evans extraído mediante formamida de músculo esquelético envejecido *mg53*^{-/-} (azul) y wt (negro) después del ejercicio. Los datos representan el valor medio de azul de Evans (ng) por gramo de músculo ± etm, n = 8-12, **p* < 0,005 mediante la prueba t de Student.

5 FIG. 11. La ablación de MG53 conduce a la función de reparación de la membrana muscular defectuosa. (a) Inmunotinción de MG53 en fibras FDB wt aisladas para ilustrar su localización simultánea en la zona de la lesión. Estas son imágenes representativas de >20 fibras musculares diferentes que presenten daños durante el aislamiento. (b) Exclusión del colorante fluorescente FM-143 impermeable a la membrana en fibras musculares FDB aisladas de los ratones control wt después del daño inducido por láser de la membrana del sarcolema. (c) Entrada de colorante fluorescente FM-143 en una fibra muscular FDB aislada de los ratones *mg53*^{-/-} después del daño inducido por láser. Se indicaron los tiempos después de la lesión con láser. (d) Acumulación dependiente del tiempo de FM-143 dentro de la fibra muscular FDB inducida por una lesión por láser de la membrana del sarcolema. Los datos son las medias ± etm para n = 30 fibras obtenidos de ratones wt y n = 18 fibras de ratones *mg53*^{-/-}.

15 FIG. 12. Las MG53 que contienen vesículas forman un parche en la membrana plasmática tras una agresión física. A. El daño de una membrana de mioblastos C2C12 utilizando una micropipeta conduce a la rápida acumulación de GFP-MG53 en el sitio de la lesión (flecha). Las imágenes eran representativas de n = 40 células separadas. B. La recuperación de un miotubo C2C12 maduro en respuesta a un daño grave, p. ej., separación de la membrana celular, se asocia con el reclutamiento de GFP-MG53 hacia el sitio de curación (n = 28).

20 FIG. 13. Papel de los dominios TRIM y SPRY en el direccionamiento de MG53 a la membrana de la superficie celular de las células musculares. A. Esquema de los constructos de la proteína de fusión de delección de MG53 con GFP fusionado al extremo N o extremo C. Con referencia al SEC ID NO: 1, "TRIM" representa los aa 1-287 y "SPRY" representa los aa 288-477 e incluye los motivos PRY y SPRY. B. imágenes confocales representativas que muestran la localización intracelular de cada constructo de delección en células C2C12. La barra de escala es de 5 µm. C. MG53 interactúa con la caveolina-3 a través del motivo TRIM. El producto lisado celular de células CHO transfectadas simultáneamente con GFP-MG53 o GFP-TRIM y pcADN-Cav-3 se sometió a IP con anti-caveolina-3 (anticuerpo monoclonal de ratón). (Calle 1, producto lisado de células mixtas como control positivo; Calle 2, IgG de ratón normal como control negativo; Calle 3, producto lisado de células que expresan GFP-MG53, Calle 4, producto lisado de células que expresan en exceso GFP-TRIM).

25 FIG. 14. Papel de los dominios TRIM y SPRY en el direccionamiento de MG53 a la membrana de la superficie celular en células CHO no musculares. Imágenes confocales representativas que muestran que GFP-MG53 exhibe vesículas intracelulares, direccionamiento a la membrana y gemación, sin embargo MG53-GFP es principalmente soluble en la naturaleza (*panel superior*); SPRY-GFP y GFP-SPRY son citosólicos (*panel central*); TRIM-GFP y GFP-TRIM están principalmente en vesículas intracelulares, y no se dirigen a la membrana plasmática (*panel inferior*). "TRIM" representa los aa 1-287 y "SPRY" representa los aa 288-477 e incluye los motivos PRY y SPRY. La barra de escala es de 5 µm.

30 FIG. 15. Purificación de constructos de TAT-MG53 recombinante y mutante. (a) Representación del constructo de proteína recombinante TAT-MG53 y constructos de delección asociados. (b) Tinción con azul de Coomassie de un gel desnaturante que muestra las etapas de purificación para TAT-MG53. Las calles de gel se cargaron con un marcador de peso molecular (M), sobrenadante de *E. coli* (Sup), flujo directo de la columna de inmunoafinidad (FT), flujo directo de lavado (W1,2) y fracciones de elución (E1-5). (c) gel desnaturante teñido con Coomassie de las proteínas TAT-MG53 mutantes recombinantes aisladas de *E. coli*.

35 Fig. 16: Se generaron líneas celulares HEK293 (Riñón embrionario Humanas) estables que expresaban RFP-MG53. (a) Líneas celulares que expresan de forma estable una proteína de control RFP (proteína fluorescente roja) que muestra un patrón de expresión citosólico. (b) La lesión de las células HEK293 que expresan RFP sólo con un microelectrodo no produce translocación de RFP al sitio de la lesión (*flecha*). Se produce cierto blanqueamiento de la fluorescencia por RFP a partir de la entrada excesiva de tampón extracelular (*). (c) Las células HEK293 que están expresando establemente RFP-MG53 muestran la localización para las vesículas intracelulares. (d) La lesión de las células HEK293 que expresan RFP-MG53 da como resultado la translocación masiva de MG53 al sitio de la lesión (*flecha*) en menos de 90 segundos. La entrada limitada de tampón en la célula por la rápida reparación de la membrana plasmática evita la decoloración de la fluorescencia por RFP-MG53.

50 FIG. 17: TAT-MG53 humana recombinante (Véase la proteína TAT de VIH-1, SEC ID NO: 17) puede penetrar en las células de diferentes orígenes. Se incubaron cardiomiocitos HL-1 y fibroblastos 3T3 con 4 o 8 µg/ml de TAT-MG53 recombinante humana durante 15 minutos a 37°C. Las células se lavaron tres veces en una solución salina tamponada y a continuación se lisaron para el análisis de transferencia de Western. La transferencia Western muestra que las células de control (*control*) no contienen MG53 endógena, sin embargo las incubadas con TAT-MG53 contienen abundante TAT-MG53 intracelular. Obsérvese que TAT-MG53 es ligeramente más grande que MG53 visualizada a partir de extracto de músculo esquelético (*músculo*) debido a la adición del péptido TAT que penetra la célula a la proteína.

Figura 18: Expresión recombinante de MG53. (A) gel teñido con azul de Coomassie de fracciones de proteína MG53 humana recombinante (*flecha*) aisladas de células Sf9 con una columna de Ni-NTA. Entrada = extracto celular, FT = flujo directo, M = marcador, E = índice de elución. (b) gel teñido con azul de Coomassie de TAT-MG53 humana recombinante (*flecha*) aislada de células Sf9. (c) gel teñido con azul de Coomassie de TAT-MG53 recombinante de ratón (*flecha*) aislada de *E. coli*.

FIG. 19: MG53 interactúa con las membranas celulares a través de una asociación con fosfatidilserina para mediar en el tráfico vesicular. (A) El análisis de transferencia puntual de la banda con lípido PIP₂ revela que MG53 recombinante (1 µg/ml) se une específicamente a fosfatidilserina (PS) y no a otros lípidos de la membrana, incluyendo esfingosina-1-P, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y diversos metabolitos de fosfoinositol. (B) La Anexina-V-GFP (una molécula con capacidad bien definida para unirse a PS) transfectada a mioblastos C2C12 (*izquierda*) muestra la translocación mínima siguiente a la herida de la célula con un microelectrodo (*flecha*), mientras que la expresión simultánea de la Anexina-V-GFP con RFP-MG53 (*derecho*) da como resultado la acumulación acelerada de Anexina V-GFP. Los datos representan la media ± ETM (n = 10). * *p* < 0,01 mediante la prueba t de Student.

FIG. 20: Ilustración que demuestra la hipótesis actual de los autores de la presente invención en el mecanismo de reparación de la membrana mediado por MG53. Aunque no se está limitado a ninguna teoría en particular, la evidencia experimental indica que MG53 se localiza probablemente a la superficie interna de la membrana plasmática debido a su asociación con las vesículas que contienen fosfatidilserina. En condiciones normales MG53 es probablemente monomérica y secuestrada proximal a la superficie de la membrana debido a las asociaciones con la caveolina-3. Tras el daño a la membrana celular, MG53, que normalmente está en su forma reducida, se expone a un entorno oxidativo localizado que desencadena la formación de puentes disulfuro cruzados y oligomerización de MG53 intermolecular. La oligomerización de MG53 reúne vesículas que contienen fosfatidilserina en el lugar del daño. Las vesículas lipídicas son capaces a continuación de parchear la membrana dañada - probablemente mediado por simples fuerzas hidrófobas.

Descripción detallada

La presente invención proporciona nuevos nucleótidos y polipéptidos codificados por los mismos. Se incluyen en la invención nuevas secuencias de ácidos nucleicos y sus polipéptidos codificados. Las secuencias son referidas colectivamente en la presente memoria como "ácidos nucleicos de MG53" o "polinucleótidos de MG53" y los correspondientes polipéptidos codificados son referidos como "polipéptidos de MG53" o "proteínas de MG53". A menos que se indique lo contrario, se pretende que "MG53" se refiera a cualquiera de las nuevas secuencias descritas en la presente memoria.

La reparación de la membrana dinámica es esencial no solo para el mantenimiento a largo plazo de la integridad celular, sino también para la recuperación de la lesión celular aguda. Los defectos de reparación de la membrana se han vinculado a numerosos estados de enfermedad incluyendo la distrofia muscular, la insuficiencia cardíaca y la neurodegeneración. La reparación de la membrana celular requiere el tráfico vesicular intracelular que está asociado con la acumulación de vesículas en la membrana plasmática.

La presente invención se refiere al descubrimiento de que la fusión vesicular durante la reparación de la membrana aguda es impulsada por la mitsugumina 53 (MG53) (SEQ ID NO. 1), un nueva proteína de la familia de motivos tripartitos (TRIM) específica de músculo. La expresión MG53 es necesaria para permitir el tráfico de vesículas intracelulares y la fusión con la membrana plasmática. La lesión aguda de la membrana celular conduce al reclutamiento de vesículas que contienen MG53 para parchear la membrana en el lugar de la lesión. Las células que son nulas para MG53 muestran defectos en la reparación de la membrana en respuesta a múltiples tensiones, incluyendo la lesión inducida por láser, el daño muscular inducido por el ejercicio, y la recuperación comprometida de la función contráctil del músculo después de la fatiga. De este modo, MG53 es un componente crítico de los eventos de tráfico vesicular que subyace a la reparación y remodelación agudas de las membranas celulares.

La invención se basa en parte en el descubrimiento de secuencias de ácidos nucleicos que codifican nuevos polipéptidos. Los nuevos ácidos nucleicos y polipéptidos se denominan en la presente memoria como ácidos nucleicos y polipéptidos de MG53.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico de MG53 aislada que codifica un polipéptido de MG53 que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos una identidad de 70% con los ácidos nucleicos descritos en los SEQ ID NO: 2, 4, y 6, como se define en las reivindicaciones. En ciertos aspectos la molécula de ácido nucleico de MG53 aislada hibridará en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico complementaria a una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia que codifica una proteína de una secuencia de ácido nucleico de MG53. La descripción también incluye un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de MG53, o un fragmento, homólogo, análogo, proteína de fusión, pseudopéptido, peptidomimético o derivado del mismo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar un polipéptido con una identidad de al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% con un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NOS: 1, 3, 5, y 7. El ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un fragmento de ADN genómico o una

molécula de ADNc que incluye la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de los SEQ ID NO: 2, 4, y 6.

También se describe en la memoria descriptiva un oligonucleótido, p. ej., un oligonucleótido que incluye al menos 6 nucleótidos contiguos de un ácido nucleico de MG53 (p. ej., SEQ ID NO: 2, 4, y 6) o un complemento de dicho oligonucleótido.

- 5 También se describen en la memoria descriptiva polipéptidos de MG53 sustancialmente purificados (SEQ ID NO: 1, 3, 5, y 7). En ciertos aspectos, los polipéptidos de MG53 incluyen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de MG53 humano.

La memoria descriptiva también describe anticuerpos que se unen inmunoselectivamente a polipéptidos de MG53, o fragmentos, homólogos, análogos, pseudopéptidos, peptidomiméticos o derivados de los mismos.

- 10 En otro aspecto, la invención incluye composiciones farmacéuticas que incluyen cantidades terapéuticamente o profilácticamente eficaces de un agente terapéutico y un portador farmacéuticamente aceptable. El agente terapéutico puede ser un polipéptido como se define en las reivindicaciones 1-7. En un aspecto adicional, la invención incluye, en uno o más recipientes, una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de esta composición farmacéutica.

- 15 En un aspecto adicional, la memoria descriptiva describe un método de producción de un polipéptido mediante el cultivo de una célula que incluye un ácido nucleico de MG53 expresado endógenamente o exógenamente, en condiciones que permiten la expresión del polipéptido de MG53 codificado por el ADN. Si se desea, se puede recuperar después el polipéptido de MG53.

- 20 En otro aspecto más, la memoria descriptiva describe un método para producir un polipéptido mediante el cultivo de una célula que contiene un ácido nucleico de MG53 endógeno dispuesto aguas arriba o aguas abajo de un promotor exógeno. En particular, el promotor exógeno se incorpora al genoma de una célula anfitriona por medio de recombinación homóloga, rotura de la hebra o mecanismos de reparación de emparejamientos erróneos.

- 25 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un método para detectar la presencia de un polipéptido de MG53 en una muestra. En el método, una muestra se pone en contacto con un compuesto que se une selectivamente al polipéptido en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el polipéptido y el compuesto. El complejo se detecta, si está presente, identificando de este modo el polipéptido de MG53 dentro de la muestra.

- 30 La memoria descriptiva también describe métodos para identificar los tipos de células o tejidos específicos basándose en su expresión de un ácido nucleico de MG53, polipéptido o polipéptido de fusión de MG53. Por ejemplo, la presente memoria descriptiva describe proteínas de fusión que comprenden una "etiqueta" o porción indicadora y una porción de MG53. En ciertos aspectos la etiqueta o porción indicadora puede ser un péptido adaptado con fines de purificación, por ejemplo, etiqueta FLAG, etiqueta 6xHis, o similares. En otros aspectos, el péptido etiqueta comprende un péptido adaptado para proporcionar una señal tal como un epítipo de anticuerpo o un péptido fluorescente. Otros aspectos más incluyen la fusión de MG53 con un péptido que está adaptado para mediar la localización subcelular o la translocación a través de una membrana celular, por ejemplo, una proteína de fusión TAT del virus VIH.
- 35

También se describe en la memoria descriptiva un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de MG53 en una muestra poniendo en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico o cebador de MG53, y detectando si la sonda de ácido nucleico o el cebador se unen a una molécula de ácido nucleico de MG53 en la muestra.

- 40 En un aspecto adicional, la memoria descriptiva describe un método para modular la actividad de un polipéptido de MG53 poniendo en contacto una muestra celular que incluye el polipéptido de MG53 con un compuesto que se une al polipéptido de MG53 en una cantidad suficiente para modular la actividad de dicho polipéptido. El compuesto puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, tal como un ácido nucleico, péptido, polipéptido, peptidomimético, hidrato de carbono, lípido u otra molécula orgánica (que contiene carbono) o inorgánica, como se describe adicionalmente en la presente memoria.
- 45

- También se encuentra dentro del alcance de la invención el uso de un agente terapéutico de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir trastornos o síndromes que incluyen, p. ej., enfermedad cardiovascular, cardiomiopatía, aterosclerosis, hipertensión, defectos congénitos del corazón, estenosis aórtica, defecto atrial septal (ASD), defecto del canal auriculoventricular (AV) ductus arterioso, estenosis pulmonar, estenosis subaórtica, defecto ventricular septal (VSD por sus siglas en inglés), enfermedades de las válvulas, hipercoagulabilidad, hemofilia, úlceras, heridas, lesiones, cortes, abrasiones, daño oxidativo, degeneración de tejidos relacionada con la edad, lesiones relacionadas con la cirugía, quemaduras, debilidad muscular, atrofia muscular, trastornos del tejido conectivo, púrpura trombocitopénica idiopática, insuficiencia cardíaca, patologías secundarias causadas por insuficiencia cardíaca e hipertensión, hipotensión, angina de pecho, infarto de miocardio, esclerosis
- 50
- 55 tuberosa, esclerodermia, trasplante, enfermedades autoinmunitarias, lupus eritematoso, infecciones

virales/bacterianas/parasitarias, esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunitarias, alergias, inmunodeficiencias, enfermedad de injerto contra anfitrión, asma, enfisema, ARDS, inflamación y modulación de la respuesta inmunitaria, patogénesis viral, trastornos relacionados con el envejecimiento, enfermedades inflamatorias Th1 tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias intestinales, SIDA, reparación de heridas, ataques cardíacos, insuficiencia cardíaca, distrofia muscular, úlceras de decúbito, úlceras diabéticas, daño oxidativo, y daños en los tejidos, tales como la sinusitis o la mucositis, arrugas, eccema o dermatitis, piel seca, obesidad, diabetes, trastornos endocrinos, anorexia, bulimia, estenosis de la arteria renal, nefritis intersticial, glomerulonefritis, enfermedad renal poliquistica, acidosis tubular renal sistémica, nefropatía por IgA, enfermedades nefrológicas, hipercalcemia, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL), trauma, regeneración (in vitro e in vivo), enfermedad de Hirschsprung, enfermedad de Crohn, apendicitis, endometriosis, laringitis, psoriasis, queratosis actínica, acné, crecimiento/pérdida del cabello, alopecia, trastornos de la pigmentación, miastenia gravis, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, otros trastornos de almacenamiento, enfermedades peroxisomales como el síndrome de Zellweger, la enfermedad de Refsum infantil, condrodisplasia rizomélica (condrodisplasia punctata, rizomélica) y acidemia hiperpipecólica, osteoporosis, trastornos musculares, retención urinaria, Osteodistrofia Hereditaria de Albright, úlceras, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, parálisis cerebral, epilepsia, síndrome de Lesch-Nyhan, esclerosis múltiple, ataxia-telangiectasia, trastornos del comportamiento, adicción, ansiedad, dolor, neuroprotección, Accidente cerebrovascular, afaquia, trastornos neurodegenerativos, trastornos neurológicos, defectos de desarrollo, afecciones asociadas con el papel de GRK2 en el cerebro y en la regulación de los receptores de quimioquinas, encefalomiелitis, ansiedad, esquizofrenia, depresión maníaca, delirio, demencia, retraso mental grave y discinesias, síndrome de Gilles de la Tourette, leucodistrofias, cánceres, cáncer de mama, cáncer de SNC, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de próstata, neuroblastoma, y cáncer de cuello uterino, Neoplasia; adenocarcinoma, linfoma; cáncer de útero, hipertrofia prostática benigna, fertilidad, control del crecimiento y funciones relacionadas con el desarrollo/diferenciación tales como, pero no limitadas a maduración, lactancia y pubertad, mal funcionamiento reproductivo, y/u otras patologías y trastornos o similares.

La composición terapéutica de la invención comprende, en ciertas realizaciones, por ejemplo, un ácido nucleico de MG53; un ácido nucleico que se une a un ácido nucleico que codifica MG53; polipéptidos de MG53, análogos de péptidos, pseudopéptidos o peptidomiméticos basados en los mismos. La presente memoria descriptiva describe también un modulador de molécula pequeño de MG53 o una interacción proteína-proteína de MG53; o un anticuerpo específico de MG53 o derivados o fragmentos biológicamente activos del mismo. Según se describe en la presente memoria, MG53 media en la reparación del daño a las membranas celulares. Por lo tanto, el redireccionamiento de la expresión y/o la actividad de estos ácidos nucleicos; polipéptidos, y homólogos de los mismos permitirá un nuevo tratamiento de diversas enfermedades y afecciones agudas y crónicas relacionadas con la reparación de tejidos.

En otros ciertos aspectos, la memoria descriptiva describe métodos para el tratamiento o la mejora del daño tisular y/o trastornos relacionados con el daño tisular que comprenden administrar una cantidad eficaz de la composición que se describe en la presente memoria a un sujeto que lo necesita. En particular, la memoria descriptiva describe métodos para el tratamiento del daño tisular o heridas, por ejemplo, cortes, abrasiones, lesiones, úlceras, quemaduras, úlceras de decúbito, enfermedades de las encías, mucositis, y similares, que comprenden administrar una cantidad eficaz de la composición terapéutica descrita en la presente memoria a un sujeto que lo necesita.

La presente memoria describe adicionalmente composiciones terapéuticas útiles como un coadyuvante quirúrgico. En particular, la composición de adyuvante quirúrgico descrita en la presente memoria se puede utilizar o aplicar como un agente terapéutico solo directamente al sitio de la cirugía o se puede asociar de manera integral a un instrumento quirúrgico o médico, por ejemplo, el agente terapéutico descrito en la presente memoria se puede conjugar con un dispositivo intraluminal con una base de polímero, un tubo u otro dispositivo implantable, de manera que el agente terapéutico se difunde al lugar de acción de una forma controlada para acelerar la curación y/o para minimizar el trauma de un procedimiento quirúrgico invasivo. En otro aspecto, la composición terapéutica descrita en la presente memoria se aplica como, por ejemplo, una película o recubrimiento al instrumento médico de manera que el agente terapéutico se difunde al torrente sanguíneo o los tejidos circundantes y/o se desgasta, y de ese modo se libera directamente en el lugar del daño tisular; minimizando o aliviando la cantidad de daño celular que se produce debido al uso del instrumento quirúrgico.

En otros aspectos más, la memoria descriptiva describe métodos para el tratamiento y/o la prevención de deficiencias en la reparación de tejidos que se producen como un efecto secundario natural del proceso de envejecimiento (p. ej., rejuvenecimiento de la piel, retracción de las encías, degeneración ósea, artritis, Alzheimer, Parkinson, y similares). En ciertos aspectos, la presente memoria descriptiva describe la administración de una cantidad eficaz de una composición terapéutica como se describe en la presente memoria a un sujeto que padece deficiencias relacionadas con la edad en la capacidad de reparación de tejidos, la integridad del tejido, y/o la elasticidad del tejido. En particular, la deficiencia relacionada con la edad es al menos una de arrugas, patas de gallo, líneas de expresión, cicatrices deprimidas, cicatrices, fibromas, manchas solares, y similares, o combinaciones de los mismos.

Además, debido a la naturaleza específica del músculo de la expresión del gen de MG53 endógeno, la memoria descriptiva describe métodos para el tratamiento y/o la prevención de cualquier tipo de lesión de células/tejidos musculares o vasculares, por ejemplo, la lesión tisular que se produce como resultado de la enfermedad cardiovascular, por ejemplo, infarto de miocardio; o actividad física rigurosa, por ejemplo, lesiones relacionadas con el deporte, que comprenden administrar una cantidad eficaz del agente terapéutico descrito en la presente memoria a un sujeto que lo necesita.

En otras realizaciones más, la invención comprende una composición cosmética útil para la reparación, regeneración, o la restauración de tejidos corporales que comprende el agente terapéutico de la invención y un portador o excipiente adecuado como cosmético. En particular, la memoria descriptiva describe un método de mejora del aspecto de la piel que comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición terapéutica descrita en la presente memoria en un cosmético a un sujeto.

En cualquier aspecto de la invención, la composición terapéutica descrita en la presente memoria puede estar en cualquier forma farmacéuticamente aceptable y se puede administrar mediante cualquier ruta farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, la composición terapéutica se puede administrar en forma de dosificación oral, ya sea un única dosis diaria o una forma de dosificación unitaria, para el tratamiento del daño muscular debido a un infarto de miocardio, una lesión esclerótica o un desgarro muscular debido a la actividad relacionada con el deporte para promover la regeneración y reparación del tejido muscular dañado. Tales portadores y excipientes y métodos de administración farmacéuticamente aceptables serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Además, la presente memoria descriptiva describe ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos de interferencia, y polipéptidos que codifican proteínas que interactúan con MG53, por ejemplo, polipéptidos de caveolina-3 (SEQ ID NO: 8) y homólogos de los mismos; pseudopéptidos y peptidomiméticos; así como compuestos que pueden modular la actividad de la caveolina-3 o sus interacciones intermoleculares con MG53. Por lo tanto, en aspectos adicionales, la presente memoria descriptiva describe métodos para el redireccionamiento de la expresión del gen de la caveolina-3, la actividad, y/o las interacciones intermoleculares para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o trastorno en un sujeto, por ejemplo, para promover la reparación de tejidos como se ha descrito previamente.

Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente memoria tendrán eficacia para el tratamiento de pacientes que padecen las enfermedades y trastornos descritos anteriormente y/u otras patologías y trastornos similares. Los polipéptidos se pueden utilizar como inmunógenos para producir anticuerpos como se describe en la presente memoria, y como vacunas. También se pueden utilizar escrutar compuestos agonistas y antagonistas potenciales. Además, un ADNc que codifica MG53 puede ser útil en terapia génica, y MG53 puede ser útil cuando se administra a un sujeto que lo necesita. A modo de ejemplo no limitante, las composiciones descritas en la presente memoria tendrán eficacia para el tratamiento de pacientes que padecen las enfermedades y trastornos descritos anteriormente y/u otras patologías y trastornos similares.

La memoria descriptiva describe adicionalmente un método para escrutar un modulador de los trastornos o síndromes que incluyen, p. ej., las enfermedades y trastornos descritos anteriormente y/o otras patologías y trastornos similares. El método incluye poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido de MG53 y determinar si el compuesto de ensayo se une a dicho polipéptido de MG53. La unión del compuesto de ensayo al polipéptido de MG53 indica que el compuesto de ensayo es un modulador de la actividad, o de la latencia o predisposición a los trastornos o síndromes mencionados anteriormente.

También se describe en la memoria descriptiva un método para el escrutinio de un modulador de la actividad, o de la latencia o predisposición a trastornos o síndromes que incluyen, por ejemplo, las enfermedades y trastornos descritos anteriormente y/u otras patologías y trastornos similares mediante la administración de un compuesto de ensayo a un animal de ensayo que tiene un mayor riesgo de los trastornos o síndromes mencionados anteriormente. El animal de ensayo expresa un polipéptido recombinante codificado por un ácido nucleico de MG53. La expresión o actividad del polipéptido de MG53 se mide a continuación en el animal de ensayo, como también se mide la expresión o la actividad de la proteína en un animal de control que expresa el polipéptido de MG53 de forma recombinante y no tiene un mayor riesgo de trastorno o síndrome. A continuación, se compara la expresión del polipéptido de MG53 en el animal de ensayo y el animal de control. Un cambio en la actividad del polipéptido de MG53 en el animal de ensayo con respecto al animal de control indica que el compuesto de ensayo es un modulador de la latencia del trastorno o síndrome.

En otro aspecto más, la memoria descriptiva describe un método para determinar la presencia de o la predisposición a una enfermedad asociada con niveles alterados de un polipéptido de MG53, un ácido nucleico de MG53, o ambos, en un sujeto (p. ej., un sujeto humano). El método incluye medir la cantidad del polipéptido de MG53 en una muestra de ensayo del sujeto y comparar la cantidad del polipéptido en la muestra de ensayo con la cantidad del polipéptido de MG53 presente en una muestra de control. Una alteración en el nivel del polipéptido de MG53 en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control indica la presencia de o la predisposición a una enfermedad en el sujeto. Preferiblemente, la predisposición incluye, p. ej., las enfermedades y trastornos descritos anteriormente y/u otras patologías y trastornos similares. Asimismo, los niveles de expresión de los nuevos polipéptidos descritos en la

presente memoria se pueden utilizar en un método para escrutar diversos trastornos, así como para determinar la fase de los trastornos concretos.

5 En un aspecto adicional, la memoria descriptiva describe un método de tratamiento o prevención de un estado patológico asociado con un trastorno en un mamífero mediante la administración al sujeto de un polipéptido de MG53, MG53 un ácido nucleico, o un anticuerpo-MG53 específica a un sujeto (p. ej., un sujeto humano), en una cantidad suficiente para aliviar o prevenir el estado patológico. En particular, el trastorno, incluye, por ejemplo, las enfermedades y trastornos descritos anteriormente y/u otras patologías y trastornos de la similares.

10 En otro aspecto más, la invención se puede utilizar en un método para identificar los receptores celulares y el efector aguas abajo de la invención mediante uno cualquiera de los diversos mecanismos comúnmente empleados en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan al sistema de dos híbridos, la purificación por afinidad, la co-precipitación con anticuerpos u otras moléculas de interacción específica.

15 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente comprendido por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos, y los ejemplos son meramente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término "antagonista para MG53" o "antagonista de MG53" se utiliza generalmente para referirse a un agente susceptible de inhibición directa o indirecta de la expresión, traducción, y/o actividad de MG53. Asimismo, según se utiliza en la presente memoria "receptor de MG53" se refiere generalmente a cualquier proteína o fragmento de la misma capaz de experimentar la unión a una proteína MG53.

25 Según se utiliza en la presente memoria, el término "antagonista para caveolina" o "antagonista de caveolina" se utiliza generalmente para referirse a un agente susceptible de inhibición directa o indirecta de la expresión, traducción, y/o actividad de caveolina. Asimismo, según se utiliza en la presente memoria "receptor de caveolina" se refiere generalmente a cualquier proteína o fragmento de la misma capaz de experimentar la unión a una proteína caveolina.

30 En ciertos aspectos, la modulación de la actividad de MG53 se completa, por ejemplo, mediante el uso o la modulación de compañeros de unión de MG53, es decir, factores que se unen a MG53 y neutralizan sus actividades biológicas, tales como la neutralización de anti-MG53, receptores de MG53 (por ejemplo, o caveolina-3), fragmentos de receptores de MG53, y análogos de receptores de MG53; el uso de antagonistas de receptores de MG53, tales como anticuerpos anti-caveolina-3, pseudopéptidos, análogos peptídicos o peptidomiméticos que se unen a e interrumpen la interacción del receptor de MG53; pequeñas moléculas que inhiben la actividad de MG53 o las interacciones intermoleculares, o alteran la configuración normal de MG53, o inhiben la unión productiva de MG53/receptor de MG53; o el uso de secuencias de nucleótidos derivadas de gen de MG53 y/o gen del receptor de MG53, incluyendo secuencias codificantes, no codificantes, y/o reguladoras para prevenir o reducir la expresión de MG53, por ejemplo, mediante enfoques antisentido, de ribozimas, y/o de triple hélice.

40 En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe una molécula de ácido nucleico, tal como un ARN señuelo, ARNdH, ARNip, ARNhc, micro ARN, aptámeros, moléculas de ácido nucleico antisentido, que regula a la baja la expresión de una secuencia que codifica MG53 o un receptor de MG53, para ejemplo, la caveolina-3. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria está adaptada para tratar y/o prevenir el daño tisular y promover la reparación del tejido. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria tiene una actividad endonucleasa o es un componente de un complejo de nucleasa, y escinde el ARN que tiene una secuencia de ácido nucleico de MG53 o del receptor de MG53.

45 En un aspecto, una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria comprende entre 12 y 100 bases complementarias al ARN que tiene una secuencia de ácido nucleico de MG53 o de un receptor de MG53. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria comprende entre 14 y 24 bases complementarias al ARN que tiene una secuencia de ácido nucleico de MG53 o del receptor de MG53. En cualquier aspecto descrito en la presente memoria, la molécula de ácido nucleico se puede sintetizar químicamente de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

50 En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un kit que comprende un recipiente adecuado, el agente activo capaz de inhibir la actividad, la expresión o la unión de MG53 en una forma farmacéuticamente aceptable dispuesta en su interior, y las instrucciones para su uso.

55 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un método para diagnosticar o controlar el trastorno o enfermedad o la progresión que comprende detectar la presencia de un polimorfismo de nucleótido en el gen estructural de MG53 o un receptor de MG53 asociado con la enfermedad, a través de la detección del nivel de expresión de un gen

- o proteína, o ambos de MG53 o de un receptor de MG53. Se han identificado polimorfismos que se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. (Véanse, Zhong et al., Simultaneous detection of microsatellite repeats and SNPs in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene by thin-film biosensor chips and application to rural field studies. *Nucleic Acids Res.* 2 de Agosto de 2005; 33(13):e121; Donn et al., A functional promoter haplotype of macrophage migration inhibitory factor is linked and associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* Mayo de 2004;50(5):1604-10). Según se utiliza en la presente memoria "gen de MG53 o de receptor de MG53" o "gen estructural de MG53 o del receptor de MG53" pueden incluir 5'UTR, 3'UTR, secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, ADN intrónico y exónico del gen de MG53 o del receptor de MG53, así como la secuencia de ARNm o ADNc del gen de MG53 o del receptor de MG53.
- 10 Como comprenderá un experto normal en la técnica, los polimorfismos del gen de MG53 o del receptor de MG53 asociados con trastornos de reparación tisular, y por lo tanto útiles como marcadores de diagnóstico de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria pueden aparecer en cualquiera de las regiones de ácidos nucleicos nombradas previamente. Los mecanismos para la identificación y el seguimiento de los polimorfismos son conocidos en la técnica y se comentan con detalle en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.905.827 de Wohlgemuth.
- 15 Ciertos aspectos de la memoria descriptiva incluyen los métodos para detectar la expresión génica o los polimorfismos con una o más moléculas de ADN en donde las una o más moléculas de ADN tienen una secuencia de nucleótidos que detecta la expresión de un gen que corresponde a los oligonucleótidos representados en la Lista de Secuencias. En un formato, el oligonucleótido detecta la expresión de un gen que se expresa diferencialmente. El sistema de expresión génica puede ser una genoteca de candidatos, un agente de diagnóstico, un conjunto de oligonucleótidos de diagnóstico o un conjunto de sondas de diagnóstico. Las moléculas de ADN pueden ser ADN genómico, ARN, ácido peptidónucleico (PNA), ADNc u oligonucleótidos sintéticos. Siguiendo los procedimientos ilustrados en la presente memoria, se pueden identificar secuencias de interés para analizar la expresión génica o los polimorfismos. Tales secuencias pueden ser predictivas de un estado de enfermedad.
- 20
- Oligonucleótidos de diagnóstico
- 25 Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "molécula de oligonucleótido" incluya moléculas de ADN (p. ej., ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (p. ej., ARNm), análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser de hebra sencilla o de doble hebra, pero preferiblemente está compuesto de ADN de doble hebra.
- 30 En ciertos aspectos, la memoria descriptiva describe oligonucleótidos de diagnóstico y conjuntos de oligonucleótidos de diagnóstico, para los cuales existe una correlación entre el estado de salud de un individuo, y la expresión del ARN o los productos de proteína del individuo correspondientes a la secuencia de nucleótidos. En algunos casos, solo es necesario un oligonucleótido para tal detección. Los miembros de un conjunto de oligonucleótidos de diagnóstico se pueden identificar mediante cualquier método capaz de detectar la expresión o un polimorfismo de
- 35 ARN o productos de proteína, incluyendo pero no limitado a barrido de expresión diferencial, PCR, RT-PCR, análisis SAGE, secuenciación de alto rendimiento, micromatrices, matrices líquidas u otras, métodos basados en proteínas (p. ej., transferencia western, proteómica, espectrometría de masas y otros métodos descritos en la presente memoria), y métodos de extracción de datos, como se describe adicionalmente en la presente memoria.
- 40 En un aspecto, los ácidos nucleicos y/o proteínas se manipulan de acuerdo con técnicas de biología molecular bien conocidas. Los protocolos detallados para muchos de tales procedimientos son descritos, p. ej., por Ausubel et al. en *Current Protocols in Molecular Biology* (complementado a lo largo de 2000) John Wiley & Sons, Nueva York ("Ausubel"); Sambrook et al. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2^a ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 ("Sambrook") y Berger and Kimmel *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, volumen 152, Academic Press, Inc., San Diego, California. ("Berger").
- 45 *Genotipificación*
- Además de, o junto con la correlación de los perfiles de expresión y los datos clínicos, a menudo es deseable correlacionar los patrones de expresión con el genotipo del sujeto en uno o más loci genéticos o correlacionar tanto los perfiles de expresión como los datos de loci genéticos con datos clínicos. Los loci seleccionados puede ser, por ejemplo, loci cromosómicos correspondientes a uno o más miembros de la genoteca candidato, alelos polimórficos para loci marcadores, o loci relacionados con la enfermedad alternativos (que no contribuyen a la genoteca candidato) que se sabe, o se supone que están asociados con una enfermedad (o criterio de enfermedad). De hecho, se apreciará, que cuando un alelo (polimórfico) en un locus está ligado a una enfermedad (o a una predisposición a una enfermedad), la presencia del alelo puede ser en sí misma un criterio de enfermedad.
- 50 Existen numerosos métodos bien conocidos para evaluar el genotipo de un individuo, incluyendo el análisis Southern, el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis de polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), análisis de polimorfismo de conformación de hebra sencilla (SSCP), análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (p. ej.,
- 55

a través de PCR, Taqman o balizas moleculares), entre muchos otros métodos útiles. Muchos de estos procedimientos son fácilmente adaptables a la preparación de muestras y métodos de análisis de alto rendimiento y/o automatizados (o semi-automatizados). En su mayor parte, se pueden realizar en muestras de ácido nucleico recuperadas a través de procedimientos simples a partir de la misma muestra que proporcionó el material para los perfiles de expresión. Las técnicas ilustrativas se describen, por ejemplo, en Sambrook, y Ausubel, más arriba.

La memoria descriptiva también describe moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico enzimáticas, moléculas de ácido nucleico antisentido, señuelos, ARN de doble hebra, oligonucleótidos triplex, y/o aptámeros, y métodos para modular la expresión génica, por ejemplo, de genes que codifican una proteína MG53, una proteína MG53 o una proteína de unión al receptor de MG53 o una proteína receptora de MG53. En particular, la memoria descriptiva describe moléculas y métodos basados en ácidos nucleicos para modular la expresión de una proteína MG53 o proteína receptora de MG53.

La memoria descriptiva describe una o más moléculas y métodos basados en ácidos nucleicos enzimáticos que modulan de forma independiente o combinados la expresión de uno o varios genes que codifican una proteína MG53, una proteína MG53 o proteína de unión al receptor de MG53, y/o una proteína receptora de MG53, por ejemplo, caveolina-3.

La siguiente descripción de los diversos aspectos se proporciona con referencia a los genes de MG53 y del receptor de MG53 ilustrativos. Sin embargo, los diversos aspectos también se dirigen a los genes que codifican homólogos, ortólogos, y parálogos de otras proteínas MG53, proteínas de unión a MG53, y genes de receptores de MMG53 e incluyen todas las isoformas, variantes de empalme, y polimorfismos. Esos genes adicionales se pueden analizar para determinar sitios diana los métodos descritos para las proteínas MG53, proteínas de unión a MG53, y genes de receptores de MG53. De este modo, se pueden realizar la inhibición y los efectos de tal inhibición de los otros genes como se describe en la presente memoria.

Por "regular a la baja" se quiere significar que la expresión del gen, o el nivel de los ARN o los ARN equivalentes que codifican una o más proteínas, o la actividad de una o más proteínas, tales como los genes de MG53 y de receptores de MG53, se reduce por debajo del observado en ausencia de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. En un aspecto, la inhibición o la regulación a la baja con moléculas de ácido nucleico enzimáticas está preferiblemente por debajo del nivel observado en presencia de una molécula enzimáticamente inactiva o atenuada que es capaz de unirse al mismo sitio en el ARN diana, pero es incapaz de escindir ese ARN. En otro aspecto, la inhibición o regulación a la baja con oligonucleótidos antisentido está preferiblemente por debajo del nivel observado en presencia, por ejemplo, de un oligonucleótido con la secuencia desorganizada o con emparejamientos erróneos. En otro aspecto, la inhibición o regulación a la baja de los proteínas MG53, proteínas de unión a MG53, y genes de receptores de MG53 con la molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria es mayor en presencia de la molécula de ácido nucleico que en su ausencia.

Por "regular al alza" se quiere significar que la expresión del gen, o el nivel de ARN o los ARN equivalentes que codifican una o más subunidades de proteína, o actividad de una o más subunidades de proteína, tales como proteínas MG53, proteínas de unión a MG53, y genes de receptores de MG53, es mayor que la observada en ausencia de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. Por ejemplo, se puede incrementar la expresión de un gen, tales como proteínas MG53, proteínas de unión a MG53, y genes de receptores de MG53, con el fin de tratar, prevenir, aliviar o modular una afección patológica causada o exacerbada por la ausencia o el bajo nivel de la expresión génica. En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar o prevenir la actividad excesiva de la vejiga regulando al alza la expresión, liberación, y/o actividad de las proteínas MG53, proteínas de unión a MG53, y genes de receptores de MG53.

Por "modular" se quiere significar que la expresión del gen, o el nivel de los ARN o los ARN equivalentes que codifican una o más proteínas, o la actividad de una o más proteínas está regulada al alza o regulada a la baja, de manera que la expresión, el nivel, o la actividad es mayor o menor que el observado en ausencia de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria.

Por "gen" se quiere significar un ácido nucleico que codifica el ARN, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico, que incluyen pero no se limitan a un segmento que codifica un polipéptido.

"Complementariedad" se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para formar uno o varios enlaces de hidrógeno con otra secuencia de ARN o bien mediante los tipos Watson-Crick tradicionales o bien mediante otros tipos no tradicionales.

Por "ARN" se quiere significar una molécula que comprende al menos un residuo ribonucleotídico. Por "ribonucleótido" o "2'-OH" se quiere significar un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un radical de D-ribo-furanosa.

Por "nucleótido" se quiere significar una base nitrogenada heterocíclica en conexión N-glicosídica con un azúcar fosforilado. Los nucleótidos son reconocidos en la técnica por incluir bases naturales (convencionales), y bases

modificadas bien conocidas en la técnica. Tales bases se localizan generalmente en la posición 1' de un radical azúcar del nucleótido. Los nucleótidos comprenden generalmente una base, azúcar y un grupo fosfato. Los nucleótidos pueden estar sin modificar o modificados en el azúcar, fosfato y/o radical de la base, (también referidos indistintamente como análogos nucleotídicos, nucleótidos modificados, nucleótidos no naturales, nucleótidos no convencionales y otras; véanse por ejemplo, Usman y McSwiggen, más arriba; Eckstein et al., Publicación Internacional PCT Núm. WO 92/07065; Usman et al., Publicación Internacional PCT Núm. WO 93/15187; Uhlman y Peyman. Existen varios ejemplos de bases de ácidos nucleicos modificadas conocidas en la técnica como resumen por Limbach et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183. Algunos de los ejemplos no limitantes de las bases de ácidos nucleicos modificadas químicamente y otras naturales que se pueden introducir en los ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, inosina, purina, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxibenceno, 3-metiluracilo, dihidouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitolinas (p. ej., 5-metilcitolina), 5-alquiluridinas (p. ej., ribotimidina), 5-halouridina (p. ej., 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (p. ej., 6-metiluridina), propino, queosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wibutosina, wibutoxosina, 4-acetilidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, beta-D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 3-metilcitolina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarbonilmetiluridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, beta-D-manosilqueosina, ácido uridin-5-oxiacético, 2-tiocitidina, derivados de treonina y otros (Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman y Peyman, más arriba).

Por "bases modificadas" en este aspecto se quieren significar bases nucleotídicas distintas de adenina, guanina, citosina y uracilo en la posición 1' o sus equivalentes; tales bases se pueden utilizar en cualquier posición, por ejemplo, en el núcleo catalítico de una molécula de ácido nucleico enzimático y/o en las regiones de unión al sustrato de la molécula de ácido nucleico.

Por "molécula de ácido nucleico enzimático" se quiere significar una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad en una región de unión al sustrato para una diana génica especificada, y también tiene o media una actividad enzimática que es activa para escindir específicamente ARN diana. Es decir, la molécula de ácido nucleico enzimática es capaz de escindir intermolecularmente ARN, solo o como componente de un complejo enzimático, y de ese modo inactivar una molécula de ARN diana. Estas regiones complementarias permiten una hibridación suficiente de la molécula de ácido nucleico enzimático al ARN diana y por lo tanto permiten la escisión. Se prefiere una complementariedad del cien por cien, pero también puede ser útil en esta invención una complementariedad tan baja como 50-75% (véanse, por ejemplo Werner y Uhlenbeck, 1995, Nucleic Acids Research, 23, 2092-2096; Hammann et al., 1999, Antisense and Nucleic Acid Drug Dev., 9, 25-31). Los ácidos nucleicos pueden ser modificados en la base, el azúcar y/o los grupos fosfato. El término "ácido nucleico enzimático" se utiliza indistintamente con frases tales como ribozimas, ARN catalítico, ARN enzimático, ADN catalítico, aptazima o ribozima de unión a aptámero, ribozima regulable, oligonucleótidos catalíticos, nucleozima, ADNzima, enzima de ARN, ARNip, microARN, ARN de horquilla corta, endorribonucleasa, complejos de silenciamiento inducido por ARN, endonucleasa, minizima, "leadzima", oligozima o enzima de ADN. Todas estas terminologías describen moléculas de ácido nucleico con actividad enzimática.

Las moléculas de ácido nucleico enzimático específicas descritas en la presente solicitud no son limitantes en la invención y los expertos en la técnica reconocerán que todo lo que es importante en una molécula de ácido nucleico enzimático de esta invención es que tiene un sitio de unión a sustrato específico que es complementario a una o más de las regiones del ácido nucleico diana, y que tiene secuencias de nucleótidos dentro de o alrededor de ese sitio de unión al sustrato que confiere a la molécula una actividad de escisión de y/o ligación al ácido nucleico (Cech et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.987.071; Cech et al., 1988, 260 JAMA 3030).

En la actualidad se conocen diversas variedades de ARN enzimáticos. Cada una puede catalizar la hidrólisis de enlaces fosfodiéster de ARN en trans (y por lo tanto pueden escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan uniéndose primero a un ARN diana. Tal unión se produce a través de la porción de unión a la diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad con una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Por lo tanto, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y se une después a un ARN diana a través de un emparejamiento de bases complementarias, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de tal ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se ha unido y escindido su diana de ARN, es liberado de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse y escindir repetidamente nuevas dianas. De este modo, una única molécula de ribozima es capaz de escindir muchas moléculas de ARN diana. Además, la ribozima es un inhibidor altamente específico de la expresión génica, dependiendo de la especificidad de la inhibición no solo del mecanismo de emparejamiento de bases de la unión al ARN diana, sino también del mecanismo de escisión del ARN diana. Los emparejamientos erróneos sencillos, o las sustituciones de bases, cerca del sitio de escisión pueden eliminar por completo la actividad catalítica de una ribozima.

Por "molécula de ácido nucleico" según se utiliza en la presente memoria se quiere significar una molécula que tiene

nucleótidos. El ácido nucleico puede ser de hebra sencilla, doble o múltiple y puede comprender nucleótidos modificados o no modificados o no nucleótidos o varias mezclas y combinaciones de los mismos.

Se pretende que ARN "equivalente a" o "relacionado" con proteínas MG53, proteínas de unión a MG53, y genes de receptores de MG53 incluya aquellas moléculas de ARN de origen natural que tienen homología (parcial o completa) con proteínas MG53, proteínas de unión a MG53, y genes de receptores de MG53 que codifican proteínas con función similar a las proteínas MG53, proteínas de unión a MG53, y proteínas de receptores de MG53 en diversos organismos, incluyendo seres humanos, roedores, primates, conejos, cerdos, protozoos, hongos, plantas, y otros microorganismos y parásitos. La secuencia de ARN equivalente también incluye, además de la región codificante, regiones tales como la región 5' no traducida, la región 3' no traducida, intrones, unión intrón-exón y similares. Por "homología" se quiere significar que la secuencia de nucleótidos de dos o más moléculas de ácido nucleico es parcial o completamente idéntica. En ciertos aspectos el ácido nucleico homólogo tiene una homología de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% con MG53, la proteína de unión a MG53, y/o el gen del receptor de MG53.

Por "ácido nucleico antisentido" se quiere significar una molécula de ácido nucleico no enzimático que se une al ARN diana por medio de interacciones ARN-ARN o ARN-ADN o ARN-PNA (ácido peptidonucleico; Egholm et al., 1993 Nature 365, 566) y altera la actividad del ARN diana (para una revisión, véanse Stein y Cheng, 1993 Science 261, 1004 y Woolf et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.849.902). Típicamente, las moléculas antisentido son complementarias a una secuencia diana a lo largo de una única secuencia contigua de la molécula antisentido. Sin embargo, en ciertas realizaciones, una molécula antisentido se puede unir al sustrato de modo que la molécula de sustrato forma un bucle u horquilla, y/o una molécula antisentido se puede unir de tal manera que la molécula antisentido forma un bucle o de horquilla. Por lo tanto, la molécula antisentido puede ser complementaria a dos (o incluso más) secuencias sustrato no contiguas o dos (o incluso más) porciones de secuencia no contiguas de una molécula antisentido pueden ser complementarias a una secuencia diana o las dos cosas. Para una revisión de las estrategias antisentido actuales, véase Schmajuk et al., 1999, J. Biol. Chem., 274, 21783-21789, Delilhas et al., 1997, Nature, 15, 751-753, Stein et al., 1997, Antisense N. A. Drug Dev., 7, 151, Crooke, 2000, Methods Enzymol., 313, 3-45; Crooke, 1998, Biotech. Genet. Eng. Rev., 15, 121-157, Crooke, 1997, Ad. Pharmacol, 40, 1-49. Además, el ADN antisentido se puede utilizar para dirigirse al ARN por medio de interacciones ADN-ARN, activando de este modo la RNasa H, que digiere el ARN diana del dúplex. Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender una o más regiones activadoras de la RNasa H, que son capaces de activar la escisión RNasa H de un ARN diana. El ADN antisentido se puede sintetizar químicamente o expresar a través de la utilización de un vector de expresión de ADN de hebra sencilla o un equivalente del mismo.

Se pueden utilizar ARN de doble hebra largos (ARNds; típicamente > 200 nt) para silenciar la expresión de genes diana en una variedad de organismos y tipos de células (p. ej., gusanos, moscas de la fruta, y plantas). Tras la introducción, los ARNdh largos entran en una ruta celular que se conoce comúnmente como ruta de interferencia de ARN (ARNi). En primer lugar, los ARNdh se procesan a ARN interferente pequeño (ARNip) de 20-25 nucleótidos (nt) por una enzima de tipo RNasa III denominada Dicer (etapa de inicio). A continuación, los ARNip se ensamblan en complejos que contienen endorribonucleasa conocidos como complejos de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que se desenrollan en el proceso. Las hebras de ARNip guían posteriormente los RISC a las moléculas de ARN complementarias, donde escinden y destruyen el ARN cognado (etapa efectora). La escisión del ARN cognado tiene lugar cerca de la mitad de la región unida por la hebra de ARNip. En células de mamífero, la introducción de ARNdh largo (> 30 nt) inicia una potente respuesta antiviral, ilustrada por la inhibición no específica de la síntesis de proteínas y la degradación del ARN. La respuesta antiviral en mamíferos se puede evitar, sin embargo, mediante la introducción o la expresión de ARNip.

La inyección y transfección de ARNdh en células y organismos ha sido el método principal de liberación de ARNip. Y si bien el efecto de silenciamiento dura varios días y no parece ser transferido a las células hijas, finalmente disminuye. Recientemente, sin embargo, diversos grupos han desarrollado vectores de expresión para expresar de manera continua ARNip en células de mamífero transfectadas transitoriamente y establemente. (Véanse, p. ej., Brummelkamp TR, Bernards R, y Agami R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science 296:550-553; Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li M-J, Ehsani A, Salvaterra P, y Rossi J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. Nature Biotechnol. 20:500-505; Miyagishi M, y Taira K. (2002). U6-promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. Nature Biotechnol. 20:497-500; Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, y Conklin DS. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes & Dev. 16:948-958; Paul CP, Good PD, Winer I, y Engelke DR. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. Nature Biotechnol. 20:505-508; Sui G, Soohoo C, Affar E-B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, y Shi Y. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(6):5515-5520; Yu J-Y, DeRuiter SL, y Turner DL. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(9):6047-6052.

Algunos vectores han sido diseñados para expresar los ARN de horquilla corta (ARNhc), que se procesan in vivo en moléculas de tipo ARNip capaces de llevar a cabo el silenciamiento de genes específicos. Los vectores contienen la

secuencia de ARNhc entre un promotor de la polimerasa III (Pol III) (p. ej., promotores U6 o H1) y un sitio de terminación de la transcripción de 4-5 timidinas. El transcrito termina en la posición 2 del sitio de terminación (los transcritos de pol III carecen naturalmente de colas de poli (A)) y a continuación se pliega en una estructura de tallo-bucle con salientes UU 3'. Los extremos de los ARNhc se procesan en vivo, convirtiendo los ARNhc s en moléculas de tipo ARNip de ~21 nt, que a su vez inician ARNi. Este último hallazgo se correlaciona con experimentos recientes en *C. elegans*, *Drosophila*, plantas y tripanosomas, en donde se ha inducido ARNi por medio de una molécula de ARN que se pliega en una estructura de tallo-bucle. El uso de vectores y sistemas de expresión de ARNip es conocido y son asequibles comercialmente de Ambion, Inc.[®] Lentigen, Inc. (Baltimore, MD), Panomics (Fremont, A), y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

En otro aspecto de la memoria descriptiva, las moléculas de ácido nucleico enzimático o las moléculas antisentido que interactúan con moléculas de ARN diana, y regulan a la baja la actividad de MG53, proteínas de unión a MG53, y/o un gen del receptor de MG53 se expresan a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN. Los vectores recombinantes son preferiblemente plásmidos o vectores virales de ADN. Se pueden construir vectores virales que expresan moléculas de ácido nucleico enzimático o antisentido sobre la base de, pero no limitados a, lentivirus, citomegalovirus, virus adenoasociados, retrovirus, adenovirus, o alfavirus. Preferiblemente, los vectores recombinantes capaces de expresar las moléculas de ácido nucleico enzimático o antisentido se liberan, y persisten en las células diana. Alternativamente, se pueden utilizar vectores virales que proporcionan la expresión de moléculas de ácido nucleico enzimáticos o antisentido. Tales vectores se pueden administrar repetidamente según sea necesario. Una vez expresadas, las moléculas de ácido nucleico enzimático o antisentido se unen al ARN diana y regulan a la baja su función o expresión. La liberación de los vectores de expresión de moléculas de ácido nucleico enzimático antisentido puede ser sistémica, por ejemplo mediante administración intravenosa o intramuscular, mediante administración a las células diana explantadas del paciente o sujeto seguido de reintroducción en el paciente o sujeto, o mediante cualquier otro medio que permita la introducción en la célula diana deseada. El ADN antisentido se puede expresar a través del uso de un vector de expresión intracelular de ADN de cadena sencilla.

Por "vectores" se quiere significar cualquier técnica basada en ácidos nucleicos utilizada para liberar un ácido nucleico deseado, por ejemplo, plásmido bacteriano, ácido nucleico viral, HAC, BAC, y similares.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria, de forma individual, o combinadas o junto con otros fármacos, se pueden utilizar para tratar las enfermedades o afecciones expuestas anteriormente. Por ejemplo, el sujeto se puede tratar, u otras células adecuadas se pueden tratar, como resulta evidente para los expertos en la técnica, individualmente o de manera combinada con uno o más fármacos en condiciones adecuadas para el tratamiento.

El uso de constructos de vectores diseñados especialmente para inducir la interferencia de ARN tiene numerosas ventajas sobre las técnicas basadas en oligonucleótidos. Las ventajas más significativas son la estabilidad, y la transcripción inducida por medio de promotores inducibles. Las regiones promotoras en el vector garantizan que los transcritos ARNhc son expresados constantemente, manteniendo los niveles celulares en todo momento. Por lo tanto, la duración del efecto no es tan transitoria como con el ARN inyectado, que por lo general no dura más de unos pocos días. Y mediante el uso de constructos de expresión en lugar de la inyección de oligo, es posible realizar estudios multi-generacionales de atenuación génica debido a que el vector puede convertirse en un elemento permanente en la línea celular.

Por "oligonucleótidos formadores de triplex" u "oligonucleótido triplex" se quiere significar un oligonucleótido que puede unirse a un ADN de doble hebra en una manera específica de la secuencia para formar una hélice de triple hebra. Se ha demostrado que la formación de tal estructura de triple hélice inhibe la transcripción del gen elegido como diana (Duval-Valentin et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 504; Fox, 2000, Curr. Med. Chem., 7, 17-37; Praseuth et. al., 2000, Biochim. Biophys. Acta, 1489, 181-206).

Por "ARN de doble hebra" o "ARNdh" se quiere significar un ARN de doble hebra que coincide con una secuencia génica predeterminada que es capaz de activar las enzimas celulares que degradan los transcritos de ARN mensajero correspondientes del gen. Estos ARNdh se denominan ARN interferente pequeño (ARNip) y se pueden utilizar para inhibir la expresión génica (véanse, por ejemplo Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494-498; y Bass, 2001, Nature, 411, 428-429). El término "ARN de doble hebra" o "ARNdh" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula de ARN de doble hebra susceptible de interferencia de ARN "ARNi", incluyendo ARN interferente pequeño "ARNip", véanse por ejemplo Bass, 2001, Nature, 411, 428-429; Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494-498; y Kreutzer et al., Publicación Internacional PCT Núm. WO 00/44895; Zernicka-Goetz et al., Publicación Internacional PCT Núm. WO 01/36646; Fire, Publicación Internacional PCT Núm. WO 99/32619; Plaetinck et al., Publicación Internacional PCT Núm. WO 00/01846; Mello y Fire, Publicación Internacional PCT Núm. WO 01/29058; Deschamps-Depaillette, Publicación Internacional PCT Núm. WO 99/07409; y Li et al., Publicación Internacional PCT Núm. WO 00/44914.

En un aspecto de la memoria descriptiva, una molécula de ácido nucleico de la presente invención puede tener entre aproximadamente 10 y 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico enzimático descritas en la presente memoria tienen preferiblemente entre aproximadamente 15 y 50 nucleótidos de longitud,

más preferiblemente entre aproximadamente 25 y 40 nucleótidos de longitud (p. ej., véase Jarvis et al., 1996, J. Biol. Chem., 271, 29107-29112). Las moléculas antisentido ilustrativas descritas en la presente memoria tienen preferiblemente entre aproximadamente 15 y 75 nucleótidos de longitud, más preferiblemente entre aproximadamente 20 y 35 nucleótidos de longitud (véanse, por ejemplo Woolf et al., 1992, PNAS., 89, 7305-7309; Milner et al., 1997, Nature Biotechnology, 15, 537-541). Las moléculas de oligonucleótidos formadoras de tríplex descritas en la presente memoria tienen preferiblemente entre aproximadamente 10 y 40 nucleótidos de longitud, más preferiblemente entre aproximadamente 12 y 25 nucleótidos de longitud (véanse, por ejemplo Maher et al., 1990, Biochemistry, 29, 8820-8826; Strobel y Dervan, 1990, Science, 249, 73-75). Los expertos en la técnica reconocerán que todo lo que se requiere es que la molécula de ácido nucleico sea suficientemente larga y tenga una conformación adecuada para que la molécula de ácido nucleico interactúe con su diana y/o catalice una reacción contemplada en la presente memoria. La longitud de las moléculas de ácido nucleico descritas no es limitante dentro de los límites generales establecidos. Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico que modula, por ejemplo, regula a la baja la expresión de MG53, proteína de unión a MG53, y/o gen de receptor de MG53 comprende entre 12 y 100 bases complementarias a una molécula de ARN de un gen de MG53, un gen de una proteína de unión a MG53, y/o un gen de receptor de MG53.

La memoria descriptiva describe un método para la producción de una clase de agentes moduladores de genes basados en ácido nucleico que muestran un alto grado de especificidad para el ARN de una diana deseada. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico enzimático se dirige preferiblemente a una región de secuencia altamente conservada de los ARN diana que codifican MG53, una proteína de unión a MG53, y/o un gen de receptor de MG53 de manera que se puede proporcionar el tratamiento específico de una enfermedad o afección, con una o varias moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. Tales moléculas de ácido nucleico se pueden suministrar exógenamente a las dianas tisulares o celulares específicas según se requiera. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico (p. ej., ribozimas y antisentido) pueden expresarse a partir de vectores de ADN y/o ARN que se liberan en las células específicas.

Según se utiliza en la presente memoria "célula" se usa en su sentido biológico habitual, y no se refiere a un organismo multicelular entero. La célula puede, por ejemplo, encontrarse *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*, p. ej., en cultivo celular, o presente en un organismo multicelular, incluyendo, p. ej., aves, plantas y mamíferos tales como seres humanos, vacas, ovejas, simios, monos, cerdos, perros y gatos. La célula puede ser procariota (p. ej., célula bacteriana) o eucariota (p. ej., célula de mamífero o vegetal).

Los inhibidores basados en ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se añaden directamente, o pueden formar complejos con lípidos catiónicos, empaquetados dentro de liposomas, o liberados de otro modo en las células o tejidos diana. El ácido nucleico o los complejos de ácido nucleico se pueden administrar localmente a los tejidos pertinentes *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo* a través de inyección o bomba de infusión, con o sin su incorporación a biopolímeros.

En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una molécula de ácido nucleico enzimático que tiene uno o más radicales no nucleotídicos, y que tiene actividad enzimática para escindir una molécula de ARN o ADN.

En un aspecto adicional, las moléculas de ácido nucleico descritas, tales como antisentido o ribozimas, se pueden utilizar combinadas con otros tratamientos conocidos para tratar las afecciones o enfermedades comentadas anteriormente. Por ejemplo, las moléculas descritas se pueden usar combinadas con uno o más agentes terapéuticos conocidos.

Las moléculas antisentido pueden ser ARN, ADN u oligonucleótidos poliméricos mixtos modificados o sin modificar, y principalmente funcionan uniéndose específicamente a secuencias de emparejamiento lo que da como resultado la inhibición de la síntesis peptídica (Wu-pong, Noviembre de 1994, BioPharm, 20-33). El oligonucleótido antisentido se une al ARN diana por medio de emparejamiento de bases de Watson Crick y bloquea la expresión génica evitando la traducción ribosómica de las secuencias unidas ya sea mediante el bloqueo estérico o mediante activación de la enzima ARNasa H. Las moléculas antisentido también pueden alterar la síntesis de proteínas por la interferencia en el procesamiento del ARN o el transporte desde el núcleo hacia el citoplasma (Mukhopadhyay y Roth, 1996, Crit. Rev. en Oncogénesis 7, 151-190).

Además, la unión de ADN de cadena sencilla a ARN puede dar como resultado la degradación por nucleasa del heterodúplex (Wu-pong, más arriba; Crooke, más arriba). Hasta la fecha, los únicos agentes químicos de ADN con el esqueleto modificado que actúan como sustratos para la ARNasa H son los fosforotioatos, los fosforoditioatos y los borotrifluoridatos. Recientemente se ha informado de que los oligos que contienen 2'-arabino y 2'-fluoro-arabino también pueden activar la actividad ARNasa H.

Se han descrito numerosas moléculas antisentido que utilizan configuraciones de nucleótidos modificados químicamente, estructuras secundarias, y/o dominios de sustratos de ARNasa H novedosos (Woolf et al., Publicación Internacional PCT Núm. WO 98/13526; Thompson et al., Publicación internacional PCT Núm. WO 99/54459; Hartmann et al., Patente de los Estados Unidos Núm. de Serie 60/101.174 que se presentó el 21 de Sep. de 1998).

Se conocen actualmente numerosas variedades de ARN enzimático. Además, se han utilizado estrategias de selección *in vitro* (evolución) (Orgel, 1979, Proc. R. Soc. Londres, B 205, 435) para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar la escisión y ligación de los enlaces fosfodiéster (Joyce, 1989, Gene, 82, 83-87; Beaudry et al., 1992, Science 257, 635-641; Joyce, 1992, Scientific American 267, 90-97; Breaker et al., 1994, TIBTECH 12, 268; Bartel et al., 1993, Science 261:1411-1418; Szostak, 1993, TIBS 17, 89-93; Kumar et al., 1995, FASEB J., 9, 1183; Breaker, 1996, Curr. Op. Biotech., 7, 442; Santoro et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci., 94, 4262; Tang et al., 1997, RNA 3, 914; Nakacane y Eckstein, 1994, más arriba; Long y Uhlenbeck, 1994, más arriba; Ishizaka et al., 1995, más arriba.; Vaish et al., 1997, Biochemistry 36, 6495). Cada uno puede catalizar una serie de reacciones, incluyendo la hidrólisis de enlaces fosfodiéster *in trans* (y por lo tanto pueden escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas.

La naturaleza enzimática de una molécula de ácido nucleico enzimático puede permitir que la concentración de molécula de ácido nucleico enzimático necesaria para afectar a un tratamiento terapéutico sea menor. Esto refleja la capacidad de la molécula de ácido nucleico enzimático para actuar enzimáticamente. Por lo tanto, una única molécula de ácido nucleico enzimático es capaz de escindir muchas moléculas de ARN diana. Además, la molécula de ácido nucleico enzimático es un inhibidor altamente específico, dependiendo la especificidad de la inhibición no solo del mecanismo de emparejamiento de bases de unión al ARN diana, sino también del mecanismo de escisión del ARN diana. Se pueden elegir emparejamientos erróneos individuales, o sustituciones de bases, cerca del sitio de escisión para atenuar en gran medida la actividad catalítica de una molécula de ácido nucleico enzimático.

Las moléculas de ácido nucleico que tienen una actividad enzimática endonucleasa son capaces de escindir otras moléculas de ARN separadas en repetidas ocasiones de una manera específica de la secuencia de bases del nucleótido. Tales moléculas de ácido nucleico enzimático pueden ser dirigidas prácticamente a cualquier transcrito de ARN, y lograr una escisión eficaz *in vitro* (Zaug et al., 324, 429 Nature 1986; Uhlenbeck, 1987 Nature 328, 596; Kim et al., 84 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8788, 1987; Dreyfus, 1988, Einstein Quart. J. Bio. Med., 6, 92; Haseloff y Gerlach, 334 Nature 585, 1988; Cech, 260 JAMA 3030, 1988; y Jefferies et al., 17 Nucleic Acids Research 1371, 1989; Santoro et al., 1997 más arriba).

Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácido nucleico enzimático que escinden *in trans* se pueden utilizar como agentes terapéuticos para enfermedades humanas (Usman y McSwiggen, 1995 Ann. Rep. Med. Chem. 30, 285-294; Christoffersen y Marr, 1995 J. Med. Chem. 38, 2023-2037). Las moléculas de ácido nucleico enzimático pueden ser diseñadas para escindir dianas de ARN específicas en un fondo de ARN celular. Tal evento de escisión convierte el ARN en no funcional y abroga la expresión de proteínas a partir de ese ARN. De esta manera, se puede inhibir selectivamente la síntesis de una proteína asociada con un estado de enfermedad (Warashina et al., 1999, Chemistry and Biology, 6, 237-250).

Las moléculas de ácido nucleico enzimático descritas en la presente memoria que están reguladas alostéricamente ("alozimas") se pueden utilizar para modular la expresión de MG53, proteínas de unión a MG53, y/o genes de receptores de MG53. Estos ácidos nucleicos enzimáticos alostéricos o alozimas (véanse, por ejemplo George et al, Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.834.186 y 5.741.679, Shih et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.589.332, Nathan et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.871.914, Nathan y Ellington, International Publicación PCT Núm. WO 00/24931, Breaker et al., Publicaciones Internacionales PCT Núms. WO 00/26226 y 98/27104, y Sullenger et al., Publicación Internacional PCT Núm. WO 99/29842) están diseñados para responder a un agente de señalización, que a su vez modula la actividad de la molécula de ácido nucleico enzimático y modula la expresión de MG53, proteínas de unión a MG53, y/o genes de receptores de MG53. En respuesta a la interacción con un agente de señalización predeterminado, la actividad de la molécula de ácido nucleico enzimático alostérica se activa o se inhibe de tal manera que la expresión de una diana particular es regulada a la baja selectivamente. La diana puede comprender MG53, proteínas de unión a MG53, y/o genes de receptores de MG53.

Los oligonucleótidos (p. ej., antisentido, GeneBlocs) se sintetizan usando protocolos conocidos en la técnica como describen Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19, Thompson et al., Publicación Internacional PCT Núm. WO 99/54459, Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684, Wincott et al., 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59, Brennan et al., 1998, Biotechnol Bioeng., 61, 33-45, y Brennan, Patente de los Estados Unidos Núm. 6.001.311. En un ejemplo no limitante, se llevan a cabo síntesis a pequeña escala en un sintetizador 394 Applied Biosystems, Inc. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se pueden sintetizar por separado y se pueden unir entre sí después de la síntesis, por ejemplo mediante ligación (Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al., Publicación Internacional PCT Núm. WO 93/23569; Shabarova et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides and Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204).

Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se pueden modificar ampliamente para mejorar la estabilidad por medio de modificación con grupos resistentes a nucleasas, por ejemplo, 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-H (para una revisión véanse Usman y Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163).

Si bien la modificación química de los enlaces internucleotídicos de los oligonucleótidos con conexiones fosforotioato, fosforotioato y/o 5'-metilfosfonato mejora la estabilidad, muchas de estas modificaciones pueden causar cierta toxicidad. Por lo tanto, cuando se diseñan moléculas de ácido nucleico, la cantidad de estos enlaces internucleotídicos debe reducirse al mínimo. La reducción en la concentración de estos enlaces debe reducir la toxicidad dando como resultado una mayor eficacia y una mayor especificidad de estas moléculas.

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico que tienen modificaciones químicas que mantienen o mejoran la actividad. Semejante ácido nucleico es también generalmente más resistente a las nucleasas que el ácido nucleico no modificado. Las moléculas de ácido nucleico son preferiblemente resistentes a las nucleasas con el fin de que funcionen como agentes terapéuticos intracelulares eficaces. Las mejoras en la síntesis química del ARN y el ADN (Wincott et al., 1995 *Nucleic Acids Res.* 23, 2677; Caruthers et al., 1992, *Methods in Enzymology* 211, 3-19 han ampliado la capacidad de modificar moléculas de ácido nucleico mediante la introducción de modificaciones de nucleótidos para mejorar su estabilidad frente a nucleasas como se describió anteriormente. El uso de las moléculas basadas en ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria puede conducir a un mejor tratamiento del progreso de la enfermedad permitiendo la posibilidad de terapias combinadas (p. ej., múltiples moléculas de ácidos nucleicos antisentido o enzimáticos dirigidas a genes diferentes, moléculas de ácido nucleico acopladas a inhibidores de molécula pequeña conocidos, o tratamiento intermitente con combinaciones de moléculas y/u otras moléculas químicas o biológicas). El tratamiento de sujetos con moléculas de ácido nucleico también puede incluir combinaciones de diferentes tipos de moléculas de ácido nucleico.

En un aspecto, se proporcionan catalizadores de ácido nucleico que tienen modificaciones químicas que mantienen o aumentan la actividad enzimática. Tales ácidos nucleicos también son generalmente más resistentes a las nucleasas que el ácido nucleico no modificado.

En un aspecto, la memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico enzimático modificadas con modificaciones del esqueleto de fosfato que comprenden una o más sustituciones de fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, morfolino, amidato carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal, y/o alquilsililo. Para una revisión de las modificaciones del esqueleto oligonucleotídico véanse Hunziker y Leumann, 1995, *Nucleic Acid Analogs: Synthesis and Properties*, en *Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417, y Mesmaeker et al., 1994, *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides*, en *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, 24-39. Se pueden realizar diversas modificaciones en la estructura del ácido nucleico (p. ej., antisentido y ribozima) para mejorar la utilidad de estas moléculas. Por ejemplo, tales modificaciones pueden mejorar la vida de almacenamiento, la vida media in vitro, la biodisponibilidad, la estabilidad, y la facilidad de introducción de tales oligonucleótidos en el sitio diana, incluyendo p. ej., la mejora de la penetración de las membranas celulares y confiriendo la capacidad de reconocimiento y unión a las células diana.

Administración de moléculas de ácidos nucleicos. Los métodos para la liberación de moléculas de ácido nucleico son descritos por Akhtar et al., 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; y *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, 1995 que se incorporan ambas a la presente memoria como referencia. Sullivan et al., PCT WO 94/02595, describen adicionalmente los métodos generales para la liberación de moléculas de ARN enzimático. Estos protocolos se pueden utilizar para la liberación de prácticamente cualquier molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar a las células por medio de una variedad de métodos conocidos por aquellos familiarizados con la técnica, incluyendo, pero no limitados a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o mediante incorporación a otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas. Alternativamente, la combinación de ácido nucleico/vehículo se libera localmente por medio de inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. Otras rutas de administración incluyen, pero no se limitan a la vía oral (forma de comprimido o píldora) y/o la liberación intratecal (Gold, 1997, *Neuroscience*, 76, 1153-1158). Otros enfoques incluyen el uso de diferentes sistemas de transporte y portadores, por ejemplo, mediante el uso de productos conjugados y polímeros biodegradables. Para una mejor comprensión de las estrategias de liberación de fármacos, incluyendo la liberación en el SNC, véanse Ho et al., 1999, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 1, 336-343 y Jain, *Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities*, Decision Resources, 1998 y Groothuis et al., 1997, *J. NeuroVirol.*, 3, 387-400.

Las moléculas descritas en la presente memoria pueden ser utilizadas como agentes farmacéuticos. Los agentes farmacéuticos previenen, inhiben la aparición de, o tratan (alivian un síntoma en cierta medida, preferiblemente todos los síntomas) un estado de enfermedad en un sujeto.

Los polinucleótidos cargados negativamente descritos en la presente memoria se pueden administrar (p. ej., ARN, ADN o proteína) e introducir en un sujeto por medio de cualquier método convencional, con o sin estabilizantes, tampones, y similares, para formar una composición farmacéutica. Cuando se desea utilizar un mecanismo de liberación en liposomas, se pueden seguir los protocolos convencionales para la formación de liposomas. Las composiciones descritas en la presente memoria también se pueden formular y usar en forma de comprimidos, cápsulas o elixires para administración oral; supositorios para la administración rectal; soluciones estériles; suspensiones para la administración inyectable; y otras composiciones conocidas en la técnica.

La presente invención incluye también formulaciones farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos.

Estas formulaciones incluyen las sales de los compuestos anteriores, p. ej., sales de adición de ácido, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, bromhídrico, acético, y ácido benceno sulfónico.

Una composición o formulación farmacológica hace referencia a una composición o formulación en una forma adecuada para la administración, p. ej., administración sistémica, en una célula o sujeto, preferiblemente un ser humano. Por "administración sistémica" se quiere significar la absorción sistémica in vivo o la acumulación de fármacos en el torrente sanguíneo seguida de distribución en todo el organismo. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la ruta de entrada, por ejemplo oral, transdérmica, o por medio de inyección. Dichas formas no deben impedir que la composición o formulación alcance una célula diana (es decir, una célula en la que se desea liberar el polímero cargado negativamente). Por ejemplo, las composiciones farmacológicas inyectadas en la corriente sanguínea deben ser solubles. Se conocen en la técnica otros factores, e incluyen consideraciones tales como la toxicidad y las formas que impiden que la composición o formulación ejerzan su efecto.

Las rutas de administración que conducen a la absorción sistémica incluyen, sin limitaciones: intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, inhalación, oral, intrapulmonar e intramuscular. Se ha demostrado que la tasa de entrada de un fármaco en la circulación es una función del peso molecular o del tamaño. El uso de un liposoma u otro portador de fármaco que comprende los compuestos de la presente invención puede localizar potencialmente el fármaco, por ejemplo, en ciertos tipos de tejidos, tales como los tejidos del sistema reticuloendotelial (RES). También es útil una formulación de liposomas que puede facilitar la asociación del fármaco con la superficie de las células, tales como, linfocitos y macrófagos.

Por formulación farmacéuticamente aceptable se quiere significar, una composición o formulación que permite la distribución eficaz de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria en la localización física más adecuada para su actividad deseada. Los ejemplos no limitantes de los agentes adecuados para la formulación con las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria incluyen: ácidos nucleicos conjugados con PEG, ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos, ácidos nucleicos que contienen radicales lipófilos, fosforotioatos, inhibidores de P-glicoproteína (tales como Pluronic P85) que puede mejorar la entrada de los fármacos en diversos tejidos, por ejemplo el SNC (Jolliet-Riant y Tillement, 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 16-26); polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli(DL-lactida-coglicolido) para la administración de liberación sostenida después de la implantación (Emerich, DF et al, 1999, *Cell Transplant*, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; y nanopartículas cargadas, tales como las elaboradas con cianoacrilato de polibutilo, que pueden liberar fármacos a través de la barrera hematoencefálica y pueden modificar mecanismos de absorción neuronal (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999). Otros ejemplos no limitantes de estrategias de liberación, incluyendo la liberación en el SNC de moléculas de ácido nucleico incluyen material descrito por Boado et al., 1998, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1308-1315; Tyler et al, 1999, *FEBS Lett.*, 421, 280-284; Pardridge et al., 1995, *PNAS USA.*, 92, 5592-5596; Boado, 1995, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 15, 73-107; Aldrian-Herrada et al., 1998, *Nucleic Acids Res.*, 26, 4910-4916; y Tyler et al., 1999, *PNAS USA.*, 96, 7053-7058.

La memoria descriptiva también describe el uso de la composición que comprende liposomas de superficie modificada que contienen lípidos de poli(etilenglicol) (modificados con PEG o liposomas de larga circulación o liposomas Stealth). Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria pueden comprender también moléculas de PEG ancladas covalentemente de diversos pesos moleculares. Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de fármacos en tejidos diana. Esta clase de portadores de fármacos resiste la opsonización y la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), permitiendo de este modo tiempos de circulación en sangre más largos y exposición tisular mejorada para el fármaco encapsulado (Lasic et al. *Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011). También es probable que los liposomas de larga circulación protejan los fármacos de la degradación por nucleasa en un mayor grado en comparación con los liposomas catiónicos, basándose en su capacidad para evitar la acumulación en los tejidos del MPS metabólicamente agresivos tales como el hígado y el bazo.

La presente memoria descriptiva también describe composiciones preparadas para el almacenamiento o la administración que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes y agentes aromatizantes. Estos incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, se pueden utilizar antioxidantes y agentes de suspensión.

Una dosis farmacéuticamente eficaz o cantidad farmacéuticamente eficaz es aquella dosis necesaria para prevenir, inhibir la aparición, o tratar (aliviar un síntoma en cierta medida, preferiblemente todos los síntomas) de un estado de enfermedad. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, de la composición usada, de la ruta de administración, del tipo de mamífero que está siendo tratado, de las características físicas del mamífero específico en consideración, de la medicación concurrente y de otros factores que reconocerán los expertos en la técnica. En general, se administra una cantidad entre 0,1 mg/kg y 1000 mg/kg de peso corporal/día de los ingredientes activos dependiendo de la potencia del polímero cargado negativamente.

Las formulaciones se pueden administrar por la ruta oral, tópica, parenteral, por inhalación o pulverización o por la ruta rectal en formulaciones unitarias de dosificación que contienen portadores, coadyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales no tóxicos. El término parenteral, según se utiliza en la presente memoria incluye técnicas de inyección o infusión percutánea, subcutánea, intravascular (p. ej., intravenosa), intramuscular, o intratecal y similares. Además, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden estar presentes una o más moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria asociadas con uno o más portadores y/o diluyentes y/o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, y si se desea, otros ingredientes activos. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires.

Las composiciones destinadas a uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más de tales agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes o agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente atractivas y agradables al paladar. Los comprimidos contienen el ingrediente activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido alginico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden estar recubiertos mediante técnicas conocidas. En algunos casos tales revestimientos se pueden preparar por medio de técnicas conocidas para demorar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida a lo largo de un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de demora temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar en forma de cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropil-metilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxitileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tales como monooleato de polioxitilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilensorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo, o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo los ingredientes activos en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes y agentes aromatizantes para proporcionar preparaciones orales agradables al paladar. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Los polvos dispersables y los gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes o los agentes de suspensión adecuados se ilustran por medio de los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria también pueden estar en forma de emulsiones de aceite-en-agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de éstos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo goma de acacia o goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxitilensorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol,

glucosa o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosas inyectables estériles. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijados estériles se emplean convencionalmente como un medio disolvente o de suspensión. Para este propósito se puede emplear cualquier aceite fijado suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria también se pueden administrar en forma de supositorios, p. ej., para la administración rectal del fármaco o por medio de un catéter directamente a la propia vejiga. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se pueden administrar parenteralmente en un medio estéril. El fármaco, dependiendo del vehículo y la concentración utilizados, se puede suspender o disolver en el vehículo. Ventajosamente, se pueden disolver en el vehículo coadyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tamponadores.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una única forma de dosificación varía dependiendo del anfitrión tratado y del modo concreto de administración. Las formas unitarias de dosificación generalmente contendrán entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 1000 mg de un ingrediente activo.

Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier paciente o sujeto concreto depende de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la ruta de administración, y la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad concreta que experimenta la terapia.

Para la administración a animales no humanos, la composición también se puede añadir a la alimentación animal o al agua potable. Puede ser conveniente formular las composiciones de pienso animal y de agua potable de modo que el animal tome una cantidad terapéuticamente apropiada de la composición junto con su dieta. También puede ser conveniente presentar la composición como una premezcla para la adición al pienso o al agua potable.

La composición también se puede administrar a un sujeto combinada con otros compuestos terapéuticos para aumentar el efecto terapéutico global. El uso de múltiples compuestos para tratar una indicación puede aumentar los efectos beneficiosos, a la vez que reduce la presencia de efectos secundarios.

Alternativamente, algunas de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se pueden expresar dentro de las células de promotores eucariotas (p. ej., Izant y Weintraub, 1985, *Science*, 229, 345; McGarry y Lindquist, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 83, 399; Scanlon et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10591 5; Kashani-Sabet et al., 1992, *Antisense Res. Dev.*, 2, 3-15; Dropulic et al., 1992, *J. Virol.*, 66, 1432 41; Weerasinghe et al., 1991, *J. Virol.*, 65, 5531 4; Ojwang et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10802 6; Chen et al., 1992, *Nucleic Acids Res.*, 20, 45819; Sarver et al., 1990 *Science*, 247, 1222-1225; Thompson et al, 1995, *Nucleic Acids Res.*, 23, 2259; Good et al., 1997, *Gene Therapy*, 4, 45. Los expertos en la técnica comprenden que cualquier ácido nucleico se puede expresar en células eucarióticas a partir del vector de ADN/ARN apropiado.

En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. La secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria está unida operativamente de una manera que permite la expresión de esa molécula de ácido nucleico.

La transcripción de las secuencias de moléculas de ácido nucleico se controla desde un promotor para la ARN polimerasa I (pol I), la ARN polimerasa II (pol II), o la ARN polimerasa III (pol III) eucarióticas. Los transcritos de los promotores de pol II o pol III se expresan a altos niveles en todas las células; los niveles de un promotor de pol II dado en un tipo de célula dado depende de la naturaleza de las secuencias reguladoras de genes (potenciadores, silenciadores, etc.) presentes cerca. También se utilizan promotores de ARN polimerasa de procariotas, que hacen que la enzima ARN polimerasa procariota se exprese en las células apropiadas (Elroy-Stein y Moss, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6743 7; Gao y Huang 1993, *Nucleic Acids Res.*, 21, 2867 72; Lieber et al., 1993, *Methods Enzymol.*, 217, 47-66; Zhou et al., 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10, 4529- 37). Varios investigadores han demostrado que las moléculas de ácido nucleico, tales como las ribozimas expresadas a partir de estos promotores pueden funcionar en células de mamífero (p. ej., Kashani-Sabet et al., 1992, *Antisense Res. Dev.*, 2, 3-15; Ojwang et al., 1992, *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992, Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Yu et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-4; L'Huillier et al., 1992, EMBO J., 11, 4411-8; Lisiewicz et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8000-4; Thompson et al., 1995, Nucleic Acids Res., 23, 2259; Sullenger y Ceh, 1993, Science, 262, 1566).

5 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria de una manera que permite la expresión de esa molécula de ácido nucleico. El vector de expresión comprende en una realización; a) una región de inicio de la transcripción; b) una región de terminación de la transcripción; c) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos dicha molécula de ácido nucleico; y en donde dicha secuencia está unida operablemente a dicha región de inicio y dicha región de terminación, de una manera que permite la expresión y/o la liberación de dicha molécula de ácido nucleico.

Un objeto adicional de la presente memoria descriptiva es un kit que comprende un recipiente adecuado, el agente terapéutico descrito en la presente memoria en una forma farmacéuticamente aceptable dispuesto en su interior, y las instrucciones para su uso.

15 En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico aislada descrita en la presente memoria comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos de MG53, una proteína de unión de MG53, y/o un receptor de MG53. Según se utiliza en la presente memoria, el término "complementario" se refiere al emparejamiento de bases de Watson-Crick o de Hoogsteen entre las unidades de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico, y el término "unión" representa la interacción física o química entre dos polipéptidos o compuestos o polipéptidos o compuestos asociados o combinaciones de los mismos. La unión incluye interacciones iónicas, no iónicas, de van der Waals, hidrófobas, y similares. Una interacción física puede ser directa o indirecta.

Según se utiliza en la presente memoria, los "fragmentos" se definen como secuencias de al menos 6 ácidos nucleicos (contiguos) o al menos 4 aminoácidos (contiguos), una longitud suficiente para permitir la hibridación específica en el caso de los ácidos nucleicos o para el reconocimiento específico de un epítipo en el caso de los aminoácidos, y son a lo sumo una porción menor que una secuencia de longitud completa.

25 El término "célula anfitriona" incluye una célula que podría ser utilizada para llevar un ácido nucleico heterólogo, o expresar un péptido o proteína codificados por un ácido nucleico heterólogo. Una célula anfitriona puede contener genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, los genes encontrados en la forma nativa de la célula donde los genes se modifican y se reintroducen en la célula por medios artificiales, o un ácido nucleico endógeno para la célula que se ha modificado artificialmente sin retirar el ácido nucleico de la célula. Una célula anfitriona puede ser procariota o eucariota. Las condiciones de crecimiento generales necesarias para el cultivo de bacterias se pueden encontrar en textos como BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Vol. 1, N. R. Krieg, ed., Williams y Wilkins, Baltimore/Londres (1984). Una "célula anfitriona" también puede ser aquella en la que los genes endógenos o promotores o ambos se han modificado para producir uno o más de los componentes polipeptídicos del complejo de la invención.

35 Los "derivados" son composiciones formadas a partir de los compuestos nativos ya sea directamente, mediante modificación, o mediante sustitución parcial.

Los "análogos" son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos que tienen una estructura similar, pero no idéntica, al compuesto nativo.

40 Los derivados o análogos de los ácidos nucleicos o proteínas de la invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas que comprenden regiones que son sustancialmente homólogas a los ácidos nucleicos o proteínas de la invención, en diversas realizaciones, con una identidad de al menos 70%, 80%, 90%, o 95% (con una identidad preferida de 80-95%) con respecto a una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de tamaño idéntico o cuando se compara con una secuencia alineada en la que el alineamiento se lleva a cabo por medio de un programa informático de homología conocido en la técnica, o cuyo ácido nucleico codificante es capaz de hibridar con el complemento de una secuencia que codifica las proteínas de la invención en condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas, o poco rigurosas. Véanse, p. ej. Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1993. Los derivados y las modificaciones de ácidos nucleicos incluyen los obtenidos mediante sustitución génica, mutación específica de sitio, delección, inserción, recombinación, reparación, barajado, digestión con endonucleasas, PCR, subclonación, y técnicas relacionadas.

50 Los "homólogos" pueden ser de origen natural, o creados mediante síntesis artificial de uno o más ácidos nucleicos que tienen secuencias relacionadas, o mediante modificación de uno o más ácidos nucleicos para producir ácidos nucleicos relacionados. Los ácidos nucleicos son homólogos cuando derivan, natural o artificialmente, de una secuencia ancestral común (p. ej., ortólogos o parálogos). Si la homología entre dos ácidos nucleicos no se describe expresamente, la homología se puede inferir a partir de una comparación de ácidos nucleicos entre dos o más secuencias. Si las secuencias muestran cierto grado de similitud de secuencia, por ejemplo, más de aproximadamente 30% en el nivel de la estructura primaria de aminoácidos, se llega a la conclusión de que comparten un ancestro común. Para los propósitos de la presente invención, los genes son homólogos si las

secuencias de ácidos nucleicos son suficientemente similares para permitir la recombinación y/o la hibridación en condiciones de baja rigurosidad.

Según se utiliza en la presente memoria "hibridación", se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula solamente con una secuencia de nucleótidos concreta en condiciones de baja, media, o alta rigurosidad, incluyendo, cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (p. ej., celular total) de ADN o ARN.

Además, un experto normal en la técnica reconocerá que las "mutaciones conservativas" también incluyen la sustitución, delección o adición de ácidos nucleicos que alteran, añaden o eliminan un solo aminoácido o un pequeño número de aminoácidos en una secuencia codificante donde las alteraciones de ácidos nucleicos dan como resultado la sustitución de un aminoácido químicamente similar. Los aminoácidos que pueden servir como sustituciones conservativas entre sí incluyen los siguientes: Alcalinos: Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); Ácidos: Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E), Asparragina (N), Glutamina (Q); hidrófilos: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I); Hidrófobos: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); que contienen azufre: Metionina (M), Cisteína (C). Además, las secuencias que difieren en variaciones conservativas son generalmente homólogas.

Las descripciones de las técnicas biológicas moleculares útiles para la práctica de la invención, incluyendo la mutagénesis, la PCR, la clonación, y similares incluyen Berger y Kimmel, GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, METHODS IN ENZYMOLOGY, volumen 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook et al., MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, y CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc.; Berger, Sambrook, y Ausubel, así como Mullis et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.202 (1987); PCR PROTOCOLS A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (Innis et al. eds), Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1990) (Innis); Arnheim y Levinson (Oct. 1, 1990) C&EN 36-47; Lueng, et al.,

En otro aspecto más, se expresa un ácido nucleico tal como se describe en la presente memoria en células de mamífero utilizando un vector de expresión de mamífero. Para los sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas veáanse, por ejemplo, los Capítulos 16 y 17 de Sambrook, et al, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.

Un polinucleótido puede ser una molécula de ADN, una molécula de ADNc, una molécula de ADN genómico, o una molécula de ARN. Un polinucleótido como ADN o ARN puede incluir una secuencia en donde T (timidina) también puede ser U (uracilo). Si un nucleótido en una posición determinada de un polinucleótido es capaz de formar un emparejamiento de Watson-Crick con un nucleótido en la misma posición en una hebra de ADN o ARN anti-paralela, en ese caso el polinucleótido y la molécula de ADN o ARN son complementarios entre sí en esa posición. El polinucleótido y la molécula de ADN o ARN son sustancialmente complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden hibridar entre sí con el fin de efectuar el proceso deseado.

La transformación de una célula anfitriona con ADN recombinante se puede llevar a cabo mediante mecanismos convencionales que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por "transformación" se quiere significar un cambio genético permanente o transitorio inducido en una célula después de la incorporación de nuevo ADN (es decir, ADN exógeno a la célula).

En otro aspecto, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula particular (p. ej., se utilizan elementos reguladores específicos de tejidos para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de los promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico del hígado; Pinkert, et al., 1987. Genes Dev.1: 268-277), los promotores específicos linfoides (Calame y Eaton, 1988. Adv. Immunol. 43: 235-275), en particular los promotores de receptores de células T (Winoto y Baltimore, 1989. EMBO J. 8: 729-733) y las inmunoglobulinas (Banerji, et al., 1983. Cell 33: 729-740; Queen y Baltimore, 1983. Cell 33: 741-748), los promotores específicos de neuronas (p. ej., el promotor de neurofilamentos; Byrne y Ruddle, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5473-5477), los promotores específicos de páncreas (Edlund, et al., 1985. Science 230: 912-916), y los promotores específicos de glándula mamaria (p. ej., promotor de suero de leche; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea Núm. 264.166). Los promotores regulados evolutivamente también están incluidos, por ejemplo, los promotores Hox murinos (Kessel y Gruss, 1990. Science 249: 374-379) y el promotor de alfa-fetoproteína (Campes y Tilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537-546).

En cualquiera de los aspectos, los ácidos nucleicos que codifican MG53, proteína de unión a MG53, y/o receptor de MG53 pueden estar presentes como: uno o más ADN desnudos; uno o más ácidos nucleicos dispuestos en un vector de expresión apropiado y mantenidos episomalmente; uno o más ácidos nucleicos incorporados en el genoma de la célula anfitriona; una versión modificada de un gen endógeno que codifica los componentes del complejo; uno

o más ácidos nucleicos combinados con una o más secuencias de ácido nucleico reguladoras; o combinaciones de los mismos. El ácido nucleico puede comprender opcionalmente un péptido conector o un componente de una proteína de fusión, por ejemplo, His-Tag, FLAG-Tag, proteína fluorescente, GST, TAT, una porción de anticuerpo, un péptido señal, y similares, en el extremo 5', el extremo 3', o en cualquier ubicación dentro del ORF.

- 5 En un aspecto el ácido nucleico de la invención comprende un polinucleótido que codifica la porción soluble (es decir, extracelular) de un receptor de MG53. Cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, se puede lograr utilizando enfoques genéticos y biológicos moleculares convencionales bien conocidos por los expertos normales en la técnica.

10 Cuando el anfitrión es procarionta, tal como *E. coli*, se pueden preparar células competentes que son capaces de absorber el ADN a partir de células recogidas después de la fase de crecimiento exponencial y posteriormente tratadas mediante el método de CaCl_2 por procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, también se pueden utilizar MgCl_2 , RbCl , liposomas, productos conjugados de liposoma-proteína. La transformación también se puede realizar después de formar un protoplasto de la célula anfitriona o mediante electroporación. Estos ejemplos no son limitantes en la presente invención; existen numerosos mecanismos para la transfección de células anfitrionas que son bien conocidos por los expertos en la técnica y que se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

15 Cuando el anfitrión es un eucariota, tales métodos de transfección con ADN incluyen co-precipitación con fosfato de calcio, se pueden utilizar procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas, o vectores de virus, así como otros conocidos en la técnica. La célula eucariota puede ser una célula de levadura (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*) o puede ser una célula de mamífero, incluyendo una célula humana. Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable.

Polipéptidos

25 Por "MG53", "proteína de unión a MG53", y "receptor de MG53" se quiere significar, un péptido o proteína que comprende una MG53 completa, una proteína de unión a MG53 o una proteína receptora de MG53, un dominio, una proteína de fusión, una quimera, o un fragmento de los mismos.

30 En otros aspectos, la memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican MG53, proteínas de unión a MG53, y/o polipéptidos receptores de MG53, polipéptidos de anticuerpos, o porciones biológicamente activas de los mismos. Los polipéptidos del complejo se pueden formar, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de acuerdo con los métodos convencionales; o expresando cada polipéptido por separado en una célula o extracto celular, aislando y purificando a continuación el polipéptido.

Anticuerpos

35 El término "anticuerpo" según se utiliza en la presente memoria se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con un antígeno, que comprende al menos una, y preferiblemente dos, regiones variables de cadena pesada (H) (abreviadas en la presente memoria como VH), y al menos una y preferiblemente dos regiones variables de la cadena ligera (L) (abreviadas en la presente memoria como VL). Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, Fab, Fab' y F(ab')_2 , y una biblioteca de expresión de Fab. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). La extensión de la región marco y la CDR se han definido con precisión (véanse, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EEUU, Publicación NIH Núm. 91-3242, y Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917. Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En general, las moléculas de anticuerpos obtenidas a partir de seres humanos se refieren a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren unas de otras en la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Algunas clases también tienen subclases, tales como IgG_1 , IgG_2 , y otras. Además, en los seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

45 La referencia en la presente memoria a los anticuerpos incluye una referencia a todas estas clases, subclases y tipos de especies de anticuerpos humanos.

50 Los anticuerpos se pueden preparar a partir del polipéptido intacto o de fragmentos que contienen péptidos de interés como agente inmunizante. Un fragmento de polipéptido antigénico preferido tiene 15-100 aminoácidos contiguos de MG53, una proteína de unión de MG53, o una proteína receptora de MG53. En una realización, el péptido se encuentra localizado en un dominio no transmembrana del polipéptido, p. ej., en un dominio extracelular o intracelular. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo ilustrativo se une a un epítipo que es accesible desde el medio extracelular y que altera la funcionalidad de la proteína. En particular, la presente memoria descriptiva

describe anticuerpos que reconocen y son específicos para uno o más epítomos de una proteína MG53, una proteína de unión a MG53, y/o una proteína receptora MG53, variantes, porciones y/o combinaciones de las mismas. En un aspecto alternativo, los anticuerpos descritos se pueden dirigir a e interferir en la interacción de MG53/receptor de MG53 para inhibir la señalización.

5 La preparación de anticuerpos monoclonales es bien conocida en la técnica; véase, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, página 726 (Cold Spring Harbor Pub. 1988). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante la inyección a ratones o conejos de una composición que comprende un antígeno, verificando la presencia de producción de anticuerpos retirando una muestra de suero, retirando el bazo para
10 obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando los clones positivos que producen anticuerpos para el antígeno, y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de hibridoma mediante mecanismos bien conocidas en la técnica.

En otros aspectos, el anticuerpo se puede producir de forma recombinante, p. ej., se puede producir mediante presentación en fagos o mediante métodos combinatorios. La presentación en fagos y los métodos combinatorios se
15 pueden utilizar para aislar anticuerpos recombinantes que se unen a MG53, proteínas de unión a MG53, y/o proteínas receptoras de MG53 o fragmentos de las mismas (como describen, p. ej., Ladner et al. Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *PNAS* 89:3576-3580.

20 Los anticuerpos monoclonales humanos también se pueden generar usando ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana en lugar del sistema de ratón. Se utilizan esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés para producir hibridomas que secretan mAb humanos con afinidades específicas por epítomos de una proteína humana (véase, p. ej., Wood et al. Solicitud Internacional WO 91/00906; Lonberg, N. et al. 1994 *Nature* 368:856-859; Green, L. L. et al. 1994 *Nature Genet.* 7:13-21; Morrison, S. L. et al. 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855).

Un anticuerpo terapéuticamente útil para los componentes del complejo descrito en la presente memoria o el propio complejo puede derivar de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo regiones determinantes de la complementariedad de ratón de las cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano, sustituyendo a continuación los residuos
30 humanos de las regiones marco de las contrapartes murinas. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los problemas potenciales asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes murinas. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados se pueden encontrar en Jones et al., *Nature* 321: 522, 1986 y Singer et al., *J. Immunol.* 150: 2844, 1993. Los anticuerpos también pueden derivar de fragmentos de anticuerpos humanos aislados de una biblioteca combinatoria de
35 inmunoglobulina; véase, por ejemplo, Barbas et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2, 119, 1991. Además, se pueden obtener anticuerpos quiméricos por corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón con especificidad apropiada por el antígeno junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de especificidad biológica apropiada; véase, por ejemplo, Takeda et al., *Nature* 314: 544-546, 1985. Un anticuerpo quimérico es aquel en el que las diferentes porciones derivan de diferentes especies animales.

40 Se puede utilizar la tecnología anti-idiotipo para producir anticuerpos monoclonales que imitan un epítomo. Un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico elaborado para un primer anticuerpo monoclonal tendrá un dominio de unión en la región hipervariable que es la "imagen" del epítomo unido por el primer anticuerpo monoclonal. Alternativamente, se pueden utilizar técnicas utilizadas para producir anticuerpos de cadena sencilla para producir anticuerpos de
45 cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla. Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos, p. ej., epítomos extracelulares, se pueden generar por medio de mecanismos bien conocidos en la técnica. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fab producidos por digestión proteolítica, y fragmentos Fab generados por reducción de los puentes disulfuro. Cuando se utilizan para la
50 inmunoterapia, los anticuerpos monoclonales, los fragmentos de los mismos o ambos pueden estar marcados o no marcados con un agente terapéutico. Estos agentes se pueden acoplar directa o indirectamente al anticuerpo monoclonal mediante mecanismos bien conocidos en la técnica, e incluyen agentes tales como fármacos, radioisótopos, lectinas y toxinas.

Los intervalos de dosificación para la administración de anticuerpos monoclonales son lo suficientemente grandes como para producir el efecto deseado, y variarán con la edad, la afección, el peso, el sexo, la edad y el grado de la
55 afección a tratar, y pueden ser determinados fácilmente por un experto en la técnica. Las dosis pueden ser de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg. Los anticuerpos monoclonales se pueden administrar por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, y/o por vía subcutánea.

En ciertos aspectos, al menos un epítomo abarcado por el péptido antigénico es una región de MG53, una proteína de unión a MG53, y/o un receptor de MG53 que se encuentra localizado en la superficie de la proteína, p. ej., una

región hidrófila. Un análisis del carácter hidrófobo de la secuencia de la proteína indicará qué regiones de un polipéptido son particularmente hidrófilas y, por lo tanto, es probable que codifiquen residuos de la superficie útiles para dirigir la producción de anticuerpos. Como un medio para dirigir la producción de anticuerpos, se pueden generar diagramas de hidropatía que muestran las regiones de carácter hidrófilo e hidrófobo por cualquier método bien conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los métodos de Kyte y Doolittle o de Hopp Woods, con o sin transformada de Fourier. Véanse, p. ej., Hopp y Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 3824-3828; Kyte y Doolittle 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-142. También se proporcionan en la presente memoria los anticuerpos que son específicos para uno o más dominios dentro de una proteína antigénica, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Se puede utilizar una proteína de la invención, o un derivado, fragmento, análogo, homólogo u ortólogo de la misma, como inmunógeno en la generación de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a estos componentes proteicos.

Anticuerpos Humanos

Los anticuerpos completamente humanos se refieren esencialmente a moléculas de anticuerpo en las que la secuencia completa tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluyendo las CDR, proceden de genes humanos. Tales anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos", o "anticuerpos completamente humanos" en la presente memoria. Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar mediante la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, et al, 1983 Immunol Today 4: 72) y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véanse. Cole, et al, 1985 en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden utilizar en la práctica de la presente invención y se pueden producir utilizando hibridomas humanos (véase Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o mediante transformación de células B humanas con virus de Epstein Barr in vitro (véase. Cole, et al, 1985 en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pags. 77-96).

Además, los anticuerpos humanos también pueden producirse usando técnicas adicionales, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). De un modo similar, se pueden elaborar anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras la sensibilización, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la transposición génica, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en Marks et al. (Bio/Technology, 10:779-783 (1992)); Lonberg et al. (Naturaleza, 368:856-859 (1994)); Morrison (Nature, 368:812-13 (1994)); Fishwild et al, (Nature Biotechnology, 14:845-51 (1996)); Neuberger (Nature Biotechnology, 14:826 (1996)); y Lonberg y Huszar (Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)).

Adicionalmente se pueden producir anticuerpos humanos utilizando animales transgénicos no humanos que son modificados con el fin de producir anticuerpos completamente humanos en lugar de los anticuerpos endógenos del animal en respuesta a la sensibilización por un antígeno. Los genes endógenos que codifican las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina en el anfitrión no humano han sido incapacitados, y los loci activos que codifican las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas humanas se insertan en el genoma del anfitrión. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, utilizando cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humano necesarios. A continuación se obtiene un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas como progenie mediante cruzamiento de animales transgénicos intermedios que contienen menos que el complemento completo de las modificaciones. Un aspecto preferido de tal animal no humano es un ratón, y se denomina el Xenomouse™ como se describe en las publicaciones PCT WO 96/33735 y WO 96/34096.

Fragmentos Fab y anticuerpos de cadena sencilla

De acuerdo con un aspecto, las técnicas se pueden adaptar a la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos para una proteína antigénica como se describe en la presente memoria (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.946.778). Además, los métodos se pueden adaptar a la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase p. ej., Huse, et al., Science 246:1275-1281 (1989)) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para una proteína o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma. Los fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos para un antígeno proteico se pueden producir mediante mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a: (i) un fragmento F(ab')₂ producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂; (iii) un fragmento Fab generado por tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos Fv.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de

unión es para una proteína antigénica como se describe en la presente memoria. La segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína o receptor o subunidad de receptor de la superficie celular. Los métodos para elaborar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la expresión simultánea de dos pares cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de Mayo de 1993, y Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véanse, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986); y Brennan et al., *Science* 229:81 (1985).

Adicionalmente, los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que expresaban en exceso el receptor ErbB2 y a células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148 (5):1547-1553 (1992). La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. USA* 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. También se ha descrito otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase, Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994). Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991). También se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno concreto. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante radionúclido, tal como EOTUBE, DTPA, DOTA, o TETA.

Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también se describen en la presente memoria descriptiva. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse in vitro utilizando métodos conocidos en química de síntesis de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de los reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.676.980.

Productos inmunoconjugados

La memoria descriptiva también describe productos inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente químico, o un isótopo radioactivo (es decir, un producto radioconjugado). Los productos conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se elaboran utilizando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como describen Vitetta et al., en *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos a anticuerpos. Véase el documento WO94/1102.

Inmunoliposomas

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los

descritos por Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.013.556.

5 Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo descritos en la presente memoria anteriormente se pueden conjugar con liposomas como describen Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro.

10 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo descrito se refiere en general a la cantidad necesaria para lograr un objetivo terapéutico. Como se ha indicado anteriormente, éste puede ser una interacción de unión entre el anticuerpo y su antígeno diana que, en ciertos casos, interfiere en el funcionamiento de la diana, y en otros casos, promueve una respuesta fisiológica. La cantidad requerida que se vaya a administrar dependerá además de la afinidad de unión del anticuerpo por su antígeno específico, y también dependerá de la velocidad a la que un anticuerpo administrado se agota a partir del volumen libre de otro sujeto al que se administra. Los intervalos
15 comunes para la dosificación terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención pueden ser, a modo de ejemplo no limitante, de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de dosificación comunes pueden oscilar, por ejemplo, de dos veces al día a una vez a la semana.

20 Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de la invención, así como otras moléculas identificadas mediante los análisis de escrutinio descritos en la presente memoria, se pueden administrar para el tratamiento de diversos trastornos en la forma de composiciones farmacéuticas. Los principios y las consideraciones implicadas en la preparación de tales composiciones, así como las pautas en la elección de los componentes se proporcionan, por ejemplo, en Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19^a ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., Editores) Mack
25 Pub. Co., Easton, Pa: 1995; Drug Absortion Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; y Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, vol. 4), 1991, M. Dekker, Nueva York. Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente,
30 sistemas de liberación de fármacos coloidales (p. ej., liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Las formulaciones que se van a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de las preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (p. ej., poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de los Estados Unidos Núm. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, etileno-acetato vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT[™] (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico. Si bien los polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos.
35

Análisis ELISA

45 Un agente para la detección de un analito de proteína es un anticuerpo capaz de unirse a un analito de proteína, preferiblemente un anticuerpo con una marca detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se puede utilizar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (p. ej., Fab o F(ab)₂). Se pretende que el término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, incluya el marcaje directo de la sonda o el anticuerpo mediante acoplamiento (esto es, conexión física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está
50 marcado directamente. Los ejemplos del marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y marcaje terminal de una sonda de ADN con biotina de manera que se pueda detectar con estreptavidina marcada fluorescentemente. Se pretende que el término "muestra biológica" incluya tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Por lo tanto, se encuentran incluidos dentro del uso del término "muestra biológica", la sangre y una fracción o componente de la sangre, incluyendo suero sanguíneo, plasma sanguíneo, o linfa. Es decir, el método de detección descrito en la presente memoria se puede utilizar para detectar un analito de ARNm, proteína, o ADN genómico en una muestra biológica in vitro así como in vivo. Por ejemplo, las técnicas in vitro para la detección de un analito de ARNm incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones in situ. Las técnicas in vitro para
55

la detección de un analito de proteína incluyen análisis inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas in vitro para la detección de un analito de ADN genómico incluyen hibridaciones Southern. Los procedimientos para llevar a cabo los inmunoanálisis se describen, por ejemplo, en "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, N.J., 1995; "Immunassay", E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1996; y "The Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Además, las técnicas in vivo para la detección de un analito de proteína incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo anti-analito de proteína marcado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto se pueden detectar mediante técnicas de formación de imagen convencionales dentro de la cavidad, o transdérmicamente, solo o con células efectoras.

Las preparaciones para la administración del agente terapéutico descrito en la presente memoria incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones acuosas o no acuosas, estériles. Los ejemplos de los disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, vehículos intravenosos de Ringer con lactato añadido incluyendo fluidos y reponedores de nutrientes, reponedores de electrolitos, y similares. Se pueden añadir conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Los compuestos, las moléculas de ácido nucleico, los polipéptidos y los anticuerpos (también referidos en la presente memoria como "compuestos activos") descritos en la presente memoria y los derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Tales composiciones típicamente comprenden la molécula de ácido nucleico, proteína, o anticuerpo y un portador farmacéuticamente aceptable. Según como se utiliza en la presente memoria, se pretende que "portador farmacéuticamente aceptable" incluya cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los portadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia convencional en el campo. Los ejemplos preferidos de tales portadores o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de los Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijados. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios.

Una composición farmacéutica descrita en la presente memoria se formula para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de las rutas de administración incluyen la administración parenteral, p. ej., administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosal, intraperitoneal, y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis elaborados de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr por medio de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (p. ej., el complejo terapéutico de la invención) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar a excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un portador fluido para su uso como un enjuague bucal, en el que el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se agita y se expectora o se traga. Se pueden incluir agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales coadyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un antiapelmazante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, o aroma de naranja.

Para la administración oral, las composiciones Farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados mediante métodos convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); filtros (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p. ej., almidón de patata o sal sódica de glicolato de almidón); o agentes humectantes (p. ej., lauril sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes, o suspensiones, o se pueden presentar en forma de un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar mediante métodos convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado.

Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para proporcionar la liberación controlada del compuesto activo. Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o grageas formulados de manera convencional. Para la administración mediante inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación en aerosol de pulverización en envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos p. ej. de gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Los compuestos se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para la inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados poco solubles, por ejemplo, en forma de una sal poco soluble.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se suministran en forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que vaya a ser penetrada. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr a través del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

En un aspecto, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenoacetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en formas unitarias de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación según se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación descritas en la presente memoria está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica se pueden suministrar a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está incluido el vehículo de liberación génica. Alternativamente, cuando el vector de liberación génica completo se puede producir intacto a partir de células recombinantes, p. ej., vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de liberación génica. Las composiciones farmacéuticas pueden estar incluidas en un recipiente, envase, o dispensador junto con instrucciones para su administración.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del agente terapéutico suficiente para producir una mejora o retraso de los síntomas. La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosificación entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y éste se puede expresar como la razón DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos. Aunque se pueden utilizar compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de liberación que dirija tales compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios. Los datos obtenidos a partir de los análisis de cultivos celulares y de estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente en de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método como descrito en la presente memoria, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de análisis de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración de plasma circulante que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

También se describen en la memoria descriptiva un kit o sistema que utiliza uno cualquiera de los métodos, las estrategias de selección, los materiales o los componentes descritos en la presente memoria. Los kits ilustrativos de acuerdo con la presente descripción incluirán opcionalmente, de manera adicional, instrucciones para la realización los métodos o análisis, materiales de embalaje, uno o más recipientes que contienen un análisis, un dispositivo o componentes del sistema, o similares.

Los objetos y ventajas adicionales de la presente invención serán apreciados por uno experto normal en la técnica a la luz de la descripción actual y de los ejemplos de las realizaciones preferidas, y se describen expresamente en la memoria descriptiva.

Ejemplos

5 Descubrimiento de MG53, una proteína de la familia TRIM específica de músculo. Se aisló MG53 utilizando un enfoque inmunoproteómico establecido previamente que permite la identificación de nuevas proteínas implicadas en la miogénesis, la señalización de Ca^{2+} y el mantenimiento de la integridad de la membrana en células del músculo estriado. En resumen, este enfoque utiliza una biblioteca de anticuerpos monoclonales que contiene ~6500 clones que se generó a partir de ratones inmunizados con membranas enriquecidas en tríadas de músculo esquelético de conejo. Los anticuerpos de interés se seleccionaron basándose en los patrones de tinción de la línea z de las secciones de músculo estriado observadas bajo un microscopio de inmunofluorescencia. Las proteínas diana se purificaron a través de una columna de afinidad de anticuerpos, y se obtuvieron secuencias parciales de aminoácidos de las proteínas purificadas. Basándose en la secuencia de aminoácidos parcial, se aisló el ADNc completo que codificaba el gen diana a partir de una biblioteca de ADNc de músculo esquelético. A continuación, el escrutinio del gen homólogo se utilizó para buscar la presencia de diferentes isoformas de los genes identificados en otros tejidos excitables. Por último, se generaron modelos de ratones transgénicos o con un gen desactivado para estudiar la función fisiológica *in vivo* de los genes de interés.

El escrutinio de esta biblioteca inmuno-proteómica de las proteínas específicas de músculo condujo a la identificación de un antígeno reconocido por mAb5259 con un tamaño molecular de 53 kilodaltons (kDa) específicamente con los tejidos de músculo estriado (**Fig. 3B**). La proteína, "MG53", se purificó parcialmente a partir de músculo esquelético de conejo mediante una columna de inmutafinidad con mAb5259 y se sometió a secuenciación de aminoácidos. El escrutinio de la biblioteca de ADNc de músculo esquelético y las búsquedas de bases de datos genómicas identificaron las secuencias de aminoácidos pronosticadas para MG53 y el gen de MG53 correspondiente en el locus *16p11.2* humano. La transferencia Northern para el ARNm de *MG53* confirmó la expresión específica con el músculo esquelético y cardíaco (**Fig. 3C**). El análisis de homología del dominio reveló que MG53 contiene los motivos tripartitos prototípicos que incluyen un Anillo, la Caja B y los radicales de Bobina en Espiral (RBCC), así como un dominio SPRY en el carboxilo terminal (**Figs. 1, 2, y 3A**). El dominio SPRY es una secuencia conservada observada por primera vez en el canal de liberación de Ca^{2+} del receptor de rianodina en el retículo sarcoplásmico de células excitables. De los aproximadamente 60 miembros de la familia TRIM identificados hasta ahora en varios genomas de mamíferos, 15 miembros llevan un dominio SPRY similar después del dominio RBCC, y MG53 muestra una estructura primaria conservada con estas proteínas de la sub-familia TRIM.

MG53 media el tráfico de vesículas en las células musculares. Aunque no existe un segmento que abarque la membrana ni un motivo de modificación de lípidos en su estructura primaria, MG53 parece estar restringida principalmente a las estructuras de la membrana en el músculo esquelético. El análisis inmunohistoquímico reveló un marcaje específico para MG53 en la membrana del sarcolema y las vesículas intracelulares (**Fig. 3D**). La expresión en exceso de MG53 en la línea celular miogénica C2C12 conduce a cambios morfológicos drásticos. Las células transfectadas transitoriamente con MG53 y GFP muestran prolongaciones de la membrana plasmática con diferentes estructuras de tipo filopodio que no estaban presentes en las células que expresaban solamente GFP (**Fig. 4A-D**). Utilizando un constructo de fusión GFP-MG53, se encontró que MG53 se localiza tanto en las vesículas intracelulares como en la membrana plasmática de los mioblastos C2C12 (**Fig. 4B**). La formación de imágenes por fluorescencia de células vivas reveló un tráfico intracelular dinámico y eventos de fusión en las células C2C12 que expresaban en exceso GFP-MG53. Esta fusión de vesículas mediada por GFP-MG53 en la membrana de la superficie celular da como resultado la gemación de vesículas de GFP-MG53 de la membrana celular (**Fig. 4D**). Esto se confirma mediante la formación de imágenes de eventos de fusión de vesículas en la membrana plasmática utilizando microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIR-F), que demuestra que los eventos fusión de vesículas son incrementados considerablemente por la expresión simultánea de MG53 (datos no mostrados). En conjunto, estos experimentos ilustran que MG53 endógena es una proteína de la familia TRIM específica de músculo que media el tráfico de vesículas intracelulares a la membrana del sarcolema.

MG53 es una proteína muscular específica que contiene motivos TRIM y SPRY. En estudios previos los autores de la presente invención han establecido una biblioteca de anticuerpos monoclonales (mAb) que se dirigen a las proteínas asociadas con la unión de las tríadas en el músculo esquelético. El escrutinio de esta biblioteca inmuno-proteómica para determinar las proteínas específicas del músculo condujo a la identificación de un antígeno denominado MG53 con un tamaño molecular de 53 kilodaltons (kDa), que fue reconocido por mAb5259. MG53 se purificó parcialmente a partir de músculo esquelético de conejo mediante una columna de inmutafinidad conjugada con mAb5259, y se sometió a secuenciación de aminoácidos. Basándose en las secuencias de aminoácidos parciales obtenidas, se aislaron los ADNc que codificaban MG53 a partir de bibliotecas de músculo esquelético de conejo y de ratón. La búsqueda de la biblioteca genómica identificó el gen de MG53 correspondiente en el locus *16p11.2* humano. Las secuencias de aminoácidos pronosticadas para MG53 en varias especies se muestran en la **Fig. 1**.

El análisis de homología de dominios reveló que MG53 contiene la secuencia distintiva de TRIM prototípica de RBCC más un dominio SPRY en el carboxilo terminal, y por lo tanto pertenece a la familia TRIM/RBCC (**Fig. 1**). De los aproximadamente 60 miembros de la familia de TRIM identificados hasta ahora en los genomas de mamífero, 15 miembros portan un dominio SPRY similar después del dominio RBCC y MG53 muestra una estructura primaria conservada con estas proteínas de la sub-familia TRIM (**Fig. 2**). Sin embargo, sorprendentemente e inesperadamente los estudios de los autores de la presente invención indican que MG53 es la única proteína de la familia TRIM de las de la **Fig.2** que muestra una función de reparación de la membrana.

El análisis de transferencia Western confirma la expresión específica de músculo de MG53 en tejidos de ratón (**Fig. 3B**). Aunque no existe un segmento que abarque la membrana ni un motivo de modificación de lípidos en su estructura primaria, MG53 parece estar restringida principalmente a las estructuras de membrana en el músculo esquelético. El análisis inmunohistoquímico con mAb5259 mostró un marcaje específico para MG53 en las membranas del sarcolema y TT en secciones transversales de fibras del músculo esquelético (**Fig. 3C**). Por otra parte, las secciones transversales revelaron concentraciones localizadas de MG53 cerca de la membrana del sarcolema, con un patrón de tinción más amplio del que se observa típicamente para las proteínas integrantes de la membrana del sarcolema. Por lo tanto, MG53 es una proteína de la familia TRIM específica de músculo que muestra un patrón de distribución subcelular único para una proteína de la familia TRIM.

La expresión en exceso de MG53 produce estructuras de tipo filopodio en células tanto excitables como no excitables. Para dilucidar la función biológica en las células de MG53, el ADNc de MG53 de ratón se expresó en células miogénicas C2C12, así como en células de ovario de hámster chino (CHO). Las células C2C12 en la fase de mioblasto no expresan la proteína MG53 endógena, sin embargo los miotubos C2C12 diferenciados expresan MG53. Las células CHO son células epiteliales no excitables que no contienen proteína MG53 endógena. Como se muestra en la **Fig. 4A (panel de la izquierda)**, la transfección transitoria de ADNc de MG53 en mioblastos C2C12 o células CHO produjo la expresión de una proteína recombinante de 53 kDa que podría ser reconocida por mAb5259. El tamaño molecular de la proteína recombinante es idéntico al de la MG53 endógena presente en músculos tanto de conejo como de ratón, confirmando de este modo la identidad del clon de ADNc aislado como MG53. La transfección simultánea de las células con dos plásmidos que contienen ADNc que codifica EGFP o MG53 a una razón 10:1 proporcionó un método conveniente para identificar las células transfectadas mediante microscopía de fluorescencia. Con la formación de imágenes microscópicas confocales, los autores de la presente invención observaron cambios drásticos en la morfología de las células transfectadas transitoriamente con MG53 (**Fig. 4B**). En concreto, las prolongaciones de las membranas de la superficie celular formaron distintas estructuras de tipo filopodio tanto en células CHO como en mioblastos C2C12 que expresaban en exceso MG53 transitoriamente.

Para examinar adicionalmente los cambios inducidos por MG53 en la morfología celular, se generaron dos constructos de fusión con GFP de MG53: GFP-MG53 y MG53-GFP, con la unión de GFP al extremo amino y al extremo carboxilo de MG53, respectivamente. Aunque ambas proteínas de fusión pueden ser expresadas en células CHO y en mioblastos C2C12 (**Fig. 4C, panel de la derecha**), la distribución subcelular y los efectos funcionales de GFP-MG53 y MG53-GFP fueron drásticamente y sorprendentemente diferentes. Utilizando microscopía confocal, se encontró que las proteínas de fusión GFP-MG53 estaban localizadas en las vesículas intracelulares y en las membranas de la superficie celular tanto en células CHO como C2C12 (**Fig. 4C, paneles de la izquierda**). Este resultado es coherente con la localización por inmunotinción de MG53 en las fibras musculares esqueléticas (**Fig. 3C**), y sugiere que MG53 participa en eventos de tráfico de membrana en las células musculares.

Inesperadamente, el patrón de distribución de la proteína de fusión MG53-GFP fue principalmente citosólico tanto en las células CHO como C2C12 (**Fig. 4C, paneles de la derecha**). Que está en agudo contraste con la distribución unida a membrana de GFP-MG53. Además, las amplias prolongaciones de membrana de tipo filopodio inducidas por la expresión en exceso de MG53 o GFP-MG53 estuvieron completamente ausentes en las células transfectadas con MG53-GFP. Puesto que el blindaje del extremo carboxilo de MG53 por fusión con GFP altera la distribución subcelular de MG53, es probable que el motivo SPRY en el extremo carboxilo terminal de MG53 juegue un papel en el anclaje de MG53 a los diferentes compartimentos de membrana y sea esencial para la función de MG53 (véanse las **Figs. 13 y 14**).

La formación de imágenes por fluorescencia de células vivas identificó el tráfico dinámico de vesículas intracelulares, y la fusión exocitótica activa y la gemación de las vesículas en la membrana de la superficie celular, en células que expresan en exceso GFP-MG53 (**Fig. 4D**). El examen minucioso reveló la aparición de eventos de fusión de vesículas en la membrana de la superficie (**Fig. 4D, panel de la izquierda**). La gemación de vesículas que contenían GFP-MG53 podía ser identificada claramente, así como las vesículas extracelulares liberadas observadas en las proximidades de las células transfectadas (**Fig. 4D, panel de la derecha**).

Tomados en conjunto, los estudios de formación de imagen celulares sugieren que MG53 se puede localizar tanto en vesículas intracelulares como dirigirse a membranas de la superficie celular, y que es un mediador clave de la fusión de membranas y de la gemación de vesículas.

MG53 media la reparación aguda de membrana en las fibras del músculo esquelético después de lesión celular. La fusión de vesículas con la membrana plasmática se requiere para reparación de la membrana y los estudios

anteriores indican un papel para la disferlina en el mantenimiento de la integridad de la membrana del músculo esquelético. Los descubrimientos de los autores de la presente invención indican que MG53 es capaz de conducir el tráfico de vesículas a la membrana plasmática, tal vez para mediar el proceso de reparación después de la rotura de la membrana. La lesión celular aguda generada por la penetración física de la membrana plasmática con un microelectrodo conduce al rápida reclutamiento de vesículas con GFP-MG53 hacia el sitio de la lesión (**Fig. 12A**). Cuando se produce un daño más severo que da como resultado la fractura de la célula, el sitio de reparación está densamente marcado con GFP-MG53 (**Fig. 12B**). Además, esta reparación aguda de la membrana también se observó en miotubos C2C12 maduros (véanse las **películas 2 y 3**). Estos datos indican que el tráfico de vesículas mediado por MG53 juega un papel activo en la reparación aguda de la membrana celular.

Para definir adicionalmente la función fisiológica de MG53 en la reparación de la membrana muscular, se generó un modelo de ratón nulo para MG53 (**Figs. 9-11**). Los ratones *mg53*^{-/-} son viables hasta los 11 meses de edad, en condiciones no estresadas. *In vivo* las pruebas de estrés revelaron graves defectos en la función de reparación de la membrana del músculo *mg53*^{-/-}. Como se muestra en **Fig. 10C**, la lesión de la membrana inducida por el ejercicio de carrera cuesta abajo reveló una función contráctil gravemente comprometida del músculo sóleo de los *mg53*^{-/-}. Sin el ejercicio extenuante, los músculos sóleos *mg53*^{-/-} presentaron cierta dificultad en la recuperación de la función contráctil después de la estimulación de fatiga *ex vivo*, en comparación con los controles de tipo salvaje (wt) (no mostrados). Estas diferencias pueden ser exageradas drásticamente después de las lesiones inducidas por el ejercicio a los 8-10 meses de edad. Claramente, la lesión más grave se pudo encontrar con el músculo *mg53*^{-/-}, donde se observó una función contráctil más débil y fluctuante en comparación con el músculo wt (**Fig. 10D**).

La inyección de colorante azul de Evans en el espacio intraperitoneal de los ratones controla directamente la integridad de la membrana del sarcolema después de la lesión muscular inducida por el ejercicio cuesta abajo. Como se muestra en la **Fig. 10E**, las fibras musculares aisladas de los ratones *mg53*^{-/-} mostraron significativamente más tinción de azul de Evans que el músculo wt, revelando un extenso grado de daño muscular inducido por el ejercicio. Esto se confirmó mediante tinción con H/E que ilustró el aumento de la distrofia en el músculo *mg53*^{-/-} que aumentaba en ratones *mg53*^{-/-} de edad avanzada en comparación con los ratones *mg53*^{-/-} jóvenes (**Fig. 10A**). El análisis cuantitativo de la absorbancia total del azul de Evans extraído de los haces musculares proporcionó un apoyo directo al aumento de daño muscular en los ratones *mg53*^{-/-} después de la carrera cuesta abajo (**Fig. 10F**).

En consonancia con el papel de MG53 en la reparación de la membrana, se observaron concentraciones elevadas de MG53 en el sitio de la lesión con la inmunotinción de las fibras de los músculos flexores cortos de los dedos (FDB) del individuo que fueron dañadas durante el aislamiento (**Fig. 11A**). Estos parches de membrana se colocalizarían frecuentemente con la tinción para la disferlina. Los autores de la presente invención evaluaron directamente la función de reparación de membrana mediada por MG53 a través de la medición de la entrada de colorante fluorescente FM-1 43 después del daño de la membrana inducido por láser a las fibras musculares FDB del individuo. Las fibras musculares wt poseían función intrínseca de reparación de la membrana y eran bastante resistentes al daño inducido por láser de la membrana del sarcolema, ya que presentaban una exclusión eficaz del colorante fluorescente de FM-143 (**Fig. 11B**). Se puede observar la entrada significativa de colorante fluorescente FM-1 43 en las fibras musculares FDB *mg53*^{-/-} después del daño inducido por láser (**Fig. 11C**). La acumulación dependiente del tiempo de FM-143 en el interior de las fibras musculares FDB después del daños por láser de la membrana del sarcolema proporciona un apoyo directo de la función de reparación de la membrana defectuosa del músculo *mg53*^{-/-} (**Fig. 11D**).

La expresión de MG53 es esencial para mantener la integridad normal de la membrana cardíaca. Los defectos en los ratones *mg53*^{-/-} no se limitan a las fibras musculares esqueléticas. Durante la inyección de colorante azul de Evans, ~50% de los ratones *mg53*^{-/-} murieron en el plazo de 16 horas desde la inyección en comparación con ninguno de los animales de tipo salvaje inyectados. El examen post mortem de los corazones *mg53*^{-/-} reveló un marcaje extenso de las fibras del músculo cardíaco con azul de Evans, incluso en ausencia de estrés por ejercicio (**Fig. 9**). Los autores de la presente invención también encontraron que el ejercicio agravaría considerablemente el grado de tinción con azul de Evans en corazones *mg53*^{-/-}.

Papel para MG53 en la formación de miotubos durante el desarrollo muscular. La reparación de la membrana es solo uno de los procesos celulares que requieren el tráfico dinámico de vesículas intracelulares para permitir la reorganización de las membranas celulares. Uno de tales procesos en el músculo esquelético se produce durante la miogénesis. Durante la diferenciación de los mioblastos a miotubos, los mioblastos mononucleares deben fusionarse para formar miotubos multinucleados. Para examinar directamente el papel de la fusión de membranas mediada por MG53 en la miogénesis del músculo esquelético, se utilizó una sonda de ARN de interferencia específica para atenuar la expresión endógena de MG53 en miotubos C2C12 en diferenciación. Una sonda de ARN de horquilla corta (HC) que reconocía la secuencia de nucleótidos 632 a 652 del ADNc de MG53 de ratón suprimió en más de 80% la expresión de MG53 en las células transfectadas con ARNhc-MG53, en comparación con las células transfectadas con una sonda de ARNhc no específica para una versión desorganizada de la secuencia diana de MG53 (**Fig. 5A**). la supresión aguda de MG53 dio como resultado una marcada disminución en la diferenciación de miotubos C2C12 (**Fig. 5B**). Los mioblastos C2C12 transfectados con la sonda ARNhc-MG53 formaron significativamente menos miotubos tanto el día 5 como el día 10 después de la diferenciación inducida por la

privación de suero (**Fig. 5C**). Estos resultados sugieren que es necesaria la expresión normal de MG53 para la diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos.

5 Debido a que la caveolina-3 está regulada evolutivamente (**Fig. 6A**) y puede interactuar con MG53 (**Fig. 6B**), los autores de la presente invención sometieron a ensayo si la estructura de tipo filopodio inducida por MG53 en mioblastos C2C12 podría estar influenciada por la expresión en exceso de la caveolina-3. Como se muestra en la **Fig. 6D**, la expresión en exceso simultánea de caveolina-3 y MG53, en mioblastos C2C12 conduce a la inhibición notable de la aparición de estructuras de tipo filopodio asociadas con la expresión en exceso de GFP-MG53. De media, los mioblastos C2C12 transfectadas con caveolina-3 y GFP-MG53 (a una razón 10:1) mostraron una reducción de $82 \pm 6\%$ en la aparición de estructuras de tipo filopodio, respectivamente (**Fig. 6E y F**). Estos resultados sugieren que la caveolina-3 representa uno de los reguladores moleculares de los eventos de fusión de membrana mediados por MG53.

10 Para investigar más a fondo el papel de la caveolina-3 en la distribución subcelular de MG53 y la formación de estructuras de tipo filopodio, se construyó un plásmido de ARNhc para caveolina-3 (Tabla 1) que incluye un casete de expresión de la proteína Fluorescente roja independiente para proporcionar un marcador para las células transfectadas ARNhc. El análisis de transferencia Western mostrado en la **Fig. 7A** revela que la sonda de ARNhc-cav3 es altamente eficaz en la supresión de la expresión de la caveolina-3 en células CHO transfectadas de forma transitoria con el ADNc de la caveolina-3 sin afectar a la expresión de la caveolina-1.

15

TABLA 1. Oligonucleótidos para la construcción del ARNhc para MG53 y caveolina-3.

Plásmido		Oligos insertados
ARNhc desorganizado para MG53	efector (SEQ ID NO. 18)	5'-GTA CCT CGC CTG CCG TCC AAA GTT GTA ATC AAG AGT TAC AAC TTT GGA CGG CAG GCT TTT TGG AAA-3'
	antisentido (SEQ ID NO. 19)	5'-AGC TTT TCC AAA AAG CCT GCC GTC CAA AGT TGT AAC TCT TGA TTA CAA CTT TGG ACG GCA GGC GAG-3'
ARNhc para MG53	efector (SEQ ID NO.20)	5'-GTA CCT CGA GCT GTC AAG CCT GAA CTC TTC AAG AGA GAG TT CAG GCT TGA CAG CTC TTT TTG GAA A-3'
	antisentido (SEQ ID NO. 21)	5'-AGC TTT TCC AAA AAG AGC TGT CAA GCC TGA ACT CTC TCT TGA AGA GTT CAG GCT TGA CAG CTC GAG-3'
ARNhc desorganizado para Cav-3	efector (SEQ ID NO. 22)	5'- GAT CCG CGG AGA CAT AGC CTG TAA TTC AAG AGA TTA CAG GCT ATG TCT CCG CTT TTT TAC CGG TG -3'
	antisentido (SEQ ID NO. 2)	5'- AAT TCA CCG GTA AAA AAG CGG AGA CAT AGC CTG TAA TCT CTT GAA TTA CAG GCT ATG TCT CCG CG -3'
ARNhc para Cav-3	efector (SEQ ID NO. 24)	5'- GAT CCG GAC ATT CAC TGC AAG GAG TTC AAG AGA CTC CTT GCA GTG AAT GTC CTT TTT TAC CGG TG -3'
	antisentido (SEQ ID NO. 25)	5'- AAT TCA CCG GTA AAA AAG GAC ATT CAC TGC AAG GAG TCT CTT GAA CTC CTT GCA GTG AAT GTC CG -3'

Si bien los mioblastos C2C12 transfectados con un ARNhc no específico muestran un patrón de diferenciación

normal como lo demuestran los abundantes miotubos marcados con rojo fluorescente abundante en el panel de la izquierda de la **Fig. 7B**, la supresión aguda de la caveolina-3 podría inhibir significativamente la diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos (**Fig. 7B**, *panel de la derecha*). Se media, menos de 10% de los mioblastos transfectados con ARNhc-CAV3 marcados mediante fluorescencia roja se pudieron diferenciar en miotubos maduros el día 6 después de la aplicación del medio de diferenciación (**Fig. 7C**). Este resultado coincide con estudios previos de otros investigadores, que demostraron que la expresión de la caveolina-3 es esencial para la diferenciación de miotubos C2C12.

La formación de imágenes microscópicas confocales demostró que la transfección de ARNhc-CAV3 en mioblastos C2C12 no parecía afectar a la distribución subcelular de GFP-MG53 expresado en estas células (**Fig. 7D**). En particular, el patrón distinto de distribución vesicular de GFP-MG53 y las estructuras de membrana de tipo filopodo no se vio afectado por la transfección transitoria con ARNhc-CAV3 o ARNhc no específico. Este resultado coincide con la carencia de expresión de la caveolina-3 en la fase de mioblastos de las células C2C12.

Debido a la naturaleza esencial de la caveolina-3 en la diferenciación de miotubos, se sometió a ensayo el efecto de la metil- β -ciclodextrina (M-beta CD) en mioblastos C2C12 que expresaban en exceso GFP-MG53 para analizar adicionalmente el impacto funcional de la interacción MG53-caveolina sobre el reciclaje de membrana. M-beta CD puede extraer el colesterol de las membranas celulares y ha sido ampliamente utilizado como agente para desorganizar las estructuras en caveola. Como se muestra en la **Fig. 8A**, los mioblastos que expresaban en exceso GFP-MG53 mostraron una fusión espontánea de vesículas intracelularmente, así como en la membrana del sarcolema. Estos eventos de fusión espontánea son lentos y se producen en el orden de minutos. Después del tratamiento con M-beta CD, los eventos excitotóxicos aumentan enormemente dando como resultado una fusión de membrana acelerada y una gemación masiva de las vesículas de la membrana (**Fig. 8B**). Estas alteraciones iniciales son inducidas rápidamente y la incubación prolongada con M-beta CD da como resultado la solubilización de GFP-MG53 dentro del mioblasto (**Fig. 8C**).

La internalización mediada por caveolina de vesículas de membrana probablemente desempeña un papel regulador en la contención de los eventos excitotóxicos excesivos generados por la expresión en exceso de MG53. Además, la interacción de MG53 con caveolina es necesaria para mantener la localización subcelular de MG53. Esta conclusión se apoya en los resultados de experimentos adicionales que utilizan formas mutantes de caveolina-3 (SEQ ID NO: 8).

Papel de los motivos TRIM y SPRY en la función de MG53. La evaluación de la estructura/función de los dominios de MG53 (**Fig. 13**) reveló una notable polaridad de la fusión de GFP a MG53 en la distribución intracelular de MG53. En particular, la fusión de GFP al extremo carboxilo de MG53 altera la capacidad de MG53 para repartirse en el compartimento vesicular y para dirigirse a la membrana del sarcolema. Para someter a ensayo adicionalmente la función de los dominios TRIM y SPRY para facilitar la función de la fusión a la membrana de MG53, se generó una serie de mutantes por delección acoplados a GFP (**Fig. 13A**).

Para analizar la localización subcelular de estos constructos mutantes de MG53, se aplicó la formación de imágenes microscópica confocales a los mioblastos C2C12 después de la expresión transitoria. Como se muestra en la **Fig. 13B**, (*paneles de la derecha*), GFP-TRIM o TRIM-GFP se localizaban predominantemente hacia las vesículas intracelulares sin un marcaje aparente de la membrana del sarcolema. Este resultado sugiere que el dominio SPRY, que está ausente de GFP-TRIM o TRIM-GFP, es necesario para el direccionamiento de MG53 a la membrana del sarcolema. El hecho de que MG53-GFP muestre una distribución predominantemente citosólica (**Fig. 13B**, (*panel de la izquierda*)), Apoya adicionalmente el papel de SPRY en el direccionamiento de MG53 a la membrana de la superficie celular.

Curiosamente, a pesar de que GFP-SPRY o SPRY-GFP muestren un patrón de distribución predominantemente citosólico, están claramente excluidos de las vesículas intracelulares (**Fig. 13B**, (*paneles centrales*)). El patrón de distribución citosólica acoplado con la exclusión de la localización en las vesículas intracelulares de GFP-SPRY y SPRY-GFP probablemente refleja el papel de TRIM. Presumiblemente, el motivo TRIM puede mediar en la adherencia de MG53 a las vesículas intracelulares (**Fig. 13B**, (*paneles de la derecha*)). El dominio SPRY es insuficiente para dirigirse al sarcolema por sí mismo, por lo tanto, el dominio TRIM debe estar presente en tándem con el dominio SPRY para el tráfico apropiado de MG53 a la membrana del sarcolema. Además, los datos de inmunoprecipitación simultánea de los autores de la presente invención demuestran que la caveolina-3 interactúa con el motivo de TRIM de MG53 (**Fig. 13C**). Por lo tanto, es posible que la interacción funcional entre MG53 y caveolina-3 pueda ser la base algunos de los factores celulares que contribuyen al patrón difuso de GFP-SPRY y SPRY-GFP en mioblastos C2C12. En general, la distribución regulada de MG53 a la superficie celular y a los compartimentos intracelulares probablemente sería el resultado de una acción coordinada entre los dominios TRIM y SPRY. Este requisito, tanto de TRIM como de SPRY para la correcta localización subcelular de MG53 también tiene una trascendencia funcional evidente, ya que ninguno de estos mutantes por delección presentan las estructuras de tipo filopodio o los robustos eventos de gemación de vesículas observados a partir de la expresión en exceso de MG53 completa.

MG53 puede funcionar completamente en los tipos de células no musculares. El análisis de la función de MG53 en

células C2C12 miogénicas y en fibras musculares esqueléticas aisladas reveló un papel esencial de MG53 en el tráfico de vesículas y la reparación de membranas en el músculo estriado. Teniendo en cuenta que la reparación de la membrana es esencial para mantener la homeostasis celular, es probable que mecanismos de reparación similares en otros tipos de células no musculares puedan utilizar una maquinaria molecular similar para facilitar este proceso. Para someter a ensayo esta posibilidad, se repitieron varios de los experimentos anteriores llevados a cabo con células miogénicas C2C12 con células de ovario de hámster chino (CHO) no musculares. En estas células, se encontró un fenotipo muy similar al observado en las células C2C12. En primer lugar, GFP-MG53 pudo producir protuberancias de tipo filopodio de la membrana plasmática y localizarse tanto en vesículas intracelulares y como en la membrana plasmática (**Fig. 6 y 14**). En segundo lugar, las proteínas de delección de MG53 se comportaron de una manera idéntica a la observada en las células C2C12. Por último, la caveolina-3 también puede controlar la actividad de MG53 expresada en células CHO (**Fig. 14**). Como resultado, estos estudios indican que MG53 actúa a través de un mecanismo molecular conservado que está presente en otros tipos de células además del músculo.

Purificación de MG53 recombinante y TAT-MG53. Para suministrar MG53 a la célula diana para facilitar una regeneración celular mejorada se acopla una secuencia peptídica que penetra la célula derivada del gen TAT de VIH con MG53 (TAT-MG53) completa y con varios mutantes de delección de MG53 (**Fig. 15A**). Estas proteínas de fusión se pueden expresar en la bacteria *E. coli* y purificada efectivamente utilizando cromatografía de afinidad (**Fig. 15B y 15C**). Los autores de la presente invención han demostrado previamente que la aplicación de tales proteínas de fusión a monocapas de células da como resultado una translocación eficaz de las proteínas recombinantes en células de mamífero. La generación de estas proteínas de fusión permitirá a los autores de la presente invención aumentar la cantidad de MG53 dentro de las células diana para que puedan resolver los efectos terapéuticos de MG53 en el tejido dérmico.

La expresión de MG53 recombinante se puede realizar en células eucariotas o procariotas. La **Figura 18** ilustra que MG53 recombinante se puede expresar en cualquiera de los sistemas eucariotas o procariotas. Brevemente, MG53 recombinante se expresa en células Sf9 como una proteína de fusión que contiene tanto una porción del péptido TAT como una etiqueta de seis histidinas (etiqueta 6-HIS). Esta etiqueta de histidina se puede utilizar para aislar y purificar la proteína recombinante utilizando mecanismos de cromatografía de filtración bien conocidos en la técnica. El Panel (**A**) muestra el gel teñido con azul de Coomassie de fracciones de proteína MG53 humana recombinante (*flecha*) aisladas de células Sf9 con una columna Ni-NTA. Entrada = extracto celular, FT = flujo directo, M = marcador, E = número de elución. (**B**) Gel teñido con azul de Coomassie de TAT-MG53 humana recombinante (*flecha*) aislado a partir de células Sf9. El gel teñido con azul de Coomassie en (**C**) representa TAT-MG53 de ratón recombinante (*flecha*) expresada y aislada a partir de *E. coli*.

TAT-MG53 humana recombinante puede penetrar células de diferentes orígenes. Con el fin de que MG53 funcione debe estar presente intracelularmente. Para demostrar que MG53 recombinante se puede translocar a través de la membrana celular en cantidades terapéuticamente significativas HL-1 se incubaron cardiomiocitos y fibroblastos 3T3 con aproximadamente 4 o 8 mg/ml TAT-MG53 humana recombinante durante 15 minutos a 37°C (**Fig. 17**). Las células se lavaron tres veces en una solución salina tamponada y a continuación se lisaron para el análisis de transferencia Western. La transferencia Western muestra que las células de control (*control*) no contienen MG53 endógena, sin embargo las incubadas con TAT-MG53 contienen abundante TAT-MG53 intracelular. Obsérvese que TAT-MG53 es ligeramente más grande que MG53 visualizada a partir de extracto de músculo esquelético (*músculo*) debido a la adición del péptido de penetración celular TAT a la proteína. Se pueden generar múltiples bandas mediante el procesamiento intracelular para la proteína de fusión TAT-MG53. Por lo tanto, al describir un aspecto del agente terapéutico polipeptídico de MG53, la presente memoria descriptiva describe un polipéptido recombinante que comprende una porción de polipéptido TAT y una porción de polipéptido MG53, en donde las porciones de polipéptido TAT y MG53 están presentes en una sola cadena polipeptídica contigua.

La expresión heteróloga de MG53 en una línea celular humana da como resultado la reparación de la membrana en respuesta a una lesión aguda. La **Figura 16** demuestra que MG53 recombinante se puede expresar en un sistema de expresión heterólogo y conservar su capacidad para reparar el daño de la membrana celular sin la expresión de las proteínas adicionales. Específicamente, MG53 se clonó en un vector de expresión como una proteína de fusión con la proteína fluorescente roja (RFP). La proteína de fusión se expresó en una línea celular de riñón embrionario humano (línea celular de fibroblastos HEK293) y la capacidad de la célula para reparar el daño de la membrana se comparó con las células que expresaban solo RFP. El Panel (**a**) demuestra que las líneas celulares que expresan establemente una proteína de control RFP (proteína fluorescente roja) muestran un patrón de expresión citosólica. Sin embargo, en las células HEK293 que expresan solo RFP (**Fig. 16A**); la lesión con un microelectrodo no da como resultado la translocación de RFP al sitio de la lesión (*flecha*). Se produce un cierto blanqueamiento de la fluorescencia de RFP a partir de la entrada excesiva de tampón extracelular (*). En contraste, las células HEK293 que están expresando de manera estable RFP-MG53 (**c**) muestran la localización en vesículas intracelulares. La lesión con microelectrodos de células HEK293 que expresan RFP-MG53 (**d**) da como resultado la translocación masiva de MG53 al sitio de la lesión (*flecha*) en menos de 90 segundos. Este resultado demuestra que MG53 recombinante puede ser útil para reparar el daño celular y/o tisular en cualquier entorno celular. Aunque MG53 recombinante es capaz de reparar lesiones de las membranas celulares cuando se expresa en un sistema heterólogo la invención no está tan limitada. En ciertos aspectos, la memoria descriptiva describe métodos de

expresión simultánea de MG53 y caveolina-3 con el fin de promover la reparación de la membrana para tratar o prevenir el daño tisular. En otros aspectos, la presente memoria descriptiva describe una composición terapéutica que comprende un polipéptido de TAT-MG53 y un polipéptido de TAT-caveolina-3.

5 La asociación de MG53 con membranas y la reparación de membranas depende de la interacción con fosfatidilserina. El perfilado lipídico (**Fig. 19**) reveló que la MG53 recombinante purificada podía interactuar específicamente con fosfatidilserina (PS), lípidos que aparecen preferentemente en la parte interior de la membrana plasmática y la cara citoplasmática de las vesículas intracelulares (**Fig. 19A**). Si esta interacción permite que MG53 se fije a las membranas intracelulares, en ese caso, la acumulación vesicular siguiente a la desorganización de la membrana se podría controlar por el movimiento de la Anexina-V, una proteína que se sabe que interactúa con PS. Utilizando anexina-V-GFP, los autores de la presente invención observaron un rápido marcaje de anexina-V-GFP en el sitio de la lesión de mioblastos C2C12 (**Fig. 19B**). La acumulación de Anexina-V-GFP se aceleró mediante la expresión simultánea de RFP-MG53, que coincide con un papel de MG53 en la mediación del proceso de reparación agudo de la membrana. La formación de cúmulos de células vivas demostró un movimiento coordinado de RFP-MG53 y Anexina-V-GFP hacia el lugar de la lesión.

15 **Métodos ilustrativos**

Identificación y clonación de MG53 - La preparación y el escrutinio de una biblioteca de mAb para determinar las proteínas microsomales de músculo esquelético de conejo se han descrito previamente (21). La preparación de mAb5259 (subclase de IgG1) y la purificación por inmunoadinidad se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (21). La MG53 purificada se sometió a análisis de la secuencia de amino ácido y todas las secuencias determinadas fueron codificadas en ADNc de MG53 de conejo (datos no mostrados). Las búsquedas de homología en las bases de datos encontraron MG53 ratón y humana utilizando las secuencias de aminoácidos parciales de conejo. Una región del exón del gen de MG53 de ratón se amplificó a partir de ADN genómico 32 de ratón, y las bibliotecas de músculo esquelético de conejo y de ratón se escrutaron utilizando el fragmento exónico marcado con ³²P para producir ADNc completos.

25 *Análisis inmunohistoquímico y de inmunotinción* - Los análisis inmunoquímicos utilizando mAb5259 se llevaron a cabo como se describió previamente (21). La microscopía inmunoelectrónica utilizando el anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro de 15 nm se llevó a cabo como se describió previamente (17).

30 *Cultivo celular* - La línea celular de mioblastos murinos C2C12 utilizada para todos los estudios se adquirió de la Colección de Cultivos Tipo Americana (Manassas, VA). Las células fueron cultivadas en un entorno humidificado a 37°C y con 5% de CO₂ en medio DMEM para C2C12 o medio F12 de Ham para las células CHO con un suplemento de suero fetal bovino al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Con el fin de inducir la diferenciación de miotubos, los mioblastos C2C12 se hicieron crecer hasta la confluencia y el medio se cambió a DMEM que contenía suero de caballo al 2%, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml). Para las transfecciones transitorias, los mioblastos C2C12 o las células CHO se cultivaron en placa a 70% de confluencia en placas con fondo de vidrio. Después de 24 horas, las células se transfectaron con los plásmidos descritos anteriormente utilizando el reactivo GeneJammer (Stratagene). Las células se visualizaron mediante formación de imágenes confocales de células vivas 24-48 horas después de la transfección o en los momentos indicados para los experimentos individuales. En algunos experimentos, se permitió que los mioblastos C2C12 se diferenciaran a miotubos durante el tiempo indicado antes de la observación.

40 *Construcción de plásmidos* - Se generaron ADNc completo de MG53 de ratón y mutantes por truncamiento asociados mediante PCR utilizando los cebadores descritos en la tabla complementaria 1. Para la construcción de pCMS-MG53, después de la digestión por las enzimas de restricción apropiadas, el ADNc amplificado por PCR se insertó en el vector pCMS-EGFP (Invitrogen) en los sitios Nhe I/Xba I. Para la construcción de GFP-MG53, GFP-TRIM, GFP-SPRY, MG53-GFP, TRIM-GFP y SPRY-GFP, los productos de la PCR se insertaron en pEGFP-C1 en los sitios XhoI/XbaI o pEGFP-N1 en los sitios XhoI/KpnI.

Formación de imágenes de células vivas - Para controlar el tráfico intracelular de GFP-MG33 se cultivaron células CHO o C2C12 en placas con fondo de vidrio (Biotech Inc.) y se transfectaron con los plásmidos descritos anteriormente. Las imágenes de fluorescencia (512x512) fueron capturadas a 3,18 s/sección óptica usando un microscopio confocal de barrido láser BioRad 2100 Raciace con un objetivo de inmersión en aceite 63X y 1,3AN.

50 *Análisis de ARNi* - La secuencia diana para el ARNhc atenuado de MG53 se encuentra en la posición 622- 642 (GAG CTG TCA AGC CTG AAC TCT) en el ADNc de MG53 de ratón. Para la caveolina-3, la secuencia diana se encuentra en la posición 363-380 (GAC ATT CAC TGC AAG GAG ATA). Se sintetizaron los oligonucleótidos efector y antisentido complementarios. Para construir el ARNhc de MG53 y los plásmidos de control, los oligonucleótidos hibridados se insertaron en psiRNA-hH1GFPzeo G2 (InvivoGene) en los sitios de las enzimas de restricción Ace 65I/Hind III. Para el ARNhc y los plásmidos de control de caveolina-3, los oligonucleótidos hibridados se insertaron en el vector pRNAiDsRed (BD Biosciences) en los sitios de las enzimas de restricción EcoR I/BamH I. Cada vector tiene un casete de expresión de la proteína fluorescente (verde o rojo) independiente que actúa como marcador de la transfección celular. Todos los plásmidos se confirmaron mediante secuenciación directa con cebadores contiguos

y se examinó la regulación a la baja de la expresión de las proteínas MG53 y caveolina-3 mediante análisis de transferencia Western.

5 *Transferencia Western e inmunoprecipitación simultánea* - En las inmunotransferencias se utilizaron técnicas convencionales. En resumen, las células C2C12 o CHO se cosecharon y se lisaron con tampón RIPA (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP40 al 1%, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) modificado enfriado con hielo en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma). Se separaron 20 µg de proteína total sobre un gel de poliacrilamida-SDS al 4-12%. Se utilizó un protocolo convencional para los estudios de inmunoprecipitación simultánea de MG53 y caveolina-3. En resumen, se lisaron tejido muscular esquelético o miotubos de C2C12 en 0,5 ml de tampón RIPA modificados. El producto lisado de células completas (500 µg) se incubó durante la noche con 5 µg de anticuerpo (mAb) policlonal anti-MG53 (anticuerpo policlonal), o anti-caveolina-3. Como control negativo, se incubaron 500 µg de producto lisado de células completas con 5 µg IgG de conejo y ratón normal y se procesaron como se ha descrito anteriormente. Los complejos inmunológicos se recogieron sobre cuentas de proteína G-Sefarosa mediante incubación durante 2 horas y se lavaron cuatro veces con tampón RIPA.

15 Se entiende que los ejemplos detallados y los aspectos descritos en la presente memoria se proporcionan a modo de ejemplo con fines ilustrativos solamente, y de ninguna manera se considera que sean limitantes de la invención. Las diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos serán sugeridas a los expertos en la técnica y se incluyen en esta solicitud. Por ejemplo, las cantidades relativas de los ingredientes se pueden variar para optimizar los efectos deseados, se pueden añadir ingredientes adicionales, y/o se pueden sustituir por ingredientes similares uno o más de los ingredientes descritos. Las características ventajosas adicionales y las funcionalidades asociadas con los sistemas, los métodos y los procedimientos de la presente invención serán evidentes a partir de las reivindicaciones adjuntas.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Ma, Jianjie
- 5 <120> Proteinas, Ácidos Nucleicos que Las Codifican y Métodos Asociados de Uso
- <130> 99823.00022
- <140> TBD
- 10 <141> 29-06-2007
- <150> 60/830,013
- <151> 11-07-2006
- 15 <150> 60/876,871
- <151> 22-12-2006
- <160> 25
- 20 <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 477
- <212> PRT
- 25 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> característica_misc
- <222> (1)..(477)
- 30 <223> Polipéptido MG53 Humano
- <400> 1

```

Met Ser Ala Ala Pro Gly Leu Leu His Gln Glu Leu Ser Cys Pro Leu
 1          5          10          15

Cys Leu Gln Leu Phe Asp Ala Pro Val Thr Ala Glu Cys Gly His Ser
          20          25          30

Phe Cys Arg Ala Cys Leu Gly Arg Val Ala Gly Glu Pro Ala Ala Asp
          35          40          45

Gly Thr Val Leu Cys Pro Cys Cys Gln Ala Pro Thr Arg Pro Gln Ala
 50          55          60

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Leu Ala Arg Leu Val Glu Gly Leu Ala Gln
 65          70          75          80

Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
          85          90          95

Cys Glu Gln Asp Arg Ala Leu Val Cys Gly Val Cys Ala Ser Leu Gly
          100          105          110

Ser His Arg Gly His Arg Leu Leu Pro Ala Ala Glu Ala His Ala Arg
          115          120          125

Leu Lys Thr Gln Leu Pro Gln Gln Lys Leu Gln Leu Gln Glu Ala Cys
          130          135          140
    
```

35

ES 2 479 668 T3

Met Arg Lys Glu Lys Ser Val Ala Val Leu Glu His Gln Leu Val Glu
145 150 155 160

Val Glu Glu Thr Val Arg Gln Phe Arg Gly Ala Val Gly Glu Gln Leu
165 170 175

Gly Lys Met Arg Val Phe Leu Ala Ala Leu Glu Gly Ser Leu Asp Cys
180 185 190

Glu Ala Glu Arg Val Arg Gly Glu Ala Gly Val Ala Leu Arg Arg Glu
195 200 205

Leu Gly Ser Leu Asn Ser Tyr Leu Glu Gln Leu Arg Gln Met Glu Lys
210 215 220

Val Leu Glu Glu Val Ala Asp Lys Pro Gln Thr Glu Phe Leu Met Lys
225 230 235 240

Tyr Cys Leu Val Thr Ser Arg Leu Gln Lys Ile Leu Ala Glu Ser Pro
245 250 255

Pro Pro Ala Arg Leu Asp Ile Gln Leu Pro Ile Ile Ser Asp Asp Phe
260 265 270

Lys Phe Gln Val Trp Arg Lys Met Phe Arg Ala Leu Met Pro Ala Leu
275 280 285

Glu Glu Leu Thr Phe Asp Pro Ser Ser Ala His Pro Ser Leu Val Val
290 295 300

Ser Ser Ser Gly Arg Arg Val Glu Cys Ser Glu Gln Lys Ala Pro Pro
305 310 315 320

Ala Gly Glu Asp Pro Arg Gln Phe Asp Lys Ala Val Ala Val Val Ala
325 330 335

His Gln Gln Leu Ser Glu Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Asp Val Gly
340 345 350

Asp Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Val Ile Ala Ala Glu Ala Pro Arg
355 360 365

Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly
370 375 380

Leu Arg Glu Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
385 390 395 400

Arg Ala Leu Arg Ser Pro Glu Arg Arg Pro Thr Arg Ile Gly Leu Tyr

ES 2 479 668 T3

405 410 415

Leu Ser Phe Gly Asp Gly Val Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Asp Ala
 420 425 430

Asp Ala Leu Val Pro Leu Phe Ala Phe His Glu Arg Leu Pro Arg Pro
 435 440 445

Val Tyr Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
 450 455 460

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Glu Gly Ala Glu Ala
 465 470 475

5 <210> 2
 <211> 1434
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1434)
 <223> cADN MG53 humano

<400> 2

atgtcggctg cgcccggcct cctgcaccag gagctgtcct gcccgctgtg cctgcagctg 60
 ttccgacgcg ccgtgacagc cgagtgcggc cacagtttct gccgcgcctg cctaggccgc 120
 gtggccgggg agccggcggc ggatggcacc gttctctgcc cctgctgcca ggccccacg 180
 cggccgcagg cactcagcac caacctgcag ctggcgcgcc tggaggagg gctggcccag 240
 gtgccgcagg gccactgcga ggagcacctg gaccgcctga gcatctactg cgagcaggac 300
 cgcgcgctgg tgtgcggagt gtgcgcctca ctcggtcgc accgcggta tgcctcctg 360
 cctgcgcgag aggcccacgc acgctcaag acacagctgc cacagcagaa actgcagctg 420
 caggaggcat gcatgcgtaa ggagaagagt gtggctgtgc tggagcatca gctggaggag 480
 gtggaggaga cagtgcgtca gttccggggg gccgtggggg agcagctggg caagatgcgg 540
 gtgttcctgg ctgcaactgga gggctccttg gactgcgagg cagagcgtgt acggggtgag 600
 gcaggggtcg ccttgccgag ggagctggg agcctgaact cttacctgga gcagctgcgg 660
 cagatggaga aggtcctgga ggaggtggcg gacaagccgc agactgagtt cctcatgaaa 720
 tactgcctgg tgaccagcag gctgcagaag atcctggcag agtctcccc accgcccgt 780
 ctggacatcc agctgccaat tatctcagat gacttcaaat tccagggtgt gaggaagatg 840
 ttccgggctc tgatgccagc gctggaggag ctgaccttg acccgagctc tgcgcacccg 900
 agcctggtgg tgtcttctc tggccgcgc gtggagtgt cggagcagaa ggcgccgccc 960
 gccggggagg acccgccca gttcgacaag gcggtggcgg tggaggcgca ccagcagctc 1020
 tccgagggcg agcactactg ggaggtggat gttggcgaca agccgcgctg ggcgctgggc 1080
 15 gtgatcgcgg ccgaggcccc ccgcccggg cgctgcacg cgggtgccctc gcagggcctg 1140

ES 2 479 668 T3

tggctgctgg ggctgcgcga gggcaagatc ctggaggcac acgtggaggc caaggagccg 1200
 cgegetctgc gcagccccga gaggggcccc acgcgcattg gcctttacct gagcttcggc 1260
 gacggcgtec tctccttcta cgatgccagc gacgccgacg cgctcgtgcc gctttttgcc 1320
 ttccacgagc gcctgcccag gcccgtgtac cccttcttcg acgtgtgctg gcacgacaag 1380
 ggcaagaatg cccagccgct gctgctcgtg ggtcccgaag gcgccgaggc ctga 1434

<210> 3
 <211> 477
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (1)..(477)
 <223> Ratón MG53

<400> 3

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

15

ES 2 479 668 T3

Glu Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Ala Gly Val Ala Leu Arg Arg Glu
 195 200 205
 Leu Ser Ser Leu Asn Ser Tyr Leu Glu Gln Leu Arg Gln Met Glu Lys
 210 215 220
 Val Leu Glu Glu Val Ala Asp Lys Pro Gln Thr Glu Phe Leu Met Lys
 225 230 235 240
 Phe Cys Leu Val Thr Ser Arg Leu Gln Lys Ile Leu Ser Glu Ser Pro
 245 250 255
 Pro Pro Ala Arg Leu Asp Ile Gln Leu Pro Val Ile Ser Asp Asp Phe
 260 265 270
 Lys Phe Gln Val Trp Lys Lys Met Phe Arg Ala Leu Met Pro Ala Leu
 275 280 285
 Glu Glu Leu Thr Phe Asp Pro Ser Ser Ala His Pro Ser Leu Val Val
 290 295 300
 Ser Ser Ser Gly Arg Arg Val Glu Cys Ser Asp Gln Lys Ala Pro Pro
 305 310 315 320
 Ala Gly Glu Asp Thr Arg Gln Phe Asp Lys Ala Val Ala Val Val Ala
 325 330 335
 Gln Gln Leu Leu Ser Gln Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly
 340 345 350
 Asp Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Val Met Ala Ala Asp Ala Ser Arg
 355 360 365
 Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly
 370 375 380
 Leu Arg Asp Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
 385 390 395 400
 Arg Ala Leu Arg Thr Pro Glu Arg Pro Pro Ala Arg Ile Gly Leu Tyr
 405 410 415
 Leu Ser Phe Ala Asp Gly Val Leu Ala Phe Tyr Asp Ala Ser Asn Pro
 420 425 430
 Asp Val Leu Thr Pro Ile Phe Ser Phe His Glu Arg Leu Pro Gly Pro
 435 440 445
 Val Tyr Pro Ile Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
 450 455 460
 Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Glu Gln Glu Gln Ala
 465 470 475

- 5 <210> 4
- <211> 1434
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

ES 2 479 668 T3

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1434)
 5 <223> cADN MG53 Ratón

 <400> 4

 atgtcggctg caccggcct tctgegtac gaactgtcct gccactgtg cttgcagctg 60
 ttcgatgcgc cagtgcggc tgagtgtggc cacagtttct gccgtgcctg cctgatccgg 120
 gtggcagggg agcctgctgc ggacggcaca gttgcctgtc cctgttgtca ggcacctaca 180
 eggccgeagg ctctaagcac taacctccag ttgtcacgcc ttgtggaggg tttggcgcaa 240
 gtgccccaa ggcactgcga ggaacacctg gatccactga gcatctactg cgagcaggac 300
 cgcacacttg tgtgtggtgt gtgtgcctcg ctcggttctc accgtgggtca tegtctcctg 360
 cctgccgctg aagcccaagc acgcctcaag acacagcttc cacagcagaa gatgcagctg 420
 caggaggcat gcatgcgcaa ggagaagact gtacgggtgc tggagcatca gctggtggag 480
 gtggaggaga cagtgcgcca gttccgggga gctgtcgggg agcagctggg gaagatgcgg 540
 atgttctctg ctgccttaga aagttctctg gaccgtgaag cagaaagggt tcggggtgat 600
 gctggggttg ccttgcgtcg ggagctgtca agcctgaact cttacctaga gcaactgagg 660
 cagatggaga aggtgctgga ggaggtggct gacaagccac agacagaatt cctcatgaaa 720
 ttctgocctg taaccagcag gctgcagaag atcctgtcag agtcaccacc accggcaagg 780
 ctagatatcc agctgcctgt catctcagat gacttcaaat tccagggtgtg gaagaagatg 840
 ttccgggctc tgatgccagc gctggaggaa ctgacttttg accccagctc tgcgcacccg 900
 agcctggttg tgcctcctc tggcgcgca gtggagtgtc cagaccagaa ggcgccgcca 960
 gcgggagaag acacgcgtca gttcgacaag gcagtagcgg tggggcgca gcagctgctg 1020
 tcacagggcg agcactattg ggaggtggag gtggggcaca aaccacgctg ggccctggga 1080
 gtgatggcgg ctgacgcttc ccgctgtggc cggctgcacg cggtgccctc acaggggctg 1140
 tggctgctgg gtctgcgca tggcaagatc ctggaggcgc acgtggaggc caaggagccg 1200
 cgggcactgc gcacccaga gaggcctccg gcgcgattg gcctctacct aagcttcgca 1260
 gatggcgtcc tggctttcta tgatgcgagc aaccccgacg tacttacgcc aatcttttct 1320
 ttccaagcgc gtctgcccgg gccgggttac cccatctttg acgtgtgctg gcacgacaag 1380
 ggcaagaatg cccagcccct gctgcttgtg gggccggagc aggaacaggc ctga 1434

10 <210> 5
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(477)
 <223> MG53Conejo

20 <400> 5

ES 2 479 668 T3

Met Ser Ala Ala Pro Gly Leu Leu His Gln Glu Leu Ser Cys Pro Leu
1 5 10 15

Cys Leu Gln Leu Phe Asp Ala Pro Val Thr Ala Glu Cys Gly His Ser
20 25 30

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

Gly Thr Val Asn Cys Pro Cys Cys Gln Ala Pro Thr Arg Pro Gln Ala
50 55 60

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Leu Ala Arg Leu Val Glu Gly Leu Ala Gln
65 70 75 80

Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
85 90 95

Cys Glu Gln Asp Arg Val Leu Val Cys Gly Val Cys Ala Ser Leu Gly
100 105 110

Ser His Arg Gly His Arg Leu Leu Pro Ala Ala Glu Ala His Ser Arg
115 120 125

Leu Lys Thr Gln Leu Pro Gln Gln Lys Leu Gln Leu Gln Glu Ala Ser
130 135 140

Met Arg Lys Glu Lys Ser Val Ala Val Leu Glu His Gln Leu Thr Glu
145 150 155 160

Val Glu Glu Thr Val Arg Gln Phe Arg Gly Ala Val Gly Glu Gln Leu
165 170 175

Gly Lys Met Arg Val Phe Leu Ala Ala Leu Glu Gly Ser Leu Asp Arg
180 185 190

Glu Ala Glu Arg Val Arg Ser Glu Ala Gly Val Ala Leu Arg Arg Glu
195 200 205

Leu Gly Gly Leu His Ser Tyr Leu Glu Gln Leu Arg Gln Met Glu Lys
210 215 220

Val Leu Glu Glu Val Ala Asp Lys Pro Gln Thr Glu Phe Leu Met Lys

ES 2 479 668 T3

```

atgtcggcgg cgccccggcct cctgcaccag gagctgtctt gcccgctgtg cctgcagctg 60
ttcgcagcgc ccgtgacagc cgagtgcggc cacagtttct gccgcgcctg cctgagccgc 120
gtggcggggg agccggcggc cgatggcacc gtgaaactgcc cgtgctgccca ggcgcccacg 180
cggccgcagg cgctcagcac caacctgcag ctggcgcgcc tggaggagg gctggcgcag 240
gtgccgcagg gccactgcga ggagcacctg gaccgctga gcatctactg cgagcaggac 300
cgcgttctcg tgtgcggcgt gtgcgcctcg ctgcgctcgc accgcggcca ccgcctgctg 360
cccgcgcggc agggcccactc gcgtctcaag acgcagctgc cccagcagaa gctgcagctg 420
caggaggcga gcatgcgcaa ggagaagagc gtggccgtgc tggagacca gctcacggag 480
gtggaggaga cagtgcgtca gttccggggg gcagtggggg agcagctggg caagatgcgg 540
gtgttctctg ccgcccctgga gggctccctg gaccgcgagg cagaactgtg gcggagcgag 600
gcgggggtgg ccttgcggcg ggagctgggg ggcctccact cgtacctgga gcagctgcgg 660
cagatggaga aggtgttgga ggaggtggct gacaagccac agaccgagtt ccttatgaaa 720
tattgccttg tgaccagcag gctgcagaag atcctggcgg agtcgccacc acctgctcgt 780
ctggacatcc agctgcccac ctttcagat gacttcaa atccaggtgtg gaggaagatg 840
tctcgggctc tyatgccagc gctggaggag ctgacctttg acccgagctc cgcgcacccg 900
agcctcgtgg tgtcaccac gggccgcca gtggagtgt cggagcagaa ggcgcccgc 960
gccggggacg acgcgcgcca gttcgacaag gctgtggccg tggaggcgca gcagctgctg 1020
tccgacggcg agcactactg ggaggtggag gtggcgaca agccgcgctg ggcgctgggc 1080
gtgatggcct ccgaggcgag ccgccgtggc cggctgcacg ccgtgccctc acagggtttg 1140
tggctgctgg ggctgcgca cggcaagacc ctggaggcgc acgtggaggc caaggagccg 1200
cgcgcgctgc gcaccccga gcggcggccc acgcgcctcg gcctctacct cagcttcggc 1260
gatggcgtgc tcgccttcta cgacgccagc gacgccgacg cgctcgagct gctgtttgct 1320
ttccgcgagc gcctgcccgg gcccggttac cccttctcg acgtgtgctg gcatgacaag 1380
ggcaagaatg cgcagccgct gctgctcgtg gggccggatg gccaggaggc ctga 1434

```

<210> 7
 <211> 477
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MUTAGEN
 10 <222> (29)..(29)
 <223> C29L/C242A

<220>
 <221> MUTAGEN
 15 <222> (242)..(242)
 <223> C29L/C242A

<400> 7

ES 2 479 668 T3

Met Ser Ala Ala Pro Gly Leu Leu His Gln Glu Leu Ser Cys Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Gln Leu Phe Asp Ala Pro Val Thr Ala Glu Leu Gly His Ser
 20 25 30

Phe Cys Arg Ala Cys Leu Gly Arg Val Ala Gly Glu Pro Ala Ala Asp
 35 40 45

Gly Thr Val Leu Cys Pro Cys Cys Gln Ala Pro Thr Arg Pro Gln Ala
 50 55 60

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Leu Ala Arg Leu Val Glu Gly Leu Ala Gln
 65 70 75 80

Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
 85 90 95

Cys Glu Gln Asp Arg Ala Leu Val Cys Gly Val Cys Ala Ser Leu Gly
 100 105 110

Ser His Arg Gly His Arg Leu Leu Pro Ala Ala Glu Ala His Ala Arg
 115 120 125

Leu Lys Thr Gln Leu Pro Gln Gln Lys Leu Gln Leu Gln Glu Ala Cys
 130 135 140

Met Arg Lys Glu Lys Ser Val Ala Val Leu Glu His Gln Leu Val Glu
 145 150 155 160

Val Glu Glu Thr Val Arg Gln Phe Arg Gly Ala Val Gly Glu Gln Leu
 165 170 175

Gly Lys Met Arg Val Phe Leu Ala Ala Leu Glu Gly Ser Leu Asp Cys
 180 185 190

Glu Ala Glu Arg Val Arg Gly Glu Ala Gly Val Ala Leu Arg Arg Glu
 195 200 205

Leu Gly Ser Leu Asn Ser Tyr Leu Glu Gln Leu Arg Gln Met Glu Lys
 210 215 220

Val Leu Glu Glu Val Ala Asp Lys Pro Gln Thr Glu Phe Leu Met Lys
 225 230 235 240

Tyr Ala Leu Val Thr Ser Arg Leu Gln Lys Ile Leu Ala Glu Ser Pro
 245 250 255

ES 2 479 668 T3

Pro Pro Ala Arg Leu Asp Ile Gln Leu Pro Ile Ile Ser Asp Asp Phe
 260 265 270

Lys Phe Gln Val Trp Arg Lys Met Phe Arg Ala Leu Met Pro Ala Leu
 275 280 285

Glu Glu Leu Thr Phe Asp Pro Ser Ser Ala His Pro Ser Leu Val Val
 290 295 300

Ser Ser Ser Gly Arg Arg Val Glu Cys Ser Glu Gln Lys Ala Pro Pro
 305 310 315 320

Ala Gly Glu Asp Pro Arg Gln Phe Asp Lys Ala Val Ala Val Val Ala
 325 330 335

His Gln Gln Leu Ser Glu Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Asp Val Gly
 340 345 350

Asp Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Val Ile Ala Ala Glu Ala Pro Arg
 355 360 365

Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly
 370 375 380

Leu Arg Glu Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
 385 390 395 400

Arg Ala Leu Arg Ser Pro Glu Arg Arg Pro Thr Arg Ile Gly Leu Tyr
 405 410 415

Leu Ser Phe Gly Asp Gly Val Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Asp Ala
 420 425 430

Asp Ala Leu Val Pro Leu Phe Ala Phe His Glu Arg Leu Pro Arg Pro
 435 440 445

Val Tyr Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
 450 455 460

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Glu Gly Ala Glu Ala
 465 470 475

<210> 8

<211> 151

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (1)..(151)

<223> CAVEOLINA-3 P56539 CAV3_HUMANA - HOMO SAPIENS (HUMANO).

<400> 8

15 Met Met Ala Glu Glu His Thr Asp Leu Glu Ala Gln Ile Val Lys Asp

ES 2 479 668 T3

Ala Gln Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser
85 90 95

Val Tyr Cys Glu Gln Asp Arg Ala Leu Ile Cys Gly Val Cys Ala Ser
100 105 110

Leu Gly Lys His Arg Gly His Ser Val Val Thr Ala Ala Glu Ala His
115 120 125

Gln Arg Met Lys Lys Gln Leu Pro Gln Gln Arg Leu Gln Leu Gln Glu
130 135 140

Ala Cys Met Arg Lys Glu Lys Thr Val Ala Leu Leu Asp Arg Gln Leu
145 150 155 160

Ala Glu Val Glu Glu Thr Val Arg Gln Phe Gln Arg Ala Val Gly Glu
165 170 175

Gln Leu Gly Val Met Arg Ala Phe Leu Ala Ala Leu Glu Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Lys Glu Ala Glu Arg Val Thr Gly Glu Ala Gly Thr Ala Leu Lys
195 200 205

Ala Glu Arg Arg Ile Val Thr Ser Tyr Leu Asp Gln Leu Gln Gln Met
210 215 220

Glu Lys Val Leu Asp Glu Val Thr Asp Gln Pro Gln Thr Glu Phe Leu
225 230 235 240

Arg Lys Tyr Cys Leu Val Ile Ser Arg Leu Gln Lys Ile Leu Ala Glu
245 250 255

Ser Pro Pro Ala Ala Arg Leu Asp Ile Gln Leu Pro Ile Ile Ser Asp
260 265 270

Asp Phe Lys Phe Gln Val Trp Arg Lys Met Phe Arg Ala Leu Met Pro
275 280 285

Gly Met Glu Val Leu Thr Phe Asp Pro Ala Ser Ala His Pro Ser Leu
290 295 300

Leu Val Ser Pro Ser Gly Arg Arg Val Glu Cys Val Glu Gln Lys Ala
305 310 315 320

Pro Pro Ala Gly Asp Asp Pro Gln Gln Phe Asp Lys Ala Val Ala Leu
325 330 335

ES 2 479 668 T3

Val Ala Lys Gln Gln Leu Ser Glu Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Glu
 340 345 350

Val Gly Asp Lys Pro Arg Trp Gly Leu Gly Leu Ile Ser Ala Asp Val
 355 360 365

Ser Arg Arg Gly Lys Leu His Pro Thr Pro Ser Gln Gly Phe Trp Met
 370 375 380

Leu Gly Leu Arg Glu Gly Lys Val Tyr Glu Ala His Val Glu Ser Lys
 385 390 395 400

Glu Pro Lys Val Leu Lys Val Asp Gly Arg Pro Ser Arg Ile Gly Leu
 405 410 415

Tyr Leu Ser Phe Arg Asp Gly Val Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Asp
 420 425 430

Leu Asp Asn Leu Leu Pro Leu Tyr Ala Phe His Glu Arg Leu Pro Gly
 435 440 445

Pro Val Tyr Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn
 450 455 460

Ala Gln Pro Leu Leu Leu Leu Gly Pro Asp Gly Glu Gln
 465 470 475

<210> 10
 <211> 477
 5 <212> PRT
 <213> Canis sp.

<220>
 <221> PÉPTIDO
 10 <222> (1)..(477)
 <223> MG53 Perro

<400> 10

Met Ser Ala Ala Pro Gly Leu Leu His Gln Glu Leu Ser Cys Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Gln Leu Phe Asp Ala Pro Val Thr Ala Glu Cys Gly His Ser
 20 25 30

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

Gly Thr Val Pro Cys Pro Cys Cys Gln Ala Leu Thr Arg Pro Gln Ala
 50 55 60

Leu Ser Thr Asn Gln Gln Leu Ala Arg Leu Val Glu Gly Leu Ala Gln
 65 70 75 80

15 Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr

ES 2 479 668 T3

Glu Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Val Ile Ala Ala Gln Ala Ser Arg
 355 360 365

Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly
 370 375 380

Leu Arg Asp Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
 385 390 395 400

Arg Ala Leu Arg Thr Pro Glu Arg Arg Pro Thr Arg Ile Gly Ile Tyr
 405 410 415

Leu Ser Phe Gly Asp Gly Val Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Asp Pro
 420 425 430

Asp Ala Leu Glu Leu Leu Phe Ala Phe His Glu Arg Leu Pro Gly Pro
 435 440 445

Val Tyr Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
 450 455 460

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Asp Gly Glu Glu Ala
 465 470 475

<210> 11
 <211> 477
 5 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<220>
 <221> PÉPTIDO
 10 <222> (1)..(477)
 <223> MG53 Chimpancé

<400> 11

Met Ser Ala Ala Pro Gly Leu Leu His Gln Glu Leu Ser Cys Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Gln Leu Phe Asp Ala Pro Val Thr Ala Glu Cys Gly His Ser
 20 25 30

Phe Cys Arg Ala Cys Leu Gly Arg Val Ala Gly Glu Pro Ala Ala Asp
 35 40 45

Gly Thr Val Leu Cys Pro Cys Cys Gln Ala Pro Thr Arg Pro Gln Ala
 50 55 60

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Leu Ala Arg Leu Val Glu Gly Leu Ala Gln
 65 70 75 80

Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
 85 90 95

15

ES 2 479 668 T3

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

ES 2 479 668 T3

Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly
 370 375 380

Leu Arg Glu Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
 385 390 395 400

Arg Ala Leu Arg Ser Pro Glu Arg Arg Pro Thr Arg Ile Gly Leu Tyr
 405 410 415

Leu Ser Phe Gly Asp Gly Val Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Asp Ala
 420 425 430

Asp Ala Leu Val Pro Leu Phe Ala Phe His Glu Arg Leu Pro Arg Pro
 435 440 445

Val Tyr Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
 450 455 460

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Glu Gly Ala Glu Ala
 465 470 475

<210> 12

<211> 477

5 <212> PRT

<213> Macaca mulata

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(477)

<223> MG53 Mono Rhesus

<400> 12

Met Ser Ala Ala Pro Gly Leu Leu His Gln Glu Leu Ser Cys Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Gln Leu Phe Asp Ala Pro Val Thr Ala Glu Cys Gly His Ser
 20 25 30

Phe Cys Arg Ala Cys Leu Gly Arg Val Ala Gly Glu Pro Ala Ala Asp
 35 40 45

Gly Thr Val Leu Cys Pro Cys Cys Gln Ala Pro Thr Arg Pro Gln Ala
 50 55 60

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Leu Ala Arg Leu Val Glu Gly Leu Ala Gln
 65 70 75 80

Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
 85 90 95

15 Cys Glu Gln Asp Arg Ala Leu Val Cys Gly Val Cys Ala Ser Leu Gly
 100 105 110

ES 2 479 668 T3

Ser His Arg Gly His Arg Leu Leu Pro Ala Ala Glu Ala His Ala Arg
 115 120 125

Leu Lys Thr Gln Leu Pro Gln Gln Lys Leu Gln Leu Gln Glu Ala Cys
 130 135 140

Met Arg Lys Glu Lys Ser Val Ala Val Leu Glu His Gln Leu Val Glu
 145 150 155 160

Val Glu Glu Thr Val Arg Gln Phe Arg Gly Ala Val Gly Glu Gln Leu
 165 170 175

Gly Lys Met Arg Val Phe Leu Ala Ala Leu Glu Gly Ser Leu Asp Arg
 180 185 190

Glu Ala Glu Arg Val Arg Gly Glu Ala Gly Val Ala Leu Arg Arg Glu
 195 200 205

Leu Gly Ser Leu Asn Ser Tyr Leu Glu Gln Leu Arg Gln Met Glu Lys
 210 215 220

Val Leu Glu Glu Val Ala Asp Lys Pro Gln Thr Glu Phe Leu Met Lys
 225 230 235 240

Tyr Cys Leu Val Thr Ser Arg Leu Gln Lys Ile Leu Ala Glu Ser Pro
 245 250 255

Pro Pro Ala Arg Leu Asp Ile Gln Leu Pro Ile Ile Ser Asp Asp Phe
 260 265 270

Lys Phe Gln Val Trp Arg Lys Met Phe Arg Ala Leu Met Pro Ala Leu
 275 280 285

Glu Glu Leu Thr Phe Asp Pro Ser Ser Ala His Pro Ser Leu Val Val
 290 295 300

Ser Ser Ser Gly Arg Arg Val Glu Cys Ser Glu Gln Lys Ala Pro Pro
 305 310 315 320

Ala Gly Glu Asp Pro Arg Gln Phe Asp Lys Ala Val Ala Val Val Ala
 325 330 335

His Gln Gln Leu Ser Glu Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly
 340 345 350

Asp Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Val Ile Ala Ala Glu Gly Pro Arg
 355 360 365

Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly

ES 2 479 668 T3

370

375

380

Leu Arg Glu Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
385 390 395 400

Arg Ala Leu Arg Ser Pro Glu Arg Arg Pro Thr Arg Ile Gly Leu Tyr
405 410 415

Leu Ser Phe Gly Asp Gly Val Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Asp Ala
420 425 430

Asp Ala Leu Val Pro Leu Phe Ala Phe His Glu Arg Leu Pro Gly Pro
435 440 445

Val Tyr Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ser
450 455 460

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Ser Glu Gly Ala Glu Ala
465 470 475

<210> 13
<211> 482
5 <212> PRT
<213> Bos sp.

<220>
10 <221> PÉPTIDO
<222> (1)..(482)
<223> MG53 Bovino

<400> 13

Met Ser Ala Ala Pro Gly Leu Leu His Gln Glu Leu Ser Cys Pro Leu
1 5 10 15

Cys Leu Gln Leu Phe Asp Ala Pro Val Thr Ala Glu Cys Gly His Ser
20 25 30

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

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

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Leu Ala Arg Leu Val Glu Gly Leu Ala Gln
65 70 75 80

Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
85 90 95

Cys Glu Gln Asp Arg Ala Leu Val Cys Gly Val Cys Ala Ser Leu Gly
100 105 110

Ser His Arg Gly His Arg Leu Leu Pro Ala Ala Glu Ala His Ala Arg
115 120 125

15

ES 2 479 668 T3

Leu Lys Thr Gln Leu Pro Gln Gln Lys Met Gln Leu Gln Glu Ala Cys
 130 135 140

Met Arg Lys Glu Lys Ser Val Ala Leu Leu Glu His Gln Leu Leu Glu
 145 150 155 160

Val Glu Glu Thr Val Arg Gln Phe Arg Gly Ala Val Gly Glu Gln Leu
 165 170 175

Gly Lys Met Arg Leu Phe Leu Ala Ala Leu Glu Gly Ser Leu Asp Arg
 180 185 190

Glu Ala Glu Arg Val Arg Gly Glu Ala Gly Val Ala Leu Arg Arg Glu
 195 200 205

Leu Gly Ser Leu Asn Ser Tyr Leu Glu Gln Leu Arg Gln Met Glu Lys
 210 215 220

Val Leu Glu Glu Val Ala Asp Lys Pro Gln Thr Glu Phe Leu Met Lys
 225 230 235 240

Tyr Cys Leu Val Thr Ser Arg Leu Gln Lys Ile Leu Ala Glu Ser Pro
 245 250 255

Pro Pro Ala Arg Leu Asp Ile Gln Leu Pro Ile Ile Ser Asp Asp Phe
 260 265 270

Lys Phe Gln Val Trp Arg Lys Met Phe Arg Ala Leu Met Pro Ala Arg
 275 280 285

Gln Glu Leu Thr Phe Asp Pro Ser Thr Ala His Pro Ser Leu Val Leu
 290 295 300

Ser Asn Ser Gly Arg Cys Val Glu Cys Ser Glu Gln Lys Ala Pro Pro
 305 310 315 320

Ala Gly Glu Asp Pro Arg Gln Phe Asp Lys Ala Val Ala Val Val Thr
 325 330 335

His Gln Leu Leu Ser Glu Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly
 340 345 350

Asp Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Val Ile Gly Ala Gln Ala Gly Arg
 355 360 365

Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly
 370 375 380

ES 2 479 668 T3

Leu Arg Asp Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
385 390 395 400

Arg Ala Leu Arg Thr Pro Glu Arg Arg Pro Thr Arg Ile Gly Ile Tyr
405 410 415

Leu Ser Phe Gly Asp Gly Val Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Asp Pro
420 425 430

Asp Ala Leu Glu Leu Leu Phe Ala Phe His Glu Arg Leu Pro Gly Pro
435 440 445

Val Tyr Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
450 455 460

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Glu Val Ser Gly Gly Ser Gly Ser
465 470 475 480

Glu Ala

<210> 14

<211> 477

5 <212> PRT

<213> Rattus sp.

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(477)

<223> MG53 Rata

<400> 14

Met Ser Thr Ala Pro Gly Leu Leu Arg Gln Glu Leu Ser Cys Pro Leu
1 5 10 15

Cys Leu Gln Leu Phe Asp Ala Pro Val Thr Ala Glu Cys Gly His Ser
20 25 30

Phe Cys Arg Ala Cys Leu Ile Arg Val Ala Gly Glu Pro Ala Asp Asp
35 40 45

Gly Thr Val Ala Cys Pro Cys Cys Gln Ala Ser Thr Arg Pro Gln Ala
50 55 60

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Leu Ala Arg Leu Val Glu Gly Leu Ala Gln
65 70 75 80

Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
85 90 95

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

15 Ser His Arg Gly His Arg Leu Leu Pro Ala Ala Glu Ala His Ala Arg

ES 2 479 668 T3

Leu Arg Asp Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
385 390 395 400

Arg Ala Leu Arg Thr Pro Glu Arg Pro Pro Ala Arg Ile Gly Leu Tyr
405 410 415

Leu Ser Phe Ala Asp Gly Val Leu Thr Phe Tyr Asp Ala Ser Asn Thr
420 425 430

Asp Ala Leu Thr Pro Leu Phe Ser Phe His Glu Arg Leu Pro Gly Pro
435 440 445

Val Tyr Pro Met Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ser
450 455 460

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Asp Ser Glu Gln Ala
465 470 475

<210> 15

<211> 477

5 <212> PRT

<213> Xenopus laevis

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(477)

<223> Xenopus laevis

<400> 15

Met Ser Thr Pro Gln Leu Met Gln Gly Met Gln Lys Asp Leu Thr Cys
1 5 10 15

Gln Leu Cys Leu Glu Leu Phe Arg Ala Pro Val Thr Pro Glu Cys Gly
20 25 30

His Thr Phe Cys Gln Gly Cys Leu Thr Gly Val Pro Lys Asn Gln Asp
35 40 45

Gln Asn Gly Ser Thr Pro Cys Pro Thr Cys Gln Ser Pro Ser Arg Pro
50 55 60

Glu Thr Leu Gln Ile Asn Arg Gln Leu Glu His Leu Val Gln Ser Phe
65 70 75 80

Lys Gln Val Pro Gln Gly His Cys Leu Glu His Met Asp Pro Leu Ser
85 90 95

Val Tyr Cys Glu Gln Asp Lys Glu Leu Ile Cys Gly Val Cys Ala Ser
100 105 110

Leu Gly Lys His Lys Gly His Asn Ile Ile Thr Ala Ser Glu Ala Phe
115 120 125

15

ES 2 479 668 T3

Ala Lys Leu Lys Arg Gln Leu Pro Gln Gln Gln Val Ile Leu Gln Glu
 130 135 140

Ala Arg Leu Lys Lys Glu Lys Thr Val Ala Val Leu Asp Arg Gln Val
 145 150 155 160

Ala Glu Val Gln Asp Thr Val Ser Arg Phe Lys Gly Asn Val Lys His
 165 170 175

Gln Leu Asn Ala Met Arg Ser Tyr Leu Asn Ile Met Glu Ala Ser Leu
 180 185 190

Gly Lys Glu Ala Asp Lys Ala Glu Ser Ala Ala Thr Glu Ala Leu Leu
 195 200 205

Val Glu Arg Lys Thr Met Gly His Tyr Leu Asp Gln Leu Arg Gln Met
 210 215 220

Glu Gly Val Leu Lys Asp Val Glu Gly Gln Glu Gln Thr Glu Phe Leu
 225 230 235 240

Arg Lys Tyr Cys Val Val Ala Ala Arg Leu Asn Lys Ile Leu Ser Glu
 245 250 255

Ser Pro Pro Pro Gly Arg Leu Asp Ile Gln Leu Pro Ile Ile Ser Asp
 260 265 270

Glu Phe Lys Phe Gln Val Trp Arg Lys Met Phe Arg Ala Leu Met Pro
 275 280 285

Ala Leu Glu Asn Met Thr Phe Asp Pro Asp Thr Ala Gln Gln Tyr Leu
 290 295 300

Val Val Ser Ser Glu Gly Lys Ser Val Glu Cys Ala Asp Gln Lys Gln
 305 310 315 320

Ser Val Ser Asp Glu Pro Asn Arg Phe Asp Lys Ser Asn Cys Leu Val
 325 330 335

Ser Lys Gln Ser Phe Thr Glu Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Ile Val
 340 345 350

Glu Asp Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Ile Ile Ser Glu Thr Ala Asn
 355 360 365

Arg Lys Gly Lys Leu His Ala Thr Pro Ser Asn Gly Phe Trp Ile Ile
 370 375 380

Gly Cys Lys Glu Gly Lys Val Tyr Glu Ala His Thr Glu Gln Lys Glu
 385 390 395 400

ES 2 479 668 T3

Pro Arg Val Leu Arg Val Glu Gly Arg Pro Glu Lys Ile Gly Val Tyr
 405 410 415

Leu Ser Phe Ser Asp Gly Val Val Ser Phe Phe Asp Ser Ser Asp Glu
 420 425 430

Asp Asn Leu Lys Leu Leu Tyr Thr Phe Asn Glu Arg Phe Ser Gly Arg
 435 440 445

Leu His Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ser
 450 455 460

Gln Pro Leu Lys Ile Phe Tyr Pro Pro Ala Glu Gln Leu
 465 470 475

<210> 16
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> Xenopus sp.

5

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(477)
 <223> MG53 Xenopus tropicalis

10

<400> 16

Met Ser Thr Pro Gln Leu Met Gln Gly Met Gln Lys Asp Leu Thr Cys
 1 5 10 15

Pro Leu Cys Leu Glu Leu Phe Arg Ala Pro Val Thr Pro Glu Cys Gly
 20 25 30

His Thr Phe Cys Gln Gly Cys Leu Thr Gly Ala Pro Lys Asn Gln Asp
 35 40 45

Gln Asn Gly Ser Thr Pro Cys Pro Thr Cys Gln Thr Pro Ser Arg Pro
 50 55 60

Glu Thr Leu Gln Ile Asn Arg Gln Leu Glu His Leu Val Gln Ser Phe
 65 70 75 80

Lys Gln Val Pro Lys Gly His Cys Leu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser
 85 90 95

Val Tyr Cys Glu Gln Asp Lys Glu Leu Ile Cys Gly Val Cys Ala Ser
 100 105 110

Leu Gly Lys His Lys Gly His Asn Ile Ile Thr Ala Ala Glu Ala Tyr
 115 120 125

Ala Lys Leu Lys Arg Gln Leu Pro Gln Gln Gln Val Ile Leu Gln Glu
 130 135 140

15

ES 2 479 668 T3

Ala Arg Leu Lys Lys Glu Lys Thr Val Ala Val Leu Asp Arg Gln Val
 145 150 155 160

Ala Glu Val Gln Asp Thr Val Ser Arg Phe Lys Gly Asn Val Lys His
 165 170 175

Gln Leu Asn Ala Met Arg Ser Tyr Leu Ser Ile Met Glu Ala Ser Leu
 180 185 190

Ser Lys Glu Ala Asp Asn Ala Glu His Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu
 195 200 205

Val Glu Arg Lys Thr Met Gly His Tyr Leu Asp Gln Leu Arg Gln Met
 210 215 220

Asp Gly Val Leu Lys Asp Val Glu Ser Gln Glu Gln Thr Glu Phe Leu
 225 230 235 240

Arg Lys Tyr Cys Val Val Ala Ala Arg Leu Asn Lys Ile Leu Ala Glu
 245 250 255

Ser Pro Pro Pro Gly Arg Leu Asp Ile Gln Leu Pro Ile Ile Ser Asp
 260 265 270

Glu Phe Lys Phe Gln Val Trp Arg Lys Met Phe Arg Ala Leu Met Pro
 275 280 285

Ala Leu Glu Asn Leu Thr Phe Asp Pro Asp Thr Ala Gln Gln Asn Leu
 290 295 300

Val Val Phe Ser Asp Gly Lys Ser Val Glu Cys Ser Glu Gln Lys Gln
 305 310 315 320

Ser Val Ser Asp Glu Pro Asn Arg Phe Asp Lys Ser Asn Cys Leu Val
 325 330 335

Ser Lys Glu Ser Phe Thr Glu Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Leu Val
 340 345 350

Glu Asp Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Ala Asn
 355 360 365

Arg Lys Gly Lys Leu His Ala Ser Pro Ser Asn Gly Phe Trp Leu Ile
 370 375 380

Gly Cys Lys Glu Gly Lys Val Tyr Glu Ala His Thr Glu Gln Lys Glu
 385 390 395 400

Pro Arg Val Leu Arg Val Glu Gly Arg Pro Glu Lys Ile Gly Ile Tyr

ES 2 479 668 T3

405 410 415

Leu Ser Phe Ser Asp Gly Val Val Ser Phe Phe Asp Ser Ser Asp Glu
 420 425 430

Asp Asn Ile Lys Leu Leu Tyr Thr Phe Asn Glu Arg Phe Ser Gly Arg
 435 440 445

Leu His Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
 450 455 460

Gln Pro Leu Lys Ile Phe Tyr Pro Pro Ala Glu Gln Leu
 465 470 475

5 <210> 17
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1

10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(101)
 <223> Proteína TAT HIV-1

<400> 17

Met Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Pro Thr Ala Cys Ser Lys Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Trp
 20 25 30

His Cys Gln Leu Cys Phe Leu Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Lys His Arg Arg Gly Thr Pro Gln Ser Ser Lys Asp
 50 55 60

His Gln Asn Pro Ile Pro Glu Gln Pro Leu Pro Ile Ile Arg Gly Asn
 65 70 75 80

Gln Thr Gly Pro Lys Glu Gln Lys Lys Thr Val Ala Ser Lys Ala Glu
 85 90 95

15 Arg Asp Leu Cys Ala
 100

<210> 18
 <211> 66
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado Químicamente

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(66)
 <223> shARN encriptado para MG53 – sentido

ES 2 479 668 T3

<400> 18

gtacctcgcc tgccgtccaa agttgtaatc aagagttaca actttggacg gcaggctttt 60

tggaaa 66

5

<210> 19
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Sintetizado Químicamente

<220>

15

<221> característica_misc
 <222> (1)..(66)
 <223> shARN encriptado para MG53 – antisentido

<400> 19

20

agcttttcca aaaagcctgc cgtccaaagt tgtaactctt gattacaact ttggacggca 60

ggcgag 66

<210> 20
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Sintetizado Químicamente

30

<220>

35

<221> característica_misc
 <222> (1)..(66)
 <223> shARN para MG53

<400> 20

gtacctcgag ctgtcaagcc tgaactcttc aagagagagt tcaggcttga cagctctttt 60

tggaaa 66

40

<210> 21
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Sintetizado Químicamente

<220>

50

<221> característica_misc
 <222> (1)..(66)
 <223> shARN para MG53

<400> 21

55

agcttttcca aaaagagctg tcaagcctga actctctctt gaagagttca ggcttgacag 60

ctcgag 66

ES 2 479 668 T3

<210> 22
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintetizado Químicamente
 <220>
 10 <221> característica_misc
 <222> (1)..(65)
 <223> shRNA encriptado para Cav-3 – sentido
 <400> 22
 15 gatccgcgga gacatagcct gtaattcaag agattacagg ctatgtctcc gcttttttac 60
 cggtg 65
 <210> 23
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado Químicamente
 <220>
 30 <221> característica_misc
 <222> (1)..(65)
 <223> shRNA encriptado para Cav-3 – antisentido
 <400> 23
 aattcaccgg taaaaagcg gagacatagc ctgtaattctc ttgaattaca ggctatgtct 60
 ccgcg 65
 <210> 24
 <211> 65
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado Químicamente
 45 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(65)
 <223> shRNA para Cav-3 – sentido
 50 <400> 24
 gatccggaca ttcactgcaa ggagtccaag agactccttg cagtgaatgt ccttttttac 60
 cggtg 65
 <210> 25
 55 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Sintetizado Químicamente

ES 2 479 668 T3

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(65)

<223> shRNA para Cav-3 – antisentido

5

<400> 25

aattcaccgg taaaaaagga cattcactgc aaggagtctc ttgaactcct tgcagtgaat 60

gtccg 65

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende:

i) una secuencia de aminoácidos de al menos uno del SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7, o

5 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia de al menos 70% con al menos uno del SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7,

para su uso como medicamento.

2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido es capaz de promover la reparación de una membrana celular dañada.

10 3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que consiste en el SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.

4. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en la prevención o el tratamiento del daño celular.

15 5. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en la prevención o el tratamiento de daño de las células musculares.

6. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece una quemadura.

7. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde el daño celular se debe a un trastorno cardiovascular, un ejercicio, una actividad física rigurosa, o un procedimiento o dispositivo quirúrgico.

20 8. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y al menos un portador, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptables.

9. Una composición cosmética que comprende un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, junto con un portador aceptable desde el punto de vista cosmético.

10. Un método de escrutinio de un agente útil para tratar o prevenir el daño celular que comprende las etapas de:

25 - proporcionar una célula que expresa un ácido nucleico que codifica un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;

- proporcionar una biblioteca de un agente de ensayo;

- tratar la célula con el agente de ensayo;

- inducir el daño en la membrana de la célula;

30 - medir la capacidad de la célula para reparar el daño en una membrana; y

- comparar la capacidad de reparación de la célula tratada frente a una célula no tratada,

en donde el agente se selecciona del grupo que consiste en un agonista de un polipéptido de MG53, un antagonista de un polipéptido de MG53 y un antagonista de una interacción de caveolina-3/MG53.

35 11. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como medicamento, en donde dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende una porción de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se define en la reivindicación 3, y al menos otra porción de polipéptido ubicada en el extremo amino, el extremo carboxi, o ambos, y en donde las porciones de polipéptido se disponen en una sola cadena contigua de polipéptido.

12. Un ácido nucleico aislado que comprende:

40 i) una secuencia de ácido nucleico del SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6, o

ii) una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con al menos uno del SEQ ID NO: 2, SEC ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6,

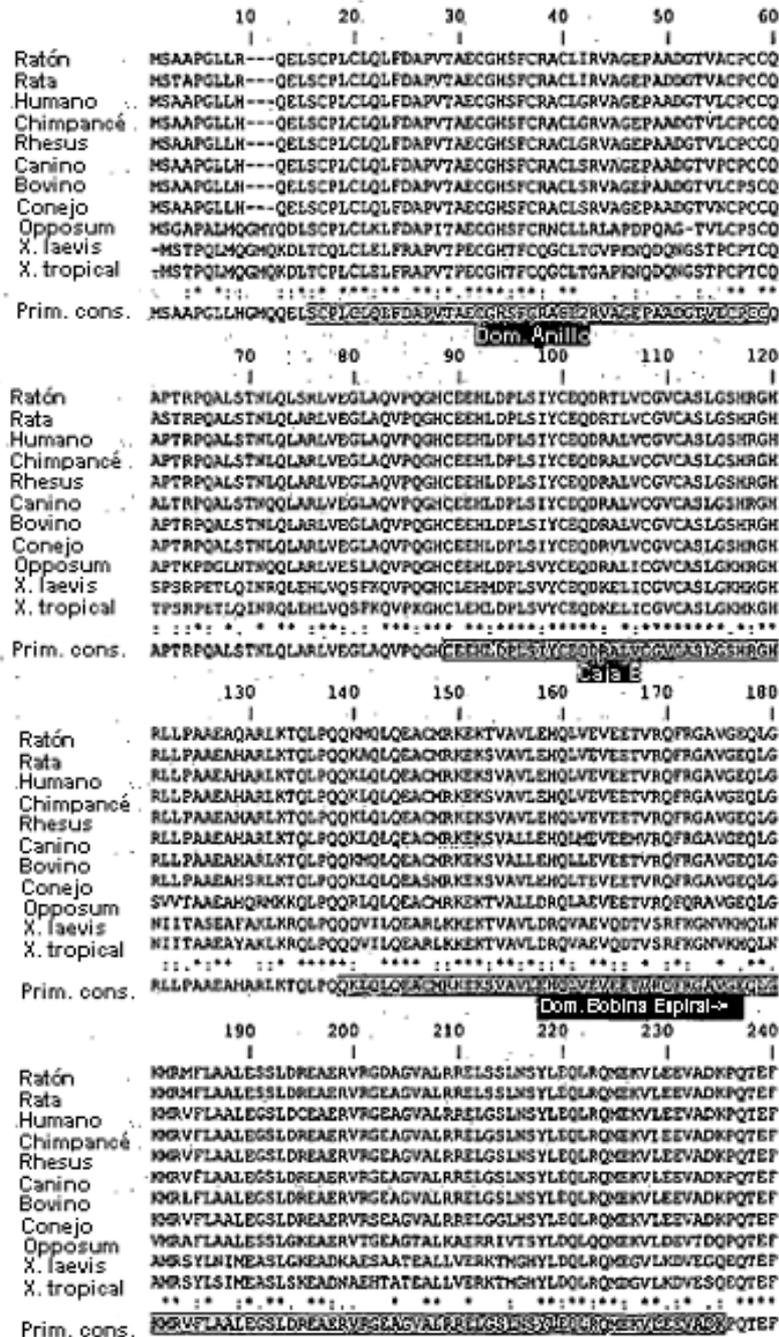
45 iii) un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de un ácido nucleico de acuerdo con los apartados i) o ii), en donde dicho ácido nucleico es capaz de promover la reparación de una membrana celular dañada,

para su uso como medicamento.

13. Un método para diagnosticar o controlar in vitro una disfunción de reparación celular en un sujeto, que comprende detectar un polimorfismo en un gen, el nivel de expresión de un gen o ambos, en el sujeto para diagnosticar o controlar la disfunción en el sujeto en donde el gen comprende la secuencia de ácido nucleico definida en la reivindicación 12.

5

FIG. 1



	250	260	270	280	290	300
Ratón	IMKFC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
Rata	IMKFC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
Humano	IMKFC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
Chimpancé	IMKFC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
Canino	IMKFC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
Bovino	IMKFC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
Conejo	IMKFC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
Opposum	LRKYC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
X. laevis	LRKYC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
X. tropical	LRKYC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
Prim. cons.	IMKFC	LVT	SRLQK	ILSES	PPPARLDI	QLPVI
	310	320	330	340	350	360
Ratón	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
Rata	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
Humano	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
Chimpancé	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
Rhesus	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
Canino	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
Bovino	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
Conejo	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
Opposum	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
X. laevis	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
X. tropical	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
Prim. cons.	AHPSL	VSS	SGRRV	ECSDQ	KAPPAGE	DT
	370	380	390	400	410	420
Ratón	ALGVH	AAS	RRGR	LHAVP	SQGLW	LLGL
Rata	ALGVH	AAS	RRGR	LHAVP	SQGLW	LLGL
Humano	ALGVH	AAS	RRGR	LHAVP	SQGLW	LLGL
Chimpancé	ALGVH	AAS	RRGR	LHAVP	SQGLW	LLGL
Rhesus	ALGVH	AAS	RRGR	LHAVP	SQGLW	LLGL
Canino	ALGVH	AAS	RRGR	LHAVP	SQGLW	LLGL
Bovino	ALGVH	AAS	RRGR	LHAVP	SQGLW	LLGL
Conejo	ALGVH	AAS	RRGR	LHAVP	SQGLW	LLGL
Opposum	ALGI	ISET	NRNG	LHATP	SNGF	WII
X. laevis	ALGI	ISET	NRNG	LHATP	SNGF	WII
X. tropical	ALGI	ISET	NRNG	LHATP	SNGF	WII
Prim. cons.	ALGVH	AAS	RRGR	LHAVP	SQGLW	LLGL
	430	440	450	460	470	480
Ratón	SFADG	VLA	FYDAS	NDAL	TPLE	S
Rata	SFADG	VLT	FYDAS	NDAL	TPLE	S
Humano	SFADG	VLS	FYDAS	NDAL	TPLE	S
Chimpancé	SFADG	VLS	FYDAS	NDAL	TPLE	S
Rhesus	SFADG	VLS	FYDAS	NDAL	TPLE	S
Canino	SFADG	VLS	FYDAS	NDAL	TPLE	S
Bovino	SFADG	VLS	FYDAS	NDAL	TPLE	S
Conejo	SFADG	VLS	FYDAS	NDAL	TPLE	S
Opposum	SFADG	VLS	FYDAS	NDAL	TPLE	S
X. laevis	SFADG	VLS	FYDAS	NDAL	TPLE	S
X. tropical	SFADG	VLS	FYDAS	NDAL	TPLE	S
Prim. cons.	SFADG	VLS	FYDAS	NDAL	TPLE	S

FIG. 2

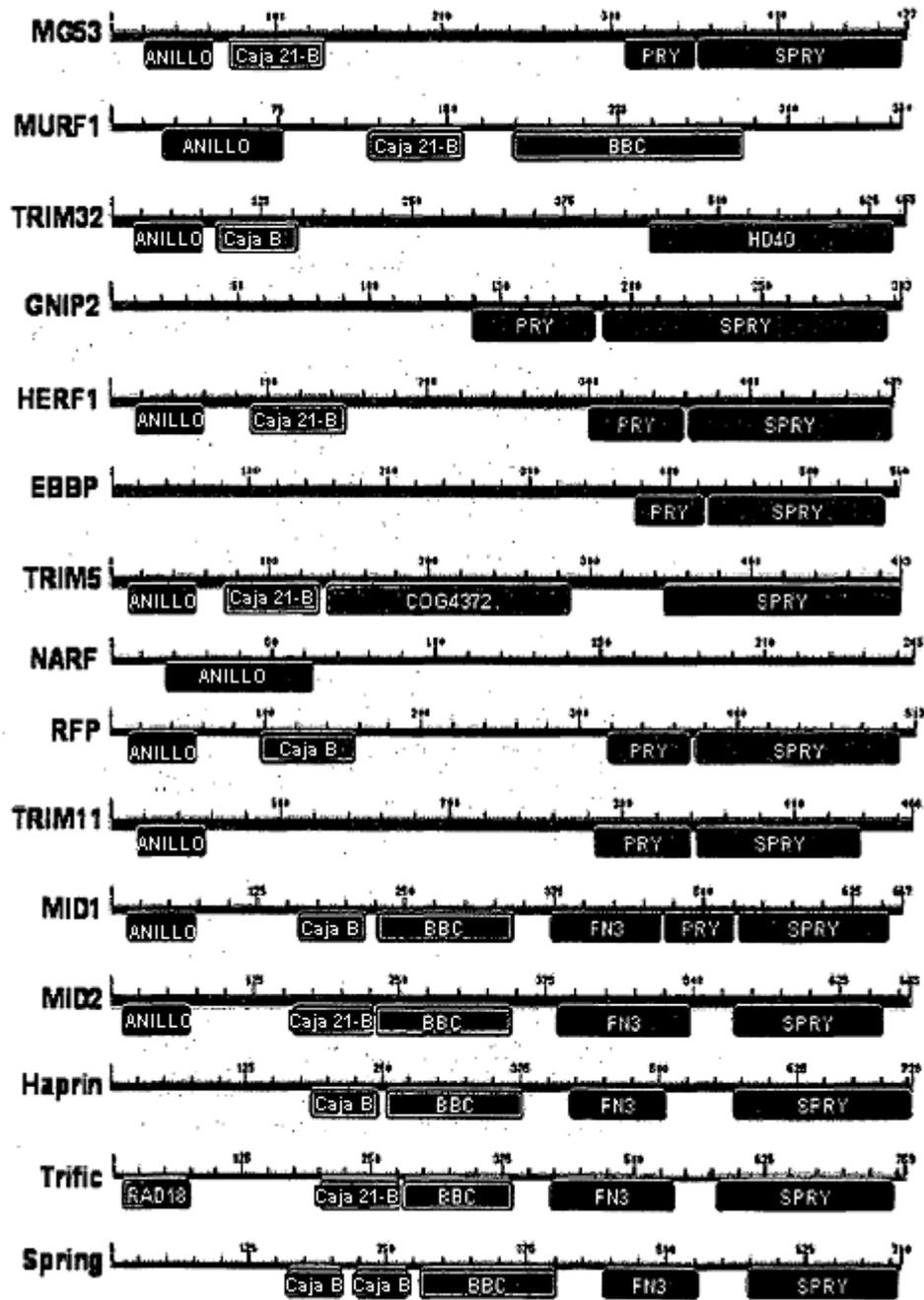


FIG. 3

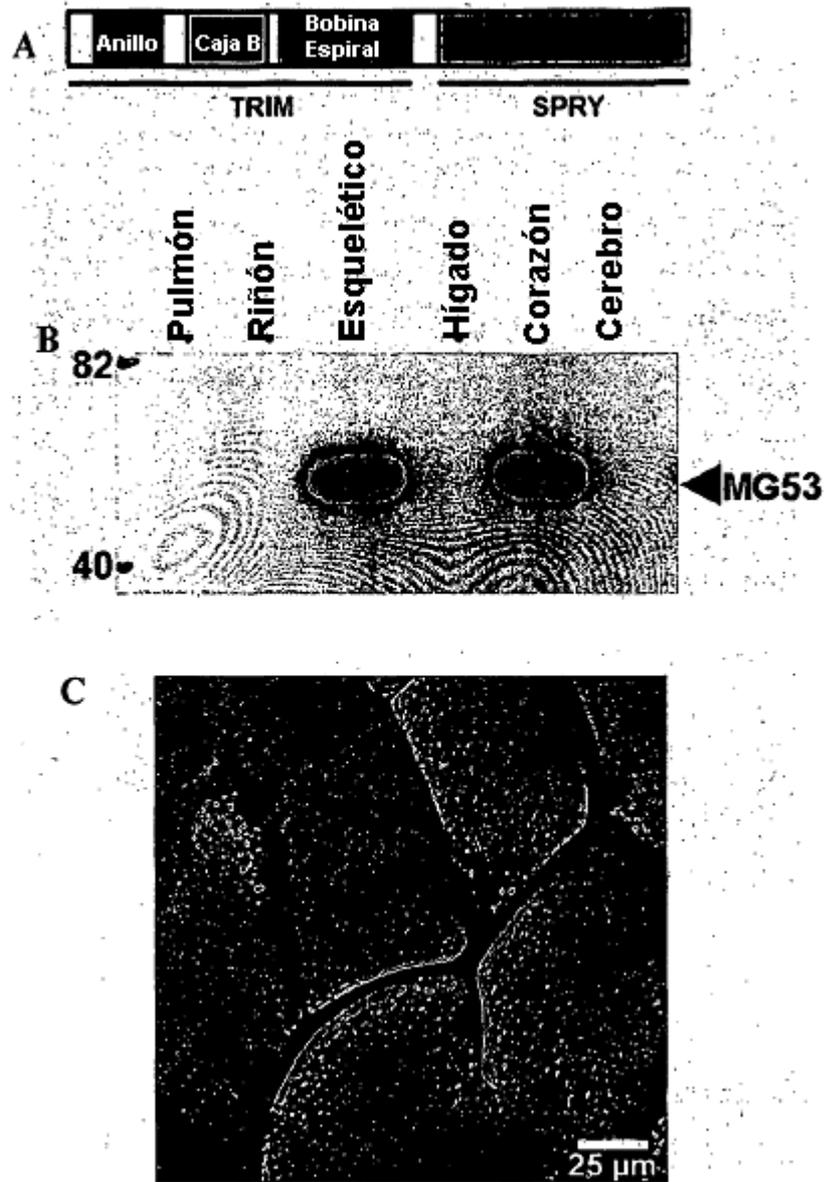


FIG. 4

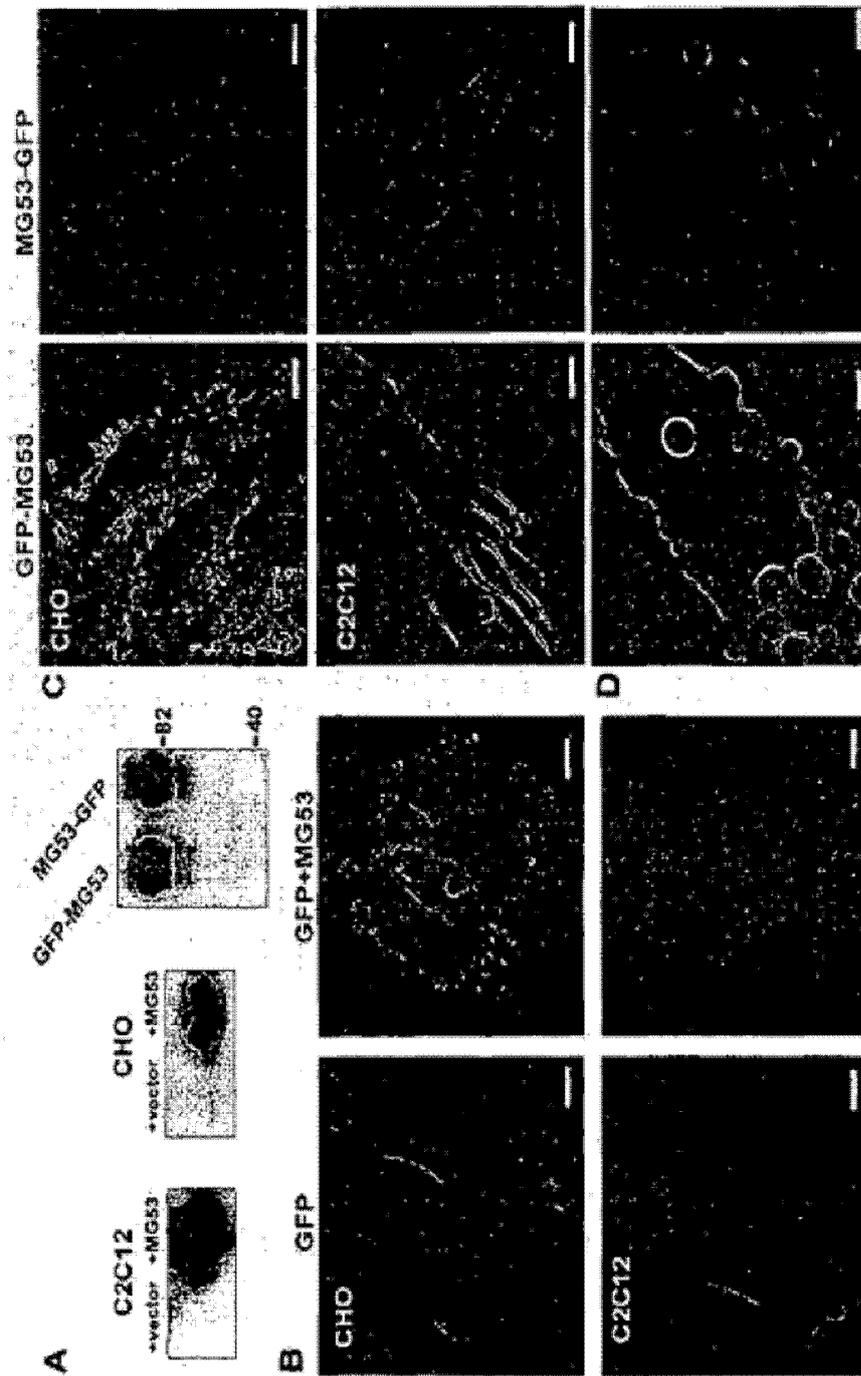


FIG. 5

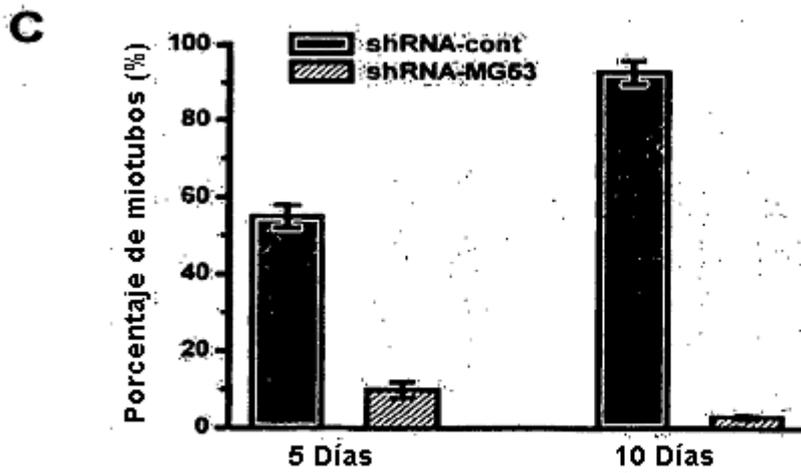
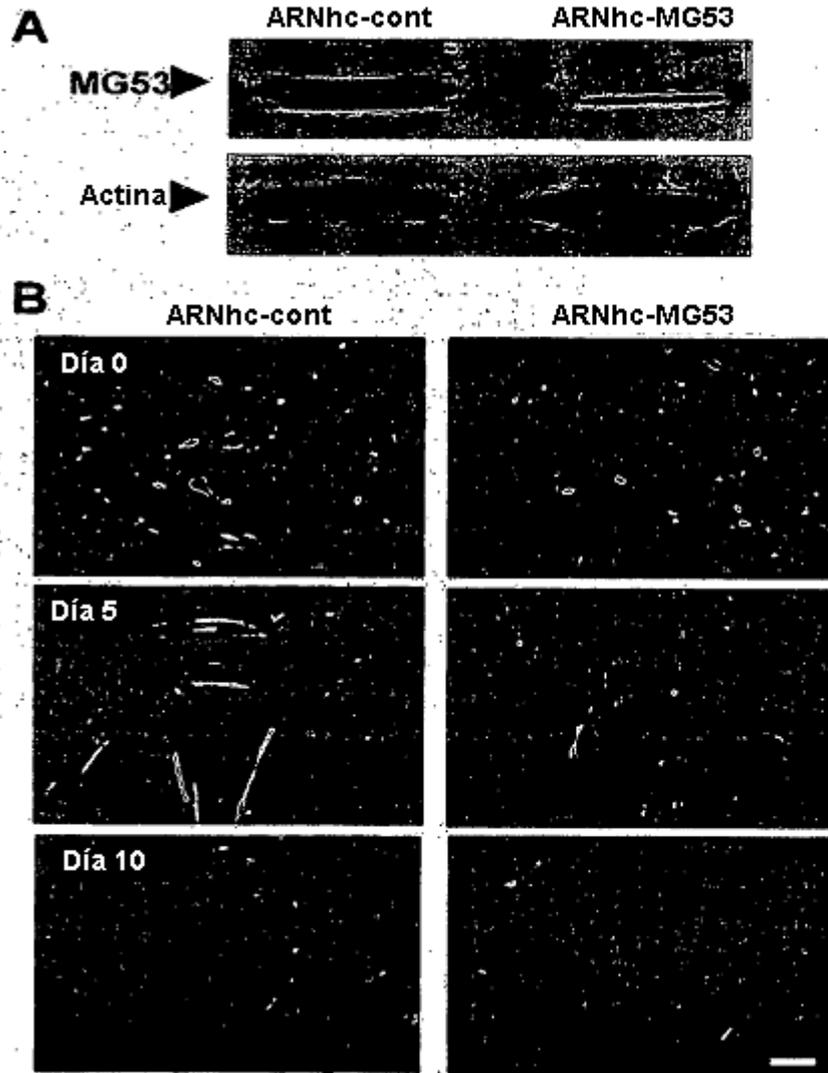
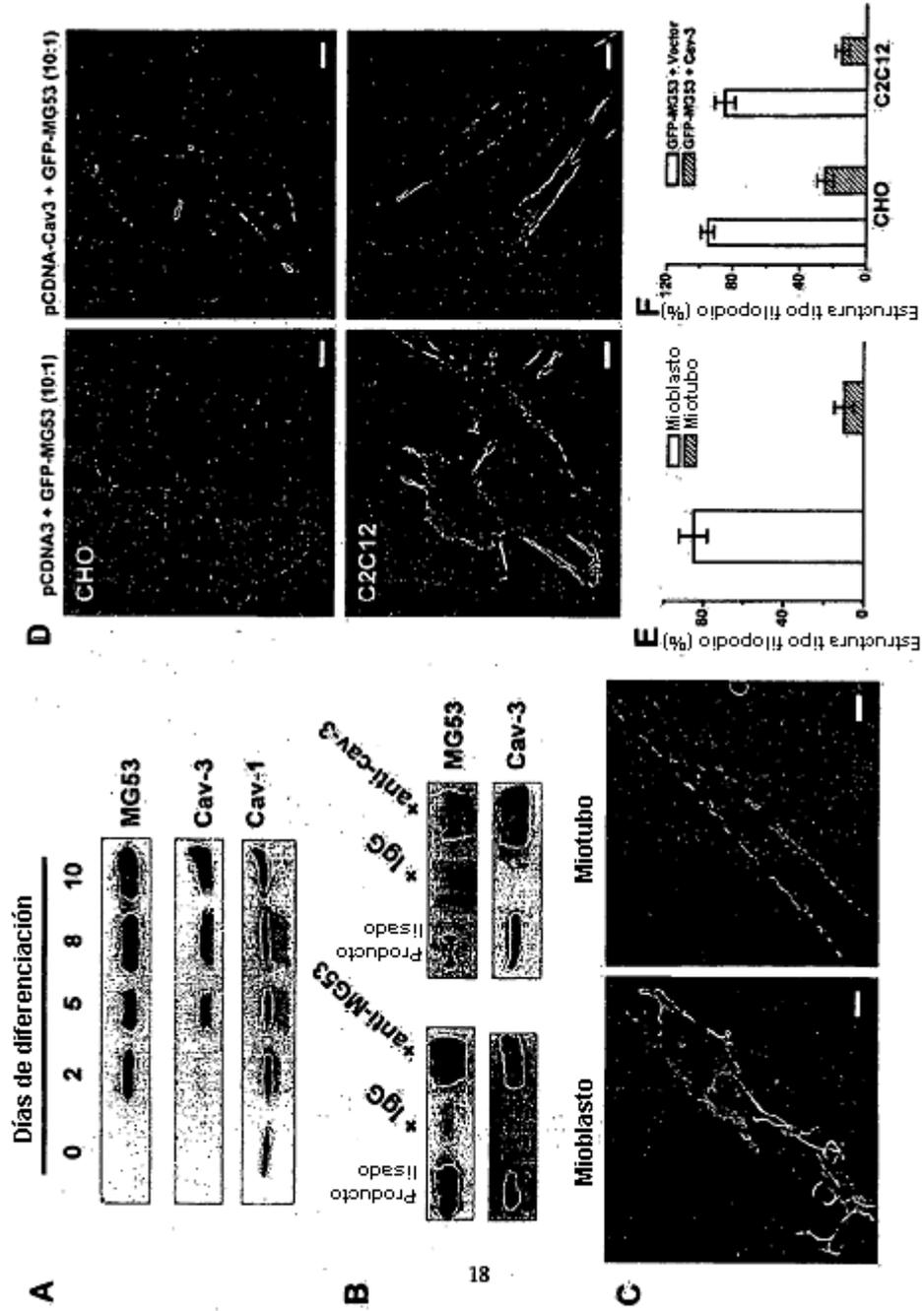


FIG. 6



18

FIG. 7

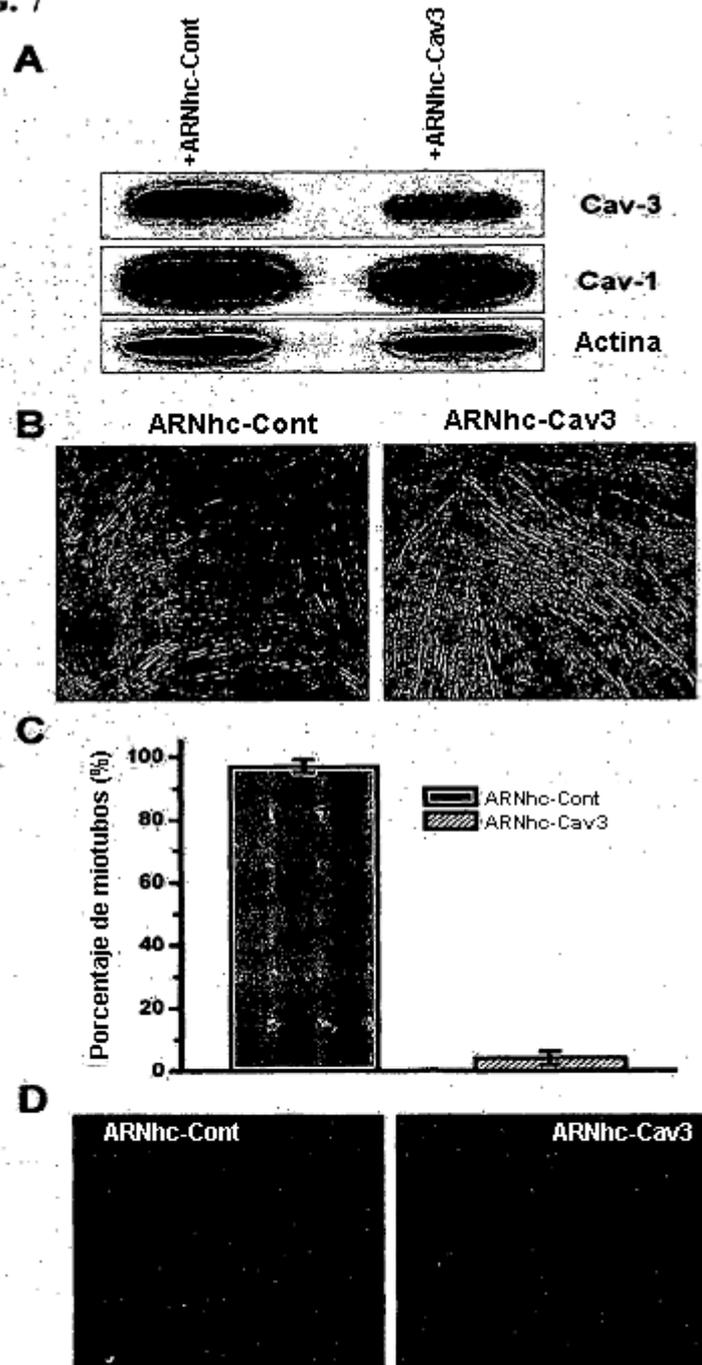


FIG. 8

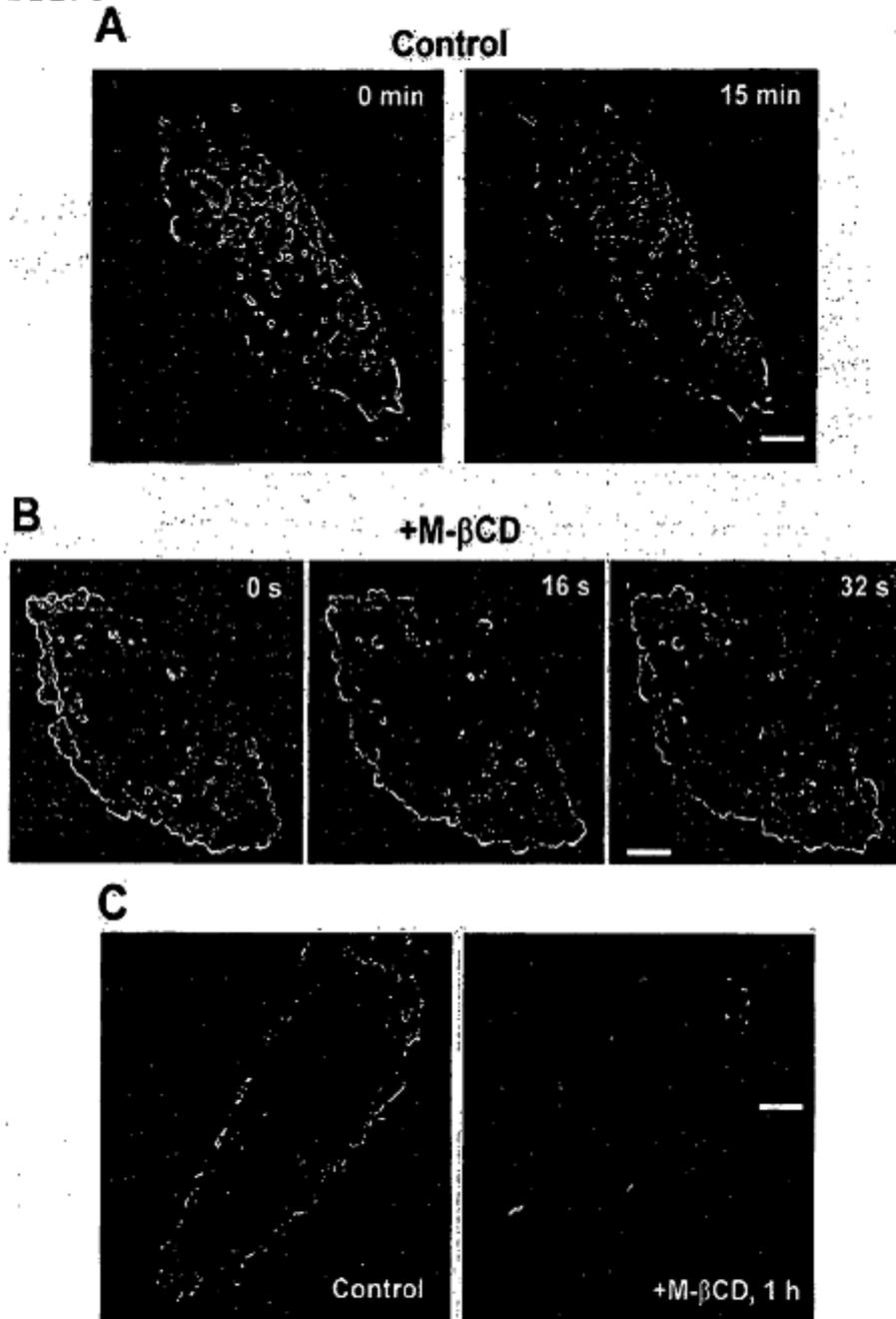


FIG. 9

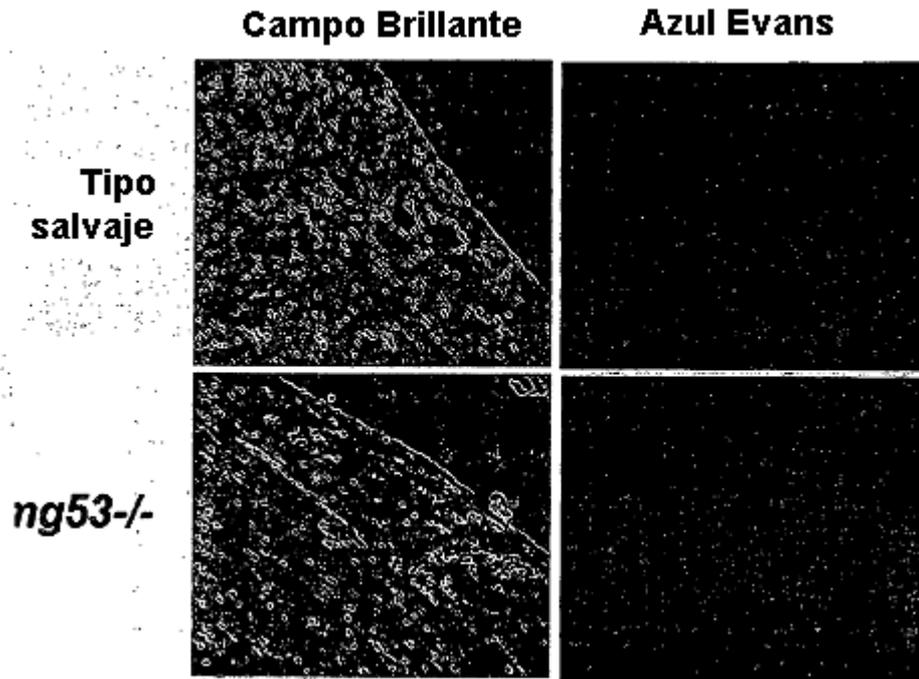


FIG. 10

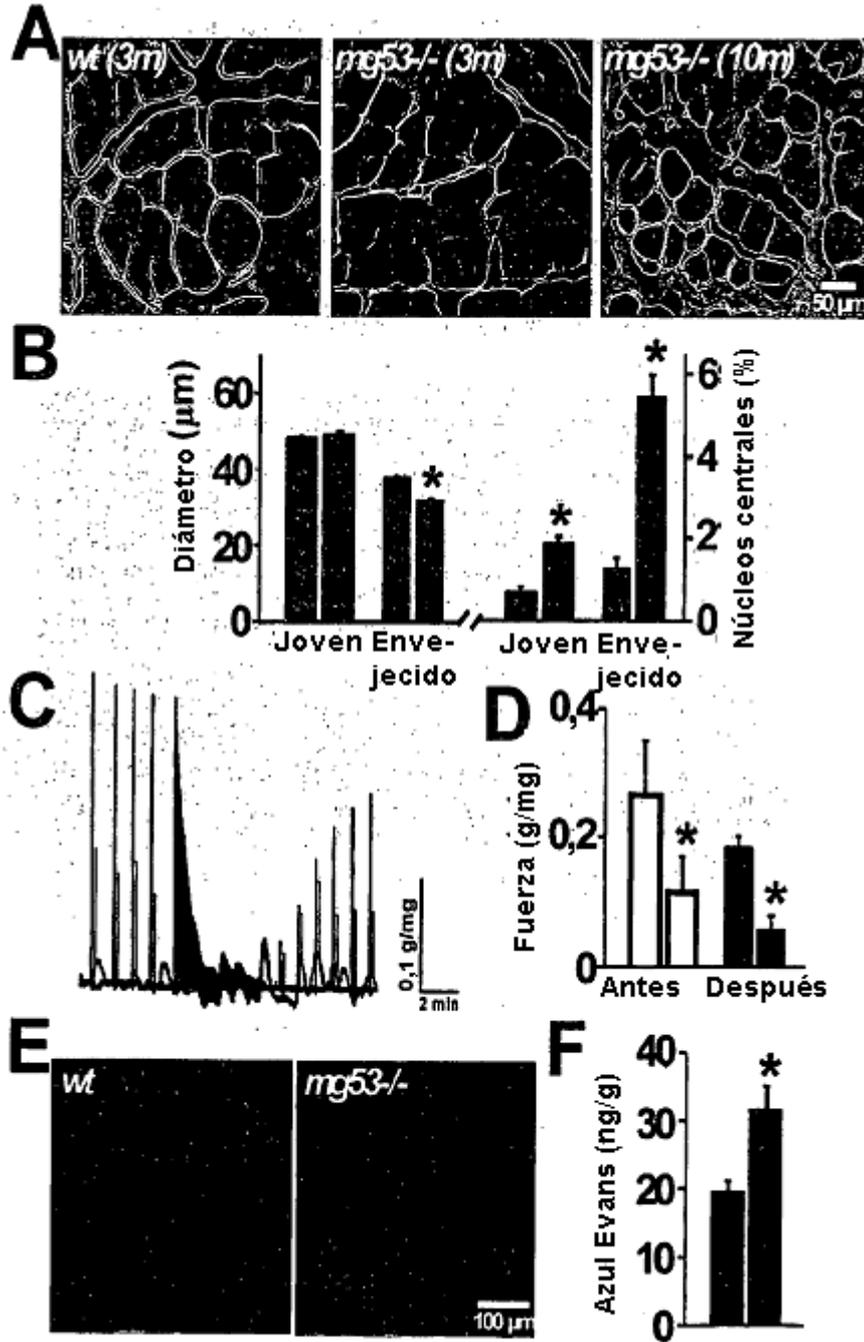


FIG. 11

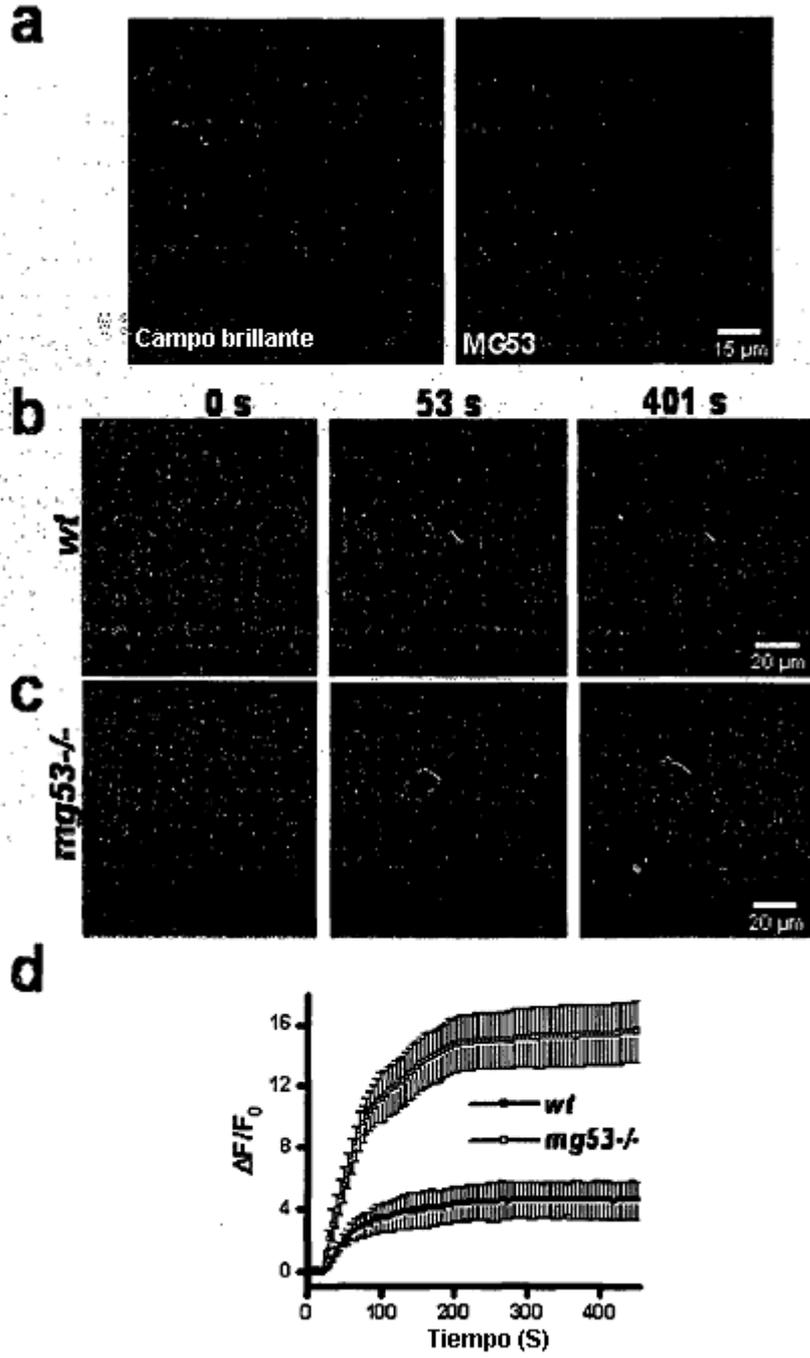


FIG. 12

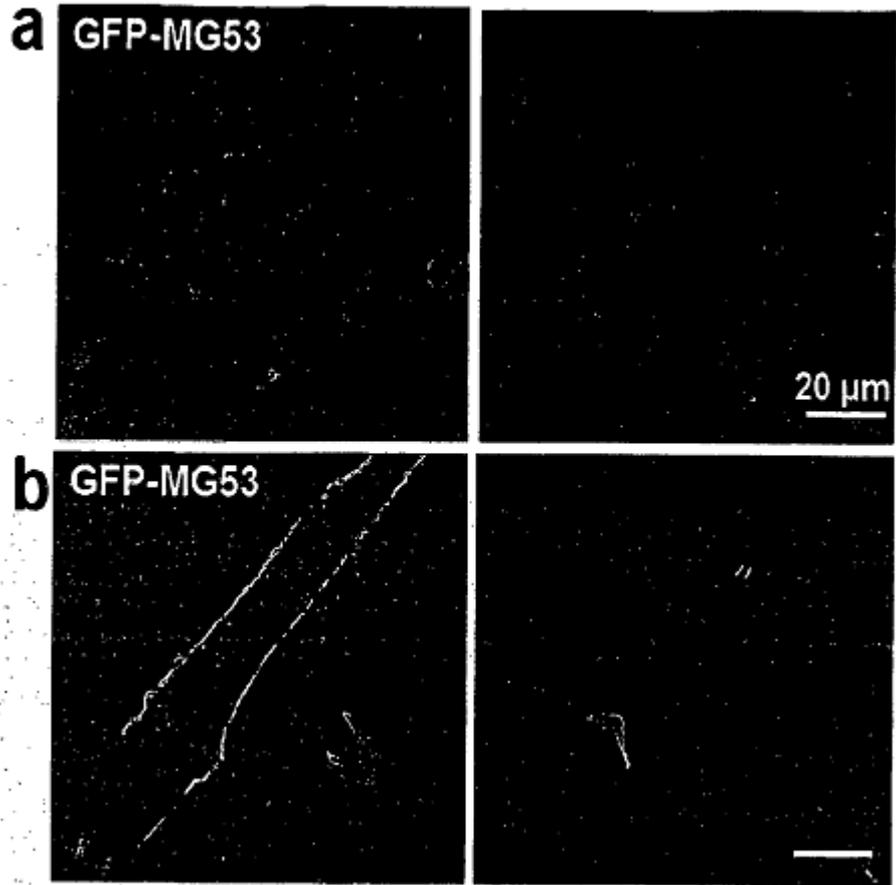


FIG. 13

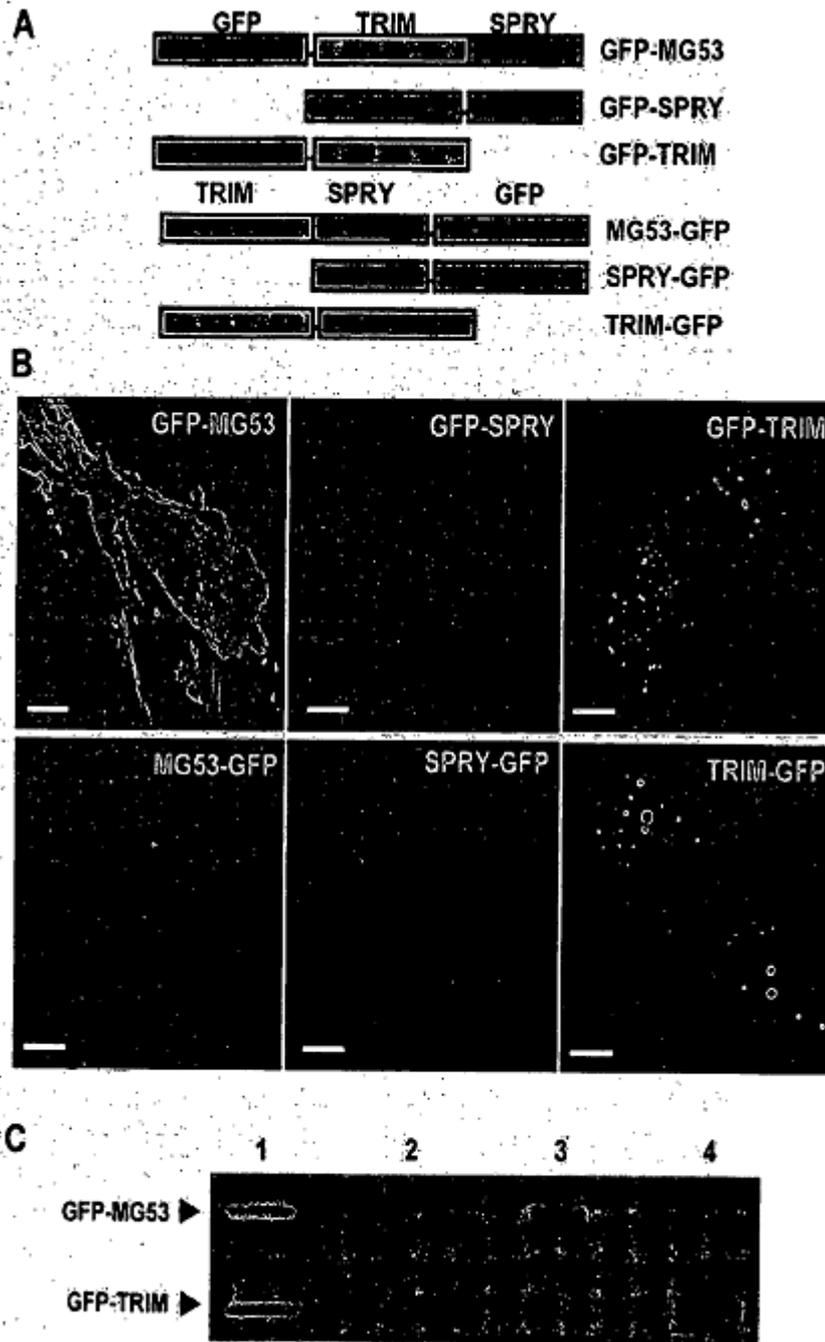


FIG. 14

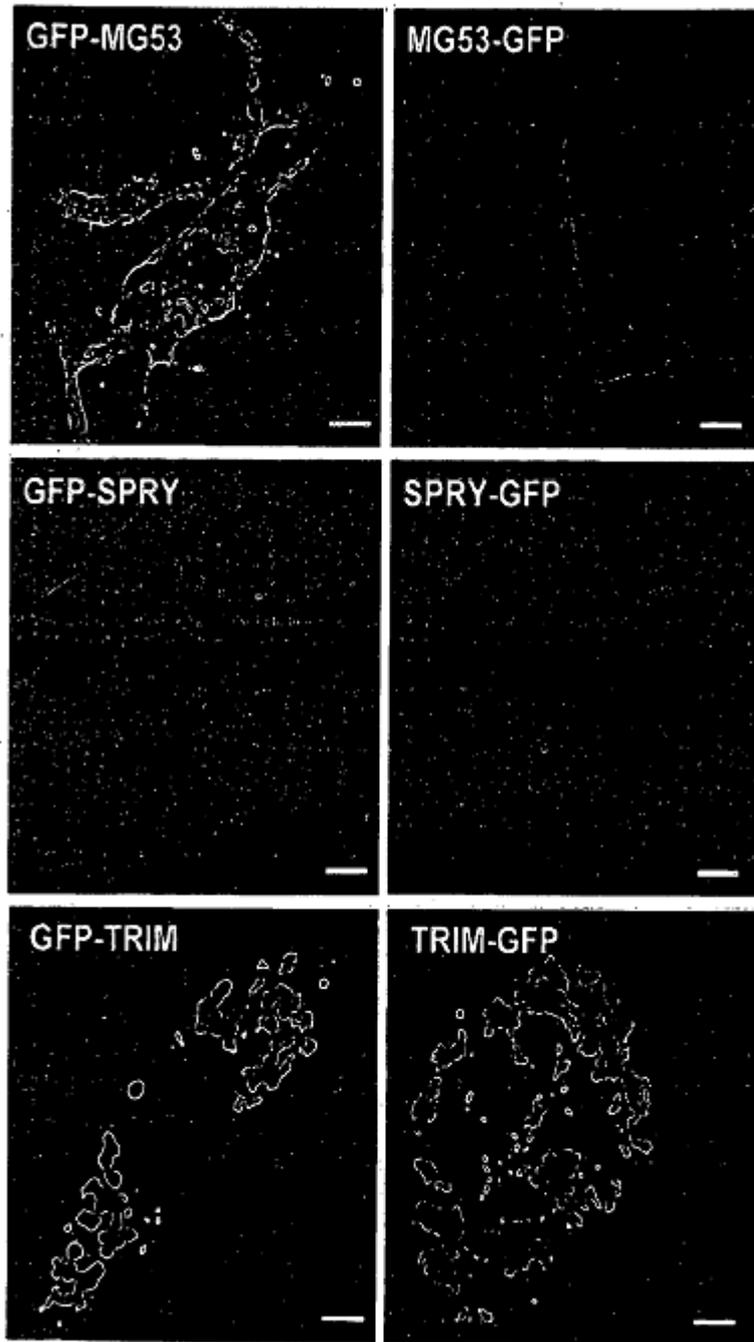


FIG. 15

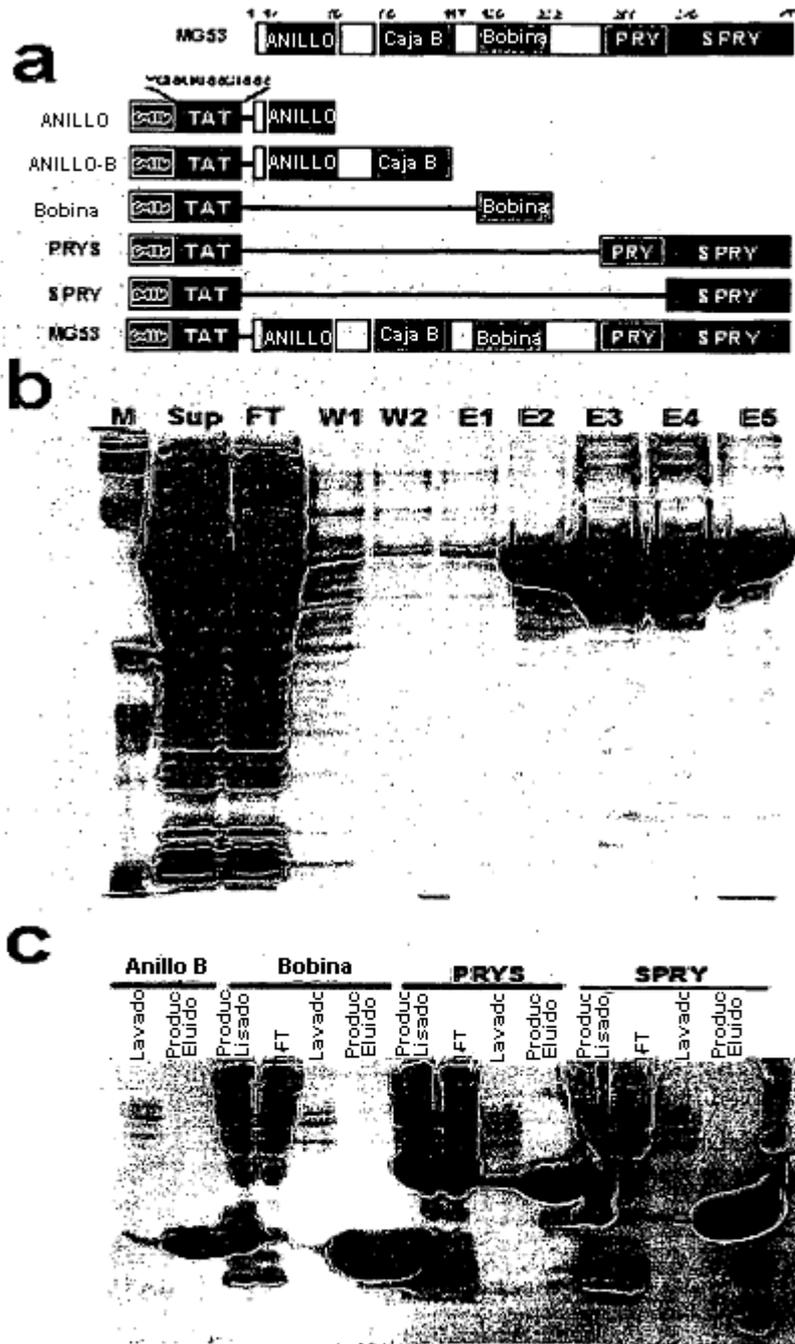


FIG. 16

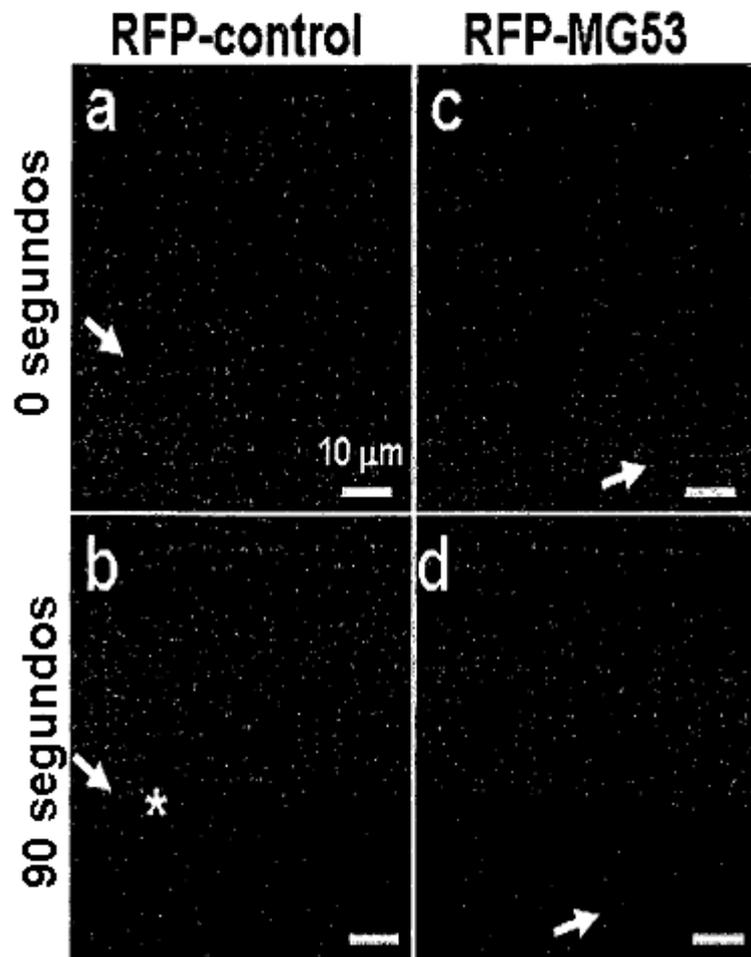


FIG. 17

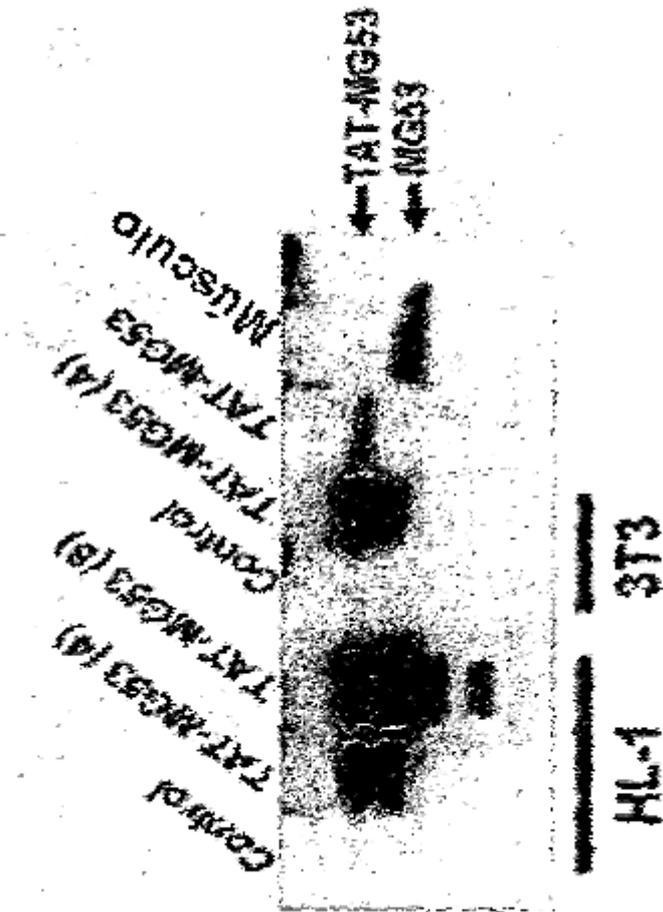


FIG. 18

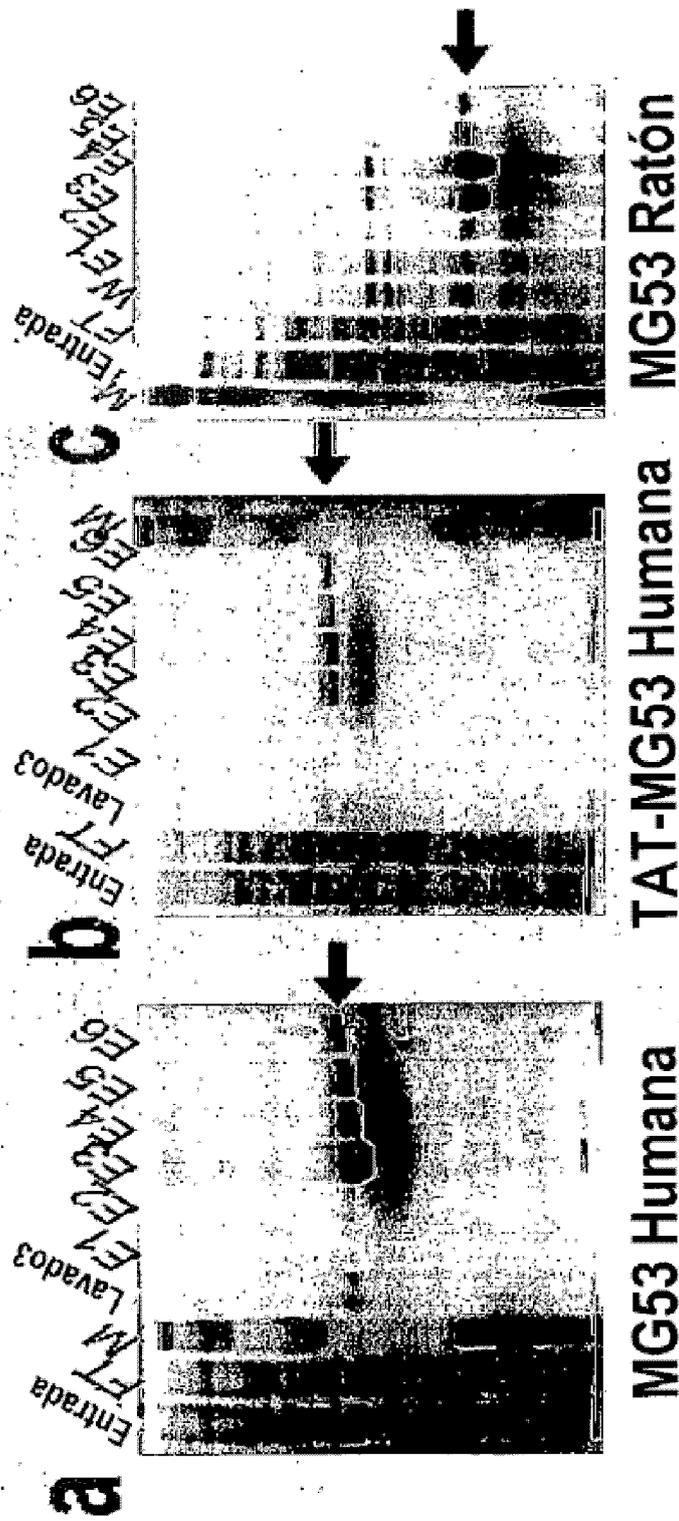


FIG. 19

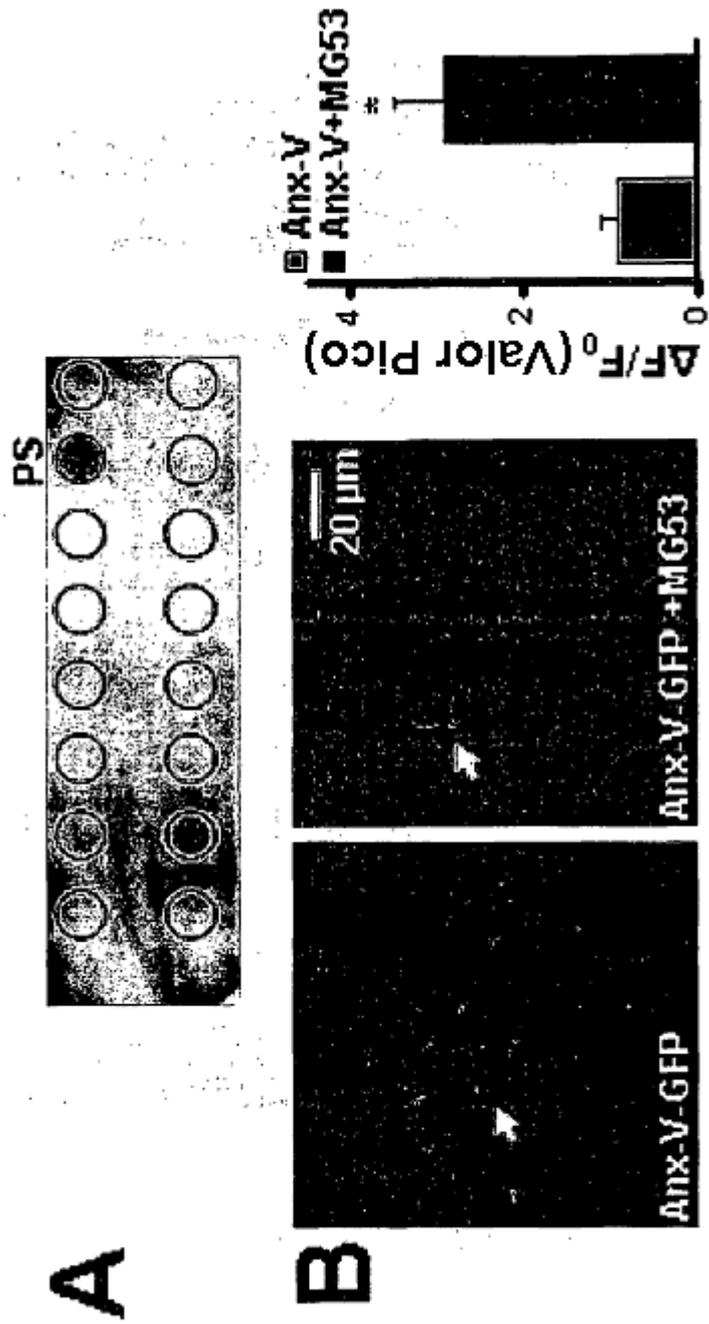


FIG. 20

