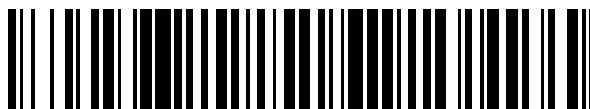


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 288**

51 Int. Cl.:

G01N 33/567 (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 4/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2006** **PCT/US2006/012092**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2006** **WO06105448**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2006** **E 06740287 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019** **EP 1875244**

54 Título: **Proliferación de células que expresan MUC1**

30 Prioridad:

30.03.2005 US 667216 P
14.09.2005 WO PCT/US2005/032821

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
19.07.2019

73 Titular/es:

MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION
(100.0%)
40 Bear Hill Road
Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

BAMDAD, CYNTHIA C.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 720 288 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

Proliferación de células que expresan MUC1

5 Campo de la invención:

La invención se refiere a un método para expandir una población de células que expresan MUC1.

10 Antecedente general y estado de la técnica:

La reciente investigación apoya la existencia de células madre cancerosas (CSC) (Prospective identification of tumorigenic stem cells. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ y Clarke MF. (2003). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 3983-3988; Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanheco Y, Smith BD, Civin CI y Jones RJ. (2004) Blood, 103, 2332-2336; Identification of a cancer stem cell in human brain tumor. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J y Dirks PB. (2003) Cancer Res., 63, 5281-5288). Las células madre normales se caracterizan por su capacidad de autorrenovarse indefinidamente y de diferenciarse para convertirse en células adultas de diferentes tipos de tejidos. Las células progenitoras tienen la capacidad de diferenciarse aún más en distintos tipos celulares pero han perdido la capacidad de diferenciarse en *cualquier* tipo de célula. Se ha demostrado que no todas las células cancerosas tienen la capacidad de autorrenovarse, de inducir enfermedad en un nuevo huésped o de formar nuevos tumores (A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Lapidot T, Srirad C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri M y Dick J. (1994). Nature, 17, 645-648; Identification of a cancer stem cell in human brain tumor. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J y Dirks PB. (2003) Cancer Res., 63, 5281-5288; Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Bonnet D., y Dick JE. (1997) Nat. Med. 3, 730-737). Más bien, solo una pequeña fracción de células cancerosas tiene esta capacidad de autorrenovarse y de formar nuevos tumores, es decir, hacer metástasis. Una teoría líder es que el cáncer es provocado por células madre normales cuyo sistema de controles y balances fuertemente regulado se ha roto (Self-renewal and solid tumor stem cells. Al-Hajj M y Clarke MF. (2004) Oncogene, 23, 7274-7282). Los tumores sólidos se producen en órganos que tienen poblaciones de células madre. Los cánceres epiteliales, que incluyen cánceres de mama, próstata, colon y pulmón son los cánceres más comunes en adultos. Más del 75 % de estos cánceres se caracterizan por la expresión aberrante del receptor MUC1 (Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. Burchell J, Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Girling A, Lewis A, Millis R, y Lampton D. (1987) Cancer Res., 47, 5476-5482; Monoclonal antibodies to epithelial sialomucins recognize epitopes at different cellular sites in adenolymphomas of the parotid gland. Zotter S, Hageman P C, Lossnitzer A, Mooi W y Hilgers J. (1988) Cancer Rev. 11-12, 55-101; Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. Byrd JC y Bresalier RS. (2004) Cancer Metastasis Review enero-junio;23(1-2):77-99.), en donde expresión aberrante significa que el receptor no se ubica más en el borde apical de las células lumbales sino que se distribuye de manera uniforme en toda la superficie celular (Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. (1984) Kufe D, Inghirami G, Abe, M, Hayes D, Justi-wheeler H y Schlom J. Hybridoma, 3, 223-232). El mayor porcentaje de cánceres positivos a MUC1 se encuentra en los cánceres de mama donde más del 96 % muestra una expresión aberrante de MUC1. De manera interesante, en la hembra adulta, el tejido mamario debe experimentar proliferaciones cíclicas del crecimiento y apoptosis con cada periodo menstrual y embarazo. Por lo tanto se deduce que el tejido mamario debe mantener las poblaciones de células madre o al menos de células progenitoras funcionales durante la vida de la hembra adulta.

La identificación de factores de crecimiento y sus receptores que conducen al crecimiento de células madre cancerosas podrían proporcionar la clave para comprender cómo cultivar y manipular células madre y células progenitoras para la investigación, la terapia y otros usos.

MUC1 (mucina 1) es una glicoproteína mucina de membrana que se expresa en una serie de tipos de células epiteliales (Molecular cloning and expression of the human tumor associated polymorphic epithelial mucin, PEM. Gendler S, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Dhuig, T, Peat, N, Burchell, J, Pemberton, L, Lalani, E-N y Wilson D. (1990) J. Biol. Chem. 265, 15286-15293; Episialin, a carcinoma associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. Ligtenberg MJL, Vos HL, Genissen, AMC y Hilken J. (1990) J. Biol. Chem. 265, 15573-15578), en células hematopoyéticas (Evaluation of MUC1 and EGP40 in Bone marrow and Peripheral Blood as a Marker for Occult breast cancer. (2001). Zhong XY, Kaul S, Bastert G, Arch Gynecol Obstet 264:177-181), y en células progenitoras también (Epithelial Progenitors in the Normal Human mammary Gland. Stingl J, Raouf A, Emerman J, y Eaves C. (2005). Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, Vol. 10, No. 1, 49-59). El receptor de superficie celular MUC1 está presente en el borde apical del epitelio sano, pero se expresa de manera aberrante (se expande en toda la superficie celular) en una amplia variedad de tumores sólidos humanos. Se ha conocido durante algún tiempo que el receptor MUC1 puede escindirse o "desprenderse" de la superficie celular. El ectodominio de MUC1 en realidad se compone de tres regiones diferentes: 1) las repeticiones en tándem; 2) una región de unión intercadenas que se autoagrega; y 3) la porción del receptor que permanece unida a la superficie celular después de la proteólisis, llamada PSMGFR en la presente descripción. La porción del receptor MUC1 que permanece unida a la superficie celular después de la escisión, que consiste principalmente en PSMGFR, es el principal receptor del factor de crecimiento que media el crecimiento de células cancerosas positivas a MUC1 *in vitro*. La transfección de un receptor MUC1 mutante compuesto

por los dominios de transmembrana y citoplasmáticos intactos, pero que tiene un ectodominio que termina en el extremo de la secuencia de PSMGFR, que se ha demostrado que es un sitio de escisión natural que se produce en células cancerosas, es suficiente para conferir la capacidad de estas células de adherirse en cultivo independientemente de la prueba para la transformación a un estado neoplásico. Esta forma escindida de MUC1 es la forma predominante del receptor MUC1 en muestras de tejido canceroso humano.

En mayor detalle, MUC1 comprende varias regiones denominadas en la presente descripción como sigue, mencionadas en un orden que comienza desde la región más cercana a la superficie celular y que continúa fuera de la célula. La estructura básica del receptor MUC1 se ilustra en la Figura 1. El receptor, como se ilustra comprende: 1) cola citoplasmática; 2) sección de transmembrana; 3) MGFR; 4) IBR, 5) Región Única, 6) repeticiones, y región N-terminal que comprende un péptido señal. Para una descripción detallada de MUC1 y su función en células normales y tumorales, consultar el documento PCT/US2005/032821.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención se dirige a un método *in vitro* para estimular la proliferación o mejorar la proliferación de células madre o células progenitoras mediante la activación del receptor MUC1 en las células, en donde el receptor MUC1 es un producto de escisión que comprende una cola citoplasmática, una porción de transmembrana y un dominio extracelular que se escinde, en donde el dominio extracelular del producto de escisión de MUC1 es la secuencia peptídica definida en la SEQ ID NO:10 y todas las variantes funcionales y fragmentos de esta que tienen cualquier valor entero de adiciones o deleciones de aminoácidos de hasta 20 en sus extremos N-terminal y/o C-terminal.

La activación puede llevarse a cabo mediante el contacto de las células con (i) un agente que multimeriza la secuencia peptídica definida en la SEQ ID NO: 10; o (ii) un ligando que se une a la secuencia peptídica definida en la SEQ ID NO:10. El receptor MUC1 puede activarse mediante un agente de multimerización del receptor MUC1. El agente de multimerización puede ser un agente bivalente. El agente bivalente puede reconocer una porción de la secuencia peptídica definida en la SEQ ID NO:10. Además, el agente bivalente puede ser un compuesto sintético. El agente bivalente puede ser un ligando dimérico de MUC1. Y más aún, el agente bivalente puede ser un anticuerpo. En algunas modalidades en donde el agente es un ligando de MUC1, el agente es NM23. Estos y otros objetivos de la invención se completarán de manera más completa a partir de la siguiente descripción de la invención, las figuras referenciadas adjuntas a esta y las reivindicaciones adjuntas a esta.

Breve descripción de las figuras

La presente invención se comprenderá de manera más completa a partir de la descripción detallada dada en la presente descripción a continuación, y las figuras acompañantes que se dan solo a modo de ilustración, y por lo tanto no son limitativos de la presente invención, y en donde;

La Figura 1 es un esquema del receptor MUC1 de longitud completa y el producto de escisión receptor del factor de crecimiento, MGFR.

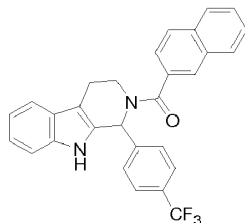
La Figura 2 es un gráfico de un ensayo de proliferación celular en el cual se trataron con anti-PSMGFR tres (3) líneas celulares diferentes (A) línea celular de cáncer de mama 1504, (B) células HeLa que son muy poco positivas a MUC1 y muestran una ligera respuesta en cultivo a la dimerización de MUC1, y (C) células HEK 293 que son negativas a MUC1. El crecimiento celular normalizado se grafica como una función de la concentración de anticuerpos. La curva de crecimiento de la línea celular de cáncer de mama positiva a MUC1 1504 muestra la respuesta bifásica típica que es característica de un receptor del factor de crecimiento de Clase I; el crecimiento celular se mejora a medida que aumenta la concentración de anticuerpos a medida que cada anticuerpo dimeriza cada dos receptores. El crecimiento celular comienza a disminuir a medida que la concentración de anticuerpos se hace muy alta y que cada anticuerpo único se une a un único receptor en lugar de dimerizar dos receptores. En ausencia de dimerización, se pierde la señal de crecimiento. Las células HEK 293 no muestran respuesta a la estimulación de MUC1 por anti-PSMGFR ya que carecen de receptores MUC1. Estos resultados indican que la porción del receptor MUC1 que contiene la secuencia de PSMGFR funciona como un receptor del factor de crecimiento y estimula que la célula se divida cuando dimeriza. Anti-Muc1* se refiere al anticuerpo anti-PSMGFR.

La Figura 3 es un gráfico de un ensayo de proliferación celular en el cual las células de riñón embrionario humano (HEK) 293 (negativas a MUC1) que se han transfectado establemente con un receptor MUC1 que tiene un ectodominio truncado, terminado en el extremo de la secuencia de PSMGFR, se trataron con anti-PSMGFR. El crecimiento celular normalizado se grafica como una función de la concentración de anticuerpos y muestra que la porción PSMGFR del receptor MUC1 media el crecimiento celular a través de la dimerización de esta porción del receptor.

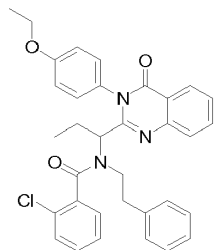
La Figura 4 es un gráfico de un ensayo de proliferación celular en el cual tres (3) líneas celulares se trataron con el anti-PSMGFR monovalente que es incapaz de dimerizar el receptor. El gráfico muestra que las líneas celulares de control (A) HeLa y (B) HEK 293 no se afectan por la adición del anticuerpo pero en la línea celular de cáncer de mama positiva a MUC1 1504 (C) y (D), se inhibe el crecimiento celular.

La Figura 5 es una transferencia de western que muestra que la rama ERK2 de la ruta de proliferación de MAP quinasa se activa (ERK2 se fosforila) tras la dimerización de la región de PSMGFR del receptor MUC1.

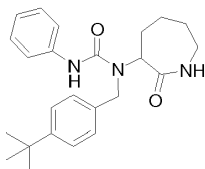
La Figura 6 es una transferencia de western de un experimento de competencia en el cual las pequeñas moléculas que se unen a la región de PSMGFR de MUC1 compiten con anti-PSMGFR por la unión al sitio. En presencia de la pequeña molécula competidora, el anticuerpo no se une y se inhibe la fosforilación de ERK2. Estos resultados indican que la porción PSMGFR del receptor MUC1 media el crecimiento celular y la dimerización del receptor puede desencadenar esta señal de crecimiento. La fórmula química del compuesto competidor MN 9 mencionado en esta figura es



El compuesto MN 21 es



y el compuesto MN 13 es



Las Figuras 7A-7B muestran cuatro (4) fotografías de muestras de cáncer de mama humano con aumento. (A) y (C) son cortes adyacentes de la misma sección de un cáncer positivo a MUC1 y (B) y (D) son cortes adyacentes de la misma sección de un cáncer negativo a MUC1. Las secciones (A) y (B) (parte superior) se han tratado con anti-PSMGFR que se une a la porción del receptor MUC1 que permanece unida a la superficie celular después de la escisión del receptor. Las secciones (C) y (D) (parte inferior) se han tratado con anticuerpo VU4H5 que se une a la porción de repetición en tándem del receptor MUC1, que se desprende frecuentemente de la superficie de las células cancerosas. Notar la mayor intensidad de la tinción con anti-PSMGFR en comparación con la tinción con VU4H5. Este resultado indica que la forma predominante del receptor MUC1 en la superficie de células cancerosas carece de la porción de repetición en tándem y se compone esencialmente de la secuencia de PSMGFR.

Las Figuras 8A-8C muestran tres (3) fotografías de cortes adyacentes de una muestra de biopsia de cáncer de mama teñida ya sea con A) H&E; B) anti-PSMGFR, o C) VU4H5. La comparación de B) y C) muestra que VU4H5 tiñe el citoplasma de manera difusa mientras que anti-PSMGFR tiñe de manera clara la membrana de la superficie celular. Esto indica que, en las células cancerosas, el receptor MUC1 se ha escindido para liberar la porción de repetición en tándem pero deja la porción que contiene la secuencia de PSMGFR unida a la superficie celular.

Las Figuras 9A-9D muestran cuatro (4) fotografías de muestras de tejido de cáncer de pulmón humano con aumento. (A) y (C) son cortes adyacentes de una primera sección de un cáncer de pulmón positivo a MUC1 y (B) y (D) son cortes adyacentes de un cáncer negativo a MUC1. Las secciones (A) y (B) (parte superior) se han tratado con anti-PSMGFR, el cual se une a la porción del receptor MUC1 que permanece unida a la superficie celular después de la escisión del receptor. Las secciones (C) y (D) (parte inferior) se han tratado con anticuerpo VU4H5 que se une a la porción de repetición en tándem del receptor MUC1, que se desprende frecuentemente de la superficie de las células cancerosas. Notar la mayor intensidad de la tinción con anti-PSMGFR en comparación con la tinción con VU4H5 y esa tinción con anti-PSMGFR

se limita a la superficie celular. Estos resultados indican de nuevo que la forma predominante del receptor MUC1 en la superficie de células de cáncer de pulmón positivas a MUC1 carece principalmente de la porción de repetición en tándem y se compone esencialmente de la secuencia de PSMGFR.

Las Figuras 10A-10C muestran el mismo conjunto de muestras de tejido de cáncer de pulmón positivo a MUC1 como en las Figuras 9A-9D a un mayor aumento. A mayor aumento, se observa fácilmente que la tinción con anti-PSMGFR se limita a la superficie celular mientras que la tinción con VU4H5 es difusa y citoplasmática, lo que confirma que el receptor MUC1 en la superficie de células de cáncer de pulmón positivo a MUC1 se escinde para liberar el dominio de repetición en tándem y deja la porción MGFR unida a la superficie celular.

Las Figuras 11A-11B muestran dos (2) fotografías de muestras de tejidos de cáncer de colon que se han teñido ya sea con (A) anti-PSMGFR o (B) VU4H5. Las flechas señalan las porciones de la sección que son muy cancerosas como lo indica el hecho de que han perdido toda la arquitectura celular. La sección (A), muestra regiones oscuras de la tinción con anti-PSMGFR pero la misma región de la sección adyacente (B), la cual se ha teñido con VU4H5, que reconoce la porción de repetición en tándem del receptor MUC1, no muestra ninguna tinción. Estos resultados indican que, en el cáncer de colon positivo a MUC1, el receptor MUC1 se ha escindido para liberar la porción de repetición en tándem pero deja la porción del receptor que contiene la secuencia de PSMGFR intacta y unida a la superficie celular.

Las Figuras 12A-12B muestran dos (2) fotografías de muestras de tejido negativo a MUC1 teñidas ya sea con anti-PSMGFR (A) o VU4H5 (B). Notar que en (A) las flechas señalan varios mastocitos, cuya superficie se ha teñido fuertemente con anti-PSMGFR pero no con VU4H5. Estos resultados indican que una forma escindida del receptor MUC1 que contiene la secuencia de PSMGFR, pero no el dominio de repetición en tándem, está presente en la superficie de mastocitos.

La Figura 13 es un mayor aumento de la Figura 12 (A) y muestra los mastocitos revestidos con anti-PSMGFR. Las flechas señalan los mastocitos revestidos con el producto de escisión de MUC1, PSMGFR.

Las Figuras 14A-14B muestran fotografías de cortes adyacentes de muestras de tejido de trompas de Falopio sanas teñidas ya sea con anticuerpo anti-PSMGFR (A) o VU4H5 (B).

Descripción detallada

En la presente solicitud, "un" y "una" se usan para referirse tanto a objetos únicos como a una pluralidad de objetos.

El término "Receptor del factor de crecimiento de MUC1" (MGFR) es una definición funcional que significa esa porción del receptor MUC1 que interactúa con un ligando de activación, tal como un factor de crecimiento o una enzima de modificación tal como una enzima de escisión, para promover la proliferación celular. La región de MGFR de MUC1 es esa porción extracelular que es cercana a la superficie celular y está definida por la mayoría o la totalidad de la PSMGFR, como se define más abajo. El MGFR incluye tanto los péptidos no modificados como los péptidos que han experimentado modificaciones enzimáticas, tales como, por ejemplo, fosforilación, glicosilación, etcétera. Los resultados son consistentes con un mecanismo en el cual esta porción se hace accesible al ligando tras la escisión de MUC1 en un sitio asociado con la tumorigénesis que provoca la liberación de algunas o todas las IBR desde la célula.

Como se usa en la presente descripción, "anti-PSMGFR" se refiere a cualquier anticuerpo que reconoce una región del MGFR y opcionalmente cualquier porción de PSMGFR. El anticuerpo contra nat-PSMGFR se ejemplifica y se prefiere en la solicitud, pero no pretende limitarse a un anticuerpo producido contra esta secuencia específica, ya que se contemplan también otros fragmentos de MGFR y PSMGFR.

El término "Región de unión intercadenas" (IBR) es una definición funcional que significa esa porción del receptor MUC1 que se une fuertemente a regiones idénticas de otras moléculas de MUC1 lo que brinda a MUC1 la capacidad de agregarse (es decir, autoagregarse) con otros receptores MUC1 a través de las IBR de los respectivos receptores. Esta autoagregación puede contribuir a la agrupación de receptores MUC1, observada en células sanas. La IBR puede definirse aproximadamente como un tramo de al menos una secuencia de 12 a 18 aminoácidos dentro de la región del receptor MUC1 humano de longitud completa definida como que comprende los aminoácidos 507 a 549 de la secuencia extracelular del receptor MUC1 (SEQ ID NO: 1), con los aminoácidos 525 al 540 y 525 al 549 especialmente preferidos (los números se refieren a Andrew Spicer y otros, J. Biol. Chem Vol 266 No. 23, 1991 páginas 15099-15109; estos números de aminoácidos corresponden a los números 1067, 1109, 1085, 1100, 1085, 1109 del número de acceso de Genbank P15941; PID G547937, SEQ ID NO: 1) o fragmentos, variantes funcionales o sustituciones conservadoras de estos, como se define en mayor detalle más abajo.

El término "IBR escindida" significa la IBR (o una porción de esta) que se ha liberado del segmento de la molécula de receptor que permanece unida a la superficie celular. La liberación puede ser debido a la escisión enzimática u otra escisión de la IBR. Como se usa en la presente descripción, cuando la IBR está "en la superficie de una célula", significa que la IBR se une a la porción del receptor de superficie celular que no se ha desprendido o escindido. La IBR escindida de interés es una "escisión asociada a enfermedad", es decir, el tipo de escisión que puede dar como resultado un cáncer.

El término "Región constante" (CR) es cualquier secuencia no repetitiva de MUC1 que existe en una relación 1:1 con la IBR y forma parte de la porción de MUC1 que se desprende tras la escisión en células sanas y tumorigénicas.

El término "Repeticiones" proporciona su significado normal en la técnica.

El término "Secuencia primaria del receptor del factor de crecimiento de MUC1" (PSMGFR) es una secuencia peptídica que define la mayoría o todo el MGFR en algunos casos, y las variantes funcionales y fragmentos de la secuencia peptídica, como se define más abajo. La PSMGFR se define como la SEQ ID NO: 10 enumerada más abajo en la Tabla 1, y todas las variantes funcionales y fragmentos de esta que tienen cualquier valor entero de sustituciones de aminoácidos de hasta 20 (es decir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) y/o cualquier valor entero de adiciones o deleciones de aminoácidos de hasta 20 en sus extremos N-terminal y/o C-terminal. Una "variante o fragmento funcional" en el contexto anterior se refiere a tal variante o fragmento que tiene la capacidad de unirse específicamente a, o de cualquier otra manera interactuar específicamente con, ligandos que se unen específicamente a, o de cualquier otra manera interactúan específicamente con, el péptido de la SEQ ID NO: 10. Un ejemplo de una PSMGFR que es una variante funcional del péptido de PSMGFR de la SEQ NO: 10 (denominada nat-PSMGFR - para "nativo") es la SEQ NO: 12 (denominada var-PSMGFR), que difiere de nat-PSMGFR en la inclusión de una secuencia -SPY- en lugar de la -SRY- nativa (ver el texto en negrita en los listados de secuencias). Var-PSMGFR puede tener una mejor estabilidad conformacional, cuando se compara con la forma nativa, lo cual puede ser importante para determinadas aplicaciones tal como para la producción de anticuerpos. La PSMGFR incluye tanto los péptidos no modificados como los péptidos que han experimentado modificaciones enzimáticas, tales como, por ejemplo, fosforilación, glicosilación, etcétera.

El término "Secuencia extendida del receptor del factor de crecimiento de MUC1" (ESMGFR) es una secuencia peptídica, definida más abajo (Ver la Tabla 1 - SEQ ID NO: 15), que define toda la His-var-PSMGFR más 9 aminoácidos del extremo proximal de PSIBR.

El término "Secuencia extendida específica de tumor del receptor del factor de crecimiento de MUC1" (TSESMGFR) es una secuencia peptídica (Ver, como un ejemplo, la Tabla 1 - SEQ ID NO: 16) que define un producto de escisión de MUC1 encontrado en células tumorales que permanece unida a la superficie celular y es capaz de interactuar con ligandos de activación de una manera similar a la PSMGFR. PSIBR es una secuencia peptídica, definida más abajo (Ver la Tabla 1 - SEQ ID NO: 17), que define la mayoría o todas las IBR.

"Región de unión intercadenas truncada" (TPSIBR) es una secuencia peptídica definida más abajo (Ver la Tabla 1 - SEQ ID NO: 18), que define una porción más pequeña de la IBR que se libera de la superficie celular después de la escisión del receptor en algunas células tumorales.

PSMGFRTC es una isoforma truncada del receptor MUC1 que comprende PSMGFR y se trunca en o dentro de aproximadamente hasta 30 (es decir dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) aminoácidos de su extremo N-terminal y que comprende las secuencias de transmembrana y citoplasmáticas del receptor MUC1 de longitud completa. Como se usa en la presente descripción, la frase "en su extremo N-terminal" en referencia a la localización de una secuencia mencionada dentro de una molécula más grande, tal como un polipéptido o receptor, se refiere a una secuencia tal que no es más de 30 aminoácidos del aminoácido N-terminal de la molécula. Opcionalmente la PSMGFRTC, así como las otras isoformas truncadas del receptor MUC1 analizadas más abajo, pueden incluir una secuencia de señalización en el extremo N-terminal de MUC1 (Tabla 1-SEQ ID NOS: 2, 3 o 4), típicamente entre 20 y 30 aminoácidos de longitud, o un fragmento o variante funcional de esta. Una secuencia tal es codificada típicamente por los constructos de ácidos nucleicos que codifican una isoforma truncada del receptor MUC1 y se traduce pero se escinde típicamente antes de o tras la inserción del receptor en la membrana de la célula. Una PSMGFRTC tal, es decir, que incluye la secuencia señal opcional, aún podría ser un péptido o proteína "que tiene una " secuencia "PSMGFR en su extremo N-terminal" por la definición anterior. Un ejemplo es nat-PSMGFRTC (SEQ ID NO: 5, con o sin el péptido señal de las SEQ ID NOS: 2, 3, o 4 en el extremo N-terminal) que tiene nat-PSMGFR (SEQ NO: 10) en su extremo N-terminal (es decir, en el extremo N-terminal o dentro de los 30 aminoácidos de este).

Como se usa en la presente descripción, "multimerización" de los receptores incluye sin limitación la dimerización de los receptores. Además, la multimerización incluye la unión del correceptor o de correceptores con MUC1, o la unión de múltiples receptores MUC1 entre sí, los que pueden ser reunidos por un ligando o ligandos que poseen múltiples valencias.

Un "ligando" para un receptor de superficie celular, se refiere a cualquier sustancia que puede interactuar con el receptor para alterar de manera temporal o permanente su estructura y/o función. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a parejas de unión del receptor, (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos), y agentes capaces de alterar la estructura química del receptor (por ejemplo, enzimas de modificación).

Un "ligando de activación" se refiere a un ligando capaz de interactuar con un receptor para transducir una señal a la célula. Los ligandos de activación pueden incluir, pero no se limitan a, especies que efectúan la multimerización inductiva de los receptores de superficie celular tal como una especie molecular única con más de un sitio activo capaz de unirse a un receptor; un dímero, un tetrámero, un multímero superior, un anticuerpo bivalente o fragmento de unión a antígeno bivalente de este, o un complejo que comprende una pluralidad de especies moleculares. Los ligandos de activación pueden incluir además especies que modifican el receptor de manera que el receptor transmita después una señal. Las

- enzimas también pueden ser ligandos de activación cuando modifican un receptor para convertirlo en un nuevo sitio de reconocimiento para otros ligandos de activación, por ejemplo las glicosilasas son ligandos de activación cuando la adición de carbohidratos mejora la afinidad de un ligando por el receptor. Las enzimas de escisión son ligandos de activación cuando el producto de escisión es la forma más activa del receptor, por ejemplo haciendo un sitio de reconocimiento para un ligando más accesible. En el contexto de las células madre o las células progenitoras positivas a MUC1, un ligando de activación puede ser una especie que escinde MUC1, modifica químicamente el receptor, o especies que interactúan con los MGFR en la superficie de las células MUC1 para transducir una señal a la célula que estimule la proliferación, por ejemplo, una especie que efectúa la multimerización inductiva.
- Un "factor de crecimiento" se refiere a una especie que puede o no pertenecer a una clase de factores de crecimiento identificados anteriormente, pero que actúa como un factor de crecimiento en el sentido de que actúa como un ligando de activación.
- Una "célula presentadora de MUC1" se refiere a células que expresan MUC1 y/o MGFR en la superficie. El término "célula inmadura" se usa en la presente descripción para referirse a células que se encuentran en diversas etapas de diferenciación desde células madre no diferenciadas a células progenitoras y otras células tales como diversas células precursoras y neutrófilos, que se diferencian parcialmente, y excluye las células que se diferencian completamente.
- El término, "célula madre" se refiere a una célula con capacidad de diferenciarse en múltiples linajes y de autorrenovarse, así como con la capacidad de regenerar tejido. Las células madre pueden originarse de, pero no se limita a, sangre de cordón umbilical, células madre hepáticas, células madre pancreáticas, células madre neuronales, células madre de médula ósea, células madre de sangre periférica o una mezcla de estos. Además, la invención no se limita al trasplante de cualquier célula madre particular obtenida a partir de cualquier fuente particular, pero puede incluir células madre de "múltiples fuentes de células madre" mezcladas entre sí. Por lo tanto, las células estromales mesenquimales expandidas pueden usarse en el cotrasplante de las células madre obtenidas a partir de una única o múltiples fuentes de células madre para aumentar la cantidad de injerto.
- El término "cáncer", como se usa en la presente descripción, puede incluir pero no se limita a: cáncer del tracto biliar; cáncer de vejiga; cáncer de cerebro incluido glioblastomas y meduloblastomas; cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer de endometrio; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasias hematológicas incluidas leucemia linfocítica aguda y mielógena; mieloma múltiple; leucemias asociadas a AIDS y linfoma o leucemia de células T del adulto; neoplasias intraepiteliales incluidas enfermedad de Bowen y enfermedad de Paget; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; linfomas incluido enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cáncer de boca incluido carcinoma de células escamosas; cáncer de ovario incluidos los que surgen de células epiteliales, células estromales, células germinales y células mesenquimales; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer de recto; sarcomas incluidos leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel incluido melanoma, sarcoma de Kaposi, cáncer basocelular, y cáncer de células escamosas; cáncer de testículos incluidos tumores germinales tales como seminoma, no seminoma (teratomas, coriocarcinomas), tumores estromales y tumores de células germinales; cáncer de tiroides incluido adenocarcinoma de tiroides y carcinoma medular; y cáncer de riñón incluido adenocarcinoma y tumor de Wilms. Los cánceres preferidos son; cáncer de mama, próstata, pulmón, ovario, colorrectal y cáncer de cerebro.
- El término "tratamiento del cáncer" como se describe en la presente descripción, puede incluir pero no se limita a: quimioterapia, radioterapia, terapia adyuvante o cualquier combinación de los métodos mencionados anteriormente. Los aspectos del tratamiento que pueden variar incluyen, pero no se limitan a: dosificaciones, momento de administración o duración de la terapia; y pueden combinarse o no con otros tratamientos, los cuales también pueden variar en dosificación, momento o duración. Otro tratamiento para el cáncer es la cirugía, que puede utilizarse ya sea sola o en combinación con cualquiera de los métodos de tratamiento mencionados anteriormente. Un experto en las técnicas médicas puede determinar un tratamiento apropiado.
- Un "agente para la prevención del cáncer o la tumorigénesis" significa cualquier agente que contrarresta cualquier proceso asociado con el cáncer o la tumorigénesis descrito en la presente descripción.
- Un "agente que mejora la escisión de una región de unión intercadenas del receptor de superficie celular" como se usa en la presente descripción es cualquier composición que promueva la escisión en una localización particular mediante la modificación de MUC1 con grupos de azúcar o fosfatos que generen un motivo de reconocimiento para la escisión en esa localización. Otras enzimas pueden promover la escisión de receptores mediante la activación de otras enzimas de escisión. Una manera de seleccionar agentes que mejoren la escisión de una IBR del receptor de superficie celular es primero identificar las enzimas que afectan la escisión como se describió anteriormente, y tamizar agentes y sus análogos, para determinar su capacidad de alterar la actividad de estas enzimas. Otra manera es probar agentes que se conoce que afectan la actividad de enzimas similares (por ejemplo, de la misma familia) para determinar su capacidad de alterar el sitio de escisión de MUC1, y probar de manera similar los análogos de estos agentes. Alternativamente, los agentes se tamizan en un ensayo libre de células que contiene la enzima y los receptores MUC1, y la tasa o posición de la escisión se mide mediante el sondeo de anticuerpos, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), o similares. Alternativamente, sin identificar primero las enzimas que afectan MUC1, los agentes se tamizan contra las células que presentan MUC1 para determinar la capacidad de los agentes de alterar el sitio de escisión o la tasa de escisión de MUC1.

Por ejemplo, los agentes pueden tamizarse en un ensayo que contenga todas las células que presentan MUC1 y puede medirse la agregación potencial del sobrenadante celular, un indicio de la cantidad de IBR que permanece unida a la porción escindida de MUC1, es decir, el grado de escisión entre MGFR e IBR. En otra técnica, los agentes pueden tamizarse en un ensayo que contiene células enteras que presentan MUC1, el sobrenadante se elimina, y el remanente de células se analiza para determinar la accesibilidad de la porción MGFR, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo marcado contra el MGFR. Los agentes pueden identificarse de las fuentes disponibles comercialmente tales como bibliotecas moleculares, o diseñarse racionalmente en base a agentes conocidos que tengan la misma capacidad funcional y analizarse para determinar la actividad mediante el uso de los ensayos de tamizaje.

Un sujeto, como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier mamífero (preferentemente, un ser humano). Los ejemplos incluyen un ser humano, primate no humano, vaca, caballo, cerdo, cabra, carnero, perro o gato. En general, la invención se dirige hacia el uso con seres humanos. Las muestras usadas en la presente descripción son cualquier muestra de tejido corporal y de fluido corporal obtenida de un sujeto. Se prefieren los fluidos corporales, por ejemplo linfa, saliva, sangre, orina, leche y secreciones mamarias, y similares. La sangre es la más preferida. Las muestras de tejido y/o células para el uso en los diversos métodos descritos en la presente descripción pueden obtenerse mediante métodos estándar incluidos, pero no se limitan a: biopsia de tejidos, que incluye biopsia por punción y raspado celular, biopsia con agujas, y recolección de sangre y otros fluidos corporales mediante aspiración u otros métodos.

Expansión celular a través de la manipulación del receptor MUC1

La presente solicitud describe que la porción del receptor MUC1 que permanece unida a la superficie celular después de la escisión del receptor, MGFR, que consiste principalmente en Nat-PSMGFR (Tabla 1: SEQ ID NO: 10) (Figura 1), es un receptor del factor de crecimiento primario que impulsa el crecimiento de células madre y/o células progenitoras o células más diferenciadas que aún pueden experimentar otra etapa de diferenciación. El receptor puede activarse a propósito para promover el crecimiento de estas células madre o células precursoras *in vitro*, *ex vivo*, y/o *in vivo* para terapia, investigación y otros fines.

El receptor MUC1 puede activarse a propósito mediante: 1) la inducción de la escisión del receptor; 2) el tratamiento de células que portan el receptor con un ligando de activación que puede ser un agente que dimeriza el receptor, incluido un anticuerpo que se une a una porción del receptor que es accesible; 3) la transfección de células con el receptor MUC1 o la porción MGFR de este; y/o el suministro de un gen u otro mecanismo que permita que una célula exprese el receptor MUC1 y/o sus ligandos de activación.

El receptor MUC1 se expresa en el epitelio normal, en donde el receptor se agrupa típicamente en el borde apical de células lumbinales adultas. MUC1 se expresa además en la mucosa intestinal, células madre de médula ósea pluripotentes, precursores de neutrófilos y neutrófilos. El solicitante ha observado que los mastocitos se recubren con un receptor MUC1 truncado que consiste esencialmente en la secuencia de PSMGFR (Figuras 12 y 13). Una publicación reciente demostró que cuando los pacientes de cáncer de mama se trataron con G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) sus niveles séricos de MUC1 desprendido aumentó mucho (G-CSF induce la elevación de CA 15-3 circulante en pacientes de carcinoma de mama tratados en un entorno adyuvante. Briasoulis E, Andreopolou E, Tolis CF, Bairaktari E, Katsaraki A, Dimopoulos MA, Fountzilias G, Seferiadis C y Pavlidis N. (2001) Cancer, 91, 909-917). Su investigación demostró que el aumento de los niveles de MUC1 desprendido se correlaciona con un aumento del número de neutrófilos. Estos investigadores informaron que estos neutrófilos portan un mayor número de receptores MUC1 en el citoplasma, pero no en la superficie del neutrófilo. El solicitante demostró que las conclusiones logradas en esta publicación, es decir que los neutrófilos no expresan MUC1 en su superficie, es una conclusión errónea porque los estudios mencionados usaron un anticuerpo (CA 15.3) que reconoce la porción de repetición en tándem del receptor MUC1, (ver las Figuras 8, 10 y 14). Las Figuras 8 y 10 muestran que las células de cáncer de mama y pulmón se tiñen positivas para el receptor MUC1 en el citoplasma, pero no en la superficie celular cuando se prueban con VU4H5, que es un anticuerpo que se une a la porción de repetición en tándem del receptor. Sin embargo, cuando la sección adyacente se prueba con anti-PSMGFR, el cual se une a la porción PSMGFR del receptor, puede observarse que un producto de escisión del receptor recubre completamente la superficie celular. Los solicitantes demostraron anteriormente que un producto de escisión del receptor MUC1 que se compone esencialmente de la secuencia de PSMGFR, funciona como un receptor del factor de crecimiento. La Figura 14 muestra una muestra de tejido de una trompa de Falopio sana que muestra que las células lumbinales que revisten la trompa se tiñen positivas en la superficie celular cuando se prueban con anti-PSMGFR (A), pero no se tiñen positivas en el citoplasma cuando se prueban con VU4H5 (B). Las células que revisten las trompas de Falopio y otros conductos muestran un producto de escisión de MUC1 que contiene la región de PSMGFR pero no las repeticiones en serie. Estas células lumbinales no son cancerosas pero deben reponerse con frecuencia. Estos tejidos contienen células madre y células progenitoras para hacer este rápido recambio de células posibles.

Estos datos son consistentes con la idea de que G-CSF estimula la proliferación de neutrófilos y que el aumento de la proliferación se debe a un mayor número de receptores MUC1 que están presentes en la superficie de neutrófilos en la forma escindida, a los que se les han quitado la sección de repetición en tándem, y que esta forma proteolizada de MUC1 es el receptor del factor de crecimiento que impulsa la proliferación. Las células en muestras de tejido canceroso humano muestran además una fuerte tinción citoplasmática para MUC1 y no una tinción en la superficie, cuando se usan anticuerpos que se unen a la porción de repetición en tándem del receptor (Figuras 7C, 8C y 10C). Sin embargo, el sondeo del corte de tejido adyacente con un anticuerpo contra la región de PSMGFR de MUC1 demostró que toda la superficie

celular se revistió de manera uniforme con un MUC1 escindido que no contenía la sección de repetición en tándem pero contenía la secuencia de PSMGFR (Figuras 7A, 8B y 10B). A la luz de estos hallazgos, la forma predominante del receptor MUC1 en neutrófilos, sus precursores y en células madre, incluidas las células madre pluripotentes, es la forma escindida, que comprende o que consiste esencialmente en PSMGFR. Este MUC1 escindido media la proliferación y expansión de algunas si no todas las células madre, células progenitoras, neutrófilos y precursores. Además, la dimerización de la porción MGFR de MUC1 desencadena esta proliferación celular, opcionalmente con un agente para hacerlo. Por lo tanto, los agentes que dimerizan MUC1 pueden usarse para estimular el crecimiento de ciertos tipos celulares, tal como *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*, o *in situ*. Específicamente, las células madre, células progenitoras, células precursoras, neutrófilos y similares, pueden estimularse para proliferar mediante la adición de agentes que dimerizan o multimerizan la porción MGFR de MUC1.

Se ha demostrado que los anticuerpos bivalentes dirigidos contra la secuencia de PSMGFR o nat-PSMGFR del receptor MUC1 estimulan el crecimiento de células tumorales presentadoras de MUC1 (Figuras 2-6). Pueden usarse anticuerpos similares para activar el receptor MUC1 y promover la proliferación de una variedad de células no cancerosas incluidas células inmaduras o células madre. El anticuerpo anti-PSMGFR o anti-nat-PSMGFR son ejemplos de tales anticuerpos. Sin embargo cualquier anticuerpo dirigido contra cualquier región del MGFR puede usarse para estimular el crecimiento de células positivas a MUC1 en donde la porción nat-PSMGFR del receptor es accesible. Los ligandos naturales del receptor MUC1 o imitadores naturales de estos pueden usarse además para promover el crecimiento de células mediadas por MUC1. Los ligandos del receptor MUC1 pueden incluir pero no se limitan a NM23, 14-3-3 y/o catepsina D.

Como se informa en la literatura, G-CSF mejora la producción de MUC1 y específicamente de la forma escindida de MUC1 que actúa como un receptor del factor de crecimiento. Por lo tanto, las estrategias para estimular el crecimiento de tipos celulares que presentan el receptor MUC1 y/o el receptor G-CSF pueden incluir agentes que actúan sobre el receptor G-CSF y el receptor MUC1, específicamente la porción que permanece unida a la superficie celular después de la escisión del receptor. Es decir que la proliferación de células madre puede lograrse mediante la coestimulación de ambos receptores, ya sea simultáneamente o en protocolos de tratamiento escalonados.

Existen muchos usos de las técnicas para estimular el crecimiento de células madre y células progenitoras. Una sola célula madre puede proliferar y diferenciarse hasta convertirse en un órgano completo. Los métodos para manipular el crecimiento y/o la diferenciación de células madre y progenitoras podrían encontrar usos en la regeneración de tejidos, generación de órganos, expansión de poblaciones celulares agotadas para tratar afecciones tales como lesión de la columna espinal y enfermedad de Alzheimer. El cultivo de estas células puede llevarse a cabo *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, las propias células de un paciente podrían expandirse y después reintroducirse al paciente. Alternativamente, los agentes estimulantes pueden introducirse *in vivo*, ya sea solos o en combinación con células madre o células de tipo células madre, por ejemplo en un sitio de tejido o lesión nerviosa. En otras modalidades, pueden usarse células alogénicas en el caso de células madre.

Los agentes que se dirigen a la porción MGFR del receptor MUC1, tales como un anticuerpo dimerizante, pueden usarse para mejorar el recuento de células blancas en pacientes que reciben terapias que inducen neutropenia. Estos agentes pueden administrarse directamente a pacientes que se tratan para condiciones no cancerosas o cánceres negativos a MUC1, así como otros pacientes inmunocomprometidos. Alternativamente, los propios neutrófilos de un paciente o precursores de estos pueden eliminarse del paciente y expandirse y después reintroducirse en el paciente. Por ejemplo, esto podría eliminar la necesidad de trasplantes de médula ósea para pacientes que han experimentado una radiación extensa u otros métodos que destruyen la médula ósea. Las afecciones tales como leucemias pueden tratarse además con este método para restaurar el sistema inmunitario del paciente y el perfil sanguíneo. Los métodos que incluyen anticuerpos que dimerizan la porción MGFR del receptor MUC1 incluyen administrarlos a neutrófilos o sus precursores *in vitro* o *ex vivo*, después eliminar el anticuerpo y reintroducir los neutrófilos o sus precursores al paciente. De manera similar, los agentes que aumentan la escisión de MUC1 a la forma del receptor del factor de crecimiento pueden usarse para estimular el crecimiento de células inmaduras, tales como pero no se limita a células madre, células progenitoras, células precursoras, neutrófilos y precursores de neutrófilos. Los ligandos, tales como los factores de crecimiento, que activan la porción MGFR del receptor MUC1 pueden usarse además para estimular el crecimiento de estos tipos celulares. Estos métodos pueden usarse para estimular la proliferación de células madre, neutrófilos o cualquier otra célula que presenta el receptor de superficie celular MUC1, donde podría ser conveniente la proliferación celular.

Una forma de terapia génica diseñada para estimular el crecimiento de células inmaduras tales como células madre, células progenitoras, neutrófilos o precursores de neutrófilos, comprende introducir el ADN que codifica para MUC1 o preferentemente el MUC1 truncado, que consiste esencialmente en la PSMGFR, en células inmaduras tales como células madre, células progenitoras, neutrófilos o células similares en donde es conveniente la proliferación. El ADN que codifica en ligando de MUC1 o los anticuerpos que se unen a la porción del receptor que permanece unida a la superficie celular después de la escisión puede introducirse para estimular el crecimiento de las células nuevas. El ADN que codifica el receptor G-CSF puede introducirse en paralelo ya que G-CSF estimula la expresión o escisión del receptor MUC1.

G-CSF puede añadirse o administrarse en combinación con un agente que activa MUC1 y/o un agente que dimeriza el receptor MUC1 para provocar la proliferación de células madre o células progenitoras que presentan el receptor MUC1 y/o el receptor G-CSF.

Los agentes que realizan las funciones descritas anteriormente pueden identificarse, sintetizarse y/o seleccionarse por los expertos en la técnica en base a la descripción en la presente descripción sin exceso de experimentación.

Expresión de MUC1 en células tumorales

Un mecanismo clave del crecimiento celular en cánceres positivos a MUC1 puede depender más de la cantidad de escisión de MUC1 que se produce en lugar de la cantidad total de receptor MUC1 que se expresa. Las especies de bajo peso molecular que migran en un gel de acrilamida con un peso molecular aparente de alrededor de 20-30 kD (algunas glicosiladas) existen en células tumorales positivas a MUC1 pero no existen en cantidades suficientes para ser detectables en células positivas a MUC1 no tumorales. Se identificaron anteriormente dos sitios de escisión del receptor MUC1 en células tumorales. El primer sitio de escisión se produce en el medio de la IBR y el segundo sitio de escisión, el cual según lo indica la evidencia es la forma más tumorigénica, se produce en el extremo C-terminal de la IBR: el primer sitio de escisión que se ubica en el extremo N-terminal de TPSIBR (SEQ ID NO: 17) y el segundo sitio de escisión que se ubica en el extremo N-terminal de la nat-PSMGFR que tiene la SEQ ID NO: 13. Cuando la escisión se produce en el primer sitio, la porción del receptor que permanece unida a la superficie celular es similar a TSESMGFR (Ver la Tabla 1, SEQ ID NO: 16, pero con la secuencia de SRY nativa). Cuando se escinde en el segundo sitio, la porción restante es una PSMGFR como se muestra en la Tabla 1, SEQ ID NO: 11. Esta especie de bajo peso molecular que es específica de tumor consiste esencialmente en la secuencia de PSMGFR nativa y en algunos casos la secuencia de TSESMGFR y está disponible para ligandos afines, es decir, no autoagregados, que en la cantidad general del receptor MUC 1 expresado por la célula. Como apoyo a esta conclusión, se encontró que la susceptibilidad de las células tumorales a proliferar es una función de la cantidad de la forma más corta del receptor MUC1. La Figura 7 muestra cuatro (4) fotografías de muestras de cáncer de mama humano con aumento. (A) y (C) son cortes adyacentes de la misma sección de un cáncer positivo a MUC1 y (B) y (D) son cortes adyacentes de la misma sección de un cáncer negativo a MUC1. Las secciones (A) y (B) (parte superior) se han tratado con anti-PSMGFR que se une a la porción del receptor MUC1 que permanece unida a la superficie celular después de la escisión del receptor. Las secciones (C) y (D) (parte inferior) se han tratado con anticuerpo VU4H5 que se une a la porción de repetición en tándem del receptor MUC1, que se desprende frecuentemente de la superficie de las células cancerosas. Notar la mayor intensidad de la tinción con anti-PSMGFR en comparación con la tinción con VU4H5. Este resultado indica que la forma predominante del receptor MUC1 en la superficie de células cancerosas carece de la porción de repetición en tándem y se compone esencialmente de la secuencia de PSMGFR. La Figura 9 muestra cuatro (4) fotografías de muestras de tejido de cáncer de pulmón humano con aumento. (A) y (C) son cortes adyacentes de una primera sección de un cáncer de pulmón positivo a MUC1 y (B) y (D) son cortes adyacentes de un cáncer negativo a MUC1. Las secciones (A) y (B) (parte superior) se han tratado con anti-PSMGFR, el cual se une a la porción del receptor MUC1 que permanece unida a la superficie celular después de la escisión del receptor. Las secciones (C) y (D) (parte inferior) se han tratado con anticuerpo VU4H5 que se une a la porción de repetición en tándem del receptor MUC1, que se desprende frecuentemente de la superficie de las células cancerosas. Notar la mayor intensidad de la tinción con anti-PSMGFR en comparación con la tinción con VU4H5 y esa tinción con anti-PSMGFR se limita a la superficie celular. Estos resultados indican de nuevo que la forma predominante del receptor MUC1 en la superficie de células de cáncer de pulmón positivas a MUC1 carece principalmente de la porción de repetición en tándem y se compone esencialmente de la secuencia de PSMGFR. La Figura 11 muestra dos (2) fotografías de muestras de tejidos de cáncer de colon que se han teñido ya sea con (A) anti-PSMGFR o (B) VU4H5. Las flechas señalan las porciones de la sección que son muy cancerosas como lo indica el hecho de que han perdido toda la arquitectura celular. La sección (A), muestra regiones oscuras de la tinción con anti-PSMGFR pero la misma región de la sección adyacente (B), la cual se ha teñido con VU4H5, que reconoce la porción de repetición en tándem del receptor MUC1, no muestra ninguna tinción. Estos resultados indican que, las porciones de crecimiento más rápido del tumor presentan una forma de MUC1 que carece de la porción de repetición en tándem pero deja la porción del receptor que contiene la secuencia de nat-PSMGFR intacta y unida a la superficie celular.

En apoyo adicional a la conclusión de que los productos de escisión del receptor MUC1 funcionan como receptores del factor de crecimiento en células tumorales, las células HEK se transfectaron con variantes de MUC1 que se terminaron ya sea después de PSMGFR (ver la Tabla 1, SEQ ID NO: 5) o después de la región de unión intercadena completa (PSIBR) (SEQ ID NO: 6). Las células transfectadas con el receptor que incluye la PSIBR crecieron a una tasa 4-6 veces menor que las células transfectadas con las variantes de MUC1 que se terminaron después de la PSMGFR (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). El solicitante ha demostrado anteriormente que una forma proteolizada de MUC1 es un receptor del factor de crecimiento que impulsa la proliferación de una amplia variedad de células cancerosas. La Figura 2 es un gráfico de un ensayo de proliferación celular en el cual se trataron con anti-PSMGFR tres (3) líneas celulares diferentes (A) línea celular de cáncer de mama 1504, (B) células HeLa que son muy poco positivas a MUC1 y muestran una ligera respuesta en cultivo a la dimerización de MUC1, y (C) células HEK 293 que son negativas a MUC1. El crecimiento celular normalizado se grafica como una función de la concentración de anticuerpos. La curva de crecimiento de la línea celular de cáncer de mama positiva a MUC1 1504 muestra la respuesta bifásica típica que es característica de un receptor del factor de crecimiento de Clase I; el crecimiento celular se mejora a medida que aumenta la concentración de anticuerpos a medida que cada anticuerpo dimeriza cada dos receptores.

El crecimiento celular comienza a disminuir a medida que la concentración de anticuerpos se hace muy alta y que cada anticuerpo único se une a un único receptor en lugar de dimerizar dos receptores. En ausencia de dimerización, se pierde la señal de crecimiento. Las células HEK 293 no muestran respuesta a la estimulación de MUC1 por anti-PSMGFR ya

que carecen de receptores MUC1. Estos resultados indican que la porción del receptor MUC1 que contiene la secuencia de PSMGFR funciona como un receptor del factor de crecimiento y estimula que la célula se divida cuando dimeriza.

La Figura 3 es un gráfico de un ensayo de proliferación celular en el cual se trataron con anticuerpo anti-PSMGFR las células de riñón embrionario humano (HEK) 293 (negativas a MUC1) que se habían transfectado establemente con un receptor MUC1 que tenía un ectodominio truncado, terminado en el extremo de la secuencia de PSMGFR. El crecimiento celular normalizado se grafica como una función de la concentración de anticuerpos y muestra que la porción PSMGFR del receptor MUC1 media el crecimiento celular a través de la dimerización de esta porción del receptor. La Figura 4 es un gráfico de un ensayo de proliferación celular en el cual tres (3) líneas celulares se trataron con el anti-PSMGFR monovalente que es incapaz de dimerizar el receptor. El gráfico muestra que las líneas celulares de control (A) HeLa y (B) HEK 293 no se afectan por la adición del anticuerpo pero en la línea celular de cáncer de mama positiva a MUC1 1504 (C) y (D), se inhibe el crecimiento celular.

La Figura 5 es una transferencia de western que muestra que la rama ERK2 de la ruta de proliferación de MAP quinasa se activa (ERK2 se fosforila) tras la dimerización de la región de PSMGFR del receptor MUC1. La Figura 6 es una transferencia de western de un experimento de competencia en el cual las pequeñas moléculas que se unen a la región de PSMGFR de MUC1 compiten con anti-PSMGFR por la unión al sitio. En presencia de la pequeña molécula competidora, el anticuerpo no se une y se inhibe la fosforilación de ERK2. Estos resultados indican que la porción PSMGFR del receptor MUC1 media el crecimiento celular y la dimerización del receptor puede desencadenar esta señal de crecimiento. Estos resultados apoyan la conclusión de que la porción del receptor MUC1 que actúa como un receptor del factor de crecimiento es un producto de escisión en el cual muchas o todas las IBR se liberan de la superficie celular.

Además, estos resultados apoyan la conclusión de que los tumores en los cuales se ha escindido un buen porcentaje de los receptores MUC1 para liberar la TPSIBR (SEQ ID NO: 18) son cánceres especialmente agresivos y los que se escinden para liberar la IBR completa, dejando PSMGFR (SEQ ID NO: 11) unida a la superficie celular son incluso más agresivos. Por lo tanto, los anticuerpos que se generan contra la porción TPSIBR (SEQ ID NO: 18) del receptor MUC1 pueden usarse para evaluar la agresividad de los cánceres que son positivos a MUC1.

Consistente con estos hallazgos, la cantidad de MGFR que está accesible en las células (tejidos) puede correlacionarse con la agresividad del tumor y el crecimiento celular agresivo. Por lo tanto, los anticuerpos que reconocen la porción MGFR del receptor y que se ha demostrado que desencadenan el crecimiento celular mediado por MUC1 pueden usarse para promover el crecimiento celular en células no cancerosas que expresan MUC1 en donde la porción PSMGFR del receptor está accesible. Los ejemplos de tales células incluyen pero no se limitan a células madre, neutrófilos, mastocitos y otras células inmaduras.

Proliferación de células no tumorales

Se describen además los métodos para tratar un sujeto para los cuales la célula madre o cualquier célula progenitora podrían tener valor terapéutico, u otra afección que requiere el tratamiento con uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos. El método implica administrar al sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este en una cantidad eficaz para expandir la célula madre o célula progenitora en el sujeto. En ciertos casos, puede usarse cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente o fragmentos de unión a antígeno de estos, especialmente los que se unen específicamente a MGFR, PSMGFR, nat-PSMGFR y etcétera. En ciertos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se administra en una cantidad eficaz para mejorar la interacción del receptor MUC1 por ejemplo, MGFR, que permanece unido a una célula después del desprendimiento de una región de unión intercadena del receptor MUC1. En ciertos casos, particularmente en los cuales el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este específicamente se une a MGFR, un método de tratamiento tal puede implicar administrar al sujeto el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este en una cantidad eficaz para provocar la dimerización inductiva de un receptor del factor de crecimiento, tal como MUC1 escindido.

Expansión de células inmaduras

Las células inmaduras incluyen células madre somáticas, células madre embrionarias, células madre de sangre de cordón y otras no diferenciadas completamente. Las células madre adultas también conocidas como células madre somáticas, son células indiferenciadas que se encuentran entre las células diferenciadas de un tejido específico y son en su mayoría células multipotentes. Estas ya están en uso en tratamientos para más de cien enfermedades y afecciones. Ciertas células madre adultas nombradas "células de tipo espora" están presentes en todos los tejidos (Vacanti, M. P., A. Roy, J. Cortiella, L. Bonassar, y C. A. Vacanti. 2001, J Cell Biochem 80:455-60.). Solo para referencia, las células madre embrionarias son células cultivadas que pueden obtenerse de las células de masa interna no diferenciadas de un embrión humano en etapa temprana y son totipotentes. Las células madre de sangre de cordón se derivan de la sangre de la placenta y el cordón umbilical después del nacimiento. Las células madre de sangre de cordón se usan para tratar sin limitación la enfermedad de Gunther, el síndrome de Hunter, el síndrome de Hurler, leucemia linfocítica aguda.

Se contempla el tratamiento alogénico.

Además, en particular, la médula ósea contiene dos tipos de células madre: hematopoyéticas (que pueden producir células sanguíneas) y estromales (que pueden producir grasa, cartílago y hueso). Las células madre estromales tienen la capacidad de diferenciarse en muchos tipos de tejidos, tales como tejido nervioso. Las células madre hematopoyéticas dan lugar a las tres clases de célula sanguínea que se encuentran en la circulación: leucocitos, glóbulos rojos (eritrocitos) y plaquetas (trombocitos). Las células madre hemopoyéticas pluripotenciales o células madre hematopoyéticas pluripotenciales (PHSC) son células madre encontradas en la médula ósea. Las PHSC son las células precursoras que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas de ambos linajes mieloide y linfóide. Esto incluye monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células T, células B, células NK, microglia, eritrocitos (glóbulos rojos), megacariocitos (por ejemplo plaquetas) y células dendríticas.

Como se analiza en la presente descripción, una forma proteolizada del receptor MUC1 funciona como un receptor primario del factor de crecimiento para impulsar la proliferación de una cantidad de tipos celulares, que incluyen pero no se limita a tipos celulares inmaduros tales como células madre y células progenitoras. La Tabla 3 enumera los tipos celulares que se conoce que expresan MUC1 y los tratamientos para los cuales podrían ser convenientes los métodos de la invención. Además, los tipos celulares que no expresan MUC1 podrían estimularse para proliferar mediante manipulación genética de las células para expresar MUC1 o un mutante de truncamiento de MUC1 y después la aplicación de los métodos de la invención para estimular el receptor MUC1 e inducir o mejorar la proliferación celular.

Anticuerpos

Los péptidos usados para la producción de anticuerpos pueden glicosilarse o no antes de inmunizar animales. La secuencia de estos péptidos no necesita reflejar exactamente la secuencia del receptor MUC1 tal como existe en la población general. Por ejemplo, los inventores observaron que los anticuerpos generados contra la variante peptídica de PSMGFR var-PSMGFR (SEQ ID NO: 12), que tiene un motivo "-SPY-" tienen una mayor afinidad y mayor especificidad por la proteína MUC1 que los anticuerpos generados contra la secuencia nativa actual (es decir, nat-PSMGFR, SEQ ID NO: 10), que tiene un motivo "-SRY-". Pueden introducirse mutaciones en la secuencia peptídica de PSMGFR para producir un péptido más rígido que puede mejorar la producción de anticuerpos. Por ejemplo, la mutación R a P en la secuencia de var-PFMGFR de la SEQ ID NO: 12 en realidad puede haber proporcionado un péptido más rígido y era por lo tanto más inmunogénico. Otro método de producir anticuerpos contra regiones de péptidos que no son particularmente inmunogénicos, tal como la IBR o TPSIBR es etiquetar la secuencia peptídica específica con una secuencia irrelevante en la que los aminoácidos están en la forma D y por lo tanto actúan para estimular la respuesta inmunitaria del animal huésped. Las secuencias peptídicas que se usan para inmunizar animales para la producción de anticuerpos también pueden glicosilarse. Las secuencias peptídicas de MUC1 que se usaron en la presente descripción para tamizar fármacos y para generar anticuerpos afines se derivaron de las especies humanas de MUC1. Dado que existe una conservación considerable entre las especies para la PSMGFR e IBR y algunas porciones de la UR, se anticipa que los péptidos de MUC1 cuyas secuencias se derivan de otras especies pueden usarse además en los tamizajes de fármacos y para generar anticuerpos para estos mismos fines.

En ciertos casos, se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos. En ciertos casos, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a MGFR. En ciertos casos, los anticuerpos mencionados anteriormente o fragmentos de unión a antígeno de estos se unen específicamente a PSMGFR. En ciertos casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos pueden unirse específicamente a la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 10 o una variante o fragmento funcional de esta que comprende hasta 15 adiciones o deleciones de aminoácidos en su extremo N-terminal o que comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos; en otros casos, se unen específicamente a los aminoácidos expuestos en la SEQ ID NO: 10 o una variante o fragmento funcional de estos que comprende hasta 10 sustituciones de aminoácidos; en otros casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos se unen específicamente al aminoácido expuesto en la SEQ ID NO: 10 o una variante o fragmento funcional de este que comprende hasta 5 sustituciones de aminoácidos; y aún en otros casos los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos se unen específicamente a la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 10. En ciertos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este humano, humanizado, xenogénico o quimérico humano-no humano. En ciertos casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos comprenden un anticuerpo intacto o un anticuerpo de cadena única intacto. Para anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que son monovalentes, pueden comprender un fragmento Fv de cadena única, un fragmento Fab', un fragmento Fab, o un fragmento Fd. Para anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que son bivalentes, ciertos casos comprenden un fragmento de unión a antígeno que es un F(ab')₂. En ciertas composiciones tales, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este puede ser policlonal, mientras que en otros casos puede ser monoclonal.

Dentro de la porción de unión a antígeno de un anticuerpo, como se conoce bien en la técnica, existen regiones determinantes de complementariedad (CDR), que interactúan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones marco (FR), que mantienen la estructura terciaria del paratopo (ver, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada y la cadena ligera de las inmunoglobulinas IgG, existen cuatro regiones marco (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente la CDR3 de la cadena pesada, son responsables en gran medida de la especificidad del anticuerpo.

Como se conoce bien en la técnica, las regiones que no son CDR de un anticuerpo de mamífero pueden reemplazarse con regiones similares de anticuerpos específicos de especies o heteroespecíficos mientras que mantienen la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta de manera más clara en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en los que las CDR no humanas se unen covalentemente a regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional. Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núm. 4,816,567, 5,225,539, 5,585,089, 5,693,762 y 5,859,205.

En ciertos casos, los anticuerpos monoclonales completamente humanos pueden prepararse además mediante la inmunización de ratones transgénicos para grandes porciones de los loci de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Después de la inmunización de estos ratones (por ejemplo, XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), los anticuerpos monoclonales pueden prepararse de acuerdo con la tecnología de hibridomas estándar. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias aminoacídicas de inmunoglobulina humana y por lo tanto no provocarán respuestas de anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA) cuando se administran a seres humanos.

Los métodos para producir anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de estos, que incluyen cualquiera de la(s) etapa(s) de producir un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena única, fragmento Fab, fragmento F(ab')₂, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo marcado o un análogo de cualquiera de los que son conocidos por el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en el documento WO89/09622. Los métodos para la producción de anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, los documentos EP-A1 0 239 400 y WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos a utilizar son los denominados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos humanos en ratones se describe, por ejemplo, en los documentos WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735. Como se analiza más abajo, los anticuerpos pueden existir en una variedad de formas (además de los anticuerpos intactos; incluidos, por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno de estos, tales como Fv, Fab y F(ab')₂, así como en cadenas únicas (es decir, como anticuerpos de cadena única); ver por ejemplo, el documento WO88/09344.

Por ejemplo, fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos con fragmentos F(ab')₂ en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos con fragmento Fab en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos quiméricos con fragmento Fd en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas, o los denominados anticuerpos de cadena única.

Derivados químicos de anticuerpos y formulaciones

Se describen además composiciones que comprenden los anticuerpos mencionados anteriormente o fragmentos de unión a antígeno o derivados químicos de estos. La composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable. El término "derivado químico" describe una molécula que contiene porciones químicas adicionales que no son normalmente una parte de la molécula base. Tales porciones pueden mejorar la solubilidad, vida media, absorción, etc. de la molécula base. Alternativamente las porciones pueden atenuar los efectos secundarios no deseados de la molécula base o disminuir la toxicidad de la molécula base. Los ejemplos de tales porciones se describen en una variedad de textos, tal como *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles etcétera. Las composiciones que comprenden tales portadores pueden formularse mediante los métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse mediante diferentes vías, por ejemplo, mediante la administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Las formulaciones en aerosol tales como las formulaciones para pulverización nasal incluyen soluciones acuosas purificadas u otras soluciones del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Tales formulaciones se ajustan preferentemente a un pH y estado isotónico compatible con las membranas de las mucosas nasales, por ejemplo, para la administración intranasal. Las formulaciones para la administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio con un portador adecuado.

Una dosis con eficacia terapéutica se refiere a esa cantidad de anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno que puede aliviar los síntomas o afecciones de la enfermedad que se trata. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales composiciones pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, ED50 (la dosis con eficacia terapéutica en el 50 % de la población) y LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de la dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación, LD50/ED50.

La actividad biológica de los anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno de estos indica que estos pueden tener una afinidad suficiente para hacerlos candidatos para la localización de fármacos en células que expresan las estructuras superficiales apropiadas, por ejemplo, MGFR. Por lo tanto, el direccionamiento y la unión a células de los anticuerpos y/o

fragmentos de unión a antígeno de estos, podría ser útil para el suministro de agentes terapéuticamente o diagnósticamente activos (incluidos fármacos de direccionamiento, secuencias de ADN, secuencias de ARN, lípidos, proteínas y terapia génica/suministro génico. Por lo tanto, pueden marcarse el anticuerpo y/o fragmentos de unión a antígeno de este (por ejemplo, fluorescentes, radioactivos, enzimas, magnéticos nucleares, coloides, otra entidad de señalización, etcétera) y usarse para detectar objetivos específicos *in vitro* incluidos los ensayos de tipo "inmunoquímica" *in vitro*. Otro método implica usar anticuerpos que se unen a la porción MGFR del receptor MUC1 como un método para clasificar y/o aislar células que se necesitan expandir. Una vez clasificadas, estas células podrían expandirse *in vitro*. Puede añadirse un nuevo material genético, por ejemplo que codifique correceptores y/o ligandos de activación, a estas células seleccionadas ya sea antes o después de la expansión. Pueden eliminarse los anticuerpos de activación de la población celular antes de la introducción al sujeto.

Proteínas

Se proporciona además una serie de proteínas o péptidos aislados. Los péptidos pueden incluir, pero no se limitan a, los definidos anteriormente como PSMGFR y PSMGFRTC, y los enumerados como las SEQ ID NOS: 2-19. Además, se abarca cualquier proteína, o péptido, no mencionado específicamente antes que es codificado por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas analizadas más abajo. Se abarcan además los fragmentos únicos de las proteínas o péptidos mencionados anteriormente, así como los anticuerpos generados contra ellos, incluidos los anticuerpos monoclonales y policlonales.

Las proteínas pueden aislarse a partir de muestras biológicas incluidos los homogeneizados de tejidos o células, y además pueden expresarse por vía recombinante en una variedad de sistemas de expresión procariotas y eucariotas mediante la construcción de un vector de expresión apropiado para el sistema de expresión, la introducción del vector de expresión en el sistema de expresión y el aislamiento de la proteína expresada por vía recombinante. Los polipéptidos cortos, incluidos los péptidos antigénicos (tales como los presentados por las moléculas de MHC en la superficie de una célula para el reconocimiento inmunitario) también pueden sintetizarse químicamente mediante el uso de métodos bien establecidos para la síntesis de péptidos.

También se abarcan fragmentos de las proteínas o péptidos, que en un aspecto, se usan para generar anticuerpos. Un fragmento de cualquiera de las proteínas o péptidos, por ejemplo, generalmente tiene los rasgos y las características de los fragmentos incluidos los fragmentos únicos como se analiza en la presente descripción en relación con moléculas de ácido nucleico. Como reconocerán los expertos en la técnica, el tamaño de un fragmento que es único dependerá de factores tales como si el fragmento constituye una porción de un dominio proteico conservado. Por lo tanto, algunas regiones de las proteínas o péptidos requerirán que los segmentos más largos sean únicos mientras que otros requerirán solo segmentos cortos, típicamente entre 5 y 12 aminoácidos (por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 aminoácidos de longitud).

Los fragmentos únicos de una proteína son preferentemente los fragmentos que mantienen una capacidad funcional diferente de la proteína. Las capacidades funcionales que pueden mantenerse en un fragmento de una proteína incluyen la interacción con anticuerpos, la interacción con otras proteínas o fragmentos de estas, la unión selectiva de moléculas de ácido nucleico y la actividad enzimática. Una actividad importante es la capacidad de actuar como una firma para identificar el polipéptido.

Los expertos en la técnica están bien versados en los métodos para seleccionar secuencias aminoacídicas únicas, típicamente sobre la base de la capacidad del fragmento de distinguir de manera selectiva la secuencia de interés de los miembros no familiares. Una comparación de la secuencia del fragmento con las de las bases de datos conocidas típicamente es todo lo que es necesario.

Se incluyen las variantes de las proteínas o péptidos descritos en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, una "variante" de una proteína es una proteína que contiene una o más modificaciones en la secuencia aminoacídica primaria de tal proteína. Pueden hacerse modificaciones que generen una variante proteica a una proteína 1) para producir, aumentar, reducir, o eliminar una actividad de la proteína; 2) para mejorar una propiedad de la proteína, tal como la estabilidad proteica en un sistema de expresión o la estabilidad de la unión proteína-proteína; 3) para proporcionar una nueva actividad o propiedad de una proteína, tal como la adición de un epítopo antigénico o la adición de una porción detectable; y/o 4) para proporcionar una unión equivalente o mejor a una molécula de ligando. Las modificaciones a una proteína pueden hacerse a través de modificaciones a la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína, y pueden incluir deleciones, mutaciones puntuales, truncamientos, sustituciones de aminoácidos y adiciones de aminoácidos o porciones no aminoacídicas. Alternativamente, las modificaciones pueden hacerse directamente a la proteína, tal como mediante la escisión, sustitución de uno o más aminoácidos durante la síntesis química, adición de una molécula enlazadora, adición de una porción detectable, tal como biotina, adición de un ácido graso, etcétera. Las modificaciones incluyen además proteínas de fusión que comprenden toda o parte de una secuencia de aminoácidos. A un experto en la técnica le serán familiares los métodos para predecir el efecto sobre la conformación proteica de un cambio en la secuencia de aminoácidos, y por lo tanto podrá "diseñar" un polipéptido variante de acuerdo con los métodos conocidos. Un ejemplo de un método tal se describe por Dahiyat y Mayo en Science 278:82-87, 1997, mediante el cual las proteínas pueden diseñarse *de novo*. El método puede aplicarse a una proteína conocida para variar solo una porción de la secuencia proteica. Mediante la aplicación de los métodos computacionales de Dahiyat y Mayo, las variantes

específicas de una proteína DOS pueden proporcionarse y analizarse para determinar si la variante mantiene una conformación deseada.

El experto en la técnica reconocerá además que pueden hacerse ciertas sustituciones de aminoácidos, tales como por ejemplo sustituciones conservadoras de aminoácidos, en las proteínas o péptidos para proporcionar "variantes funcionales" de las proteínas o péptidos anteriores, es decir, las variantes que poseen las capacidades funcionales de las proteínas o péptidos correspondientes. Como se usa en la presente descripción, una "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera las características de carga relativa o de tamaño de la proteína en la que se hace la sustitución de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen las sustituciones hechas entre los aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

Pueden hacerse variantes funcionales que tengan hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más sustituciones de aminoácidos. De manera similar, pueden prepararse las variantes anteriores u otras variantes funcionales que tengan, o que tengan además, hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más adiciones o deleciones de aminoácidos en sus extremos C- y/o N-terminal. Las variantes de las proteínas o péptidos preparadas mediante los métodos anteriores pueden secuenciarse, si se desea, para determinar la secuencia de aminoácidos y por lo tanto deducir la secuencia de nucleótidos que codifica tales variantes.

Ácido nucleico

Se proporcionan además secuencias de ácidos nucleicos que codifican una variedad de proteínas receptoras MUC1 truncadas, o variantes funcionales o fragmentos de estas, y otras secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan a las secuencias de ácidos nucleicos anteriores en condiciones de alta rigurosidad. La secuencia de ciertas moléculas de ácido nucleico se presentan en la Tabla 2 más abajo como las SEQ ID NO: 21-25, y las secuencias de aminoácidos predichas de los productos proteicos de estos genes, cada una que comprende una isoforma de una proteína receptora MUC1 truncada, se presentan en la Tabla 1. Por lo tanto se abarcan además las secuencias peptídicas que representan isoformas truncadas del receptor MUC1, los genes que codifican las secuencias peptídicas y las modificaciones y variantes funcionales de los anteriores, fragmentos útiles de los anteriores, así como los productos terapéuticos y los métodos relacionados a estos. Los péptidos referidos en la presente descripción como proteínas receptoras MUC1 truncadas incluyen fragmentos del receptor MUC1 de longitud completa pero no incluyen la proteína receptora MUC1 de longitud completa (es decir, SEQ ID NO: 1). De manera similar, las moléculas de ácido nucleico que codifican las diversas isoformas truncadas del receptor MUC1 descritas en la presente descripción pueden incluir fragmentos de la región codificante del gen de MUC1, pero no incluyen la región codificante de MUC1 de longitud completa.

Se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada. La molécula de ácido nucleico aislada se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos de la isoforma del receptor truncado MUC1 enumerados como las SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 8 y 9 en la Tabla 1, o variantes funcionales o fragmentos de estos, que incluyen, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos: SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24 y 25, respectivamente, y
- (b) moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones altamente rigurosas a las moléculas de ácido nucleico de (a),
- (c) deleciones, adiciones y sustituciones de las moléculas de ácido nucleico de (a) o (b),
- (d) moléculas de ácido nucleico que difieren de las moléculas de ácido nucleico de (a), (b) o (c) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético, y
- (e) complementos de (a), (b), (c) o (d).

Ciertos ácidos nucleicos aislados son moléculas de ácido nucleico que codifican una isoforma truncada del receptor MUC1, o un fragmento funcional o variante de este, o un equivalente funcional de este (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma proteína que la codificada por una de las secuencias de ácido nucleico, por ejemplo la SEQ ID NO: 21, enumerada en la Tabla 2, siempre que el fragmento o equivalente funcional codifique una proteína que exhiba la actividad funcional de una isoforma truncada del receptor MUC1 codificada por una secuencia enumerada tal. Como se usa en la presente descripción, la actividad funcional de las isoformas truncadas del receptor MUC1 se refiere a la capacidad de las isoformas truncadas de la secuencia peptídica del receptor MUC1 de interactuar específicamente con ligandos para MGFR y de modular el crecimiento celular o la proliferación celular en respuesta a tal interacción. En ciertos casos, la molécula de ácido nucleico aislada es la SEQ ID NO: 21.

Se proporcionan además las moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones de alta rigurosidad a una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en las SEQ ID NOS: 21-25. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN, compuestos de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, o pueden incorporar además nucleótidos no naturales sintéticos. Los expertos en la técnica conocen diversos métodos para determinar la expresión de un ácido nucleico y/o un polipéptido en células normales y tumorales

El término "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" como se usa en la presente descripción se refiere a parámetros con los cuales están familiarizados los expertos en la técnica. Los parámetros de hibridación de ácidos nucleicos pueden encontrarse en las referencias que compilan tales métodos, por ejemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, y otros, eds., segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, y otros, eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Más específicamente, las condiciones rigurosas, como se usa en la presente descripción, se refieren, por ejemplo, a la hibridación a 65 °C en tampón de hibridación (3,5 x SSC, Ficoll al 0,02 %, polivinilpirrolidona al 0,02 %, Albúmina Sérica Bovina al 0,02 %, NaH₂PO₄ 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5 %, EDTA 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M, pH 7; SDS es dodecil sulfato de sodio; y EDTA es ácido etilendiaminotetracético. Después de la hibridación, la membrana a la cual se transfiere el ADN se lava en 2 x SSC a temperatura ambiente y después en 0,1 x SSC/0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68 °C.

En general, los homólogos y alelos de una SEQ ID NO específica enumerada en la presente descripción (ver la Tabla 2) típicamente compartirán al menos 40 % de identidad de nucleótidos y/o al menos 50 % de identidad de aminoácidos con respecto a una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos tal, respectivamente, en algunos casos compartirán al menos 50 % de identidad de nucleótidos y/o al menos 65 % de identidad de aminoácidos y aún en otros casos compartirán al menos 60 % de identidad de nucleótidos y/o al menos 75 % de identidad de aminoácidos. Los homólogos y alelos preferidos comparten las identidades de nucleótidos y aminoácidos con la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 5, respectivamente; o la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 6, respectivamente; o la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 7, respectivamente; o la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 8, respectivamente; o la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 9, respectivamente; y codifican polipéptidos de más del 80 %, con mayor preferencia más del 90 %, aún con mayor preferencia más del 95 % y con la máxima preferencia más del 99 % de identidad. El por ciento de identidad puede calcularse mediante el uso de diversas herramientas de software públicamente disponibles desarrolladas por NCBI (Bethesda, Maryland) que pueden obtenerse en internet (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/>). Las herramientas ilustrativas incluyen el sistema BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, el cual usa algoritmos desarrollados por Altschul y otros (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997). Las alineaciones por Pairwise y ClustalW (configuración de matrices de BLOSUM30) así como el análisis hidropático por Kyte-Doolittle pueden obtenerse mediante el uso del software de análisis de secuencia de MacVector (Oxford Molecular Group). Se incluyen además los complementos de Watson-Crick de las moléculas de ácido nucleico anteriores.

Se proporcionan además fragmentos únicos aislados de las SEQ ID NOS: 21-25 y/o los complementos de las SEQ ID NOS: 21-25. Un fragmento único es uno que es una 'firma' para el ácido nucleico más grande. Este es, por ejemplo, lo suficientemente grande para asegurar que su secuencia precisa no se encuentre en las moléculas fuera de las moléculas de ácido nucleico definidas anteriormente. Los expertos en la técnica no pueden aplicar más que los procedimientos de rutina para determinar si un fragmento es único dentro del genoma humano o de ratón.

Como será reconocido por los expertos en la técnica, el tamaño del fragmento único mencionado anteriormente dependerá de su conservación en el código genético. Por lo tanto, algunas de las regiones de las SEQ ID NOS: 21-25 y sus complementos requerirán que los segmentos más largos sean únicos mientras que otros requerirán solo segmentos cortos, típicamente entre 12 y 32 nucleótidos o más de longitud (por ejemplo 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 o más), hasta la longitud completa de la secuencia descrita. Muchos segmentos de la región codificante de polinucleótidos o complementos de estos que son de 18 o más nucleótidos de longitud serán únicos. Los expertos en la técnica son bien versados en los métodos para seleccionar tales secuencias, típicamente sobre la base de la capacidad del fragmento único para distinguir de manera selectiva la secuencia de interés de otras moléculas de ácido nucleico no relacionadas. Una comparación de la secuencia del fragmento a las de las bases de datos conocidas típicamente es todo lo necesario, aunque pueden realizarse la hibridación confirmatoria y el análisis de secuenciación *in vitro*.

Como se usa en la presente descripción, un "vector" puede ser cualquiera de un número de moléculas de ácido nucleico en el que puede insertarse una secuencia deseada mediante restricción y ligazón para el transporte entre diferentes ambientes genéticos o para la expresión en una célula huésped. Los vectores se componen típicamente de ADN aunque los vectores de ARN también están disponibles. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, genomas plasmídicos, de fagémidos y virales. Un vector de clonación es uno que es capaz de replicarse en una célula huésped, y el cual se caracteriza además por uno o más sitios de restricción por endonucleasas en los cuales el vector puede ser cortado de un modo determinable y en los cuales una secuencia de ADN deseada puede ligarse de manera que el nuevo vector recombinante mantenga su capacidad de replicarse en la célula huésped. En el caso de los plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede producirse muchas veces a medida que aumenta el número de copias del dentro de la bacteria huésped o solo una vez por huésped antes de que el huésped se reproduzca por mitosis. En el caso de los fagos, la replicación puede producirse activamente durante una fase lítica o pasivamente durante una fase lisogénica.

Un "vector de expresión" es uno en el cual puede insertarse una secuencia de ADN deseada mediante restricción y ligazón de manera que ésta se una operativamente a secuencias reguladoras y pueda expresarse como un transcrito de ARN. Los vectores pueden contener además una o más secuencias de marcadores adecuadas para el uso en la identificación de células que se han transformado o transfectado o no con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que

codifican proteínas que aumentan o disminuyen ya sea la resistencia o sensibilidad a antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades son detectables mediante ensayos estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, β -galactosidasa o fosfatasa alcalina), y genes que afectan visiblemente el fenotipo de células, huéspedes, colonias o placas transformadas o transfectadas (por ejemplo, proteína fluorescente verde). Los vectores preferidos son los capaces de replicación autónoma y expresión de los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los cuales se unen operativamente.

Como se usa en la presente descripción, se dice que una secuencia codificante y las secuencias reguladoras se unen "operativamente" cuando se unen covalentemente de manera que la expresión o la transcripción de la secuencia codificante se coloca bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias codificantes se traduzcan en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN se unen operativamente si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras 5' da como resultado la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora de dirigir la transcripción de las secuencias codificantes, o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente de transcribirse en una proteína. Por lo tanto, una región promotora podría unirse operativamente a una secuencia codificante si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de manera que el transcrito resultante pudiera traducirse en la proteína o polipéptido deseado. La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies o tipos celulares y es bien conocida por el experto en la técnica.

Terapia génica

Los ácidos nucleicos que comprenden las secuencias que codifican MUC1, un fragmento de MUC1 que se expone en la superficie celular, o la porción MGFR del polipéptido MUC1 pueden administrarse para tratar, inhibir o evitar una enfermedad o trastorno en el que la terapia con células inmaduras beneficiará al paciente, mediante terapia génica. Terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable: los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que media un efecto terapéutico mediante la estimulación de la proliferación de células inmaduras que expresan MUC1.

Además, el receptor G-CSF génico puede coexpresarse para fines terapéuticos para estimular la proliferación de células inmaduras.

Puede usarse cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica. Los métodos ilustrativos se describen más abajo.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, ver Goldspiel y otros, *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu y Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIBTECH* 11(5):155-215 (1993). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel y otros (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden codificar un MUC1, un fragmento de MUC1 que se expone en la superficie celular o la porción MGFR del polipéptido MUC1, en el cual las secuencias de ácidos nucleicos son parte de vectores de expresión que expresan los polipéptidos en un huésped adecuado. En particular, tales secuencias de ácidos nucleicos tienen promotores unidos operativamente a la región codificante del polipéptido, dicho promotor es inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. En otro caso, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de polipéptidos y cualquier otra secuencia deseada se flanquean por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, lo que proporciona la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos (Koller y Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra y otros, *Nature* 342:435-438 (1989)).

El suministro de los ácidos nucleicos en un paciente puede ser directo, en cuyo caso el sujeto se expone directamente al ácido nucleico o vectores portadores de ácido nucleico, o indirectamente, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, y se trasplantan después al paciente. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

Las secuencias de ácido nucleico pueden administrarse directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto puede lograrse mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante su construcción como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y su administración de manera que se convierta en intracelular, por ejemplo, mediante la infección con el uso de retrovirales u otros vectores virales defectuosos o atenuados, o mediante la inyección directa de ADN desnudo, o el recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transcripción, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o mediante su administración en unión a un péptido que se conoce que entra al núcleo, mediante su administración en un enlace a un ligando sujeto para endocitosis mediada por receptores (ver, por ejemplo, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)) (que pueden usarse para tipos celulares objetivo que expresan específicamente los receptores) y etcétera.

- En otro caso, pueden formarse los complejos de ácido nucleico-ligando en los cuales el ligando comprende un péptido viral fusogénico para alterar los endosomas, lo que permite que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. Aún en otro caso, el ácido nucleico puede ser dirigido *in vivo* para la captación y expresión específica en células, mediante el direccionamiento de un receptor específico. Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para la expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra y otros, Nature 342:435-438 (1989)).
- Pueden usarse vectores virales que contengan las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido a usar en la terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita el suministro del gen en un paciente. Los vectores retrovirales, los vectores adenovirales y los virus adenoasociados son ejemplos de vectores virales que pueden usarse. Los vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma viral y la integración en el ADN de la célula huésped.
- Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a los epitelios respiratorios porque estos infectan de manera natural los epitelios respiratorios donde provocan una enfermedad leve. Otros objetivos para los sistemas de entrega basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales, y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaz de infectar las células que no se dividen. Además, se ha propuesto también el virus adenoasociado (AAV) para el uso en la terapia génica.
- Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a las células en cultivo de tejido mediante tales métodos como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección viral. Usualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se colocan después bajo la selección para aislar las células que están ocupadas y que expresan el gen transferido. Esas células se suministran después a un paciente.
- El ácido nucleico puede introducirse en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye pero no se limita a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago, que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etcétera. Se conocen en la técnica numerosas técnicas para la introducción de genes extraños en las células y pueden usarse siempre que no se alteren las funciones necesarias de desarrollo y fisiológicas de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de manera que el ácido nucleico es expresable por la célula y preferentemente heredable y expresable por su progenie.
- Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para fines de terapia génica abarcan cualquier tipo celular deseado, disponible, e incluyen pero no se limitan a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas a partir de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etcétera.
- La célula usada para terapia génica puede ser autóloga o alogénica. La célula usada para terapia génica puede ser autóloga con respecto al paciente.
- Cuando se usan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido se introducen en las células de manera que pueden expresarse por las células o su progenie y las células recombinantes se administran después *in vivo* para el efecto terapéutico. Pueden usarse células madre o progenitoras. Pueden usarse potencialmente cualquiera de las células madre y/o progenitoras que pueden aislarse y mantenerse *in vitro*.
- El ácido nucleico a introducir para fines de terapia génica puede comprender un promotor inducible unido operativamente a la región codificante, de manera que la expresión del ácido nucleico sea controlable mediante el control de la presencia o ausencia del inductor adecuado de la transcripción.
- Un vector viral para el suministro de una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia peptídica puede seleccionarse del grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociados, poxvirus incluidos virus vaccinia y poxvirus atenuados, virus de Semliki Forest, virus de la encefalitis equina venezolana, retrovirus, virus de Sindbis y partícula de tipo virus Ty. Los ejemplos de virus y partículas de tipo virus que se han usado para suministrar ácidos nucleicos exógenos incluyen: adenovirus con replicación defectuosa (por ejemplo, Xiang y otros, Virology 219:220-227, 1996; Eloit y otros, J. Virol. 71:5375-5381, 1997; Chengalvala y otros, Vaccine 15:335-339, 1997), un retrovirus modificado (Townsend y otros, J. Virol. 71:3365-3374, 1997), un retrovirus sin replicación (Irwin y otros, J. Virol. 68:5036-5044, 1994), un virus de Semliki Forest con replicación defectuosa (Zhao y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3009-3013, 1995), virus de la viruela del canario y derivado del virus vaccinia altamente atenuado (Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11349-11353, 1996), virus vaccinia sin replicación (Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11341-11348, 1996), virus vaccinia con replicación (Moss, Dev. Biol. Stand. 82:55-63, 1994), virus de la encefalitis equina venezolana (Davis y otros, J. Virol. 70:3781-3787,

1996), virus de Sindbis (Pugachev y otros, *Virology* 212:587-594, 1995), y partícula de tipo virus Ty (Allsopp y otros, *Eur. J. Immunol* 26:1951-1959, 1996). En ciertos casos, el vector viral es un adenovirus.

5 Otros virus, que pueden usarse potencialmente para ciertas aplicaciones, es el virus adenoasociado, un virus con ADN bicatenario. El virus adenoasociado es capaz de infectar una amplia variedad de tipos celulares y especies y puede modificarse por ingeniería genética para que tenga una replicación deficiente. Este tiene ventajas adicionales, tales como alta estabilidad en calor y solvente lipídico, altas frecuencias de transducción en células de varios linajes, incluidas las células hematopoyéticas, y falta de inhibición de la superinfección que permite por lo tanto múltiples series de transducciones. El virus adenoasociado puede integrarse en el ADN celular humano de una forma específica de sitio, lo
10 que minimiza de este modo la posibilidad de mutagénesis de inserción y la variabilidad de la expresión del gen insertado. Además, las infecciones por virus adenoasociado de tipo silvestre se han seguido en cultivo de tejido por más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un evento relativamente estable. El virus adenoasociado puede funcionar además de un modo extracromosómico

15 Otros vectores virales se basan en los virus eucariotas no citopáticos en los que se han reemplazado los genes no esenciales con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen los retrovirus, cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del ARN viral genómico en ADN con la posterior integración proviral en el ADN celular del huésped. Los adenovirus y retrovirus se han aprobado para ensayos de terapia génica en humanos. En general, los retrovirus tienen una replicación deficiente (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovirales genéticamente alterados pueden tener una utilidad general para la transducción con alta eficiencia de genes *in vivo*. Los protocolos estándar para producir retrovirus con replicación deficiente (que incluyen las etapas de la incorporación de material genético exógeno en un plásmido, la transfección de una célula de empaquetamiento revestida con plásmido, la producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, la recolección de partículas virales a partir de medios de cultivo de tejidos, y la infección de las células
20 objetivo con partículas virales) se proporcionan en Kriegler, M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, W.H. Freeman Co., Nueva York (1990) y Murry, E.J. Ed. "Methods in Molecular Biology," vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, Nueva Jersey (1991)

30 Pueden emplearse diversas técnicas para introducir moléculas de ácido nucleico en las células, dependiendo de si las moléculas de ácido nucleico se introducen *in vitro* o *in vivo* en un huésped. Tales técnicas incluyen la transfección de precipitados de moléculas de ácido nucleico-fosfato de calcio, la transfección de moléculas de ácido nucleico asociadas con DEAE, la transfección o infección con los virus anteriores que incluyen la molécula de ácido nucleico de interés, la transfección mediada por liposomas, y similares.

35 Para ciertos usos, se prefiere dirigir la molécula de ácido nucleico a células particulares. En tales casos, un vehículo usado para suministrar una molécula de ácido nucleico en una célula (por ejemplo, un retrovirus, u otro virus; un liposoma) puede tener una molécula de direccionamiento unida a este. Por ejemplo, una molécula tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana superficial en la célula objetivo o un ligando para un receptor en la célula objetivo puede unirse o incorporarse dentro del vehículo de suministro de la molécula de ácido nucleico. Específicamente se prefieren los anticuerpos monoclonales. Cuando se emplean liposomas para suministrar las moléculas de ácido nucleico, pueden incorporarse proteínas que se unen a una proteína de membrana superficial asociada con la endocitosis en la formulación del liposoma para dirigir y/o facilitar la captación. Tales proteínas incluyen proteínas de la cápsida o fragmentos de estas
40 trópicas para un tipo celular particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en ciclos, proteínas que dirigen la localización intracelular objetivo y mejoran la vida media intracelular, y similares. Los sistemas de suministro poliméricos se han usado además para suministrar exitosamente moléculas de ácido nucleico a las células, como es conocido por los expertos en la técnica. Tales sistemas incluso permiten el suministro oral de moléculas de ácido nucleico.

Además del suministro mediante el uso de vectores, los ácidos nucleicos pueden suministrarse a células sin vectores, por ejemplo, como el suministro de ácido nucleico "desnudo" mediante el uso de los métodos conocidos por los expertos en la técnica.
50

Animal Transgénico

55 Se proporciona un animal no humano transgénico que comprende un vector de expresión. Como se usa en la presente descripción, los "animales no humanos transgénicos" incluyen animales no humanos que tienen una o más moléculas de ácido nucleico exógenas incorporadas en células de línea germinal y/o células somáticas. Por lo tanto los animales transgénicos incluyen animales que tienen vectores de expresión episomales o incorporados cromosómicamente, etcétera. En general, tales vectores de expresión pueden usar una variedad de promotores que confieren el patrón de expresión génica deseado (por ejemplo, temporal o espacial). Los promotores condicionales además pueden unirse operativamente a moléculas de ácido nucleico para aumentar o disminuir la expresión de la molécula polipeptídica codificada de una manera regulada o condicional. Los reguladores negativos o positivos de acción trans de la actividad o expresión de los polipéptidos también pueden unirse operativamente a un promotor condicional como se describió anteriormente.

65 Administración y dosificación

5 Cuando se usan de manera terapéutica, los agentes pueden administrarse en cantidades con eficacia terapéutica. En general, una cantidad con eficacia terapéutica significa esa cantidad necesaria para retardar la aparición de, inhibir la progresión de, o detener por completo la afección particular que se trata. En general, una cantidad con eficacia terapéutica variará con la edad, el estado y el sexo del sujeto, así como la naturaleza y extensión de la enfermedad en el sujeto, todo lo cual puede ser determinado por un experto en la técnica. La dosificación puede ser ajustada por el médico o veterinario individual, particularmente en el caso de cualquier complicación. Una cantidad con eficacia terapéutica típicamente varía de 0,01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg. Se espera que la dosis en el intervalo de 1-500 mg/kg, y preferentemente la dosis en el intervalo de 1-50 mg/kg sea adecuada. En ciertos casos, los agentes se administrarán en dosis en el intervalo de 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, incluso con dosis más preferidas en el intervalo de 1-200 µg/kg/día, 1-100 µg/kg/día, 1-50 µg/kg/día o de 1-25 µg/kg/día. En ciertos casos, las dosificaciones pueden variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, y con la máxima preferencia de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. Estas dosificaciones pueden aplicarse en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o más días.

15 El agente puede administrarse durante un periodo de tiempo suficiente para proporcionar cualquiera o ambos de beneficio terapéutico y profiláctico al sujeto. En general, el agente se administra durante al menos un día. En algunos casos, el agente puede administrarse durante el resto de la vida del sujeto. La tasa a la cual se administra el agente puede variar dependiendo de las necesidades del sujeto y el modo de administración. Por ejemplo, puede ser necesario en algunos casos administrar dosis mayores y más frecuentes del agente a un sujeto, por ejemplo, durante o inmediatamente después de un evento asociado con tumor o cáncer, siempre que tales dosis alcancen el resultado médicamente deseable. Por otro lado, puede ser deseable administrar dosis más bajas para mantener el resultado médicamente deseable una vez que se logra. En ciertos casos, la misma dosis del agente puede administrarse en todo el periodo de tratamiento que como se describe en la presente descripción puede extenderse durante toda la vida del sujeto. La frecuencia de administración puede variar dependiendo de las características del sujeto. El agente puede administrarse a diario, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada semana, cada 10 días, cada 2 semanas, cada mes, o más, o en cualquier momento como si tal momento se hubiera mencionado explícitamente en la presente descripción.

25 En un caso, las dosis diarias de agentes activos serán de aproximadamente 0,01 miligramos/kg por día a 1000 miligramos/kg por día. Se espera que las dosis orales en el intervalo de 50 a 500 miligramos/kg, en una o varias administraciones por día, produzcan los resultados deseados. La dosificación puede ajustarse apropiadamente para lograr los niveles deseados, locales o sistémicos, dependiendo del modo de administración. En el evento que la respuesta en un sujeto es insuficiente a tales dosis, dosis aún más altas (o dosis más altas efectivas por una vía de distribución diferente y más localizada), puede ser empleado hasta el límite que permite la tolerancia del paciente. Se contemplan múltiples dosis por día para lograr niveles sistémicos apropiados de los agentes.

35 Preferentemente, tales agentes se usan en un esquema de dosis, formulación y administración que favorece la actividad del agente y no tiene un impacto significativo, si acaso, sobre las funciones celulares normales.

40 El grado de actividad del agente es al menos del 10 %. En ciertos casos, el grado de actividad del fármaco es al menos del 20 %, al menos del 30 %, al menos del 40 %, al menos del 50 %, al menos del 60 %, al menos del 70 %, al menos del 80 %, al menos del 90 %, o al menos del 95 %.

45 Cuando se administran a sujetos para fines terapéuticos, las formulaciones se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. Una composición farmacéutica puede incluir los agentes en combinación con cualquiera de los portadores fisiológicamente y/o farmacéuticamente aceptables estándar que se conocen en la técnica. Las composiciones deberían ser estériles y contener una cantidad con eficacia terapéutica del agente en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un sujeto. El término "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente descripción significa uno o más rellenos sólidos o líquidos compatibles, diluyentes o sustancias de encapsulación que son adecuados para la administración en un ser humano u otro animal. El término "portador" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual el ingrediente activo se combina para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de mezclarse con las moléculas de la presente invención, y entre sí, de una manera que no haya interacción que pueda dañar sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada. Farmacéuticamente aceptable significa además un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido u organismo. Las características del portador dependerán de la vía de administración. Los portadores fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, rellenos, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales que se conocen en la técnica.

60 Tales preparaciones pueden contener habitualmente sales, agentes tamponantes, conservantes, portadores compatibles y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. Cuando se usan en la medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales que no son farmacéuticamente aceptables pueden usarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de estas. Tales sales farmacológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Además, las sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo de ácido carboxílico

Los agentes tamponantes adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2 % P/V); ácido cítrico y una sal (1-3 % P/V); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % P/V); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 % P/V)

5 Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % P/V); clorobutanol (0,3-0,9 % P/V); parabenos (0,01-0,25 % P/V) y timerosal (0,004-0,02 % P/V).

10 Están disponibles una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, de la combinación particular de fármacos seleccionados, la gravedad de la afección que se trata, el estado del paciente y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. En términos generales, puede ponerse en práctica cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, es decir cualquier modo que produzca niveles eficaces de los compuestos activos sin provocar efectos adversos clínicamente inaceptables. Tales modos de administración incluyen la oral, rectal, tópica, nasal, otras formas mucosales, inyección directa, transdérmica, sublingual u otras vías. Las vías "parenterales" incluyen la vía subcutánea, intravenosa, intramuscular o por infusión. Puede preferirse la inyección directa para el suministro local al sitio del cáncer. Puede preferirse la administración oral para el tratamiento profiláctico, por ejemplo, en un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer, debido a la conveniencia para el paciente así como al esquema de dosificación.

20 Los vectores químicos/físicos pueden usarse para suministrar agentes a un objetivo (por ejemplo, célula) y facilitar de este modo la captación. Como se usa en la presente descripción, un "vector químico/físico" se refiere a una molécula natural o sintética, diferente de las derivadas de fuentes bacteriológicas o virales, capaz de suministrar el agente a un objetivo (por ejemplo, célula).

25 En ciertos casos un vector químico/físico es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. En ciertos casos, el sistema coloidal es un liposoma. Los liposomas son vasos de membrana artificial que se usan como un vector de suministro *in vivo* o *in vitro*. Se ha demostrado que los grandes vasos unilamelares (LUV), que varían en tamaño desde 0,2-4,0 μm pueden encapsular grandes macromoléculas. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse en el interior acuoso y pueden suministrarse a células en una forma biológicamente activa (Fraley, y otros, Trends Biochem. Sci., v. 6, p. 77 (1981)). Para que un liposoma sea un vector de transferencia de genes eficiente, deben estar presentes una o más de las siguientes características: (1) encapsulación del gen de interés a una alta eficiencia con retención de la actividad biológica; (2) unión preferencial y sustancial a una célula objetivo en comparación con células que no son objetivos; (3) suministro de los contenidos acuosos de la vesícula al citoplasma de la célula objetivo a una alta eficiencia; y (4) expresión segura y eficaz de la información genética.

35 Los liposomas pueden dirigirse a un sitio particular (por ejemplo, tejido), tal como (por ejemplo, la pared de células vasculares), mediante el acoplamiento del liposoma a un ligando específico tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glicolípido o proteína.

40 Los liposomas están disponibles comercialmente de Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN™. y LIPOFECTACE™., que se forman de lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3 dioleiloxi)-propil]-N, N, N-trimetilammonio (DOTMA) y bromuro de dimetil dioctadecilammonio (DDAB). Los métodos para producir liposomas se conocen bien en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. Los liposomas también se han revisado por Gregoriadis, G. en Trends in Biotechnology, V. 3, págs. 235-241 (1985).

45 El vehículo preferido es una micropartícula o implante biocompatible que es adecuado para el implante en el receptor mamífero. Los implantes bioerosionables ilustrativos que se usan de acuerdo con este método se describen en la solicitud internacional PCT núm. PCT/US/03307 (núm. de publicación WO 95/24929, titulada "Polymeric Gene Delivery System", que reivindica la prioridad a la solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 213,668, presentada el 15 de marzo de 1994). El documento PCT/US/0307 describe una matriz polimérica biocompatible preferentemente biodegradable para contener un gen exógeno bajo el control de un promotor apropiado. La matriz polimérica se usa para lograr la liberación sostenida del gen exógeno en el paciente. En ciertos casos el agente se encapsula o se dispersa dentro de la matriz polimérica biocompatible, preferentemente biodegradable descrita en el documento PCT/US/03307. La matriz polimérica preferentemente está en forma de una micropartícula, tal como, una microesfera (en donde el agente se dispersa en una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (en donde el agente se almacena en el núcleo de una cubierta polimérica).

50 Otras formas de la matriz polimérica para contener los agentes incluyen películas, recubrimientos, geles, implantes y prótesis endovascular. El tamaño y la composición del dispositivo de matriz polimérica se seleccionan para que den como resultado cinéticas de liberación favorables en el tejido en el cual el dispositivo de matriz se implanta. El tamaño del dispositivo de matriz polimérica se selecciona además de acuerdo con el método de suministro que va a usarse, típicamente la inyección en un tejido o la administración de una suspensión mediante aerosol en las áreas nasales y/o pulmonares. La composición de matriz polimérica puede seleccionarse para que tenga ambas tasas de degradación favorables y también para esté formada por un material que es bioadhesivo, para aumentar aún más la efectividad de la transferencia cuando el dispositivo se administre a una superficie vascular. La composición de la matriz puede seleccionarse además para que no se degrade, sino que se libere por difusión durante un período prolongado de tiempo.

65 Pueden usarse matrices poliméricas no biodegradables y biodegradables para suministrar los agentes al sujeto. Se prefieren las matrices biodegradables. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren los

polímeros sintéticos. El polímero se selecciona basado en el periodo de tiempo durante el cual se desea la liberación, en general en el orden de unas pocas horas a un año o más. Típicamente, la liberación durante un período que varíe de entre unas pocas horas y tres horas a doce meses es lo más deseable. El polímero opcionalmente está en la forma de un hidrogel que puede absorber hasta aproximadamente el 90 % de su peso en agua y además, opcionalmente está reticulado con iones multivalentes u otros polímeros.

En general, los agentes pueden administrarse mediante el uso del implante bioerosionable por difusión, o con mayor preferencia, mediante la degradación de la matriz polimérica. Los polímeros sintéticos ilustrativos que pueden usarse para formar el sistema de suministro biodegradable incluyen: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglicoluros, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de estos, alquil celulosa, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitro celulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboxietil celulosa, triacetato de celulosa, sal de sulfato de sodio de celulosa, poli(metil metacrilato), poli(etil metacrilato), poli(butilmetacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), poli(octadecil acrilato), polietileno, polipropileno, poli(etilen glicol), poli(óxido de etileno), poli(etilen tereftalato), poli(vinil alcoholes), acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo, poliestireno y polivinilpirrolidona.

Los ejemplos de polímeros no biodegradables incluyen acetato de etilenvinilo, ácido poli(met)acrílico, poliamidas, copolímeros y mezclas de estos.

Los ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polímeros sintéticos tales como polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), y poli(lactida-cocaprolactona), y polímeros naturales tales como alginato y otros polisacáridos que incluyen dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de estos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquilenos, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones hechas habitualmente por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrófilas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas, copolímeros y mezclas de estos. En general, estos materiales se degradan ya sea mediante hidrólisis enzimática o exposición al agua *in vivo*, mediante la erosión superficial o masiva.

Los polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H. S. Sawhney, C. P. Pathak y J. A. Hubell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosán, poli(metil metacrilatos), poli(etil metacrilatos), poli(butilmetacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato) y poli(octadecil acrilato). Por lo tanto, en ciertos casos se proporciona una composición de los agentes descritos anteriormente para el uso como un medicamento, los métodos para preparar el medicamento y los métodos para la liberación sostenida del medicamento *in vivo*.

Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar los agentes terapéuticos con un portador que constituye uno o más ingredientes adicionales. En general, las composiciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el agente terapéutico con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del agente terapéutico, que es preferentemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa puede formularse de acuerdo con métodos conocidos mediante el uso de agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1, 3-butano diol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer, y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos, estériles, se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite fijo suave incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tal como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de los inyectables. Las formulaciones de portadores adecuadas para la administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etcétera pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA

Las composiciones adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, bolsitas, tabletas o pastillas, cada una que contiene una cantidad predeterminada del agente terapéutico. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, un elixir o una emulsión

Otros sistemas de suministro pueden incluir sistemas de suministro de liberación por tiempo, de liberación retardada o de liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar las administraciones repetidas del agente terapéutico, lo que aumenta la conveniencia para el sujeto y el médico. Muchos tipos de sistemas de suministro para la liberación están disponibles y

se conocen por los expertos en la técnica. Estos incluyen sistemas basados en polímeros tales como ácido poliláctico y poliglicólico, poli(láctida-glicólido), copolioxalatos, polianhídridos, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y policaprolactona. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,075,109. Los sistemas no poliméricos que son lípidos incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di y triglicéridos; liposomas; fosfolípidos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de ceras, tabletas comprimidas que usan aglutinantes y excipientes convencionales, implantes parcialmente fusionados y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas erosivos en los que el polisacárido está contenido en una forma dentro de una matriz, encontrados en las patentes de Estados Unidos núms. 4,452,775, 4,675,189, y 5,736,152, y (b) sistemas difusionales en los que un componente activo permea a una tasa controlada de un polímero tal como se describe en las patentes de Estados Unidos núms. 3,854,480, 5,133,974 y 5,407,686. Además, pueden usarse sistemas hardware de suministro basados en bomba, algunos de los cuales se adaptan para el implante

El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento de afecciones establecidas así como para sujetos con riesgo de desarrollar la enfermedad. La liberación "a largo plazo", como se usa en la presente descripción, significa que el implante se construye y se dispone para suministrar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 7 días, y preferentemente 30-60 días. El implante puede ubicarse en un sitio de lesión o en la localización en la cual se desea la regeneración tisular o celular. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente

El agente terapéutico puede administrarse solo o en combinación con otros agentes que incluyen proteínas, receptores, correceptores y/o material genético diseñado para introducir, regular positivamente o regular negativamente estos genes en el área o en las células. Si el agente terapéutico se administra en combinación con los otros agentes puede administrarse mediante el mismo método, por ejemplo intravenoso, oral, etcétera o puede administrarse por separado de diferentes modos, por ejemplo el agente terapéutico administrado por vía oral, administrado por vía intravenosa, etcétera. En ciertos casos el agente terapéutico y otros agentes se coadministran por vía intravenosa. En otros casos el agente terapéutico y otros agentes se administran por separado

Otros agentes que pueden coadministrarse con los compuestos, no se limitan a Acivicina; Aclarubicina; Clorhidrato de acodazol; Acronina; Adriamicina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramicina; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Clorhidrato de bisantreno; Dimesilato de bisnafida; Bizelesina; Sulfato de bleomicina; Sodio Brequinar; Bropirimina; Busulfan; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimero; Carboplatino; Carmustina; Clorhidrato de carubicina; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucil; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Mesilato de crisanol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Clorhidrato de daunorubicina; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; Mesilato de dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Clorhidrato de doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de droloxifeno; Propionato de dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Clorhidrato de eflornitina; Elsamitrucina; Enloplatino; Enpromato; Epiropidina; Clorhidrato de epirubicina; Erbulozol; Clorhidrato de esorubicina; Estramustina; Estramustina Fosfato Sódico; Etanidazol; Etopósido; Fosfato de etopósido; Etoprina; Clorhidrato de fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de fludarabina; Fluorouracilo; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina sódica; Gemcitabina; Clorhidrato de gemcitabina; Hidroxiurea; Clorhidrato de idarubicina; Ifosfamida; Ilmofofina; Interferón alfa-2a; Interferón alfa-2b; Interferón alfa-nl; Interferón alfa-n3; Interferón Beta-1 a; Interferón Gamma-1 b; Iproplatino; Clorhidrato de irinotecán; Acetato de lanreotida; Letrozol; Acetato de leuprolida; Clorhidrato de liarozol; Lometrexol Sodio; Lomustina; Clorhidrato de losoxantrona; Masoprocól; Maitansina; Clorhidrato de mecloretamina; Acetato de megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalán; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato sódico; Metoprina; Meturedpa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Clorhidrato de mitoxantrona; Ácido mifofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatina; Oxisurano; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de peplomicina; Perfosfamida; Pipobromano; Puposulfan; Clorhidrato de piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfímero de sodio; Porfíromicina; Predinimustina; Clorhidrato de procarbazona; Puromicina; Clorhidrato de puromicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Clorhidrato de safingol; Semustina Simtrazeno; Esparfosato de sodio; Esparsomicina; Clorhidrato de espirogermanio; Espiromustina; Espiropatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Sulofenur; Talisomicina; Taxol; Tecogalan Sodio; Tegafur; Clorhidrato de teloxantrona; Temoporfina; Tenipósido; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina; Clorhidrato de topotecan; Citrato de toremifeno; Acetato de trestolona; Fosfato de triciribina; Trimetrexato; Glucuronato de trimetrexato; Triptorelina; Clorhidrato de tubulozol; Mostaza de uracilo; Uredpa; Vapreotida; Verteporfina; Sulfato de vinblastina; Sulfato de vincristina; Vindesina; Sulfato de vindesina; Sulfato de vinepidina; Sulfato de vinglicinato; Sulfato de vinleurosina; Tartrato de vinorelbina; Sulfato de vinrosidina; Sulfato de vinzolidina; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina; Clorhidrato de zorubicina. Los agentes antineoplásicos adicionales incluyen los descritos en el Capítulo 52, Agentes Antineoplásicos (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner), y la introducción a estos, 1202-1263, de Goodman y Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", octava edición, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division).

La presente invención no se limita en su alcance por las modalidades específicas descritas en la presente descripción. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en la presente descripción serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras que la acompañan. Tales modificaciones se

destinan a incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración de la presente invención y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 - Producción de anticuerpos

Los anticuerpos que se unen a la porción MGFR del receptor MUC1, denominados en la presente descripción como anti-PSMGFR se describen en detalle en la solicitud PCT núm. PCT/US2004/027954 (WO 2005/019269), en particular en el Ejemplo 8 de la solicitud PCT. La producción de anticuerpos se describe además en la solicitud PCT núm. PCT/US2005/032821, en particular en el Ejemplo 2 de la solicitud PCT. Los anticuerpos se generaron contra la porción PSMGFR del receptor MUC1, en particular nat-PSMGFR o var-PSMGFR mostrada en la Tabla 1 mediante el uso de métodos estándar de producción de anticuerpos. Los anticuerpos policlonales de conejo se produjeron y purificaron mediante cromatografía en columna en la que el péptido de inmunización se une a las perlas de la columna cromatográfica. Se demostró que los anticuerpos, anti-nat-PSMGFR y anti-var-PSMGFR, se unen específicamente y con sensibilidad a la porción MGFR del receptor MUC1.

EJEMPLO 2 - Preparación de muestras de tejidos

Las muestras de tejidos ilustradas en las Figuras 7-14 se prepararon mediante el uso de los métodos descritos anteriormente en la solicitud PCT núm. PCT/US2005/032821, en particular en el Ejemplo 3 de la solicitud PCT. Las muestras de tejido embebidas en parafina, fijadas con formalina se analizaron para determinar la reactividad a dos anticuerpos que reconocen diferentes epítomos en el receptor MUC1: 1) un anticuerpo policlonal de conejo, anti-PSMGFR, que se une a la porción PSMGFR del receptor MUC1 que permanece unida a la superficie celular después del desprendimiento del receptor; y 2) un monoclonal de ratón disponible comercialmente, VU4H5 (Santa Cruz, CA) que se une a una secuencia en la sección de repetición en tándem del receptor. Una sección de cada bloque se tiñó con hemotoxina y eosina (H&E) para ayudar en la evaluación del grado del tumor.

EJEMPLO 3 - Proliferación inducida de células presentadoras de MUC1

Los métodos usados en las Figuras 2-4 se describen en detalle en la solicitud PCT núm. PCT/US2004/027954 (WO 2005/019269), en particular en el Ejemplo 1 de la solicitud PCT. Las células positivas a MUC1 se expusieron a un anticuerpo bivalente desarrollado contra la región de MGFR del receptor MUC1. El crecimiento celular normalizado se graficó como una función de la concentración de anticuerpos. Los anticuerpos bivalentes se generaron ya sea contra las secuencias var-PSMGFR o nat-PSMGFR mostradas en la Tabla 1 (es decir, se produjo un anticuerpo único que tiene la capacidad de unirse simultáneamente a dos MGFR). Las células de tumor de mama positivas a MUC1 (T47D y 1504) y una línea celular negativa a MUC1 HEK293 transfectada con nat-PSMGFR se expusieron al anticuerpo, y la proliferación celular se estudió como una función de la concentración del anticuerpo. Se observó la curva típica de crecimiento/respuesta de una respuesta de factor de crecimiento/receptor - anticuerpo. Específicamente, a una concentración lo suficientemente baja como para que solo una pequeña porción de las células se expusieran al anticuerpo, la proliferación celular fue baja. A una concentración de anticuerpo lo suficientemente alta como para que un anticuerpo pudiera unirse a los MGFR adyacentes, la proliferación celular fue máxima. En un gran exceso de anticuerpo, cada anticuerpo se unió a un único MGFR, en lugar de dimerizar con los MGFR adyacentes, y se redujo la proliferación.

G TINVHDVETQ FNQYKTEAAS RYNLTISDVS VSDVPPFFSA QSGAGVPGWG IALLVLCVL VALAIVYLIA LAVQCRRKN YGQLDIFFAR DTYHPMSEYP TYTHGRYVP PSSTDRSPYE KVSAGNGGSS LSYTNPAVAA ASANL (SEQ ID NO: 5)	Una isoforma truncada del receptor MUC1 que tiene nat-PSMGFR y PSIBR en su extremo N-terminal e incluye las secuencias de transmembrana y citoplasmática de un receptor MUC1 de longitud completa ("isoforma CM"-se muestra excluyendo la secuencia señal N-terminal opcional, que puede escindirse después de la traducción y antes de la expresión del receptor en la superficie celular):
GFLGLS NIKFRPGSVV VQLTLAFREG TINVHDVETQ FNQYKTEAAS RYNLTISDVS VSDVPPFFSA QSGAGVPGWG IALLVLCVL VALAIVYLIA LAVQCRRKN YGQLDIFFAR DTYHPMSEYP TYTHGRYVP PSSTDRSPYE KVSAGNGGSS LSYTNPAVAA ASANL (SEQ ID NO: 6)	Una isoforma truncada del receptor MUC1 que tiene nat-PSMGFR + PSIBR + Región Única en su extremo N-terminal e incluye las secuencias de transmembrana y citoplasmática de un receptor MUC1 de longitud completa ("isoforma UR"-se muestra excluyendo las secuencias señales N-terminal):
ATTPASKST PFSIPSHSD TPTTLASHST KTDASSTHS TVPPLTSSNH STSPQLSTGW SFFFLSPHIS NLQFNSSLED PSTDYQELQ RDISEMFLQI YKQGGFLGLS NIKFRPGSVV VQLTLAFREG TINVHDVETQ FNQYKTEAAS RYNLTISDVS VSDVPPFFSA QSGAGVPGWG IALLVLCVL VALAIVYLIA LAVQCRRKN YGQLDIFFAR DTYHPMSEYP TYTHGRYVP PSSTDRSPYE KVSAGNGGSS LSYTNPAVAA ASANL (SEQ ID NO: 7)	Una isoforma truncada del receptor MUC1 que incluye las secuencias de transmembrana y citoplasmática de un receptor MUC1 de longitud completa ("isoforma Y"-se muestra excluyendo la secuencia señal N-terminal opcional, que puede escindirse después de la traducción y antes de la expresión del receptor en la superficie celular):
GSGHASSTPG GEKETATQOR SSVFSSTEKN AFNSSLEDPS TDYYQELQRD ISEMFLQIYK QGGFLGLSNI KFRGSSVVQ LTLAFREGTI NVHDMETQFN QYKTEAASRY NLTISDVSVS DVPEFFSAQS GAGVPGWGIA LLLVLCVLVA LAIVYLIALA VCQCRKNYG QLDIFFARDI YHPMSEYPTY HTHGRYVPPS STDRSPYEKV SAGNGGSSLS YTNPAVAATS ANL (SEQ ID NO: 8)	Una isoforma truncada del receptor MUC1 que tiene nat-PSMGFR + PSIBR + Región Única + Repeticiones en su extremo N-terminal e incluye las secuencias de transmembrana y citoplasmática de un receptor MUC1 de longitud completa ("isoforma Rep"-se muestra excluyendo la secuencia señal N-terminal opcional, que puede escindirse después de la traducción y antes de la expresión del receptor en la superficie celular):

[illegible]

Secuencia extendida del receptor del factor de crecimiento de MUC1 (ESMGFR) (que tiene la secuencia "SPY" de var-PSMGFR):	
VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASPYNLTISDVSVSDVPFF (SEQ ID NO: 15)	
Secuencia extendida específica de tumor del receptor del factor de crecimiento de MUC1 (TSESMGFR) (que tiene la secuencia "SPY" de var-PSMGFR):	
SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASPYNLTISDVSVSDVPFFSAQSGA (SEQ ID NO: 16)	
Secuencia primaria de la región de unión intercadenas (PSIBR):	
GFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFRE (SEQ ID NO: 17)	
Región de unión intercadenas truncada (TPSIBR):	
SVVVQLTLAFREG (SEQ ID NO: 18)	
Motivo de repetición 2 (RM2):	
PDTRPAPGSTAPPAGVTSAPDTRPAPGSTAPPAGVTS (SEQ ID NO: 19)	

Tabla 2: Secuencias de ácidos nucleicos que codifican las isoformas truncadas del receptor MUC1 (enumeradas del extremo 5'-terminal al extremo 3'-terminal):

Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor MUC1 de longitud completa de la SEQ ID NO: 1:

[illegible]

ccggacaacagggcccgcttgggctccacggccctccagtcacacaatgtcacctcgccc
tcaggctctgcatcaggctcagcttctactctgggtgcacaacggcacctctgccagggct
accacaacccccagccagcaagagcactccatttctcaattcccagccaccactctgatact
cctaccacccttggcagccatagcaccaagactgatgccagtagcactcaccatagctcg
gtacctctctcacctcctccaatcacagcacttctccccagttgtctactggggtctct
ttctttttctctgtctttttcacatttcaaacctccagtttaattcctctctggaagatccc
agcaccgactactaccaagagctgcagagagacatttctgaaatgtttttgcagatttat
aaacaagggggttttctgggcctctccaatattaagttcaggccaggatctgtggtggtta
caattgactctggccttccgagaaggtaccatcaatgtccacgacgtggagacacagttc
aatcagtatataaacggaagcagcctctcgatataacctgacgatctcagacgtcagcgtg
agtgtgtgcccatttctttctctgccagctctggggctggggtgccaggtctggggcatc
gcgctgctggtgctggtctgtgttctggttgcgctggccattgtctatctcattgccttg
gctgtctgtcagtgccgcccgaagaactacgggcagctggacatctttccagcccgggat
acctaccatcctatgagcgagtacccccacctaccacacccatgggcgctatgtgccccct
agcagtagcgatcgtagccccctatgagaaggtttctgcaggtaacggtggcagcagcctc
tcttacacaaacccagcagtgccagccgcttctgccaaactgttagggcacgtcgccgctg
agctgagtgccagccagtgccattccactccactcaggttcttcaggccagagccccctg
cacctgtttgggctggtgagctgggagttcaggtgggctgctcacagcctccttcagag
gccccaccaatttctcgacacttctcagtggtggaagctcatgtgggccccctgaggt
catgcttgggaagtgtgtgggggctcccaggaggactggcccagagagccctgagatag
cggggatcctgaactggactgaataaaacgtggtctccactg (SEQ ID NO: 20)

Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico que codifica la nat-PSMGFRTC de la SEQ ID NO: 5:

Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico que codifica la nat-PSMGFRTC de la SEQ ID NO: 5:

Acgggcacggccggtaccatcaatgtccacgacgtggagacacagttcaatcagtatataa
acggaagcagcctctcgatataacctgacgatctcagacgtcagcgtgagtgatgtgcca
tttctttctctgccagctctggggctggggtgccaggtctggggcatcgcgctgctggtg
ctggtctgtgttctggttgcgctggccattgtctatctcattgccttggctgtctgtcag
tgccgcccgaagaactacgggcagctggacatctttccagcccgggatacctaccatcct
atgagcgagtacccccacctaccacacccatgggcgctatgtgccccctagcagtagcgat
cgtagccccctatgagaaggtttctgcaggtaacggtggcagcagcctctcttacacaaac
ccagcagtgccagccgcttctgccaaactgttagggcacgtcgccgctgagctgagtggtg
agccagtgccattccactccactcaggttcttcaggccagagccccctgcacctgtttgg
gctggtgagctgggagttcaggtgggctgctcacagcctccttcagaggccccaccaatt
tctcgacacttctcagtggtggaagctcatgtgggccccctgaggtcatgcttggga
gtgtgtgggggctcccaggaggactggcccagagagccctgagatagcggggatcctga
actggactgaataaaacgtggtctccactg (SEQ ID NO: 21)

Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico que codifica la isoforma CM de la SEQ ID NO: 6:

Acggccgggttttctgggcctctccaatattaagttcagggccaggatctgtggtggtacaa
ttgactctggccttccgagaaggtaccatcaatgtccacgacgtggagacacagttcaat
cagtataaaacggaagcagcctctcgatataacctgacgatctcagacgtcagcgtgagt
gatgtgccatttctttctctgcccagtctggggctgggggtgccaggctggggcatcgcg
ctgctggtgctggtctgtgttctggttgcgctggccattgtctatctcattgccttggt
gtctgtcagtgcgcgcgaaagaactacgggcagctggacatcttccagcccgggatacc
taccatcctatgagcgagtagcccccactaccacacccatgggcgctatgtgccccctagc
agtaccgatcgtagccccctatgagaagggttctgcaggtaacgggtggcagcagcctctct
tacacaaacccagcagtgccagccgcttctgccaaactgtagggcacgtcgccgctgagc
tgagtggccagccagtgccattccactccactcaggttcttcaggccagagccccctgcac
cctgtttgggctggtgagctgggagttcaggtgggctgctcacagcctccttcagagggc
ccaccaatttctcggacacttctcagtgtgtggaagctcatgtgggccccctgaggctcat

gcctgggaagtgttgtgggggtcccaggaggactggcccagagagccctgagatagcgg
ggatcctgaactggactgaataaaacgtggtctcccactg (SEQ ID NO: 22)

Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico que codifica la isoforma UR de la SEQ ID NO: 7:

Acggccgctaccacaacccagccagcaagagcactccattctcaattcccagccaccac
tctgatactcctaccacccttgcagccatagcaccaagactgatgccagtagcactcac
catagctcggtacctcctctcacctcctccaatcacagcacttctccccagttgtctact
ggggtctcttttcttttctctgtcttttccacatttcaaacctccagtttaattcctctctg
gaagatcccagcaccgactactaccaagagctgcagagagacatttctgaaatgttttg
cagatttataaacaagggggttttctgggcctctccaatattaagttcagggccaggatct
gtggtggtacaaattgactctggccttccgagaaggtaccatcaatgtccacgacgtggag
acacagttcaatcagtataaaacggaagcagcctctcgatataacctgacgatctcagac
gtcagcgtgagtgatgtgccatttctttctctgcccagtctggggctgggggtgccaggc
tggggcatcgcgctgctggtgctggtctgtgttctggttgcgctggccattgtctatctc
attgccttggtgtgtctgtcagtgcgcgcgaaagaactacgggcagctggacatcttcca
gcccgggatacctaccatcctatgagcgagtagcccccactaccacacccatgggcgctat
gtgccccctagcagtagccgatcgtagccccctatgagaagggttctgcaggtaacgggtggc
agcagcctctcttacacaaacccagcagtgccagccgcttctgccaaactgtagggcag
tcgcccgtgagctgagtgccagccagtgccattccactccactcaggttcttcaggcca
gagccccctgcacccctgtttgggctggtgagctgggagttcaggtgggctgctcacagcct
ccttcagagggccccaccaatttctcggacacttctcagtgtgtggaagctcatgtgggc
cctgaggctcatgcctgggaagtgttgtgggggtcccaggaggactggcccagagagcc
ctgagatagcggggatcctgaactggactgaataaaacgtggtctcccactg (SEQ ID
NO: 23)

Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico que codifica la isoforma Y de la SEQ ID NO: 8:

Acagggttctgggtcatgcaagctctaccccaggtggagaaaaggagacttcgggtacccag
agaagttcagtgcccagctctactgagaagaatgcttttaattcctctctggaagatccc
agcaccgactactaccaagagctgcagagagacatttctgaaatgtttttgcagatttat
aaacaaggggggttttctgggcctctccaatattaagttcaggccaggatctgtggtggtg
caattgactctggccttccgagaagggtaccatcaatgtccacgacgtggagacacagttc
aatcagtataaaaacggaagcagcctctcgatataaacctgacgatctcagacgtcagcgtg
agtgatgtgccatttcttttctctgcccagctctggggctgggggtgccaggctggggcatc
gcgctgctgggtgctggtctgtgttctgggttgcgctggccattgtctatctcattgccttg
gctgtctgtcagtgccgcccgaagaactacgggcagctggacatctttccagcccgggat
acctaccatcctatgagcgagtacccacacctaccacacccatgggcgctatgtgcccct
agcagtaccgatcgtagccctatgagaagggttctgcaggtaatggtggcagcagcctc
tcttacacaaaaccagcagtggcagccacttctgccaaacttgtaggggcacgtcgcc
(SEQ ID NO: 24)

Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico que codifica la isoforma Rep de la SEQ ID NO: 9:

ctcgacccacgcgtccgctcgacccacgcgtccgcacctcgggccccggacaccaggccgg
ccccggggtccaccgccccccccagcccacgggtgtcacctcgggccccggacaccaggccgg
ccccggggtccaccgccccccccagcccacgggtgtcacctcgggccccggacaccaggccgg
ccccggggtccaccgccccccccagcccacgggtgtcacctcgggccccggacaccaggccgg
ccccggggtccaccgccccccccagcccacgggtgtcacctcgggccccggacaccaggccgg
ccccggggtccaccgccccccccagcccacgggtgtcacctcgggccccggacaccaggccgg
ccccggggtccaccgccccccccagcccacgggtgtcacctcgggccccggacaccaggccgg

tgtgggggctccaggaggactggcccagagagccctgagatagcggggatcctgaactg
gactgaataaaacgtggtctcccactg (SEQ ID NO: 25)

Tabla 3

	Tipo celular	Referencia	Indicación
5	Eritrocitos inmaduros	Regulated expression of MUC1 epithelial antigen in erythropoiesis. Rughetti A, Biffoni M, Pierelli L, Rahimi H, Bonanno G, Barachini S, Pellicciotta I, Napoletano C, Pescarmona E, Del Nero A, Pignoloni P, Frati L y Nuti M. (2003) Br. J. Haematol, 120(2): 344-352	Tratamiento de las enfermedades de la sangre, anemia
10	Células dendríticas	Mucin-1 is expressed on dendritic cells, both in vitro and in vivo. Cloosen S, Thio M, Vanclee A, van Leeuwen EB, Senden-Gijsbers BL, Oving EB, Germeraad WT, Bos GM. (2004) Int. Immunol. 11, 1561-71	Tratamiento de enfermedades inmunitarias, especialmente enfermedades de inmunodeficiencias
15	Células progenitoras epiteliales	Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. Stingl J, Raouf A, Emerman JT, Eaves CJ. J Mammary Gland Biol Neoplasia. (2005) ene;10(1):49-59.	Regeneración de tejidos Aumento de tejidos
20	Monoblastos y Monocitos	Epithelial membrane antigen (EMA) or MUC1 expression in monocytes and monoblasts. Leong CF, Raudhawati O, Cheong SK, Sivagengi K y Noor Hamdiah H. 2003 Pathology, 35, 422-427	Tratamiento de pacientes después de la quimioterapia y/o terapia de radiación Otras afecciones en las cuales es deseable aumentar el linaje de macrófagos
25	Células endometriales	progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J, Pellicer A, Simon C. (2001) Biol. Reprod. 64(2) 590-601	Para el tratamiento de la endometriosis, y otras afecciones relacionadas con la fertilidad
30	Pneumocito	MUC1 is a novel marker for the type II pneumocyte lineage during lung carcinogenesis. JA Jarrard, RI Linnoila, H Lee, SM Steinberg, H Witschi y E Szabo. (1998) Cancer Research, 58, (23) 5582-5589	Para el tratamiento de enfermedades respiratorias
35	Neutrófilos y Precursores	G-CSF induces elevation of circulating CA 15-3 in breast carcinoma patients treated in an adjuvant setting. Briasoulis E, Andreopolou E, Tolis CF, Bairaktari E, Katsaraki A, Dimopoulos MA, Fountzilias G, Seferiadis C y Pavlidis N. (2001) Cancer, 91, 909-917	Para el tratamiento de enfermedades de la sangre, y Neutropenia
40			Para el tratamiento de pacientes que reciben radiación ablativa, para reemplazar el trasplante de la médula ósea
45	Mastocitos	Solicitante	Para el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos

Listado de secuencias

<110> Minerva Biotechnologies Corporation Bamdad, Cynthia C

<120> proliferación de células que expresan MUC1

<130> 13150-70091PCT

<150> US 60/667,216

<151> 2005-03-30

<150> PCT/US2005/032821

<151> 2005-09-14

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1255

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

10 Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
1 5 10 15

15 Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
35 40 45

20 Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
50 55 60

25 Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65 70 75 80

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
85 90 95

30 Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
100 105 110

35 Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115 120 125

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
130 135 140

-

40 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
145 150 155 160

45 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
165 170 175

ES 2 720 288 T3

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 180 185 190
 5
 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 195 200 205
 10
 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 210 215 220
 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 225 230 235 240
 15
 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 245 250 255
 20
 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 260 265 270
 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 275 280 285
 25
 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 290 295 300
 30
 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 305 310 315 320
 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 325 330 335
 35
 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 340 345 350
 40
 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 355 360 365
 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 370 375 380
 45
 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 385 390 395 400
 50
 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 405 410 415
 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 420 425 430
 55
 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 435 440 445

ES 2 720 288 T3

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 450 455 460
 5 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 465 470 475 480
 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 10 485 490 495
 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 500 505 510
 15 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 515 520 525
 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 20 530 535 540
 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 545 550 555 560
 25 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 565 570 575
 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 580 585 590
 30 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 595 600 605
 35 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 610 615 620
 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 40 625 630 635 640
 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 645 650 655
 45 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 660 665 670
 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 50 675 680 685
 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 690 695 700
 55 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 705 710 715 720
 60
 65

ES 2 720 288 T3

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
725 730 735

5 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
740 745 750

10 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
755 760 765

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
770 775 780

15 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
785 790 795 800

20 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
805 810 815

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
820 825 830

25 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
835 840 845

30 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
850 855 860

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
865 870 875 880

35 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
885 890 895

40 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
900 905
~

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
915 920 925

45 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn
930 935 940

50 Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser
945 950 955 960

Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly
965 970 975

55 Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe
980 985 990

ES 2 720 288 T3

Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His
995 1000 1005

5 Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Ser Val Pro
1010 1015 1020

10 Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr
1025 1030 1035

Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln
1040 1045 1050

15 Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu
1055 1060 1065

20 Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln
1070 1075 1080

Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser
1085 1090 1095

25 Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn
1100 1105 1110

30 Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala
1115 1120 1125

Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp
1130 1135 1140

35 Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly
1145 1150 1155

40 Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu
1160 1165 1170

Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg
1175 1180 1185

45 Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr
1190 1195 1200

50 His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr
1205 1210 1215

Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser
1220 1225 1230

55 Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val
1235 1240 1245

Ala Ala Ala Ser Ala Asn Leu
1250 1255

60

<210> 2
<211> 19
<212> PRT
65 <213> Homo sapiens

ES 2 720 288 T3

<400> 2
 5 Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 Val Leu Thr
 <210> 3
 10 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 15 Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 20 Val Leu Thr Val Val Thr Ala
 20
 <210> 4
 25 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 30 Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 35 Val Leu Thr Val Val Thr Gly
 20
 <210> 5
 40 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 45 Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys
 1 5 10 15
 50 Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val
 20 25 30
 Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro
 35 40 45
 55
 60
 65

ES 2 720 288 T3

5 Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu
50 55 60

Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys
65 70 75 80

10 Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro
85 90 95

15 Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro
100 105 110

Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly
115 120 125

20 Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Ala Ser Ala
130 135 140

25 Asn Leu
145

<210> 6
<211> 171
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

35 Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val
1 5 10 15

Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp
20 25 30

Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr
35 40 45

45 Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe
50 55 60

Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu
65 70 75 80

Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala
85 90 95

55 Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile
100 105 110

Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr
115 120 125

60

65

ES 2 720 288 T3

His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro
 130 135 140
 5 Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr
 145 150 155 160
 10 Asn Pro Ala Val Ala Ala Ala Ser Ala Asn Leu
 165 170
 15 <210> 7
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 7
 Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser
 1 5 10 15
 25 His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr
 20 25 30
 30 Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser
 35 35 40 45
 Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe
 50 55 60
 35 Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 40 Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met
 85 90 95
 Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile
 100 105 110
 45 Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg
 115 120 125
 50 Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr
 130 135 140
 Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser
 145 150 155 160
 55 Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val
 165 170 175
 60 Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala
 180 185 190
 65

ES 2 720 288 T3

Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg
 195 200 205
 5 Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His
 210 215 220
 10 Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro
 225 230 235 240
 Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn
 245 250 255
 15 Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Ala Ser
 260 265 270
 20 Ala Asn Leu
 275
 <210> 8
 <211> 233
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 30 Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr Ser
 1 5 10 15
 Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Thr Glu Lys Asn Ala Phe
 35 20 25 30
 Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln
 35 40 45
 40 Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe
 50 55 60
 45 Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Met Glu
 85 90 95
 50 Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu
 100 105 110
 55 Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala
 115 120 125
 Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu
 130 135 140
 60 Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Trp Leu Ile Ala Leu Ala
 65

ES 2 720 288 T3

[illegible]

ES 2 720 288 T3

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
165 170 175

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
180 185 190

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
195 200 205

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
210 215 220

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
225 230 235 240

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
245 250 255

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
260 265 270

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
275 280 285

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
290 295 300

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
305 310 315 320

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
325 330 335

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
340 345 350

-

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
355 360 365

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
370 375 380

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
385 390 395 400

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
405 410 415

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
420 425 430

ES 2 720 288 T3

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 435 440 445
 5 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 450 455 460
 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 465 470 475 480
 10 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 485 490 495
 15 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 500 505 510
 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 515 520 525
 20 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 530 535 540
 25 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala
 545 550 555 560
 Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser
 565 570 575
 30 Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr
 580 585 590
 35 Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp
 595 600 605
 Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser
 610 615 620
 40 Thr His His Ser Ser Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr
 625 630 635 640
 45 Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His
 645 650 655
 Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp
 660 665 670
 50 Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile
 675 680 685
 55 Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro
 690 695 700
 60
 65

ES 2 720 288 T3

Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile
 705 710 715 720
 5 Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala
 725 730 735
 10 Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val
 740 745 750
 -
 Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly
 755 760 765
 15 Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val
 770 775 780
 20 Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly
 785 790 795 800
 Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu
 805 810 815
 25 Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr
 820 825 830
 30 Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser
 835 840 845
 Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Ala Ser Ala Asn Leu
 850 855 860
 35
 <210> 10
 <211> 45
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys
 1 5 10 15
 Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val
 20 25 30
 50 Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala
 35 40 45
 55 <210> 11
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 11
 65

ES 2 720 288 T3

Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr
 1 5 10 15
 5 Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser
 20 25 30
 Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala
 10 35 40
 <210> 12
 <211> 45
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 20 Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys
 1 5 10 15
 Thr Glu Ala Ala Ser Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val
 20 25 30
 25 Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala
 35 40 45
 30 <210> 13
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 13
 Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr
 1 5 10 15
 40 Glu Ala Ala Ser Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser
 20 25 30
 45 Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala
 35 40
 <210> 14
 <211> 33
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 55 Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys
 1 5 10 15
 Thr Glu Ala Ala Ser Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val
 20 25 30
 60 Ser
 65

ES 2 720 288 T3

<210> 15
 <211> 48
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 10 Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp
 1 5 10 15
 Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Pro Tyr
 20 25 30
 15 Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe
 35 40 45
 .
 20 <210> 16
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 16
 Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn
 1 5 10 15
 30 Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala
 20 25 30
 Ser Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro
 35 35 40 45
 Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala
 50 55
 40 <210> 17
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 17
 Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val
 1 5 10 15
 50 Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu
 20 25
 55 <210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 60 Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly
 1 5 10
 65 <210> 19
 <211> 40
 <212> PRT

ES 2 720 288 T3

<213> Homo sapiens

<400> 19

5 Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly
 1 5 10 15

 10 Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro
 20 25 30

 Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala
 35 40

15 <210> 20
 <211> 4003
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 20

	acaggttctg gtcattgcaag ctctacccca ggtggagaaa aggagacttc ggctaccag	60
25	agaagttcag tgcccagctc tactgagaag aatgctgtga gtatgaccag cagcgactc	120
	tccagccaca gccccggttc aggtcctcc accactcagg gacaggatgt cactctggcc	180
	ccggccacgg aaccagcttc aggttcagct gccacctggg gacaggatgt cacctcggtc	240
30	ccagtaccca ggccagccct gggctccacc accccgccag cccacgatgt cacctcagcc	300
	ccggacaaca agccagcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	360
	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	420
35	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	480
	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	540
	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	600
40	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	660
	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	720
	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	780
45	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	840
	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	900
	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	960
50	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	1020
	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	1080
	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	1140
55	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	1200
	ccggacacca ggccggcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc	1260

60

65

ES 2 720 288 T3

	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1320
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1380
5	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1440
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1500
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1560
10	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1620
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1680
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1740
15	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1800
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1860
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1920
20	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	1980
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2040
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2100
25	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2160
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2220
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2280
30	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2340
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2400
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2460
35	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2520
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2580
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2640
40	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2700
	ccggacacca	ggccggcccc	gggtccacc	gccccccag	cccacggtgt	cacctcggcc	2760
	ccggacaaca	ggccgcctt	gggtccacc	gccccccag	tccacaatgt	cacctcggcc	2820
45	tcaggctctg	catcaggctc	agcttctact	ctggtgcaca	acggcacctc	tgccagggct	2880
	accacaacc	cagccagcaa	gagcactcca	ttctcaattc	ccagccacca	ctctgatact	2940
	cctaccaccc	ttgccagcca	tagcaccaag	actgatgcc	gtagcactca	ccatagctcg	3000
	gtacctcctc	tcacctcctc	caatcacagc	acttctcccc	agttgtctac	tggggtctct	3060
50	ttctttttcc	tgtcttttca	catttcaaac	ctccagttta	attcctctct	ggaagatccc	3120
	agcaccgact	actaccaaga	gctgcagaga	gacatttctg	aaatgttttt	gcagatttat	3180
	aaacaagggg	gttttctggg	cctctccaat	attaagttca	ggccaggatc	tgtggtggta	3240
55	caattgactc	tggccttccg	agaaggtacc	atcaatgtcc	acgacgtgga	gacacagttc	3300
60							
65							

ES 2 720 288 T3

5	aatcagtata aaacggaagc agcctctcga tataacctga cgatctcaga cgtcagcgtg	3360
	agtgatgtgc catttccttt ctctgcccag tctggggctg gggtgccagg ctggggcatc	3420
	gcgctgctgg tgctggtctg tgttctggtt gcgctggcca ttgtctatct cattgccttg	3480
10	gctgtctgtc agtgccgccg aaagaactac gggcagctgg acatctttcc agcccgggat	3540
	acctaccatc ctatgagcga gtacccacc taccacacc atgggcgcta tgtgccccct	3600
	agcagtaccg atcgtagccc ctatgagaag gtttctgcag gtaacggtgg cagcagcctc	3660
15	tcttacacaa acccagcagt ggcagccgct tctgccaact tgtagggcac gtcgccgctg	3720
	agctgagtgg ccagccagtg ccattccact ccactcaggt tcttcaggcc agagcccctg	3780
	cacctgtttt gggctggtga gctgggagtt cagggtgggt gctcacagcc tccttcagag	3840
20	gccccacaa tttctcggac acttctcagt gtgtggaagc tcatgtgggc ccctgaggct	3900
	catgcctggg aagtgttgtg ggggctccca ggaggactgg cccagagagc cctgagatag	3960
	cggggatcct gaactggact gaataaaacg tggctctcca ctg	4003
25	<210> 21 <211> 751 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 21	
	acgggcacgg ccggtacat caatgtccac gacgtggaga cacagttcaa tcagtataaa	60
	acggaagcag cctctcgata taacctgacg atctcagacg tcagcgtgag tgatgtgcca	120
35	tttcctttct ctgccagtc tggggctggg gtgccaggct ggggcatcgc gctgctggtg	180
	ctggtctgtg ttctggttgc gctggccatt gtctatctca ttgccttggc tgtctgtcag	240
	tgccgccgaa agaactacgg gcagctggac atctttccag cccgggatac ctaccatcct	300
40	atgagcgagt accccaccta ccacacccat gggcgctatg tgccccctag cagtaccgat	360
	cgtagcccct atgagaaggt ttctgcaggt aacggtggca gcagcctctc ttacacaaac	420
	ccagcagtgg cagccgcttc tgccaacttg tagggcacgt cgccgctgag ctgagtggcc	480
45	agccagtgcc attccactcc actcaggttc ttcaggccag agcccctgca ccctgtttgg	540
	gctggtgagc tgggagttca ggtgggctgc tcacagcctc cttcagaggc cccaccaatt	600
	tctcggacac ttctcagtgt gtggaagctc atgtgggccc ctgaggctca tgcctgggaa	660
50	gtgttgtggg ggctcccagg aggactggcc cagagagccc tgagatagcg gggatcctga	720
	actggactga ataaaacgtg gtctccact g	751
55	<210> 22 <211> 820 <212> PRT <213> Homo sapiens	
60	<400> 22	
65		

ES 2 720 288 T3

5 Ala Cys Gly Gly Cys Cys Gly Gly Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Cys Cys Thr Cys Thr Cys Cys Ala Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala
 20 25 30
 10 Gly Thr Thr Cys Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Ala Thr Cys Thr
 35 40 45
 Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Ala Cys Ala Ala Thr Thr Gly Ala
 50 55 60
 15 Cys Thr Cys Thr Gly Gly Cys Cys Thr Thr Cys Cys Gly Ala Gly Ala
 65 70 75 80
 20 Ala Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Ala Thr Gly Thr Cys
 85 90 95
 Cys Ala Cys Gly Ala Cys Gly Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Ala Cys
 100 105 110
 25 Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly Thr Ala Thr Ala Ala
 115 120 125
 Ala Ala Cys Gly Gly Ala Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr
 130 135 140
 30 Cys Gly Ala Thr Ala Thr Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Cys Gly Ala
 145 150 155 160
 35 Thr Cys Thr Cys Ala Gly Ala Cys Gly Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr
 165 170 175
 Gly Ala Gly Thr Gly Ala Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Thr Thr Thr
 180 185 190
 40 Cys Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Thr
 195 200 205
 Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Gly Cys Cys
 210 215 220
 45 Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Ala Thr Cys Gly Cys Gly
 225 230 235 240
 50 Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Thr
 245 250 255
 Gly Thr Gly Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Gly Cys Gly Cys Thr
 260 265 270
 55 Gly Gly Cys Cys Ala Thr Thr Gly Thr Cys Thr Ala Thr Cys Thr Cys
 275 280 285
 60
 65

ES 2 720 288 T3

Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr Thr Gly Gly Cys Thr Gly Thr Cys Thr
290 295 300

5 Gly Thr Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Gly Cys Gly Ala Ala Ala
305 310 315 320

10 Gly Ala Ala Cys Thr Ala Cys Gly Gly Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly
325 330 335

Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys
340 345 350

15 Gly Gly Gly Ala Thr Ala Cys Cys Thr Ala Cys Cys Ala Thr Cys Cys
355 360 365

20 Thr Ala Thr Gly Ala Gly Cys Gly Ala Gly Thr Ala Cys Cys Cys Cys
370 375 380

Ala Cys Cys Thr Ala Cys Cys Ala Cys Ala Cys Cys Cys Ala Thr Gly
385 390 395 400

25 Gly Gly Cys Gly Cys Thr Ala Thr Gly Thr Gly Cys Cys Cys Cys Cys
405 410 415

30 Thr Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys Cys Gly Ala Thr Cys Gly Thr
420 425 430

Ala Gly Cys Cys Cys Cys Thr Ala Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly
435 440 445

35 Thr Thr Thr Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Thr Ala Ala Cys Gly Gly
450 455 460

40 Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Cys Thr
465 470 475 480

Thr Ala Cys Ala Cys Ala Ala Ala Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly
485 490 495

45 Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Cys
500 505 510

50 Cys Ala Ala Cys Thr Thr Gly Thr Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Gly
515 520 525

Thr Cys Gly Cys Cys Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly
530 535 540

55 Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala
545 550 555 560

60

65

ES 2 720 288 T3

Thr Thr Cys Cys Ala₅₆₅ Cys Thr Cys Cys Ala₅₇₀ Cys Thr Cys Ala Gly₅₇₅ Gly
 5 Thr Thr Cys Thr₅₈₀ Thr Cys Ala Gly₅₈₅ Cys Cys Ala Gly Ala₅₉₀ Gly Cys
 10 Cys Cys Cys₅₉₅ Thr Gly Cys Ala Cys₆₀₀ Cys Cys Thr Gly₆₀₅ Thr Thr Gly
 Gly Gly Cys Thr Gly Gly Thr₆₁₅ Gly Ala Gly Cys Thr₆₂₀ Gly Gly Gly Ala
 15 Gly Thr Thr Cys Ala Gly₆₃₀ Gly Thr Gly Gly Gly₆₃₅ Cys Thr Gly Cys Thr₆₄₀
 20 Cys Ala Cys Ala Gly₆₄₅ Cys Cys Thr Cys Cys₆₅₀ Thr Thr Cys Ala Gly₆₅₅ Ala
 Gly Gly Cys Cys₆₆₀ Cys Cys Ala Cys Cys₆₆₅ Ala Ala Thr Thr Thr₆₇₀ Cys Thr
 25 Cys Gly Gly₆₇₅ Ala Cys Ala Cys Thr₆₈₀ Thr Cys Thr Cys Ala₆₈₅ Gly Thr Gly
 30 Thr Gly Thr Gly Gly Ala Ala₆₉₅ Gly Cys Thr Cys Ala₇₀₀ Thr Gly Thr Gly
 Gly Gly Cys Cys Cys Cys₇₁₀ Thr Gly Ala Gly₇₁₅ Cys Thr Cys Ala Thr₇₂₀
 35 Gly Cys Cys Thr Gly₇₂₅ Gly Gly Ala Ala Gly₇₃₀ Thr Gly Thr Thr Gly₇₃₅ Thr
 40 Gly Gly Gly Gly₇₄₀ Gly Cys Thr Cys Cys₇₄₅ Cys Ala Gly Gly Ala₇₅₀ Gly Gly
 Ala Cys Thr₇₅₅ Gly Gly Cys Cys Cys₇₆₀ Ala Gly Ala Gly₇₆₅ Ala Gly Cys Cys
 45 Cys Thr₇₇₀ Gly Ala Gly Ala Thr₇₇₅ Ala Gly Cys Gly Gly₇₈₀ Gly Gly Ala Thr
 50 Cys Cys Thr Gly Ala Ala₇₉₀ Cys Thr Gly Gly Ala₇₉₅ Cys Thr Gly Ala Ala₈₀₀
 Thr Ala Ala Ala₈₀₅ Cys Gly Thr Gly Gly₈₁₀ Thr Cys Thr Cys Cys₈₁₅ Cys
 55 Ala Cys Thr Gly₈₂₀

60 <210> 23
 <211> 1132
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 23

ES 2 720 288 T3

	acggccgcta ccacaacccc agccagcaag agcactccat tctcaattcc cagccaccac	60
	tctgatactc ctaccaccct tgccagccat agcaccaaga ctgatgccag tagcactcac	120
5	catagctcgg tacctcctct caccctcctcc aatcacagca cttctcccca gttgtctact	180
	ggggtctctt tctttttcct gtcttttcac atttcaaacc tccagtttaa ttcctctctg	240
	gaagatccca gcaccgacta ctaccaagag ctgcagagag acattttctga aatgtttttg	300
10	cagatttata aacaaggggg ttttctgggc ctctccaata ttaagttcag gccaggatct	360
	gtggtgtgtac aattgactct ggccctccga gaaggtagca tcaatgtcca cgacgtggag	420
	acacagttca atcagtataa aacggaagca gcctctcgat ataacctgac gatctcagac	480
15	gtcagcgtga gtgatgtgcc atttcctttc tctgccagc ctggggctgg ggtgccaggc	540
	tggggcatcg cgctgctggt gctggtctgt gttctgggtg cgctggccat tgtctatctc	600
	attgccttgg ctgtctgtca gtgccgccga aagaactacg ggagcgtgga catctttcca	660
20	gcccgggata cctaccatcc tatgagcgag taccacacct accacacca tgggcgctat	720
	gtgcccccta gcagtaccga tcgtagcccc tatgagaagg tttctgcagg taacggtggc	780
	agcagcctct cttacacaaa cccagcagtg gcagccgctt ctgccaactt gtagggcacg	840
25	tcgccgctga gctgagtggc cagccagtg cattccactc cactcaggtt cttcaggcca	900
	gagcccctgc accctgtttg ggctggtgag ctgggagttc aggtgggctg ctcacagcct	960
	ccttcagagg cccaccaa tttctggaca cttctcagtg tgtggaagct catgtgggcc	1020
30	cctgaggctc atgcctggga agtgttgtgg gggctcccag gaggactggc ccagagagcc	1080
	ctgagatagc ggggatcctg aactggactg aataaacgt ggtctccac tg	1132
35	<210> 24 <211> 717 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 24	
	acaggttctg gtcatgcaag ctctaccca ggtggagaaa aggagacttc ggctacccag	60
	agaagttag tgccagctc tactgagaag aatgctttta attcctctct ggaagatccc	120
	agcaccgact actaccaaga gctgcagaga gacatttctg aaatgttttt gcagatttat	180
45	aaacaagggg gttttctggg cctctccaat attaaagtta ggccaggatc tgtggtggta	240
	caattgactc tggccttcg agaaggtacc atcaatgtcc acgacgtgga gacacagttc	300
	aatcagtata aaacggaagc agcctctcga tataacctga cgatctcaga cgtcagcgtg	360
50	agtgatgtgc catttccttt ctctgccag tctggggctg gggtagcagg ctggggcatc	420
	gcgctgctgg tgctggtctg tgttctggtt gcgctggcca ttgtctatct cattgccttg	480
	gctgtctgtc agtgccgccc aaagaactac gggcagctgg acatctttcc agcccgggat	540
55	acctaccatc ctatgagcga gtacccacc taccacacc atgggcgcta tgtgcccct	600
	agcagtaccg atcgtagccc ctatgagaag gtttctgcag gtaatggtgg cagcagctc	660
60	tcttacacaa acccagcagt ggcagccact tctgccaact tgtaggggca cgtcgcc	717

65

ES 2 720 288 T3

<210> 25
 <211> 2487
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 25

	ctcgaccac gcgccgctc gacccacgcg tccgcacctc ggccccggac accaggccgg	60
10	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	120
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	180
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	240
15	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	300
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	360
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	420
20	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	480
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	540
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	600
25	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	660
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	720
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	780
30	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	840
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	900
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	960
35	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	1020
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	1080
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	1140
40	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac accaggccgg	1200
	ccccgggctc caccgcccc ccagcccacg gtgtcacctc ggccccggac aacaggcccg	1260
	ccttgggctc caccgcccc ccagtccaca atgtcacctc ggcctcaggc tctgcatcag	1320
45	gctcagcttc tactctggtg cacaacggca cctctgccag ggctaccaca accccagcca	1380
	gcaagagcac tccattctca attcccagcc accactctga tactcctacc acccttgcca	1440
	gccatagcac caagactgat gccagtagca ctaccatag ctcggtacct cctctcacct	1500
50	cctccaatca cagcacttct cccagtttgt ctactggggt ctctttcttt ttctgtctt	1560
	ttcacatttc aaacctccag ttttaattcct ctctggaaga tcccagcacc gactactacc	1620
55		
60		
65		

ES 2 720 288 T3

	aagagctgca gagagacatt tctgaaatgt ttttgcagat ttataaaca ggggggttttc	1680
5	tgggcctctc caatattaag ttcaggccag gatctgtggt ggtacaattg actctggcct	1740
	tccgagaagg taccatcaat gtccacgacg tggagacaca gttcaatcag tataaaacgg	1800
	aagcagcctc tcgatataac ctgacgatct cagacgtcag cgtgagtgat gtgccatttc	1860
10	ctttctctgc ccagtctggg gctgggggtgc caggctgggg catcgcgctg ctggtgctgg	1920
	tctgtgttct ggttgcgctg gccattgtct atctcattgc cttggctgtc tgtcagtgcc	1980
	gccgaaagaa ctacgggcag ctggacatct ttccagcccg ggatacctac catcctatga	2040
15	gcgagtaccc cacctaccac acccatgggc gctatgtgcc ccctagcagt accgatcgta	2100
	gcccctatga gaaggtttct gcaggtaacg gtggcagcag cctctcttac acaaaccag	2160
	cagtggcagc cgcttctgcc aacttgtagg gcacgtcgcc gctgagctga gtggccagcc	2220
20	agtgccattc cactccactc aggttcttca ggccagagcc cctgcaccct gtttgggctg	2280
	gtgagctggg agttcagggtg ggctgctcac agcctccttc agaggcccca ccaatttctc	2340
	ggacacttct cagtgtgtgg aagctcatgt gggcccctga ggctcatgcc tgggaagtgt	2400
25	tgtgggggct cccaggagga ctggcccaga gagccctgag atagcgggga tcctgaactg	2460
	gactgaataa aacgtggtct ccactg	2487

30

35

40

45

50

Reivindicaciones

1. Un método *in vitro* para estimular la proliferación o mejorar la proliferación de células madre o células progenitoras mediante la activación del receptor MUC1 en las células, en donde el receptor MUC1 es un producto de escisión que comprende una cola citoplasmática, una porción de transmembrana y un dominio extracelular que se escinde, en donde el dominio extracelular del producto de escisión de MUC1 es la secuencia peptídica definida en la SEQ ID NO:10 y todas las variantes funcionales y fragmentos de estos que tienen cualquier valor entero de adiciones o deleciones de aminoácidos de hasta 20 en su extremo N-terminal y/o C-terminal.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la activación se lleva a cabo mediante el contacto de las células con:
(i) un agente que multimeriza la secuencia peptídica definida en la SEQ ID NO: 10; o
(ii) un ligando que se une a la secuencia peptídica definida en la SEQ ID NO: 10.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el receptor MUC1 es activado por un agente de multimerización del receptor MUC1.
4. El método de acuerdo con reivindicación 3, en donde el agente de multimerización es bivalente.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el agente bivalente:
a) reconoce una porción de la secuencia peptídica definida en la SEQ ID NO: 10;
b) es un compuesto sintético;
c) es un ligando dimérico de MUC1; o
d) es un anticuerpo.
6. El método de acuerdo con reivindicación 2, en donde el agente es un ligando de MUC1, que es NM23.

Figura 1

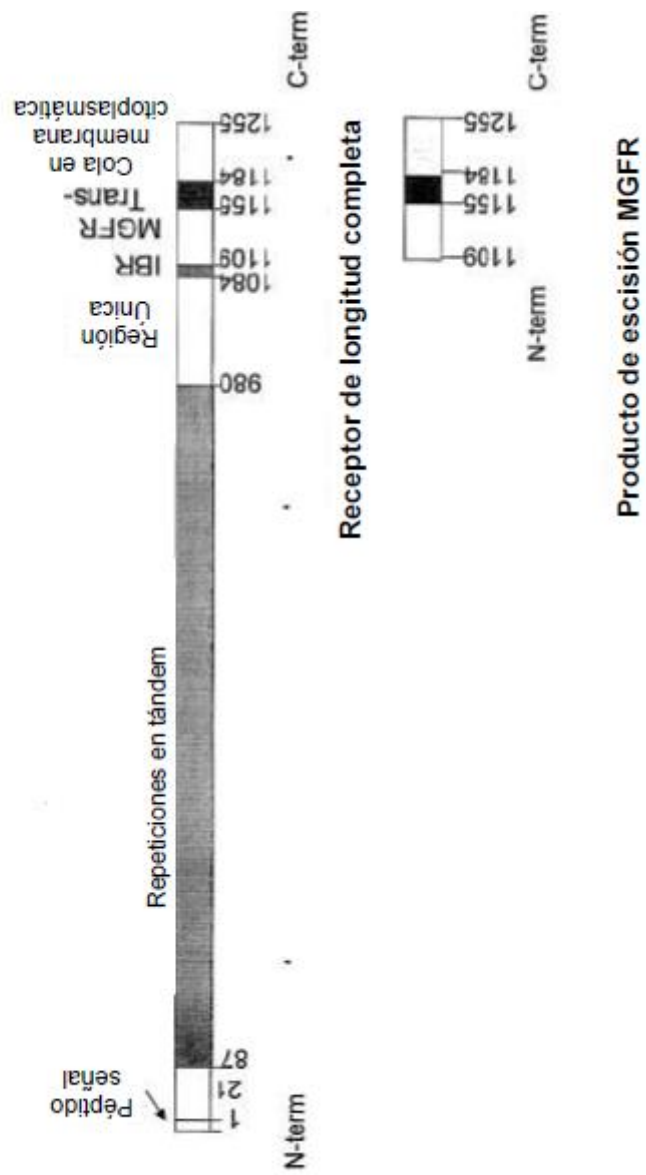


Figura 2

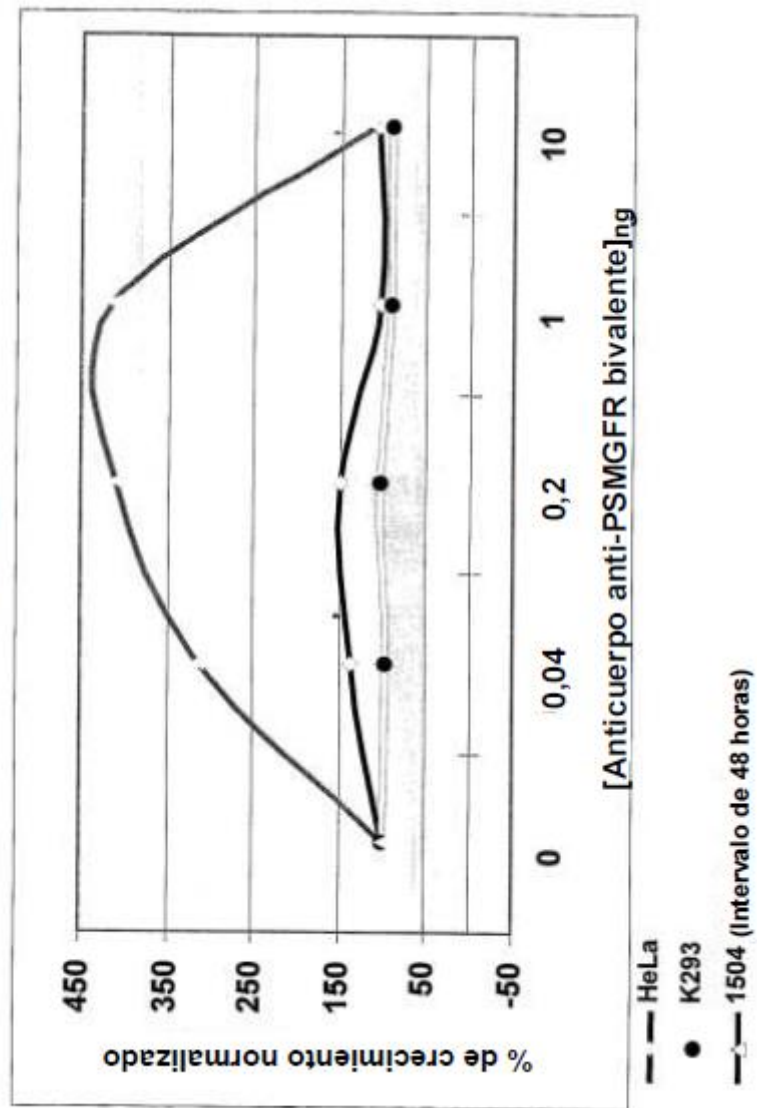


Figura 3

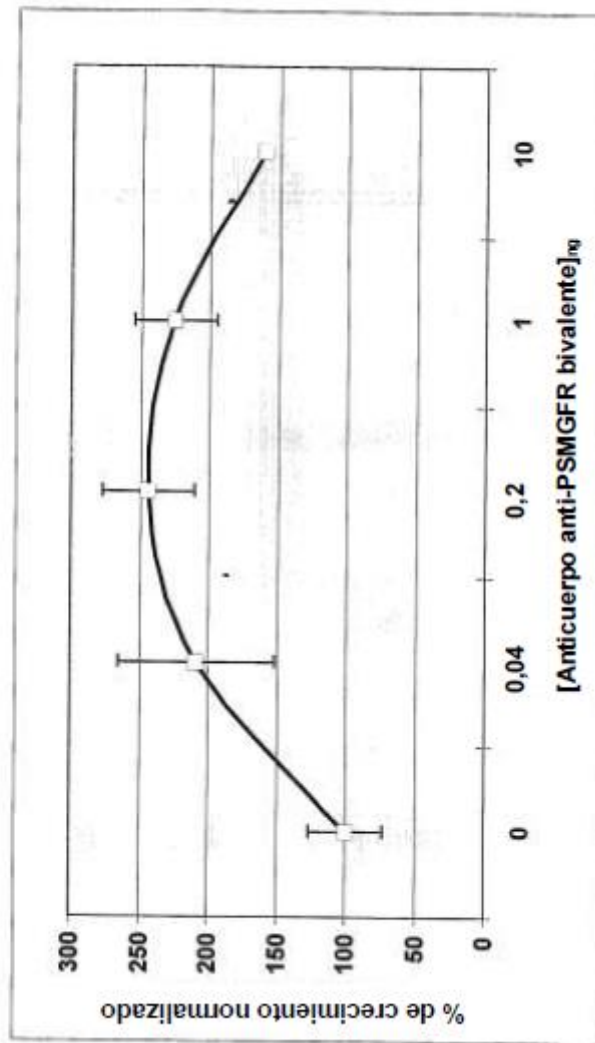


Figura 4

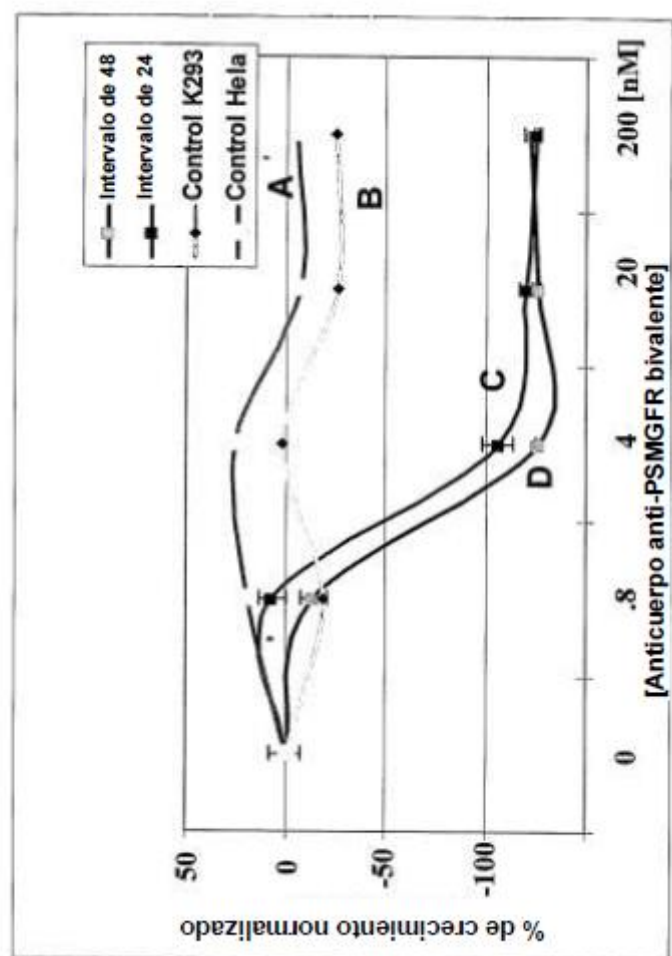


Figura 5

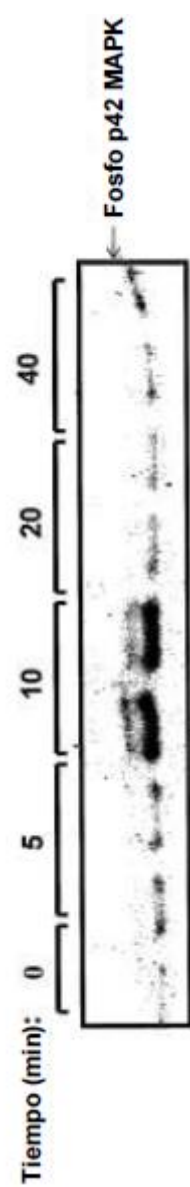


Figura 6

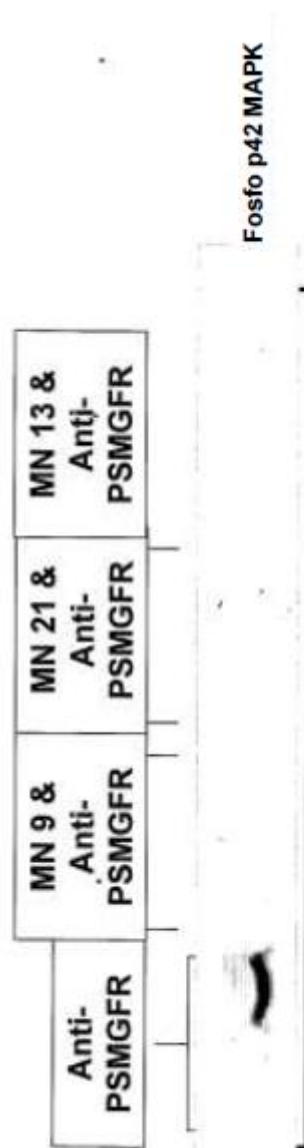


Figura 7

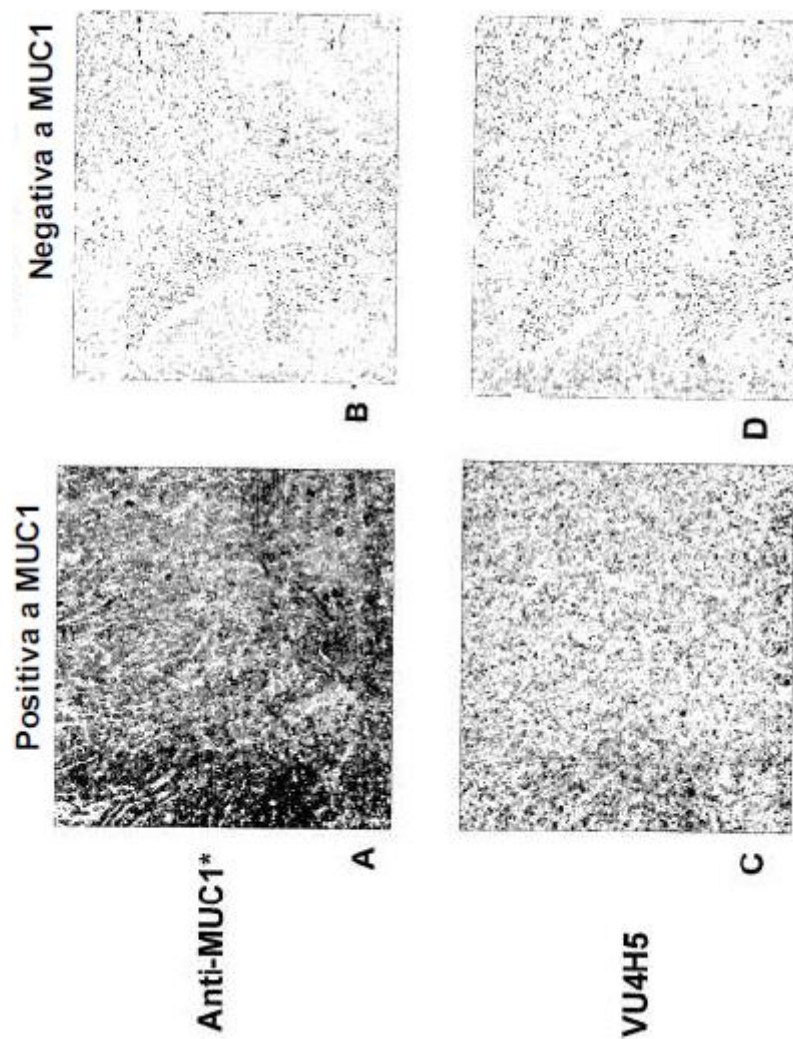


Figura 8



Figura 9

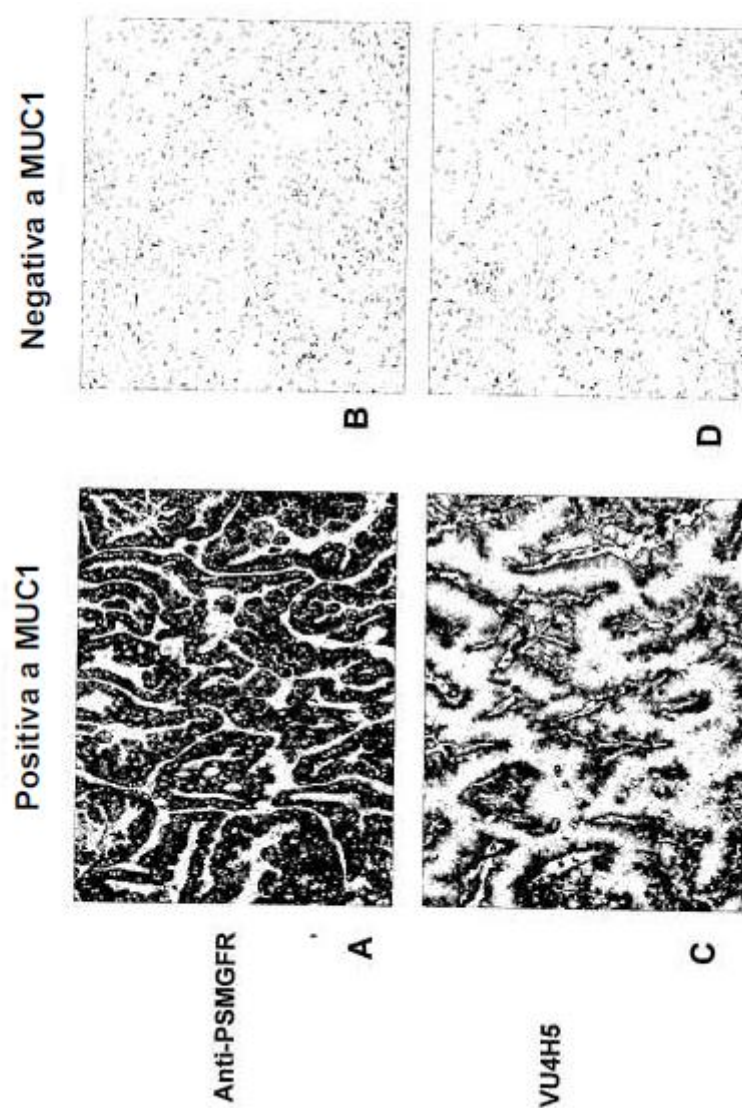


Figura 10



Figura 11

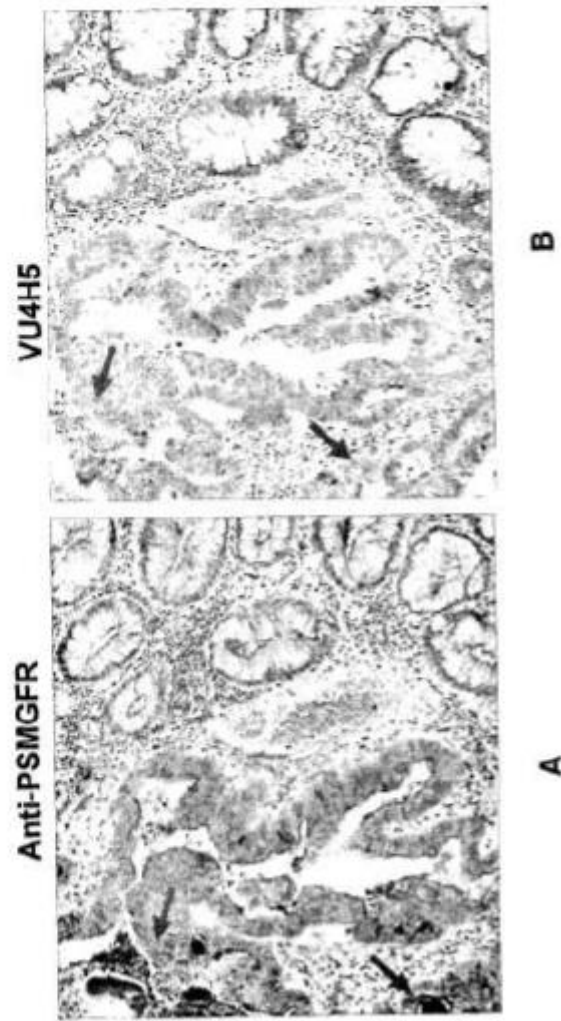


Figure 12

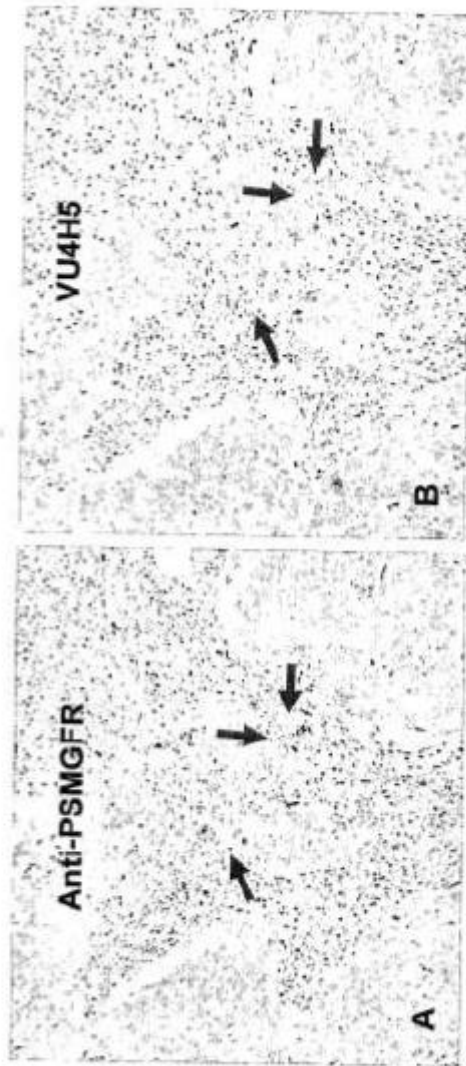


Figura 13

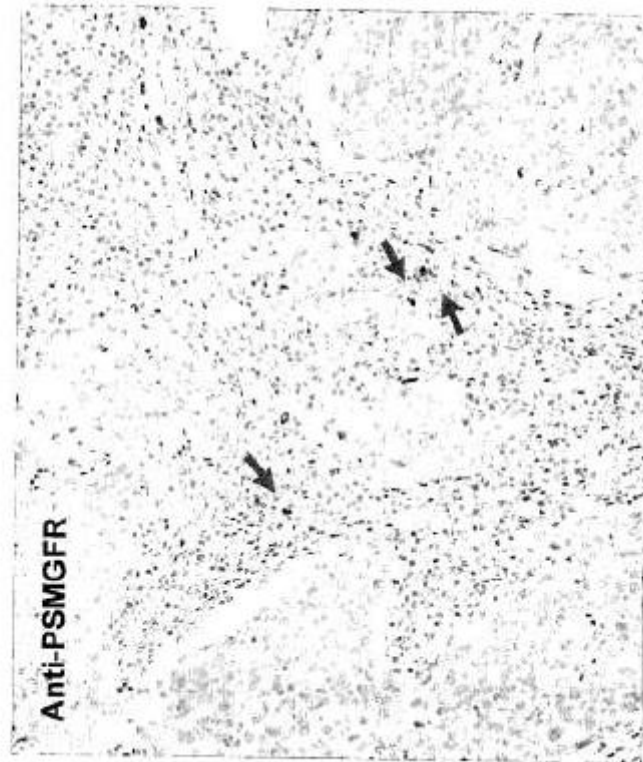


Figura 14

