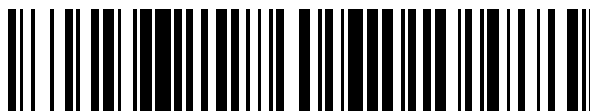


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 259**

51 Int. Cl.:

A61K 8/49 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2014 PCT/EP2014/056233**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154844**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014 E 14715870 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2978402**

54 Título: **Polirribonucleótido estabilizado que codifica una proteína de fibra elástica**

30 Prioridad:

28.03.2013 DE 102013005361

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

08.06.2020

73 Titular/es:

**EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN
MEDIZINISCHE FAKULTÄT (100.0%)
Geschwister-Scholl-Platz
72074 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**WENDEL, HANS-PETER;
KELLER, TIMEA;
NOLTE, ANDREA;
AVCI-ADALI, MELTEM y
WALKER, TOBIAS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 765 259 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

Polirribonucleótido estabilizado que codifica una proteína de fibra elástica

- 5 La presente invención se refiere a un polirribonucleótido, una composición cosmética y farmacéutica que comprende el polirribonucleótido, y un producto médico que comprende el polirribonucleótido o la composición.
- 10 Las fibras elásticas son las estructuras más grandes de la matriz extracelular. Confieren al tejido propiedades elásticas. Las fibras elásticas constan de dos componentes morfológicamente distintos. El primer y mayor componente de la fibra madura es la elastina. El segundo componente son las microfibrillas, que se componen principalmente de fibrilina y están asociadas con otras proteínas, tales como las glucoproteínas asociadas a microfibrillas (MAGP, por sus siglas en inglés), fibulinas y la proteína localizada en la interfase elastina-microfibrillas (EMILIN). En la reticulación de las fibras elásticas está implicada la lisil oxidasa (LOX).
- 15 La elastina y su precursora soluble tropoelastina se cuentan entre las principales proteínas estructurales del cuerpo. La primera da forma y soporte al tejido conjuntivo de la piel y es responsable de la elasticidad de las arterias y los pulmones.
- 20 La elastina está codificada por el gen *ELN*. Las mutaciones en el gen *ELN* pueden originar enfermedades hereditarias tales como dermatocalasia, síndrome de Williams-Beuren y estenosis aórtica congénita subvalvular (SVAS, por sus siglas en inglés).
- Los vasos sanguíneos arterioscleróticos experimentan una pérdida de elastina que no puede ser compensada de manera natural por las células involucradas en la regeneración. Esto se debe a que las células productoras
- 25 de elastina solo sintetizan y secretan nueva elastina hasta una determinada edad y durante el crecimiento del organismo. A continuación, la proteína se reticula en el espacio extracelular consigo mismo y con otras proteínas del tejido conjuntivo. Al ser la elastina particularmente duradera debido a la reticulación, las necesidades del organismo quedan cubiertas una vez que se alcanza la talla corporal definitiva, y la síntesis se detiene en gran medida.
- Debido a la síntesis reducida de elastina, en la vejez se producen relajación de la piel y formación de arrugas. No se encuentran disponibles terapias satisfactorias, y aún menos causales, para una síntesis deficitaria de proteína de fibra elástica, en particular elastina.
- 30 Hirano *et al.* (2007), Functional rescue of elastin insufficiency in mice by the human elastin gene: implications for mouse models of human disease (Rescate funcional de la insuficiencia de elastina en ratones por el gen de la elastina humana: implicaciones para los modelos en ratón de la enfermedad humana), *Circulation Research* 101: 523-531, describen la inserción de elastina humana en oocitos de ratón por medio de un plásmido de ADN.
- 35 Sin embargo, este enfoque no es adecuado para un uso terapéutico en seres humanos.
- El documento WO 2007/024708 se ocupa en general de la estabilización de ARNm y de la reducción de su inmunogenicidad mediante la introducción de nucleótidos modificados. El documento WO 2009/127230 trata del uso de ARNm modificado en los nucleótidos como ingrediente de una composición inmunosupresora. En el documento
- 40 El documento WO 2008/052770 se describe un ARNm modificado en las bases. El documento WO 2011/008904 propone el uso de un ADNc de elastina para el tratamiento cosmético. Xiong *et al.* (2008), *J. Vas. Surg.*, vol. 48, págs. 965-973, describen la expresión de tropoelastina mediada por AV en un modelo de elastasa en ratas para aneurismas aórticos abdominales.
- 45 Con estos antecedentes, es una misión de la presente invención poner a disposición una sustancia con la que se puedan resolver los problemas mencionados al principio. En particular, se debería proporcionar un sustancia de este tipo con la que se pudiera contrarrestar una deficiencia de fibras elásticas o de proteína de fibra elástica y se pudiera estimular la síntesis de fibras elásticas o de proteína de fibra elástica.
- 50 Esta misión se logra poniendo a disposición un polirribonucleótido que codifica una elastina/tropoelastina, que tiene una secuencia nucleotídica que presenta al menos una modificación química que estabiliza el polirribonucleótido,
- en donde al menos aprox. 25% de las uridinas del polirribonucleótido están reemplazadas por pseudouridina y aprox. 25% de las citidinas del polinucleótido están reemplazadas por 5-metilcitidina, para estabilizar el

polirribonucleótido.

5 Los inventores han constatado, sorprendentemente, que se puede contrarrestar causalmente una deficiencia en la síntesis de proteína de fibra elástica si se proporciona a la célula la secuencia codificante en forma directamente traducible. Se puede introducir en las células a regenerar el polirribonucleótido conforme a la invención e inducir *in situ* la síntesis de elastina/tropoelastina. Las células insertan la elastina/tropoelastina sintetizada en la ruta natural del ensamblaje de las fibras elásticas. Con ello no solo se induce la síntesis de elastina/tropoelastina, sino también la neosíntesis de las fibras elásticas. Ni la aplicación de la proteína elástica como tal ni la de otras proteínas que están implicadas en la génesis de fibras elásticas, han podido proporcionar hasta ahora resultados comparables.

10 En el estado de la técnica está ampliamente descrita la estabilización de polirribonucleótidos, por ejemplo de ARNm. Se remitirá a las siguientes publicaciones: US 2009/0093433, WO 2011/012316, WO 2012/135805,

15 WO 2012/045082, WO 2012/019168, WO 2012/045075, WO 2012/158736. Además, la estabilización de ARNm por modificación química de los ribonucleótidos está descrita en las publicaciones de Warren *et al.* (2010), High efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA (Reprogramación con alta eficiencia para la pluripotencia y diferenciación dirigida de células humanas con ARNm modificado sintético), Cell Stem Cell 7, págs. 618 a 630, y de Kormann *et al.* (2011), Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice (Expresión de proteínas terapéuticas tras la administración de ARNm químicamente modificado en ratones), Nature Biotechnology, vol. 29, núm. 2, págs. 154 a 159, Mandai y Rossi (2013), Reprogramming human fibroblast to pluripotency using modified mRNA (Reprogramación de fibroblastos humanos para la pluripotencia utilizando ARNm modificado), Nature Protocols,

20 vol. 8, núm. 3, págs. 568 a 582.

25 También están ampliamente descritos en el estado de la técnica procedimientos para la síntesis de polirribonucleótidos, por ejemplo de ARNm. Uno de los procedimientos adecuados es la transcripción *in vitro* (IVT, por sus siglas en inglés). Al ARNm resultante también se le denomina ARNm de IVT.

Los inventores se han percatado de que se puede compensar de manera selectiva la síntesis de proteína de fibra elástica *in situ*, es decir en la célula, una deficiencia que es consecuencia, por ejemplo, de una mutación o de una interrupción, debida a la edad, de la síntesis natural.

30 Gracias a la modificación química, el polirribonucleótido es lo suficientemente estable como para ser traducido por la maquinaria propia de la célula. Sin embargo, el polirribonucleótido conforme la invención es lo suficientemente inestable como para desarrollar un efecto solo transitorio, de modo que en gran medida se evitan efectos secundarios.

35 Según han podido demostrar los inventores, la respuesta inmunitaria de un organismo tratado con el polinucleótido conforme a la invención es significativamente menor que cuando se utiliza un polirribonucleótido de referencia sin modificar químicamente. Con ello se incrementa adicionalmente la utilidad terapéutica del polirribonucleótido conforme a la invención.

Queda así completamente lograda la misión que sirve de base a la invención.

Conforme a la invención, la proteína de fibra elástica es elastina/tropoelastina.

40 Esta medida presenta la ventaja de que el polirribonucleótido conforme a la invención está configurado para inducir la síntesis *in situ* de una importante proteína de fibra elástica. Preferiblemente, dicha proteína de fibra elástica es la variante humana, de modo que se favorece el uso en seres humanos.

Se prefiere además, conforme a la invención, que el polirribonucleótido sea un ARNm.

45 Esta medida presenta la ventaja de proporcionar el polirribonucleótido en una forma que puede ser utilizada inmediatamente por la maquinaria de síntesis proteica propia de la célula. Se puede tratar en este caso, por ejemplo, de un ARNm transcrito *in vitro* (ARNm de IVT).

50 Se prefiere en particular, conforme a la invención, un ARNm de la elastina humana estabilizado por modificación química, variante de transcripción 1 (ADNc, banco de datos del NCBI NM_000501.2; SEQ ID n.º 2), variante de transcripción 2 (ADNc, banco de datos del NCBI NM_001081752.1; SEQ ID n.º 3), variante de transcripción 3 (ADNc, banco de datos del NCBI NM_001081753.1; SEQ ID n.º 4), variante de transcripción 4 (ADNc, banco de datos del NCBI NM_001081754.1; SEQ ID n.º 5), variante de transcripción 5 (ADNc, banco de datos del NCBI NM_001081755.1; SEQ ID n.º 6).

La al menos una modificación química que estabiliza el polirribonucleótido comprende una uridina y/o citidina modificadas.

- A través de esta medida, los inventores han utilizado el conocimiento descrito, por ejemplo, por Kormann *et al.* (véase más arriba) de que, tras una modificación química de los ribonucleótidos de uridina y/o los ribonucleótidos de citidina, los ARNm de estructuras del sistema inmunitario, tales como los PRR (del inglés "Pattern Recognition Receptors", o receptores de reconocimiento de patrones) que median en la transducción de señal o los receptores tipo "Toll", son reconocidos de manera menos satisfactoria, con lo desencadenan una respuesta inmunitaria significativamente debilitada y alcanzan una semivida más larga.
- 5
- Conforme a la invención, un nucleósido comprende también el nucleótido correspondiente que, como diferencia respecto al nucleósido, tiene además restos fosfato.
- La uridina modificada químicamente conforme a la invención es pseudouridina.
- 10
- La citidina modificada químicamente conforme a la invención es 5-metilcitidina.
- Conforme a la invención, están modificadas al menos 25% de las uridinas y/o citidinas.
- Aunque también pueden modificarse al menos aprox. 50% o aprox. 100% de las uridinas y/o citidinas, los inventores han constatado que una modificación de hasta aprox. 25% de los nucleósidos es suficiente para estabilizar el polirribonucleótido conforme a la invención y reducir la respuesta inmunitaria. Esto presenta la ventaja de que los costes de producir el polirribonucleótido conforme a la invención son significativamente más bajos que en el caso de una modificación al 100%.
- 15
- Según un desarrollo preferido, la modificación química se selecciona del grupo consistente en: estructura de caperuza 5', preferiblemente una caperuza de guanina 5', cola de poli(A), un análogo a estructura de caperuza [ARCA (del inglés "Anti-Reverse Cap Analog", o análogo de caperuza antiinverso); 3'O-Me-m⁷G(5')ppp(5')ppp(5')G)], un refuerzo de la secuencia de inicio de traducción en el codón de inicio AUG, por ejemplo mediante la secuencia (CCCCGC)aucGagAUG.
- 20
- Mediante esta medida se logra de forma ventajosa una estabilización adicional del polirribonucleótido conforme a la invención.
- Según un desarrollo preferido, el polirribonucleótido conforme a la invención tiene la secuencia SEQ ID n.º 1, en la que al menos aprox. 25% de las uridinas y/o en la que al menos aprox. 25% de las citidinas están modificadas químicamente.
- 25
- Según se ha mencionado más arriba, ciertamente también pueden estar modificados al menos aprox. 50% o al menos aprox. 100% de los nucleósidos, pero es suficiente una modificación de aprox. 25%.
- La definición dada más arriba para "modificado químicamente" es aplicable aquí de manera análoga. Se realiza preferiblemente un intercambio de uridina (U) por pseudouridina o por trifosfato de pseudouridina (ΨUTP) y/o de citidina (C) por 5-metilcitidina o por trifosfato de 5-metilcitidina (mCTP).
- 30
- El polirribonucleótido conforme a la invención codifica preferiblemente una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo consistente en: SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 9, SEQ ID n.º 10 y SEQ ID n.º 11.
- 35
- Esta medida presenta la ventaja de que el polinucleótido conforme a la invención para una de las distintas isoformas de la elastina (SEQ ID n.º 7: isoforma a, banco de datos del NCBI NP_00049.2; SEQ ID n.º 8: isoforma b, banco de datos del NCBI NP_001075221.1; SEQ ID n.º 9: isoforma c, banco de datos del NCBI NP_001075222.1; SEQ ID
- 40
- n.º 10: isoforma d, banco de datos del NCBI NP_001075223.1; SEQ ID n.º 11: isoforma e, banco de datos del NCBI NP_001075224.1). Las isoformas de elastina presentan el efecto conocido conforme la invención.
- Conforme a la invención, se prefiere que el polirribonucleótido se diseñe para inducir la síntesis de proteínas de fibra elástica, particularmente en la pérdida de elasticidad cutánea relacionada con la edad (formación de arrugas), estimular la cicatrización de heridas, para tratar una síntesis deficitaria de proteína de fibra elástica o para tratar una enfermedad seleccionada del grupo consistente en: arteriosclerosis, estenosis aórtica, aneurisma aórtico, enfisema pulmonar, dermatocalasia, síndrome de Williams-Beuren, estenosis aórtica congénita subvalvular (SVAS).
- 45
- Con el polirribonucleótido conforme a la invención se puede tratar, además, el tejido vaginal, por ejemplo a consecuencia de un embarazo, para estimular la síntesis de elastina y recuperar la elasticidad.
- Además, el polirribonucleótido conforme a la invención puede diseñarse para aplicaciones dentales, por ejemplo para la reconstrucción y/o regeneración de tejidos blandos y duros del periodonto. Por lo tanto, el polirribonucleótido conforme a la invención está previsto o diseñado preferiblemente para la aplicación transdérmica.
- 50

Estas medidas presentan la ventaja de que el polirribonucleótido conforme a la invención está diseñado para tratar enfermedades y síntomas importantes que pueden originarse como resultado de una síntesis reducida de proteína de fibra elástica.

5 En consecuencia, en la presente memoria se describe también el uso del polirribonucleótido conforme a la invención para los fines antes mencionados.

Además, la invención puede emplearse en un procedimiento para inducir la síntesis de proteínas de fibra elástica,

10 en particular para los fines antes mencionados, que comprende los siguientes pasos: (1) proporcionar el polirribonucleótido conforme a la invención, eventualmente en una formulación farmacéuticamente aceptable o cosméticamente aceptable y (2) administrar el polirribonucleótido al interior o al exterior de un organismo.

La administración del polirribonucleótido al interior o al exterior de un organismo se puede realizar mediante una aplicación tópica, por ejemplo sobre la piel del organismo, preferiblemente la piel humana. Para ello, el polinucleótido puede ser parte de una forma farmacéutica dermatológica tal como una crema, loción, pomada, etc. No obstante,

15 la administración también se puede efectuar por vía sistémica, oral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal, subcutánea, intraperitoneal, intracardiaca, intravítrea o intraósea, etc., mediante formas farmacéuticas adecuadas.

20 La administración transdérmica del polinucleótido conforme a la invención se puede realizar por medio de microagujas, nanoparches, nanopartículas o por medio de un cañón génico. Son adecuados, además, sistemas activos que se valen de la iontoforesis. En esta técnica se hace pasar a través de la piel una corriente eléctrica muy pequeña, que transporta las moléculas cargadas. Un ejemplo de esto es el sistema de iontoforesis LTS-TTS de la empresa LTS Lohmann Therapie-Systeme AG, de Andernach, Alemania.

25 Con estos antecedentes, la presente invención se refiere también a una composición que comprende el polirribonucleótido conforme a la invención. La composición según la invención puede ser una composición cosmética y/o farmacéutica que tenga una formulación cosméticamente aceptable o farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones cosmética y farmacéuticamente aceptables son conocidas en general en el estado de la técnica. Están descritas, por ejemplo, en el tratado de Kibbe *et al.*, *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Manual de excipientes farmacéuticos), 5ª edición (2006), *American Pharmaceutical Association*. Las composiciones pueden estar diseñadas en forma de preparado único que contiene el polirribonucleótido
30 según la invención como única sustancia activa. No obstante, también pueden contener aditivos y, eventualmente, otras sustancias activas y auxiliares que son ventajosas para los usos según la invención, entre las que se cuentan agentes de transfección tales como liposomas, hidrogeles, polímeros catiónicos o péptidos, sales, agentes aglutinantes, disolventes, dispersantes y otras sustancias comúnmente utilizadas en relación con la formulación de productos cosméticos y de medicamentos.

35 Según un desarrollo preferido conforme a la invención, la composición puede comprender adicionalmente un inmunosupresor, preferiblemente un inhibidor de interferón.

40 Esta medida presenta la ventaja de que se reduce aún más la respuesta inmunitaria de un anfitrión tratado con el polirribonucleótido conforme a la invención, ya reducida por la modificación química. La represión de la respuesta inmunitaria tras la administración de un ARNm terapéutico mediante el uso del inhibidor de interferón B18R, que es adecuado para ser usado conforme a la invención, está documentada en el estado de la técnica, por ejemplo en *Warren et al.* (véase más arriba).

45 Otro objeto de la presente invención se refiere a un producto médico, por ejemplo un parche o implante, que comprende el polirribonucleótido conforme a la invención o la composición conforme a la invención o bien está revestido con estos. El implante puede ser un implante médico, preferiblemente un *stent*, incluido un *stent* coronario, o un implante vascular, un injerto con *stent* o un implante óseo.

Mediante el implante se pueden tratar específicamente vasos sanguíneos arterioscleróticos y/o zonas de tejido local, tales como el tejido vaginal, los tejidos blandos y duros del periodonto, para recuperar la elasticidad.

50 Otro objeto de la presente invención se refiere a un apósito para heridas, que está revestido con el polirribonucleótido conforme a la invención.

Un apósito para heridas semejante puede, al inducir la síntesis de elastina, reducir la formación de cicatrices y mantener la elasticidad del tejido cicatricial.

Se explicará ahora con más detalle la presente invención por medio de ejemplos de realización, de los cuales se desprenden otras propiedades y ventajas de la invención. Los ejemplos son puramente ilustrativos y no

limitan el alcance de la invención. Se hará referencia en ellos a las figuras adjuntas. Estas muestran:

- 5
Figura 1: Mediante PCR específica para ELN se verificaron en cuanto al inserto preparaciones de plásmido procedentes de cuatro colonias bacterianas individuales seleccionadas. Detección de los productos de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa, 1,2% (120 V, 30 min). Ciclos de PCR: desnaturalización: 3 min, 94 °C; 1: 40 s, 94 °C - 2: 1 min, 58 °C - 3: 2,5 min, 72 °C; amplificación final: 7 min, 72 °C;
- 10
Figura 2: Se determinaron enzimas de restricción de corte inequívoco mediante digestión de prueba del plásmido y posterior análisis en gel de agarosa al 1% (120 V, 40 min). Bandas: 1: marcador/escala de ADN, 2-5: digestión de prueba del plásmido con distintas enzimas de restricción de corte "aguas abajo" (3'): 2: Not I, 3: Xba I, 4: Bfa I, 5: Xho I, 6: digestión con enzima de corte "aguas arriba" (5'), EcoRI, 7-10: se combinaron enzimas de corte aguas abajo con EcoRI (doble digestión), secuencia igual que en 2-5. kb = kilobases;
- 15
Figura 3: ARNm de ELN sintetizado *in vitro*, en electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% (formaldehído al 16%, 100 V, 45 min). 1: reacción IVT después de 3 h de incubación; 2: reacción IVT con mezcla de poliadenilación e incubación de 25 minutos; 3; lo mismo que 2, después de 45 min; 4: marcadores; 5-6: ARNm de ELN purificados, poliadenilados; 5, 6: con el kit Ambion MEGAclear (número de catálogo AM1908); 7: con el kit Qiagen RNeasy Midi, cantidad doble de ARN (número de catálogo: 75142);
- 20
Figura 4: Detección de la expresión de gen informador: detección de la expresión de luciferasa después de transfección de ARNm de luciferasa, de IVT, en EA.hy926. h. d. t. = horas después de la transfección; d. d. t. = días después de la transfección;
- 25
Figura 5: Proteína ELN sintetizada *in vitro* sobre la base de cuatro diferentes ARNm de ELN sintetizados *in vitro* y testigos: 1, 2: marcadores; 3-6; síntesis proteica con ARNm de ELN procedente de diversas reacciones de transcripción *in vitro* (5: ARNm con nucleótidos modificados); 7: reacción de traducción *in vitro* sin ARNm (testigo negativo); 8: igual que 7, pero con adición de proteína de elastina soluble humana de Calbiochem (número de catálogo: 324751) después del período de incubación; 9: solamente la proteína de elastina de Calbiochem disuelta en agua –según la ficha técnica, la proteína debe correr como una banda de frotis entre 5 y 60 kDa. La proteína de elastina nativa se detecta por medio del anticuerpo utilizado a una altura de aprox. 50 kDa.
- 30
Figura 6: Detección de la expresión de elastina a través de la medición de la cantidad de tropoelastina en células EA.hy926 después de la transfección en tres días consecutivos con ARNm para ELN, de IVT; este contenía diversas proporciones de ácidos nucleicos modificados (mCTP/ΨUTP) y Lipofectamine 2000. Sirvieron como testigos negativos ARN o Lipofectamine 2000 solos.
- 35
Figura 7: Detección de la expresión de elastina en el sobrenadante de las células EA.hy926 después de la transfección con ARNm para ELN, de IVT, con 100% de modificación (mCTP/ΨUTP) mediante ensayos de transferencia de puntos; M: solamente medio de cultivo celular, M + L: medio de cultivo celular más reactivo de transfección.
- 40
Figura 8: Inmunoactivación de células EA.hy926 después de la transfección con ARNm para ELN, de IVT; las expresiones se normalizaron con respecto al gen constitutivo GAPDH. Los testigos negativos se fijaron en 1.
- 45
Figura 9: Detección de la expresión de gen informador: imágenes microscópicas de vasos "con *stent*", centrándose el foco en la frontera entre *stent* y tejido. A, B: testigos negativos (*stents* no revestidos). C-E: *stents* revestidos con ARNm de eGFP. La ampliación de las imágenes corresponde a un campo de 30 x 30 μm. Ilustraciones superiores: imágenes originales. Ilustraciones inferiores: imágenes con FIDSAM y corrección de contraste.
- Figura 10: Detección de la expresión de luciferasa en piel porcina después de la transfección con ARNm de luciferasa

Ejemplos de realización

- 50 1. Constructos de plásmido para la síntesis de ARN

Se obtuvo de Thermo Scientific un plásmido que codificaba elastina, variante 1 de transcripción (SEQ ID n.º

2) y que contenía un promotor Sp6, pCMV-Sp6_ELN, clonado en *E. coli*.

El plásmido que codificaba luciferasa y que contenía promotor T7, pCMV-GLuc-1, que se utilizó como gen informador, se obtuvo de Nanolight Technology, Inc. y se clonó en *E. coli* competentes para EZ de Qiagen, procedentes del kit de clonación PCT de Qiagen.

5 Los plásmidos contenían sitios para la secuenciación con cebadores tales como, por ejemplo, los cebadores M13 directo e inverso, y regiones promotoras para polimerasas, tales como la Sp6 y la T7. Estas secuencias se pueden encontrar en dirección 5' o 3' con respecto a la secuencia de interés insertada. Además, la región de inserción está flanqueada por cortas secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción específicas.

10 2. Verificación de los insertos de plásmido

Los plásmidos se aislaron con el kit Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen).

Se construyeron cebadores específicos de inserto con un DesignTool (herramienta de diseño) del NCBI para cebadores libres, y fueron preparados por Eurofins MWG Operon. Se verificaron los insertos de plásmido por medio de PCR con pares de cebadores específicos de inserto (Figura 1) utilizando los siguientes parámetros de ciclo: desnaturalización: 3 min a 94 °C; 1: 40 s a 94 °C; 2: 1 min a 58 °C; 3: 2,5 min a 72 °C; repetición de los pasos 1-3, 28x; amplificación final: 7 min, 72 °C.

Además, los insertos de plásmido fueron totalmente secuenciados por la empresa GATC Biotech con cebadores de diseño propio, específicos de inserto, y con cebadores M13 hacia adelante y hacia atrás. El ensamblaje de la secuencia se realizó con el programa DNABaser.

20 3. Síntesis *in vitro* de ARNm de ELN con distintas proporciones de ácidos nucleicos modificados

Para la transcripción *in vitro* (IVT), se linealizaron los plásmidos aguas abajo del gen de interés con el sistema de enzimas FastDigest (Fermentas/Thermo Scientific) y se purificaron con el kit de purificación MinElute PCR (Qiagen). Se efectuaron digestiones de prueba antes del experimento (Figura 2).

25 La transcripción *in vitro* se realizó con el kit MEGAscript Sp6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada reacción IVT de 40 µL se utilizó 1 µg de plantilla linealizada. Para optimizar la estabilidad y la citocompatibilidad de los ARNm de IVT, en las reacciones se combinaron distintas proporciones de los trifosfatos de ácido nucleico 5-metilcitosina y pseudouridina (TriLink Biotechnologies) con nucleótidos estándar del kit.

30 Tabla 1: Mezclas de nucleótidos en las reacciones IVT con distintas proporciones de 5-metilcitosina y pseudouridina

	CTP	5-Metilcitosina	UTP	Pseudouridina
25% de modificación	5,25 mM	1,75 mM	5,25 mM	1,75 mM
50% de modificación	3,5 mM	3,5 mM	3,5 mM	3,5 mM
100% de modificación	–	7 mM	–	7 mM

En cada reacción IVT se utilizaron ATP 6 mM, GTP 3 mM (del kit) y 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G (análogo de caperuza antiinverso de New England Biolabs) 2 mM. Se añadieron otros componentes como se indica en las instrucciones para el kit.

35 Las reacciones se incubaron durante 3,5 horas a 37 °C y se trataron con DNasa I del kit al final del período de incubación para eliminar el ADN plantilla, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La poliadenilación se efectuó con el kit de adición de cola PolyA (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 El ARNm se purificó con el kit RNeasy Mini (Qiagen). La detección del ARNm de elastina se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante (Figura 3). Las concentraciones de los ARNm se determinaron con un aparato BioPhotometer 6131 (Eppendorf).

4. Traducción *in vitro* de ARNm transcritos *in vitro*

45 La calidad del ARNm transcrito *in vitro* se determinó indirectamente mediante traducción *in vitro* con el kit de lisado de reticulocitos Retic Lysate Kit (Ambion) después de la medición de luminiscencia, en cuanto a luciferasa, o el análisis por tinción Western, en cuanto a elastina. Las reacciones de traducción *in vitro* se

llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5. Líneas celulares y agentes químicos para la transfección de ARNm de IVT

5 Para los primeros experimentos se utilizaron las líneas celulares de carcinoma de pulmón A549 y SK-MES. Se utilizó la línea celular EA-hy926 de hibridoma de células endoteliales con A549 para establecer métodos de transfección eficaces para células y tejidos endoteliales.

10 Todas las transfecciones con ARNm se realizaron utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen/Life Technologies). Como medio para las transfecciones se utilizó Opti-MEM (Gibco/Life Technologies). Los testigos negativos para todos los experimentos fueron Opti-MEM con las mismas cantidades de Lipofectamine 2000 que se habían utilizado para las transfecciones con ARNm, o ARNm sin reactivo de transfección en Opti-MEM.

6. Transfección de ARNm de IVT en cultivo celular

Para las transfecciones con ARNm de elastina, un día antes de los experimentos se extendieron en placas las células, a una densidad de 500.000 células por pocillo, en placas de 6 pocillos.

15 La transfección se realizó con 5 o 10 µg de ARNm de elastina y 3,3 µL de reactivo de transfección por pocillo, diluidos en Opti-MEM, basándose en las indicaciones del fabricante.

Se añadió a las células el medio con los complejos de transfección de ARNm y se incubaron las placas durante

20 4 horas en condiciones de cultivo celular. Posteriormente se reemplazó una fracción de 2/3 de la mezcla de transfección por medio de cultivo celular fresco y se incubaron las células durante la noche. Este procedimiento de transfección se repitió durante los 2 días siguientes. Al tercer día, se reemplazaron totalmente los complejos de transfección por cultivo celular fresco.

Se analizaron el medio y las células un día después de la última transfección.

7. Expresión del gen informador de luciferasa *in vitro*

25 La primera determinación de la expresión de luciferasa se efectuó 5 horas después de la transfección, y luego cada día, hasta que la expresión decreció. Para medir la luminiscencia, que representa la expresión de luciferasa, se tomaron de cada pocillo 20 µL de medio transcurridas 6/24/48/72 horas y 5/10/25 días después de la transfección, reemplazándose el medio después de cada toma de muestra.

8. Medición de la actividad de luciferasa

30 Se midió directamente la actividad de la enzima luciferasa después de la traducción *in vitro* o bien al cabo de un período de 5 horas a 30 días después de la transfección de ARNm de IVT en las células, añadiendo a 20 µL de medio celular procedente de las células transfectadas, o bien a la reacción de traducción *in vitro*, 100 µL de sustrato celenteracina 2,5 ng/µL. Se midió en un aparato lector de microplacas (Mithras LB 940, Berthold Technologies) la luminiscencia resultante de las muestras. La Figura 4 muestra la luminiscencia medida en el medio de las células EA.hy926 transfectadas con ARNm de IVT, que refleja la expresión de la luciferasa.

35

40 Los resultados muestran que incluso una pequeña cantidad de 200 ng de ARNm para luciferasa, de IVT, puede inducir una clara expresión de luciferasa incluso después de un corto tiempo de incubación de 5 horas. Se puede lograr una mayor expresión con 1 µg de ARNm de IVT hasta 24 horas después de la transfección, pero el curso de expresión posterior ya no se diferencia del de las muestras con menor cantidad de ARNm de IVT. Tampoco un aumento adicional hasta 2 µg en la cantidad de ARNm de IVT transfectado conduce a una expresión acrecentada.

9. Detección de (tropo)elastina mediante tinción Western

45 Se separaron sobre SDS-PAGE al 8% las proteínas de las reacciones de traducción *in vitro* y se transfirieron para su inmunodetección a una membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo primario era un anticuerpo policlonal contra ELN (región central), de conejo, de Abgent, y el anticuerpo secundario era una IgG anticonejo (molécula entera), de cabra, conjugada con fosfatasa alcalina, de Sigma-Aldrich. La proteína elastina se visualizó por precipitación del colorante añil resultante de la reacción NBT/BCIP con fosfatasa alcalina (Figura 5).

50 La detección de elastina después de la traducción *in vitro* que se realizó basada en ARNm para elastina, de IVT, confirma la integridad del ARNm conforme a la invención. Se deduce de ello que solo puede producirse una detección de proteína si la proteína sintetizada coincide con las estructuras contra las cuales se ha desarrollado el anticuerpo. Por lo tanto, el ARNm conforme a la invención también debe haber estado

presente por completo e intacto para la síntesis de proteínas. Aunque evidentemente se da una detección inespecífica de proteínas que están presentes en la mezcla de traducción *in vitro*, la especificidad de la banda de elastina es inequívoca, ya que no se encuentra en el testigo negativo que contiene solamente la mezcla de traducción *in vitro* sin ARNm de IVT.

5 10. Detección de la expresión de tropoelastina en el cultivo celular

Se analizó la expresión de elastina con el ensayo para elastina Fastin™ (Bicolor life science assays) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La Figura 6 muestra la cantidad de tropoelastina aislada 24 horas después de la última transfección con ARNm de elastina, de IVT, que contenía diversas proporciones de ácidos nucleicos modificados.

- 10 Después de la transfección triple de ARNm de elastina, de IVT, se pudo detectar en las células una clara expresión de tropoelastina, es decir, de elastina soluble no reticulada. Queda claro que una cantidad particularmente grande, 10 µg de ARNm de ELN, de IVT, transfectado, no presenta ningún efecto creciente sobre la expresión de elastina si se compara con solamente 5 µg. La mayor proporción de nucleótidos modificados no tiene tampoco ninguna influencia positiva sobre la expresión. Por lo tanto, parece que 5 µg de ARNm de ELN, de IVT, con 25% de CTP/UTP modificados, pueden producir una expresión suficiente y detectable de elastina.

- 15 En otro experimento, se sembraron 3 x 10⁵ células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente se aspiraron los sobrenadantes y se lavaron las células con 1 ml de PBS. Esto fue seguido por una incubación durante 4 horas con Opti-MEM (M), Opti-MEM con Lipofectamine 2000 (M + L) y Opti-MEM con Lipofectamine 2000 y 2,5 µg de ARNm de elastina (100% de 5mCTP/ΨUTP). Se combinaron los sobrenadantes celulares después de 24 y

- 20 48 horas. Se analizaron mediante por transferencia de puntos los sobrenadantes. En la Figura 7 se representa el resultado. La detección de elastina se efectuó mediante AK específica para elastina. Las células con incubación de ARNm de elastina (M + L + ARNm de elastina) mostraron una tinción significativamente más intensa que las células sin transfección de ARNm (M, M + L). Sin ARNm de elastina, las células EA.hy926 sintetizan cantidades pequeñas de elastina, pero con la transfección de ARNm de elastina se intensifica significativamente la síntesis de elastina.

25 11. Evaluación de la inmunogenicidad de los ARNm de IVT

- 30 Las transfecciones para el análisis de citocinas y otros marcadores de la activación inmunitaria se realizaron de manera análoga a las transfecciones de ARNm descritas en lo que antecede. Se transfectó además el inmunoestimulante poliiosina/poli(ácido citidílico) (Sigma-Aldrich) a razón de 100 ng/pocillo como testigo positivo para la activación de citocinas. Se incubaron las células con la mezcla de transfección en condiciones de cultivo celular y se reemplazó el medio al cabo de 3 horas.

- 35 Al día siguiente se lisaron las células y se extrajo el ARN con el mini-kit para ARN total Aurum (Biorad). Se midió la concentración de ARN y de cada muestra se utilizaron 40 ng para la síntesis de ADNc con el kit de síntesis de ADNc iScript (Biorad). Se diluyó el ADNc generado y se utilizó en reacciones de PCR cuantitativas en tiempo real (qRT) con la iQ SYBR Green Supermix (Biorad), en preparaciones por triplicado para cada muestra, junto con un par de cebadores específico para IFNα, IFN-γ, IL-1B, IL-12, IL-6, IL-8, TNF-α y un par de cebadores específico para GAPDH. Para cuantificar los niveles de expresión del marcador inmunitario, se realizó una qRT-PCR en el kit de detección de PCR en tiempo real CFX Connect (Biorad) en placas de 96 pocillos (Biorad) (Figura 8). Los resultados muestran que el ARNm de elastina sintetizado *in vitro* provoca en este ensayo altamente sensible muy poca activación de citocinas.

40 12. Revestimiento de *stents* coronarios con ARNm de eGFP

- 45 En otro experimento se examinó la expresión *in vivo* de eGFP a través de ARNm de IVT, con el que se habían revestido *stents* coronarios. La síntesis *in vitro* del ARNm de eGFP se realizó con el constructo de plásmido pcDNA3.3_eGFP, como se describe en Warren *et al.* (véase más arriba). El plásmido fue proporcionado por los autores a través de Addgene (Cambridge, MA, EE. UU.).

- 50 Se revistieron por inmersión *stents* coronarios BMS de 3 x 20 mm, de Qualimed (Winsen, Alemania), concretamente en una emulsión que contenía 70 µg de ARNm de eGFP, de IVT, complejo con 20 µL de Lipofectamine 2000, en agua libre de nucleasas, y 150 µg de polilactida-co-glicolida RESOMER® RG 502 H (Sigma Aldrich), disueltos en acetato de etilo.

- 55 El estudio se realizó de conformidad con la Ley de Bienestar Animal de Alemania y las recomendaciones sobre la tenencia y uso de animales de laboratorio postuladas por la FELASA (Federación de Asociaciones Europeas para las Ciencias del Animal de Laboratorio). Todos los protocolos y procedimientos fueron aprobados por la Comisión de bienestar animal de la Universidad de Tubinga.

Para este estudio se utilizaron y se incluyeron en el análisis dos cerdos hembra de aproximadamente 65 kg (raza local alemana) de una instalación de cría local "libre de patógenos específicos" (SPF, por sus siglas en inglés). Después de llegar a las instalaciones para animales de la Universidad de Tubinga, los animales pudieron adaptarse durante una semana antes de que comenzara la intervención. Durante este tiempo, se realizaron estudios clínicos para garantizar el estado de salud, particularmente con respecto al sistema cardiovascular.

Se implantaron los *stents* mediante un catéter con balón (de 3 mm) en las arterias coronarias izquierda y derecha de cada cerdo y se expandieron. La ubicación de los *stents* se visualizó con ayuda de un aparato de rayos X (de tipo "arco en C") y material radiopaco. Se efectuó deliberadamente una sobredilatación de las arterias. Tras la implantación, los animales recibieron heparina y clopidogrel para evitar trombosis postoperatorias.

Se sacrificaron los cerdos 44 horas después de la implantación de los *stents* revestidos. Se aislaron los vasos "con *stent*" y se fijaron durante una noche en formaldehído al 4%.

Para el análisis de fluorescencia, se incluyeron los *stents* en el sistema de inclusión basado en metacrilato de metilo Technovit® 9100 de HeraeusKulzer (Wehrheim, Alemania), y se analizaron mediante FIDSAM (siglas inglesas de Microscopía de análisis de la forma de decaimiento de la intensidad de fluorescencia) en el Instituto de Química Analítica de la Universidad de Tubinga.

En la Figura 9 se muestra el resultado. Se representa allí la parte del tejido fluorescente que es visible después de la sustracción de la autofluorescencia. Esta fluorescencia se basa exclusivamente en la expresión inducida de eGFP y, por lo tanto, constituye una evidencia de la captación y traducción eficiente del ARNm de IVT que codifica eGFP, por las células que rodean el material del *stent*.

13. Modelo de piel porcina

Se estableció un modelo de piel porcina para demostrar la síntesis de elastina inducida por ARNm en la piel. En los primeros experimentos se inyectaron en la piel 2,5 µg de complejos de ARNm de luciferasa y Lipofectamine 2000.

Al cabo de 24 h se trituró la piel y se lisaron las células para aislar la luciferasa. En la Figura 10 se muestra el resultado. Mediante el ensayo de luciferasa se demostró la transfección con éxito de las células con ARNm de luciferasa.

Secuencias

- 30 SEQ ID n.º 1: Secuencia nucleotídica del ARNm de elastina, de IVT (tal como se usa en los ejemplos de realización)
- SEQ ID n.º 2: Secuencia nucleotídica del ADNc derivado del ARNm de la elastina humana, variante de transcripción 1 (NM_000501.2)
- 35 SEQ ID n.º 3: Secuencia nucleotídica del ADNc derivado del ARNm de la elastina humana, variante de transcripción 2 (NM_001081752.1)
- SEQ ID n.º 4: Secuencia nucleotídica del ADNc derivado del ARNm de la elastina humana, variante de transcripción 3 (NM_001081753.1)
- SEQ ID n.º 5: Secuencia nucleotídica del ADNc derivado del ARNm de la elastina humana, variante de transcripción 4 (NM_001081754.1)
- 40 SEQ ID n.º 6: Secuencia nucleotídica del ADNc derivado del ARNm de la elastina humana, variante de transcripción 5 (NM_001081755.1)
- SEQ ID n.º 7: Secuencia de aminoácidos de la isoforma a de elastina [Homo sapiens] (NP_00049.2)
- SEQ ID n.º 8: Secuencia de aminoácidos de la isoforma b de elastina [Homo sapiens] (NP_001075221.1)
- SEQ ID n.º 9: Secuencia de aminoácidos de la isoforma c de elastina [Homo sapiens] (NP_001075222.1)
- 45 SEQ ID n.º 10: Secuencia de aminoácidos de la isoforma d de elastina [Homo sapiens] (NP_001075223.1)
- SEQ ID n.º 11: Secuencia de aminoácidos de la isoforma e de elastina [Homo sapiens] (NP_001075224.1)

Listado de Secuencias

<110> Eberhard-Karls-University Tübingen, Facultad de Medicina

ES 2 765 259 T3

<120> Polirribonucleótido estabilizado que codifica una proteína de fibra elástica

<130> Documento WO 5402P503

5 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
<211> 3196

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Otra información

<400> 1

```

auggcggguc ugacggcggc ggccccgagg cccggagucc uccugcuccu gcuguccauc      60
cuccaccccu cucggccugg aggggucccu ggggccauuc cugguggagu uccuggagga      120
gucuuuuuau caggggcugg ucucggagcc cuuggaggag gagcgcuggg gccuggaggg      180
aaaccucuua agccaguucc cggagggcuu gcgggugcug gccuuggggc agggcucggc      240
gccuuccccg caguuaaccu uccgggggcu cuggugccug guggaguggc ugacgcugcu      300
gcagccuaua aagcugcuua ggcuggcgcu gggcuuggug gugucccagg aguuggggc      360
uuaggagugu cugcaggugc ggugguuccu cagccuggag cgggagugaa gccugggaaa      420
gugccgggug uggggcugcc agguuauac ccagguggcg ugcucccagg agcucgguuc      480
cccggugugg gggugcuccc uggaguuccc acuggagcag gaguaagcc caaggcucca      540
gguguaggug gagcuuuugc uggaauccka ggaguuggac ccuuggggg accgcaaccu      600
ggagucccac ugggguaucc caucaaggc cccaagcugc cugguggcua uggacugccc      660
uacaccacag ggaaacugcc cuauggcua uggcccgagg gaguggcugg ugcagcgggc      720
aaggcugguu acccaacagg gacagggguu ggccccagg cagcagcagc agcggcagcu      780
aaagcagcag caaaguucgg ugcuggagca gccggagucc uccugggugu uggaggggcu      840
gguguuccug gcgugccugg ggcaauuccu ggaauuggag gcaucgcagg cguugggacu      900
ccagcugcag cugcagcugc agcagcagcc gcuaaggcag ccaaguaugg agcugcugca      960
ggcuuagugc cugguggggc aggcuuuggc ccgggaguag uugguguccc aggagcuggc     1020
guuccaggug uggguguccc aggagcuggg auuccaguug uccaggugc ugggauccca     1080
ggugcugcgg uuccaggggu ugugucacca gaagcagcug cuaaggcagc ugcaaaggca     1140
gccaaauacg gggccaggcc cggagucgga guuggaggca uccuacuua cgggguugga     1200
gcugggggcu uccccggcuu uggugucgga gucggaggua uccugggagu cgcagguguc     1260
ccugggugcg gagguguucc cggagucgga ggugucccgg gaguuggcau ucccccgaa     1320

```

ES 2 765 259 T3

gcucaggcag cagcugccgc caaggcugcc aaguacggag uggggacccc agcagcugca 1380
gcugcuaaag cagccgccaa agccgccag uuuggguuag uuccuggugu cggcguggcu 1440
ccuggaguug gcguggcucc uggugucggu guggcuccug gaguuggcuu ggcuccugga 1500
guuggcgugg cuccuggagu ugguguggcu ccuggcguug gcguggcucc cggcauuggc 1560
ccugguggag uugcagcugc agcaaaaucc gcugccaagg uggcugccaa agccagcuc 1620
cgagcugcag cugggcuugg ugcuggcauc ccuggacuug gaguuggugu cggcgucccu 1680
ggacuuggag uuggugcugg uguuccugga cuuggaguug gugcuggugu uccuggcuuc 1740
ggggcaguac cuggagcccu ggcugccgcu aaagcagcca aauauggagc agcagugccu 1800
gggguccuug gagggcucgg ggcucucggu ggaguaggca ucccaggcgg ugugguggga 1860
gccggacccg ccgcccgcgc ugccgcagcc aaagcugcug ccaaagccgc ccaguuuggc 1920
cuagugggag ccgcuuggcu cggagcucuc ggagucggag ggcuuaggagu uccagguguu 1980
gggggcccug gagguauacc uccagcugca gccgcuaaag cagcuaaaua cggugcugcu 2040
ggccuuggag guguccuagg gggugccggg caguucccac uuggaggagu ggcagcaaga 2100
ccuggcucug gauugucucc cauuuuccca gguggggccu gccuggggaa agcuugggc 2160
cggagagaa aaugagcuuc cuaggacccc ugacucacga ccucaucaac guuggugcua 2220
cugcuuggug gagaauguaa acccuuugua accccaucucc augcccccucc gacuccccac 2280
cccaggaggg aacgggcagg ccgggcggcc uugcagauc acagggcaag gaaacaagag 2340
gggagcggcc aagugccccc accaggaggc ccccuacuuc agaggcaagg gccauguggu 2400
ccuggccccc caccuccauc cuuccaccu aggagcucc ccuccacaca gccuccaucu 2460
ccaggggaac uuggugcuac acgcugugc ucuaucuuuc cuggggggag ggaggaggga 2520
agggugggcc cucggggaac cccuaccug ggcuccucu aaagauggug cagacacuuc 2580
cugggcaguc ccagcucccc cugcccacca ggaccaccg uggcugcca uccaguuggu 2640
accaagcac cugaagccuc aaagcuggau ucgcucuagc auccuccuc uccuggguc 2700
acuuggccgu cuccuccca ccgaucgug uuccccacau cuggggcgcu uuuggguugg 2760
aaaaccacc caccugggga auagccaccu ugcccuugua gaauccauc gcccauccgu 2820
ccauucaucc aucgguccgu ccauccaugu cccaguuuga ccgcccggca ccacuagcug 2880
gcugggugca cccaccauca accugguuga ccugucaug ccgccugugc ccugccuca 2940
ccccauccu acacuccccc agggcgugcg ggcugugca gacuggggug ccaggcaucu 3000
ccuccccacc cgggugucc ccacaugcag uacuguauc ccccauccc ucccucgguc 3060
cacugaacuu cagagcaguu cccauuccug ccccgccau cuuuuugugu cucgcuguga 3120
uagaucaua aaauuuuuu uuuuuguccu ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3180

aaaaaaaaaa aaaaaa

3196

- 5 <210> 2
- <211> 3480
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Otra información

ES 2 765 259 T3

<400> 2
ctccctcttt ccctcacagc cgacgaggca acaattaggc tttggggata aaacgaggtg 60
cggagagcgg gctggggcat ttctccccga gatggcgggt ctgacggcgg cggccccgcg 120
gcccggagtc ctctgctcc tgctgtccat cctccacccc tctcggcctg gagggtccc 180
tggggccatt cctggtggag ttcctggagg agtcttttat ccaggggctg gtctcggagc 240
ccttggagga ggagcgtg ggcctggagg caaacctctt aagccagttc ccggagggct 300
tgcgggtgct ggccttgggg cagggctcgg cgccttcccc gcagttacct ttccgggggc 360
tctggtgcct ggtggagtgg ctgacgtgc tgcagcctat aaagctgcta aggctggcgc 420
tgggcttggg ggtgtcccag gagttggtg cttaggagtg tctgcaggtg cgggtggtcc 480
tcagcctgga gccggagtga agcctgggaa agtgccgggt gtggggctgc caggtgtata 540
cccaggtggc gtgctcccag gagctcgggt ccccggtgtg ggggtgctcc ctggagttcc 600
cactggagca ggagttaagc ccaaggctcc aggtgtaggt ggagcttttg ctggaatccc 660
aggagtggga cccttgggg gaccgcaacc tggagtccca ctggggatc ccatcaaggc 720
ccccaaactg cctggtggct atggactgcc ctacaccaca gggaaactgc cctatggcta 780
tgggcccgga ggagtggctg gtgcagcggg caaggctggt taccacaacag ggacaggggt 840
tggccccag gcagcagcag cagcgcagc taaagcagca gcaaagtctg gtgctggagc 900
agccggagtc ctccctggtg ttggaggggc tgggttccct ggcgtgcctg gggcaattcc 960
tgggaattgga ggcacgcag gcgttgggac tccagctgca gctgcagctg cagcagcagc 1020
cgctaaggca gccaaagtat gagctgctgc aggttagtg cctggtgggc caggctttgg 1080
cccgggagta gttggtgtcc caggagctgg cgttccaggt gttggtgtcc caggagctgg 1140
gattccagtt gtcccaggtg ctgggatccc aggtgctgcg gttccagggg ttgtgtcacc 1200
agaagcagct gctaaggcag ctgcaaaggc agccaaatac ggggccaggc ccggagtcgg 1260
agttggaggc attcctactt acggggttg agctgggggc tttcccggct ttggtgtcgg 1320
agtcggaggt atccctggag tcgcaggtgt ccctggtgtc ggaggtgttc ccggagtcgg 1380
aggtgtcccg ggagttggca tttccccga agctcaggca gcagctgccg ccaaggtgc 1440
caagtacgga gtggggacc cagcagctgc agctgctaaa gcagcccca aagcccca 1500
gtttgggta gttcctggtg tcggcgtggc tcctggagtt ggcgtggctc ctggtgtcgg 1560

ES 2 765 259 T3

tgtggctcct ggagttggct tggctcctgg agttggcgtg gctcctggag ttggtgtggc 1620
 tcctggcgtt ggcgtggctc ccggcattgg ccctgggtga gttgcagctg cagcaaaatc 1680
 cgctgccaaag gtggctgccca aagcccagct ccgagctgca gctgggcttg gtgctggcat 1740
 ccctggactt ggagttggtg tcggcgtccc tggacttga gttgggtgctg gtgttcctgg 1800
 acttgagttt ggtgctggtg ttctggctt cggggcagta cctggagccc tggctgccgc 1860
 taaagcagcc aaatatggag cagcagtgcc tggggtcctt ggagggctcg gggctctcgg 1920
 tggagtaggc atcccaggcg gtgtgggtgg agccggaccc gccgcgcgcg ctgccgcage 1980
 caaagctgct gccaaagccg cccagtttgg cctagtggga gccgctgggc tcggaggact 2040
 cggagtcgga gggcttggag ttccaggtgt tgggggcctt ggaggtatac ctccagctgc 2100
 agccgctaaa gcagctaaat acggtgctgc tggccttga ggtgtcctag ggggtgccgg 2160
 gcagttccca cttggaggag tggcagcaag acctggcttc ggattgtctc ccattttccc 2220
 aggtggggcc tgctgggga aagcttgtgg ccggaagaga aaatgagctt cctaggacct 2280
 ctgactcacg acctcatcaa cgttgggtgct actgcttggg ggagaatgta aaccctttgt 2340
 aaccccatcc catgccctc cgactcccca cccagggag gaacgggcag gccgggcggc 2400
 cttgcagatc cacagggcaa gaaacaaga ggggagcggc caagtgcctc gaccaggagg 2460
 ccccctactt cagaggcaag ggccatgtgg tcctggcccc ccacccatc ccttcccacc 2520
 taggagctcc ccctccacac agcctccatc tccagggaa cttgggtgta cacgtgggtg 2580
 ctcttatctt cctgggggga gggaggagg aaggtggcc cctcggggaa ccccctacct 2640
 ggggctcctc taaagatggt gcagacactt cctgggcagt ccagctccc cctgcccacc 2700
 aggaccaccc gttggctgcc atccagttgg tacccaagca cctgaagcct caaagctgga 2760
 ttcgctctag catccctcct ctctgggtc cacttggccg tctcctccc accgatcgct 2820
 gttcccaca tctggggcgc ttttgggtg gaaaaccacc ccacactggg aatagccacc 2880
 ttgcccttgt agaatccatc cgcccatccg tccattcatc catcgggtccg tccatccatg 2940
 tcccagttg accgcccggc accactagct ggtggtgtc acccaccatc aacctggtt 3000
 acctgtcatg gccgcctgtg ccctgcctcc acccccatcc tacactccc cagggcgtgc 3060
 ggggctgtgc agactggggg gccaggcatc tcctcccac ccggggtgtc cccacatgca 3120
 gtactgtata ccccccaccc ctccctcgtt cactgaact tcagagcagt tcccattcct 3180
 gccccgcca tctttttgtg tctcgtgtg atagatcaat aaatatttta tttttgtcc 3240
 tggatatttg gggattattt ttgattgtg atattctctt ttggttttat tgtgtgggtt 3300
 cattgaaaa aaaagataat tttttttct gatccggga gctgtatccc cagtagaaaa 3360
 aacattttaa tcaactctaat ataactctg atgaaacaca ctttttttt taataagaaa 3420
 agagaattaa ctgcttcaga aatgactaat aatgaaaaa cttttaag aaaaaaaaa 3480

<210> 3
 <211> 3339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Otra información

<400> 3

ES 2 765 259 T3

ctccctcttt	ccctcacagc	cgacgaggca	acaattaggc	tttggggata	aaacgaggtg	60
cggagagcgg	gctggggcat	ttctccccga	gatggcgggt	ctgacggcgg	cgcccccgcg	120
gccccgagtc	ctcctgctcc	tgctgtccat	cctccacccc	tctcggcctg	gaggggtccc	180
tggggccatt	cctggtggag	ttcctggagg	agtcttttat	ccagcgtggg	ggcctggagg	240
caaacctctt	aagccagttc	ccggagggct	tgcgggtgct	ggccttgggg	cagggtcggg	300
cgcttcccc	gcagttacct	ttccgggggc	tctggtgcct	ggtggagtgg	ctgacgtgct	360
tgcagcctat	aaagctgcta	aggctggcgc	tgggcttggg	ggtgtcccag	gagttggtgg	420
cttaggagtg	tctgcaggtg	cggtggttcc	tcagcctgga	gccggagtga	agcctgggaa	480
agtgccgggt	gtggggctgc	cagggtgtata	cccagggtgc	gtgctcccag	gagctcggtt	540
ccccggtgtg	ggggtgctcc	ctggagtacc	cactggagca	ggagttaagc	ccaaggctcc	600
aggtgtaggt	ggagcttttg	ctggaatccc	aggagttgga	ccctttgggg	gaccgcaacc	660
tggagtccca	ctggggtatc	ccatcaaggc	ccccaaagctg	cctggtggct	atggactgcc	720
ctacaccaca	gggaaactgc	cctatggcta	tgggcccgga	ggagtggctg	gtgcagcggg	780
caaggctggt	taccacaacag	ggacaggggt	tggccccag	gcagcagcag	cagcggcagc	840
taaagcagca	gcaaagtctg	gtgctggagc	agccggagtc	ctccctggtg	ttggaggggc	900
tggtgttcct	ggcgtgcctg	gggcaattcc	tggaattgga	ggcatcgcag	gcgttgggac	960
tccagctgca	gctgcagctg	cagcagcagc	cgtaaggca	gccaaagtatg	gagctgctgc	1020
aggcttagtg	cctggtgggc	caggctttgg	cccgggagta	gttgggtgcc	caggagctgg	1080
cgttccaggt	gttgggtgcc	caggagctgg	gattccagtt	gtcccaggtg	ctgggatccc	1140
aggtgctgcg	gttccagggg	ttgtgtcacc	agaagcagct	gctaaggcag	ctgcaaaggc	1200
agccaaatac	ggggccaggc	ccggagtcgg	agttggaggc	attcctactt	acggggttgg	1260
agctgggggc	tttcccggct	ttggtgtcgg	agtcggaggt	atccctggag	tcgcaggtgt	1320
ccctggtgtc	ggaggtgttc	ccggagtcgg	aggtgtcccg	ggagttggca	tttccccga	1380
agctcaggca	gcagctgccg	ccaaggctgc	caagtacggg	ttagttcctg	gtgtcggcgt	1440
ggctcctgga	gttggcgtgg	ctcctggtgt	cggtgtggct	cctggagttg	gcttggctcc	1500
tggagttggc	gtggctcctg	gagttggtgt	ggctcctggc	gttggcgtgg	ctccccgcat	1560
tggccctggt	ggagttgcag	ctgcagcaaa	atccgctgcc	aaggtggctg	ccaaagccca	1620

ES 2 765 259 T3

gctccgagct gcagctgggc ttggtgctgg catccctgga cttggagttg gtgtcggcgt 1680
 ccctggactt ggagttggtg ctggtgttcc tggacttggg gttggtgctg gtgttcctgg 1740
 cttcggggca gtacctggag ccctggctgc cgttaaagca gccaaatatg gagcagcagt 1800
 gcctggggtc cttggagggc tcggggctct cggtgaggta ggcatcccag gcggtgtggt 1860
 gggagccgga cccgccgccc cgcctgccgc agccaaagct gctgccaaag ccgcccagtt 1920
 tggcctagtg ggagccgctg ggctcggagg actcggagtc ggagggcttg gagttccagg 1980
 tgttgggggc cttggaggtg tacctccagc tgcagccgct aaagcagcta aatacggagt 2040
 ggcagcaaga cctggcttcg gattgtctcc cattttccca ggtggggcct gcctggggaa 2100
 agcttgtggc cggaagagaa aatgagcttc ctaggacccc tgactcacga cctcatcaac 2160
 gttggtgcta ctgcttggtg gagaatgtaa accctttgta accccatccc atgccctcc 2220
 gactccccac cccaggaggg aacgggcagg ccgggcccgc ttgcagatcc acagggcaag 2280
 gaaacaagag gggagcggcc aagtgccccg accaggaggc cccctacttc agaggcaagg 2340
 gccatgtggt cctggccccc caccatccc cttcccacct aggagctccc cctccacaca 2400
 gcctccatct ccaggggaac ttggtgctac acgctggtgc tottatcttc ctggggggag 2460
 ggagggaggga agggtggccc ctcggggaac cccctacctg gggctcctct aaagatggtg 2520
 cagacacttc ctgggcagtc ccagctcccc ctgccacca ggaccaccg ttggtgcca 2580
 tccagttggt acccaagcac ctgaagcctc aaagctggat togctctagc atccctctc 2640
 tcctgggtcc acttggccgt ctcctcccca ccgatcgtg tccccacat ctggggcgct 2700
 tttgggttg aaaaccacc cactctggga atagccacct tgcccttgta gaatccatcc 2760
 gccatccgt ccattcatcc atcggtcogt ccattccatgt cccagttga ccgcccggca 2820
 ccaactagctg gctgggtgca cccaccatca acctggttga cctgtcatgg ccgctgtgc 2880
 cctgcctcca ccccatcct aactcccc agggcgtgcg gggctgtgca gactggggtg 2940
 ccaggcatct cctccccacc cggggtgtcc ccacatgcag tactgtatac ccccatccc 3000
 tccctoggtc cactgaactt cagagcagtt cccattcctg cccgcccac ctttttgtgt 3060
 ctgctgtga tagatcaata aatattttat tttttgtcct ggatatttgg ggattatttt 3120
 tgattgttga tattctcttt tggttttatt gttgtggttc attgaaaaa aaagataatt 3180
 ttttttctg atccggggag ctgtatccc agtagaaaa acattttaat cactctaata 3240
 taactctgga tgaaacacac cttttttttt aataagaaaa gagaattaac tgcttcagaa 3300
 atgactaata aatgaaaaac ctttaaagga aaaaaaaaa 3339

<210> 4
 <211> 3384
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Otra información

<400> 4

ES 2 765 259 T3

ctccctcttt ccctcacagc cgacgaggca acaattaggc tttggggata aaacgaggtg 60
cggagagcgg gctggggcat ttctccccga gatggcgggt ctgacggcgg cggccccggg 120
gcccggagtc ctctgctcc tgctgtccat cctccacccc tctcggcctg gaggggtccc 180
tggggccatt cctggtggag ttcctggagg agtcttttat ccaggggctg gtctcggagc 240
ccttggagga ggagcgtg ggcctggagg caaacctctt aagccagttc ccggagggct 300
tgccgggtgct ggccttgggg cagggctcgg cgccttcccc gcagttacct ttccgggggc 360
tctggtgcct ggtggagtgg ctgacgctgc tgcagcctat aaagctgcta aggctggcgc 420
tgggcttggg ggtgtcccag gagttggtgg cttaggagtg tctgcagccc cttctgtgcc 480
agggtcgggtg gttcctcagc ctggagccgg agtgaagcct gggaaagtgc cgggtgtggg 540
gctgccaggt gtatacccag gtggcgtgct cccaggagct cggttccccg gtgtgggggt 600
gctccctgga gttcccactg gagcaggagt taagcccaag gctccaggtg taggtggagc 660
tttctgtgga atcccaggag ttggaccctt tgggggaccg caacctggag tcccactggg 720
gtatcccata aaggcccca agctgcctgg tgctatgga ctgccctaca ccacagggaa 780
actgccctat ggctatgggc ccggaggagt ggctggtgca gcgggcaagg ctggttacc 840
aacagggaca ggggttggcc cccaggcagc agcagcagcg gcagctaaag cagcagcaaa 900
gttcggtgct ggagcagccg gagtcctccc tgggtgtgga ggggctggtg ttcctggcgt 960
gcctggggca attcctgga ttggaggcat cgcaggcgtt gggactccag ctgcagctgc 1020
agctgcagca gcagccgcta aggcagcaa gtatggagct gctgcaggct tagtgcctgg 1080
tggccaggc tttggcccgg gagtagttgg tgtcccagga gctggcgttc caggtgttgg 1140
tgtcccagga gctgggattc cagttgtccc agtgctggg atcccaggtg ctgcggttcc 1200
aggggttgtg tcaccagaag cagctgctaa ggcagctgca aaggcagcca aatacggggc 1260
caggcccgga gtcggagttg gaggcattcc tacttacggg gttggagctg ggggctttcc 1320
cggctttggt gtcggagtcg gaggtatccc tggagtcgca ggtgtccctg gtgtcggagg 1380
tgttcccgga gtcggaggtg tcccgggagt tggcatttcc cccgaagctc aggcagcagc 1440
tgccgccaag gctgccaagt acgggttagt tcctggtgtc ggcgtggctc ctggagttgg 1500
cgtggctcct ggtgtcggtg tggctcctgg agttggcttg gtcctggag ttggcgtggc 1560
tcctggagtt ggtgtggctc ctggcgttgg cgtggctccc ggcattggcc ctggtggagt 1620
tgcagctgca gcaaaatccg ctgccaaggt ggctgcaaaa gccagctcc gagctgcagc 1680
tgggcttggg gctggcatcc ctggacttgg agttggtgtc ggcgtccctg gacttggagt 1740

ES 2 765 259 T3

ttggtgctggt gttcctggac ttggagttgg tgctggtggt cctggcttcg gggcagtacc 1800
 tggagacctg gctgccgcta aagcagccaa atatggagca gcagtgcctg gggtccttgg 1860
 agggctcggg gctctcggtg gagtaggcat cccaggcggg gtggtgggag cccgacccgc 1920
 cgccgccgct gccgcagcca aagctgctgc caaagccgcc cagtttgcc tagtgggagc 1980
 cgctgggctc ggaggactcg gagtcggagg gcttgagatt ccagggttg ggggccttgg 2040
 aggtatacct ccagctgcag ccgctaaagc agctaaatac ggagtggcag caagacctgg 2100
 cttcggattg tctcccattt tcccaggtag ggctgcctg gggaaagctt gtggccggaa 2160
 gagaaaatga gcttcctagg acccctgact cacgacctca tcaacgttg tgctactgct 2220
 tgggtggagaa tgtaaaccct ttgtaacccc atcccatgcc cctccgactc cccaccccag 2280
 gagggaacgg gcaggccggg cggccttgca gatccacagg gcaaggaaac aagaggggag 2340
 cggccaagtg ccccaccag gagggccct acttcagagg caagggccat gtggtcctgg 2400
 cccccaccc catcccttcc cacctaggag ctccccctcc acacagcctc catctccagg 2460
 ggaacttggg gctacacgct ggtgctctta tcttctggg gggagggagg agggaaagggt 2520
 ggcccctcgg ggaaccccct acctggggct cctctaaaga tggtgacagc acttctctggg 2580
 cagtcccagc tccccctgcc caccaggacc caccggtggc tgccatccag ttggtacca 2640
 agcacctgaa gcctcaaagc tggattcgct ctagcatccc tcctctcctg ggtccacttg 2700
 gccgtctcct ccccaccgat cgctgttccc cacatctggg gcgcttttgg gttgaaaaac 2760
 cccccacac tgggaatagc caccttgccc ttgtagaatc catccgcca tccgtccatt 2820
 catccatcgg tccgtccatc catgtcccca gttgaccgcc cggcaccact agctggctgg 2880
 gtgaccccac catcaacctg gttgacctgt catggccgcc tgtgccctgc ctccaccccc 2940
 atcctacact cccccagggc gtgcggggct gtgcagactg gggtgccagg catctcctcc 3000
 ccaccggggg tgtcccaca tgcagtactg tatacccccc atccctccct cgggtccactg 3060
 aacttcagag cagttcccat tcctgccccg cccatctttt tgtgtctcgc tgtgatagat 3120
 caataaatat tttatTTTTT gtcctggata tttggggatt atttttgatt gttgatattc 3180
 tcttttggtt ttattggtt ggttcattga aaaaaaaga taattttttt ttctgatccg 3240
 gggagctgta tccccagtag aaaaaacatt ttaatcactc taatataact ctggatgaaa 3300
 cacacctttt tttttaataa gaaaagagaa ttaactgctt cagaaatgac taataaatga 3360
 aaaaccttta aaggaaaaaa aaaa 3384

<210> 5
 <211> 3441
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Otra información

<400> 5

5

10

ES 2 765 259 T3

ctccctcttt ccctcacagc cgacgaggca acaattaggc tttggggata aaacgaggtg	60
cggagagcgg gctggggcat ttctccccga gatggcgggt ctgacggcgg cggccccgcg	120
gcccggagtc ctctgctcc tgctgtccat cctccacccc tctcggcctg gaggggtccc	180
tggggccatt cctggtggag ttcttgagg agtcttttat ccaggggctg gtctcggagc	240
ccttgaggga ggagcgtgg ggcctggagg caaacctctt aagccagttc ccggagggct	300
tgcgggtgct ggccttgggg cagggctcgg cgccttcccc gcagttacct ttccgggggc	360
tctggtgcct ggtggagtgg ctgacgctgc tgcagcctat aaagctgcta aggctggcgc	420
tgggcttggg ggtgtcccag gagttggtgg cttaggagtg tctgcagccc cttctgtgcc	480
agggtcggtg gttcctcagc ctggagccgg agtgaagcct gggaaagtgc cgggtgtggg	540
gctgccaggt gtatacccag gtggcgtgct cccaggagct cggttccccg gtgtgggggt	600
gctccctgga gttcccactg gagcaggagt taagcccaag gctccaggtg taggtggagc	660
ttttgctgga atcccaggag ttggaccctt tgggggaccg caacctggag tcccactggg	720
gtatcccatc aaggccccca agctgcctgg tggtatgga ctgccctaca ccacagggaa	780
actgccctat ggctatgggc cgggaggagt ggctggtgca gcgggcaagg ctggttacct	840
aacagggaca ggggttggcc cccaggcagc agcagcagcg gcagctaaag cagcagcaaa	900
gttcgggtgct ggagcagccg gagtcctccc tgggttggga ggggctggtg ttcttgccgt	960
gcctggggca attcctggaa ttggaggcat cgcaggcgtt gggactccag ctgcagctgc	1020
agctgcagca gcagccgcta aggcagccaa gtatggagct gctgcaggct tagtgcctgg	1080
tgggccaggc tttggccccg gagtagttgg tgtcccagga gctggcgttc caggtgttgg	1140
tgtcccagga gctgggattc cagttgtccc aggtgctggg atcccaggtg ctgcccgtcc	1200
aggggttgtg tcaccagaag cagctgctaa ggcagctgca aaggcagcca aatacggggc	1260
caggccccga gtcggagttg gaggcattcc tacttacggg gttggagctg ggggctttcc	1320
cggctttggt gtcggagtcg gaggtatccc tggagtgcga ggtgtcccctg gtgtcggagg	1380
tgttcccgga gtcggaggtg tcccgggagt tggcatttcc cccgaagctc aggcagcagc	1440
tgccgccaaag gctgccaaagt acggagtggg gaccccagca gctgcagctg ctaaagcagc	1500
cgccaaagcc gccagtttg ggttagttcc tgggtgcggc gtggctcctg gagttggcgt	1560
ggctcctggt gtcgggtggt ctccctggagt tggcttggct cctggagttg gcgtggctcc	1620
tggagttggt gtggctcctg gcgttggcgt ggctcccggc attggccctg gtggagttgc	1680
agctgcagca aaatccgctg ccaaggtggc tgccaaagcc cagctccgag ctgcagctgg	1740
gcttgggtgct ggcataccctg gacttggagt tgggtgcggc gtccctggac ttggagttgg	1800
tgctggtggt cctggacttg gagttggtgc tgggttccct ggcttcgggg cagtacctgg	1860

ES 2 765 259 T3

agccctggct gccgctaaag cagccaaata tggagcagca gtgcctgggg tccttggagg 1920
gctcggggct ctcggtggag taggcatccc aggcggtgtg gtgggagccg gacccgccgc 1980
cgccgctgcc gcagccaaag ctgctgccaa agccgccag tttggcctag tgggagccgc 2040
tgggctcgga ggactcggag tcggagggct tggagttcca ggtggtgggg gccttggagg 2100
tatacctcca gctgcagccg ctaaagcagc taaatacggg gtggcagcaa gacctggctt 2160
cggattgtct cccatthttcc caggtggggc ctgcctgggg aaagcttgtg gccggaagag 2220
aaaatgagct tcctaggacc cctgactcac gacctcatca acgttgggtc tactgcttgg 2280
tggagaatgt aaaccctttg taaccccatc ccatgccctt ccgactcccc accccaggag 2340
ggaacgggca ggccgggccc ccttgcagat ccacagggca aggaaacaag aggggagcgg 2400
ccaagtcccc cgaccaggag gccccctact tcagaggcaa gggccatgtg gtccctggccc 2460
cccaccccat cccttcccac ctaggagctc ccctccaca cagcctccat ctccagggga 2520
acttgggtgct acacgctggt gctcttatct tcctgggggg agggaggagg gaagggtggc 2580
ccctcgggga accccctacc tggggctcct ctaaagatgg tgcagacact tcctgggcag 2640
tcccagctcc ccctgccac caggaccac cgttggctgc catccagtgt gtaccaagc 2700
acctgaagcc tcaaagctgg attcgtcta gcatccctcc tctcctgggt ccacttggcc 2760
gtctcctccc caccgatcgc tgttcccac atctggggcg cttttgggtt ggaaaaccac 2820
cccacactgg gaatagccac cttgcccttg tagaatccat ccgcccctcc gtccattcat 2880
ccatcgggtc gtccatccat gtcccagtt gaccgcccgg caccactagc tggctgggtg 2940
caccacccat caacctggtt gacctgtcat ggccgctgt gccctgcctc cacccccac 3000
ctacactccc ccagggcgtg cggggctgtg cagactgggg tggcaggcat ctctcccca 3060
cccggggtgt cccacatgc agtactgtat acccccac cctccctcgg tccactgaac 3120
ttcagagcag ttccattcc tgccccgcc atctttttgt gtctcgtgt gatagatcaa 3180
taaataattht atthtttgtc ctggatattt ggggattatt tttgattgtt gatattctct 3240
tttggtttta ttgttgggt tcattgaaaa aaaaagataa ttttttttc tgatccgggg 3300
agctgtatcc ccagtagaaa aaacatthta atcactctaa tataactctg gatgaaacac 3360
acctthtttt ttaataagaa aagagaatta actgcttcag aatgactaa taaatgaaaa 3420
acctthaaag gaaaaaaaa a 3441

- <210> 6
- <211> 3423
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Otra información
- 10 <400> 6

ES 2 765 259 T3

ctccctcttt ccctcacagc cgacgaggca acaattaggc tttggggata aaacgaggtg	60
cggagagcgg gctggggcat ttctccccga gatggcgggt ctgacggcgg cggccccgcg	120
gcccggagtc ctctgctcc tgctgtccat cctccacccc tctcggcctg gaggggtccc	180
tggggccatt cctggtggag ttcttgagg agtcttttat ccaggggctg gtctcggagc	240
ccttgaggga ggagcgtgg ggcctggagg caaacctctt aagccagttc ccggagggct	300
tgcgggtgct ggccttgggg cagggctcgg cgccttcccc gcagttacct ttccgggggc	360
tctggtgcct ggtggagtgg ctgacgctgc tgcagcctat aaagctgcta aggctggcgc	420
tgggcttggg ggtgtcccag gagttggtgg cttaggagtg tctgcaggtg cggtggttcc	480
tcagcctgga gccggagtga agcctgggaa agtgccgggt gtggggctgc caggtgtata	540
cccaggtggc gtgtcccag gagctcgggt ccccggtgtg ggggtgctcc ctggagttcc	600
cactggagca ggagttaagc ccaaggctcc aggtgtaggt ggagcttttg ctggaatccc	660
aggagtggga ccctttgggg gaccgcaacc tggagtccca ctggggtatc ccatcaaggc	720
ccccaaactg cctggtggct atggactgcc ctacaccaca gggaaactgc cctatggcta	780
tgggcccgga ggagtggctg gtgcagcggg caaggctggt tacccaacag ggacaggggt	840
tggccccag gcagcagcag cagcggcagc taaagcagca gcaaagtctg gtgctggagc	900
agccggagtc ctccctggtg ttggaggggc tgggttccct ggcgtgcctg gggcaattcc	960
tggaattgga ggcatgcag gcgttgggac tccagctgca gctgcagctg cagcagcagc	1020
cgctaaggca gccaaagtat gagctgctgc aggcttagtg cctggtgggc caggctttgg	1080
ccccggagta gttggtgtcc caggagctgg cgttccaggt gttggtgtcc caggagctgg	1140
gattccagtt gtcccaggtg ctgggatccc aggtgctgcg gttccagggg ttgtgtcacc	1200
agaagcagct gctaaggcag ctgcaaaggc agccaaatac ggggccaggc ccggagtcgg	1260
agttggaggc attcctactt acggggttgg agctgggggc tttcccggct ttggtgtcgg	1320
agtcggaggt atccctggag tgcaggtgt ccctggtgtc ggaggtgttc ccggagtcgg	1380
aggtgtcccg ggagttggca tttccccga agctcaggca gcagctgccg ccaaggctgc	1440
caagtacggg ttagttcctg gtgtcggcgt ggctcctgga gttggcgtgg ctccctggtgt	1500
cgggtgtggct cctggagttg gcttggctcc tggagttggc gtggctcctg gagttggtgt	1560
ggctcctggc gttggcgtgg ctcccggcat tggccctggt ggagttgcag ctgcagcaaa	1620
atccgctgcc aaggtggctg ccaaagccca gctccgagct gcagctgggc ttggtgctgg	1680
catccctgga cttggagttg gtgtcggcgt ccctggactt ggagttggtg ctggtgttcc	1740
tggacttggg gttggtgctg gtgttcctgg ctccggggca gtacctggag ccctggctgc	1800
cgctaaagca gccaaatat gagcagcagt gcctggggtc cttggagggc tcggggctct	1860

ES 2 765 259 T3

cgggtggagta ggcattcccag gcggtgtggt gggagccgga cccgccgccg ccgctgccgc 1920
 agccaaagct gctgccaaag ccgcccagtt tggcctagtg ggagccgctg ggctcggagg 1980
 actcggagtc ggagggcttg gagttccagg tgttgggggc cttggaggta tacctccagc 2040
 tgcagccgct aaagcagcta aatacgggagc tgctggcctt ggaggtgtcc taggggggtgc 2100
 cgggcagttc ccacttgag gagtggcagc aagacctggc ttcggattgt ctcccatttt 2160
 cccaggtggg gcctgcctgg ggaaagcttg tggccggaag agaaaatgag cttcctagga 2220
 cccctgactc acgacctcat caacgttggg gctactgctt ggtggagaat gtaaacctt 2280
 tgtaaccca tcccatgccc ctccgactcc ccaccccagg agggaacggg caggccgggc 2340
 ggccttgag atccacagg caaggaaca agaggggagc ggccaagtgc cccgaccagg 2400
 agggccccta cttcagaggc aagggccatg tggctctggc cccccacccc atcccttccc 2460
 acctaggagc tccccctcca cacagcctcc atctocaggg gaacttgggtg ctacacgctg 2520
 gtgctcttat cttcctgggg ggagggagga ggaaggggtg gccctcggg gaacccccta 2580
 cctggggctc ctctaaagat ggtgcagaca cttcctgggc agtcccagct ccccctgcc 2640
 accaggacc accgttggct gccatccagt tggtagccaa gcacctgaag cctcaaagct 2700
 ggattcgctc tagcatccct cctctcctgg gtccacttgg ccgtctcctc cccaccgatc 2760
 gctgttcccc acatctgggg cgcttttggg ttggaaaacc accccacact gggaatagcc 2820
 acctggccct tgtagaatcc atccgccat ccgtccattc atccatcggg ccgtccatcc 2880
 atgtcccag ttgaccgcc ggcaccacta gctggctggg tgcaccacc atcaacctgg 2940
 ttgacctgac atggccgct gtgccctgcc tccacccca tctactactc ccccagggcg 3000
 tgcggggctg tgcagactgg ggtgccaggc atctcctccc caccgggggt gtccccacat 3060
 gcagtactgt ataccccca tccctccctc ggtccactga acttcagagc agttcccatt 3120
 cctgccccgc ccatcttttt gtgtctcgct gtgatagatc aataaatatt ttattttttg 3180
 tcctggatat ttggggatta tttttgattg ttgatattct cttttggttt tattgttgg 3240
 gttcattgaa aaaaaagat aatttttttt tctgatccgg ggagctgtat ccccagtaga 3300
 aaaaacattt taactactct aatataactc tggatgaaac acaccttttt ttttaataag 3360
 aaaagagaat taactgcttc agaaatgact aataaatgaa aaacctttaa aggaaaaaaa 3420
 aaa 3423

<210> 7
 <211> 724
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Otra información

<400> 7

ES 2 765 259 T3

Met Ala Gly Leu Thr Ala Ala Ala Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Ser Ile Leu His Pro Ser Arg Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala
20 25 30

Ile Pro Gly Gly Val Pro Gly Gly Val Phe Tyr Pro Gly Ala Gly Leu
35 40 45

Gly Ala Leu Gly Gly Gly Ala Leu Gly Pro Gly Gly Lys Pro Leu Lys
50 55 60

Pro Val Pro Gly Gly Leu Ala Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Leu Gly
65 70 75 80

Ala Phe Pro Ala Val Thr Phe Pro Gly Ala Leu Val Pro Gly Gly Val
85 90 95

Ala Asp Ala Ala Ala Ala Tyr Lys Ala Ala Lys Ala Gly Ala Gly Leu
100 105 110

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Leu Gly Val Ser Ala Gly Ala Val
115 120 125

Val Pro Gln Pro Gly Ala Gly Val Lys Pro Gly Lys Val Pro Gly Val
130 135 140

Gly Leu Pro Gly Val Tyr Pro Gly Gly Val Leu Pro Gly Ala Arg Phe
145 150 155 160

Pro Gly Val Gly Val Leu Pro Gly Val Pro Thr Gly Ala Gly Val Lys
165 170 175

Pro Lys Ala Pro Gly Val Gly Gly Ala Phe Ala Gly Ile Pro Gly Val
180 185 190

Gly Pro Phe Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val Pro Leu Gly Tyr Pro Ile
195 200 205

Lys Ala Pro Lys Leu Pro Gly Gly Tyr Gly Leu Pro Tyr Thr Thr Gly
210 215 220

Lys Leu Pro Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Val Ala Gly Ala Ala Gly
225 230 235 240

Lys Ala Gly Tyr Pro Thr Gly Thr Gly Val Gly Pro Gln Ala Ala Ala
245 250 255

ES 2 765 259 T3

Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Phe Gly Ala Gly Ala Ala Gly
 260 265 270

Val Leu Pro Gly Val Gly Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ala
 275 280 285

Ile Pro Gly Ile Gly Gly Ile Ala Gly Val Gly Thr Pro Ala Ala Ala
 290 295 300

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Ala Ala
 305 310 315 320

Gly Leu Val Pro Gly Gly Pro Gly Phe Gly Pro Gly Val Val Gly Val
 325 330 335

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Ile Pro
 340 345 350

Val Val Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Val Val
 355 360 365

Ser Pro Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly
 370 375 380

Ala Arg Pro Gly Val Gly Val Gly Gly Ile Pro Thr Tyr Gly Val Gly
 385 390 395 400

Ala Gly Gly Phe Pro Gly Phe Gly Val Gly Val Gly Gly Ile Pro Gly
 405 410 415

Val Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Val
 420 425 430

Pro Gly Val Gly Ile Ser Pro Glu Ala Gln Ala Ala Ala Ala Ala Lys
 435 440 445

Ala Ala Lys Tyr Gly Val Gly Thr Pro Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala
 450 455 460

Ala Ala Lys Ala Ala Gln Phe Gly Leu Val Pro Gly Val Gly Val Ala
 465 470 475 480

Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly
 485 490 495

Leu Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly

ES 2 765 259 T3

500 505 510

Val Gly Val Ala Pro Gly Ile Gly Pro Gly Gly Val Ala Ala Ala Ala
515 520 525

Lys Ser Ala Ala Lys Val Ala Ala Lys Ala Gln Leu Arg Ala Ala Ala
530 535 540

Gly Leu Gly Ala Gly Ile Pro Gly Leu Gly Val Gly Val Gly Val Pro
545 550 555 560

Gly Leu Gly Val Gly Ala Gly Val Pro Gly Leu Gly Val Gly Ala Gly
565 570 575

Val Pro Gly Phe Gly Ala Val Pro Gly Ala Leu Ala Ala Ala Lys Ala
580 585 590

Ala Lys Tyr Gly Ala Ala Val Pro Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Ala
595 600 605

Leu Gly Gly Val Gly Ile Pro Gly Gly Val Val Gly Ala Gly Pro Ala
610 615 620

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Gln Phe Gly
625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Ala Gly Leu Gly Gly Leu Gly Val Gly Gly Leu Gly
645 650 655

Val Pro Gly Val Gly Gly Leu Gly Gly Ile Pro Pro Ala Ala Ala Ala
660 665 670

Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Ala Gly Leu Gly Gly Val Leu Gly Gly
675 680 685

Ala Gly Gln Phe Pro Leu Gly Gly Val Ala Ala Arg Pro Gly Phe Gly
690 695 700

Leu Ser Pro Ile Phe Pro Gly Gly Ala Cys Leu Gly Lys Ala Cys Gly
705 710 715 720

Arg Lys Arg Lys

<210> 8

<211> 677

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Otra información

10

<400> 8

ES 2 765 259 T3

Met Ala Gly Leu Thr Ala Ala Ala Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Ser Ile Leu His Pro Ser Arg Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala
20 25 30

Ile Pro Gly Gly Val Pro Gly Gly Val Phe Tyr Pro Ala Leu Gly Pro
35 40 45

Gly Gly Lys Pro Leu Lys Pro Val Pro Gly Gly Leu Ala Gly Ala Gly
50 55 60

Leu Gly Ala Gly Leu Gly Ala Phe Pro Ala Val Thr Phe Pro Gly Ala
65 70 75 80

Leu Val Pro Gly Gly Val Ala Asp Ala Ala Ala Tyr Lys Ala Ala
85 90 95

Lys Ala Gly Ala Gly Leu Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Leu Gly
100 105 110

Val Ser Ala Gly Ala Val Val Pro Gln Pro Gly Ala Gly Val Lys Pro
115 120 125

Gly Lys Val Pro Gly Val Gly Leu Pro Gly Val Tyr Pro Gly Gly Val
130 135 140

Leu Pro Gly Ala Arg Phe Pro Gly Val Gly Val Leu Pro Gly Val Pro
145 150 155 160

Thr Gly Ala Gly Val Lys Pro Lys Ala Pro Gly Val Gly Gly Ala Phe
165 170 175

Ala Gly Ile Pro Gly Val Gly Pro Phe Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val
180 185 190

Pro Leu Gly Tyr Pro Ile Lys Ala Pro Lys Leu Pro Gly Gly Tyr Gly
195 200 205

Leu Pro Tyr Thr Thr Gly Lys Leu Pro Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gly
210 215 220

Val Ala Gly Ala Ala Gly Lys Ala Gly Tyr Pro Thr Gly Thr Gly Val
225 230 235 240

ES 2 765 259 T3

Gly Pro Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Phe
 245 250 255

Gly Ala Gly Ala Ala Gly Val Leu Pro Gly Val Gly Gly Ala Gly Val
 260 265 270

Pro Gly Val Pro Gly Ala Ile Pro Gly Ile Gly Gly Ile Ala Gly Val
 275 280 285

Gly Thr Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala
 290 295 300

Lys Tyr Gly Ala Ala Ala Gly Leu Val Pro Gly Gly Pro Gly Phe Gly
 305 310 315 320

Pro Gly Val Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 325 330 335

Pro Gly Ala Gly Ile Pro Val Val Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Ala
 340 345 350

Ala Val Pro Gly Val Val Ser Pro Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala
 355 360 365

Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Arg Pro Gly Val Gly Val Gly Gly Ile
 370 375 380

Pro Thr Tyr Gly Val Gly Ala Gly Gly Phe Pro Gly Phe Gly Val Gly
 385 390 395 400

Val Gly Gly Ile Pro Gly Val Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Val
 405 410 415

Pro Gly Val Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Ile Ser Pro Glu Ala Gln
 420 425 430

Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Leu Val Pro Gly Val
 435 440 445

Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro
 450 455 460

Gly Val Gly Leu Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val
 465 470 475 480

Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Ile Gly Pro Gly Gly Val Ala

ES 2 765 259 T3

				485						490						495
	Ala	Ala	Ala	Lys	Ser	Ala	Ala	Lys	Val	Ala	Ala	Lys	Ala	Gln	Leu	Arg
				500					505					510		
	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	Leu	Gly	Val	Gly	Val
				515					520					525		
	Gly	Val	Pro	Gly	Leu	Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Leu	Gly	Val
				530					535					540		
	Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Phe	Gly	Ala	Val	Pro	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala
				545					550					555		560
	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val	Pro	Gly	Val	Leu	Gly	Gly
					565						570					575
	Leu	Gly	Ala	Leu	Gly	Gly	Val	Gly	Ile	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Gly	Ala
					580						585					590
	Gly	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala
					595						600					605
	Gln	Phe	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Gly	Leu	Gly	Val	Gly
					610											620
	Gly	Leu	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	Pro	Ala
					625											640
	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Tyr	Gly	Val	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Phe
					645											655
	Gly	Leu	Ser	Pro	Ile	Phe	Pro	Gly	Gly	Ala	Cys	Leu	Gly	Lys	Ala	Cys
					660											670
	Gly	Arg	Lys	Arg	Lys											
					675											

<210> 9
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Otra información

<400> 9

Met	Ala	Gly	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Leu
1				5					10						15

ES 2 765 259 T3

Leu Leu Ser Ile Leu His Pro Ser Arg Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala
 20 25 30
 Ile Pro Gly Gly Val Pro Gly Gly Val Phe Tyr Pro Gly Ala Gly Leu
 35 40 45
 Gly Ala Leu Gly Gly Gly Ala Leu Gly Pro Gly Gly Lys Pro Leu Lys
 50 55 60
 Pro Val Pro Gly Gly Leu Ala Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Ala Phe Pro Ala Val Thr Phe Pro Gly Ala Leu Val Pro Gly Gly Val
 85 90 95
 Ala Asp Ala Ala Ala Ala Tyr Lys Ala Ala Lys Ala Gly Ala Gly Leu
 100 105 110
 Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Leu Gly Val Ser Ala Ala Pro Ser
 115 120 125
 Val Pro Gly Ala Val Val Pro Gln Pro Gly Ala Gly Val Lys Pro Gly
 130 135 140
 Lys Val Pro Gly Val Gly Leu Pro Gly Val Tyr Pro Gly Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Pro Gly Ala Arg Phe Pro Gly Val Gly Val Leu Pro Gly Val Pro Thr
 165 170 175
 Gly Ala Gly Val Lys Pro Lys Ala Pro Gly Val Gly Gly Ala Phe Ala
 180 185 190
 Gly Ile Pro Gly Val Gly Pro Phe Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val Pro
 195 200 205
 Leu Gly Tyr Pro Ile Lys Ala Pro Lys Leu Pro Gly Gly Tyr Gly Leu
 210 215 220
 Pro Tyr Thr Thr Gly Lys Leu Pro Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Val
 225 230 235 240
 Ala Gly Ala Ala Gly Lys Ala Gly Tyr Pro Thr Gly Thr Gly Val Gly
 245 250 255
 Pro Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Phe Gly
 260 265 270

ES 2 765 259 T3

Ala Gly Ala Ala Gly Val Leu Pro Gly Val Gly Gly Ala Gly Val Pro
 275 280 285

Gly Val Pro Gly Ala Ile Pro Gly Ile Gly Gly Ile Ala Gly Val Gly
 290 295 300

Thr Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys
 305 310 315 320

Tyr Gly Ala Ala Ala Gly Leu Val Pro Gly Gly Pro Gly Phe Gly Pro
 325 330 335

Gly Val Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 340 345 350

Gly Ala Gly Ile Pro Val Val Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Ala Ala
 355 360 365

Val Pro Gly Val Val Ser Pro Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys
 370 375 380

Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Arg Pro Gly Val Gly Val Gly Gly Ile Pro
 385 390 395 400

Thr Tyr Gly Val Gly Ala Gly Gly Phe Pro Gly Phe Gly Val Gly Val
 405 410 415

Gly Gly Ile Pro Gly Val Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Val Pro
 420 425 430

Gly Val Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Ile Ser Pro Glu Ala Gln Ala
 435 440 445

Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Leu Val Pro Gly Val Gly
 450 455 460

Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly
 465 470 475 480

Val Gly Leu Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala
 485 490 495

Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Ile Gly Pro Gly Gly Val Ala Ala
 500 505 510

Ala Ala Lys Ser Ala Ala Lys Val Ala Ala Lys Ala Gln Leu Arg Ala

ES 2 765 259 T3

515 520 525

Ala Ala Gly Leu Gly Ala Gly Ile Pro Gly Leu Gly Val Gly Val Gly
530 535 540

Val Pro Gly Leu Gly Val Gly Ala Gly Val Pro Gly Leu Gly Val Gly
545 550 555 560

Ala Gly Val Pro Gly Phe Gly Ala Val Pro Gly Ala Leu Ala Ala Ala
565 570 575

Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Ala Val Pro Gly Val Leu Gly Gly Leu
580 585 590

Gly Ala Leu Gly Gly Val Gly Ile Pro Gly Gly Val Val Gly Ala Gly
595 600 605

Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Gln
610 615 620

Phe Gly Leu Val Gly Ala Ala Gly Leu Gly Gly Leu Gly Val Gly Gly
625 630 635 640

Leu Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Leu Gly Gly Ile Pro Pro Ala Ala
645 650 655

Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Val Ala Ala Arg Pro Gly Phe Gly
660 665 670

Leu Ser Pro Ile Phe Pro Gly Gly Ala Cys Leu Gly Lys Ala Cys Gly
675 680 685

Arg Lys Arg Lys
690

<210> 10
 <211> 711
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Otra información

<400> 10

Met Ala Gly Leu Thr Ala Ala Ala Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Ser Ile Leu His Pro Ser Arg Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala
20 25 30

ES 2 765 259 T3

Ile Pro Gly Gly Val Pro Gly Gly Val Phe Tyr Pro Gly Ala Gly Leu
35 40 45

Gly Ala Leu Gly Gly Gly Ala Leu Gly Pro Gly Gly Lys Pro Leu Lys
50 55 60

Pro Val Pro Gly Gly Leu Ala Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Leu Gly
65 70 75 80

Ala Phe Pro Ala Val Thr Phe Pro Gly Ala Leu Val Pro Gly Gly Val
85 90 95

Ala Asp Ala Ala Ala Ala Tyr Lys Ala Ala Lys Ala Gly Ala Gly Leu
100 105 110

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Leu Gly Val Ser Ala Ala Pro Ser
115 120 125

Val Pro Gly Ala Val Val Pro Gln Pro Gly Ala Gly Val Lys Pro Gly
130 135 140

Lys Val Pro Gly Val Gly Leu Pro Gly Val Tyr Pro Gly Gly Val Leu
145 150 155 160

Pro Gly Ala Arg Phe Pro Gly Val Gly Val Leu Pro Gly Val Pro Thr
165 170 175

Gly Ala Gly Val Lys Pro Lys Ala Pro Gly Val Gly Gly Ala Phe Ala
180 185 190

Gly Ile Pro Gly Val Gly Pro Phe Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val Pro
195 200 205

Leu Gly Tyr Pro Ile Lys Ala Pro Lys Leu Pro Gly Gly Tyr Gly Leu
210 215 220

Pro Tyr Thr Thr Gly Lys Leu Pro Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Val
225 230 235 240

Ala Gly Ala Ala Gly Lys Ala Gly Tyr Pro Thr Gly Thr Gly Val Gly
245 250 255

Pro Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Phe Gly
260 265 270

Ala Gly Ala Ala Gly Val Leu Pro Gly Val Gly Gly Ala Gly Val Pro
275 280 285

ES 2 765 259 T3

Gly Val Pro Gly Ala Ile Pro Gly Ile Gly Gly Ile Ala Gly Val Gly
 290 295 300

Thr Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys
 305 310 315 320

Tyr Gly Ala Ala Ala Gly Leu Val Pro Gly Gly Pro Gly Phe Gly Pro
 325 330 335

Gly Val Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 340 345 350

Gly Ala Gly Ile Pro Val Val Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Ala Ala
 355 360 365

Val Pro Gly Val Val Ser Pro Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys
 370 375 380

Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Arg Pro Gly Val Gly Val Gly Gly Ile Pro
 385 390 395 400

Thr Tyr Gly Val Gly Ala Gly Gly Phe Pro Gly Phe Gly Val Gly Val
 405 410 415

Gly Gly Ile Pro Gly Val Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Val Pro
 420 425 430

Gly Val Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Ile Ser Pro Glu Ala Gln Ala
 435 440 445

Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Val Gly Thr Pro Ala Ala
 450 455 460

Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Gln Phe Gly Leu Val Pro
 465 470 475 480

Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val
 485 490 495

Ala Pro Gly Val Gly Leu Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val
 500 505 510

Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Ile Gly Pro Gly Gly
 515 520 525

Val Ala Ala Ala Ala Lys Ser Ala Ala Lys Val Ala Ala Lys Ala Gln

ES 2 765 259 T3

530		535		540											
Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	Leu	Gly	Val
545					550					555					560
Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Leu	Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Leu
				565					570					575	
Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Phe	Gly	Ala	Val	Pro	Gly	Ala	Leu
			580					585					590		
Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val	Pro	Gly	Val	Leu
		595					600						605		
Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Leu	Gly	Gly	Val	Gly	Ile	Pro	Gly	Gly	Val	Val
	610					615					620				
Gly	Ala	Gly	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys
625					630					635					640
Ala	Ala	Gln	Phe	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Gly	Leu	Gly
				645					650					655	
Val	Gly	Gly	Leu	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro
			660					665						670	
Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Tyr	Gly	Val	Ala	Ala	Arg	Pro
		675					680						685		
Gly	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Ile	Phe	Pro	Gly	Gly	Ala	Cys	Leu	Gly	Lys
	690					695					700				
Ala	Cys	Gly	Arg	Lys	Arg	Lys									
705					710										

<210> 11
 <211> 705
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Otra información

<400> 11

Met	Ala	Gly	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Ser	Ile	Leu	His	Pro	Ser	Arg	Pro	Gly	Gly	Val	Pro	Gly	Ala
			20					25					30		

ES 2 765 259 T3

Ile Pro Gly Gly Val Pro Gly Gly Val Phe Tyr Pro Gly Ala Gly Leu
 35 40 45

Gly Ala Leu Gly Gly Gly Ala Leu Gly Pro Gly Gly Lys Pro Leu Lys
 50 55 60

Pro Val Pro Gly Gly Leu Ala Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Leu Gly
 65 70 75 80

Ala Phe Pro Ala Val Thr Phe Pro Gly Ala Leu Val Pro Gly Gly Val
 85 90 95

Ala Asp Ala Ala Ala Ala Tyr Lys Ala Ala Lys Ala Gly Ala Gly Leu
 100 105 110

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Leu Gly Val Ser Ala Gly Ala Val
 115 120 125

Val Pro Gln Pro Gly Ala Gly Val Lys Pro Gly Lys Val Pro Gly Val
 130 135 140

Gly Leu Pro Gly Val Tyr Pro Gly Gly Val Leu Pro Gly Ala Arg Phe
 145 150 155 160

Pro Gly Val Gly Val Leu Pro Gly Val Pro Thr Gly Ala Gly Val Lys
 165 170 175

Pro Lys Ala Pro Gly Val Gly Gly Ala Phe Ala Gly Ile Pro Gly Val
 180 185 190

Gly Pro Phe Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val Pro Leu Gly Tyr Pro Ile
 195 200 205

Lys Ala Pro Lys Leu Pro Gly Gly Tyr Gly Leu Pro Tyr Thr Thr Gly
 210 215 220

Lys Leu Pro Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Val Ala Gly Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Lys Ala Gly Tyr Pro Thr Gly Thr Gly Val Gly Pro Gln Ala Ala Ala
 245 250 255

Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Phe Gly Ala Gly Ala Ala Gly
 260 265 270

Val Leu Pro Gly Val Gly Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ala
 275 280 285

ES 2 765 259 T3

Ile Pro Gly Ile Gly Gly Ile Ala Gly Val Gly Thr Pro Ala Ala Ala
 290 295 300

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Ala Ala
 305 310 315 320

Gly Leu Val Pro Gly Gly Pro Gly Phe Gly Pro Gly Val Val Gly Val
 325 330 335

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Ile Pro
 340 345 350

Val Val Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Val Val
 355 360 365

Ser Pro Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly
 370 375 380

Ala Arg Pro Gly Val Gly Val Gly Gly Ile Pro Thr Tyr Gly Val Gly
 385 390 395 400

Ala Gly Gly Phe Pro Gly Phe Gly Val Gly Val Gly Ile Pro Gly
 405 410 415

Val Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Val
 420 425 430

Pro Gly Val Gly Ile Ser Pro Glu Ala Gln Ala Ala Ala Ala Ala Lys
 435 440 445

Ala Ala Lys Tyr Gly Leu Val Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val
 450 455 460

Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Leu Ala Pro
 465 470 475 480

Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val Gly Val
 485 490 495

Ala Pro Gly Ile Gly Pro Gly Gly Val Ala Ala Ala Ala Lys Ser Ala
 500 505 510

Ala Lys Val Ala Ala Lys Ala Gln Leu Arg Ala Ala Ala Gly Leu Gly
 515 520 525

Ala Gly Ile Pro Gly Leu Gly Val Gly Val Gly Val Pro Gly Leu Gly

ES 2 765 259 T3

530 535 540

Val Gly Ala Gly Val Pro Gly Leu Gly Val Gly Ala Gly Val Pro Gly
 545 550 555 560

Phe Gly Ala Val Pro Gly Ala Leu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr
 565 570 575

Gly Ala Ala Val Pro Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Ala Leu Gly Gly
 580 585 590

Val Gly Ile Pro Gly Gly Val Val Gly Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ala
 595 600 605

Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Gln Phe Gly Leu Val Gly
 610 615 620

Ala Ala Gly Leu Gly Gly Leu Gly Val Gly Gly Leu Gly Val Pro Gly
 625 630 635 640

Val Gly Gly Leu Gly Gly Ile Pro Pro Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala
 645 650 655

Lys Tyr Gly Ala Ala Gly Leu Gly Gly Val Leu Gly Gly Ala Gly Gln
 660 665 670

Phe Pro Leu Gly Gly Val Ala Ala Arg Pro Gly Phe Gly Leu Ser Pro
 675 680 685

Ile Phe Pro Gly Gly Ala Cys Leu Gly Lys Ala Cys Gly Arg Lys Arg
 690 695 700

Lys
 705
 28

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polirribonucleótido que codifica elastina/tropoelastina con una secuencia nucleotídica que presenta al menos una modificación química que estabiliza el polirribonucleótido, en donde al menos aprox. 25% de las uridinas del polirribonucleótido están reemplazadas por pseudouridina y aprox. 25% de las citidinas del polinucleótido están reemplazadas por 5-metilcitidina, para estabilizar el polirribonucleótido.
2. Polirribonucleótido según la reivindicación 1, caracterizado por que es un ARNm.
- 10 3. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones precedentes, que presenta además una modificación química que está seleccionada del grupo consistente en: estructura de caperuza 5', preferiblemente una caperuza de guanina 5', cola de poli(A), un análogo a estructura de caperuza [análogo a caperuza antiinverso (ARCA; 3'O-Me-m⁷G(5')ppp(5')ppp(5')G)], un refuerzo de la secuencia de inicio de traducción en el codón de inicio AUG, preferiblemente mediante la secuencia (CCCCGC)aucGagAUG.
4. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones precedentes, que tiene la secuencia SEQ ID n.º 1, en la que al menos aprox. 25% de las uridinas están reemplazadas por pseudouridina y en la que al menos aprox. 25% de las citidinas están reemplazadas por 5-metilcitidina.
- 15 5. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones precedentes, que codifica una secuencia de aminoácidos que está seleccionada del grupo consistente en: SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 9, SEQ ID n.º 10 y SEQ ID n.º 11.
- 20 6. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones precedentes para inducir la síntesis de elastina/tropoelastina para uso en el tratamiento de una síntesis deficitaria de proteína de fibra elástica, en particular en la pérdida de elasticidad cutánea relacionada con la edad (formación de arrugas), en la estimulación de la cicatrización de heridas, en la recuperación de la elasticidad, preferiblemente de tejido vaginal, de tejido blando y duro del periodonto.
- 25 7. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones precedentes para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo consistente en: arteriosclerosis, estenosis aórtica, aneurisma aórtico, enfisema pulmonar, dermatocalasia, síndrome de Williams-Beuren, estenosis aórtica congénita subvalvular (SVAS).
8. Composición cosmética, que comprende el polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 7 y una formulación cosméticamente aceptable y, eventualmente, otras sustancias activas y auxiliares.
- 30 9. Composición farmacéutica, que comprende el polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 7 y una formulación farmacéuticamente aceptable y, eventualmente, otras sustancias activas y auxiliares.
10. Composición según la reivindicación 8 o 9, caracterizada por que comprende además un inmunosupresor, preferiblemente un inhibidor de interferón.
- 35 11. Producto médico, preferiblemente parche o implante médico, más preferiblemente *stent*/implante vascular, que comprende el polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 7 y/o la composición según una de las reivindicaciones 8 a 10, preferiblemente está revestido con estos.

Fig. 1

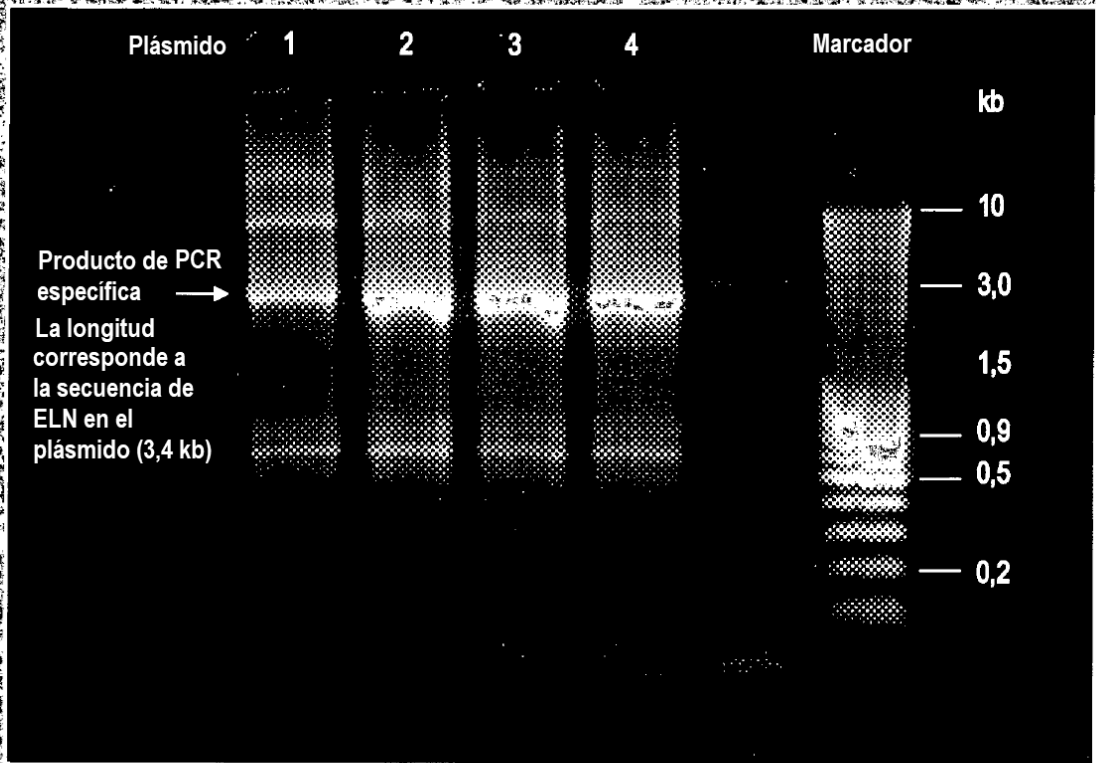


Fig. 2

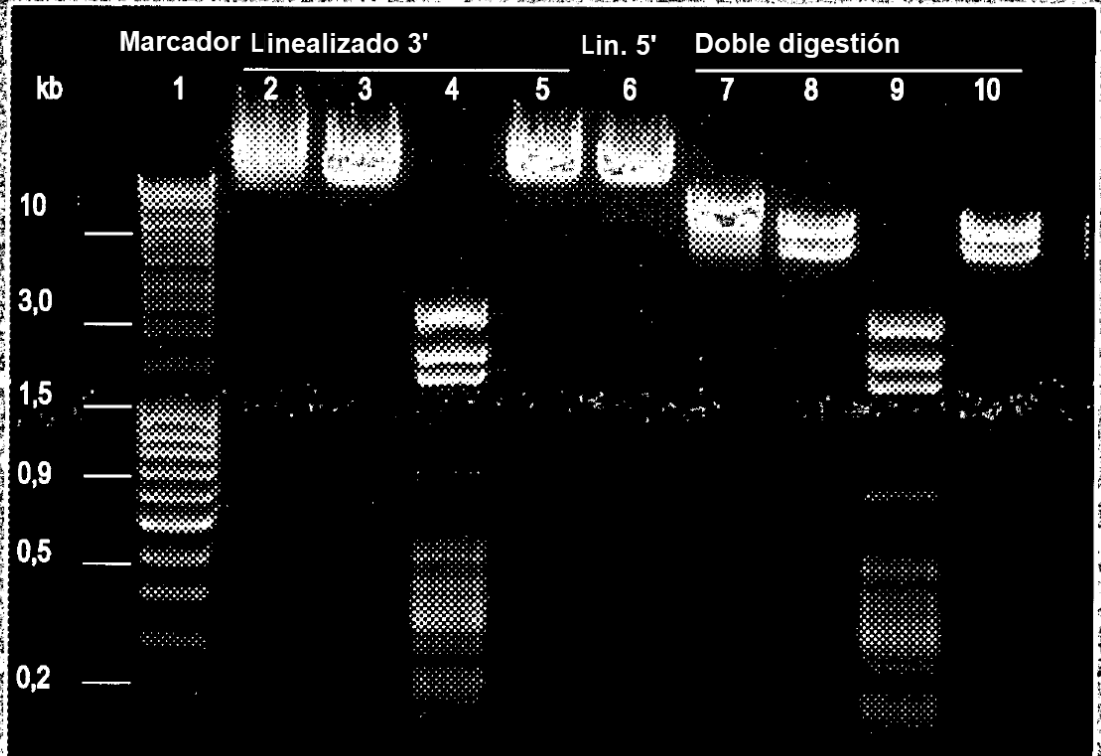


Fig. 3

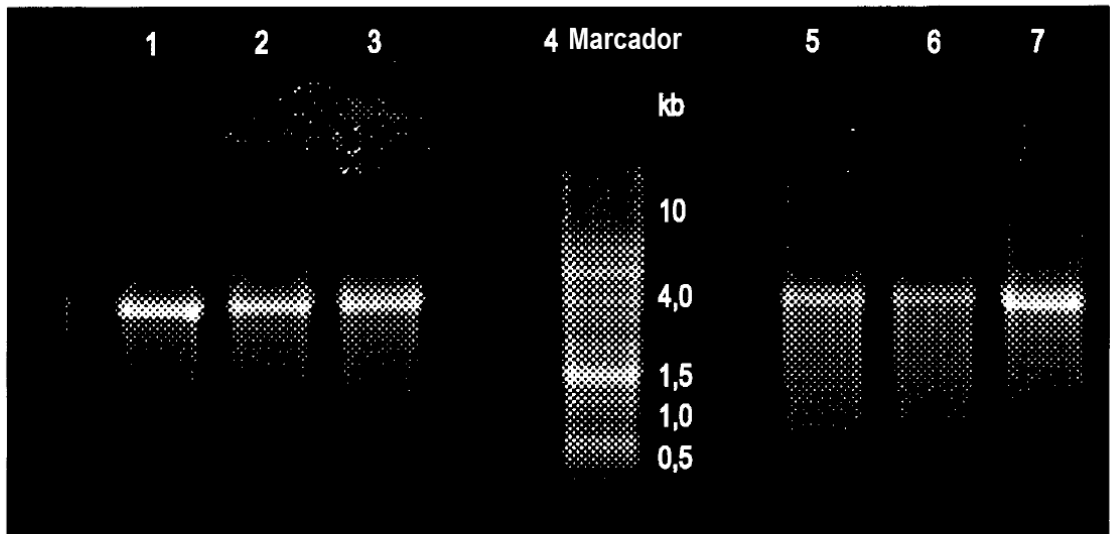


Fig. 4

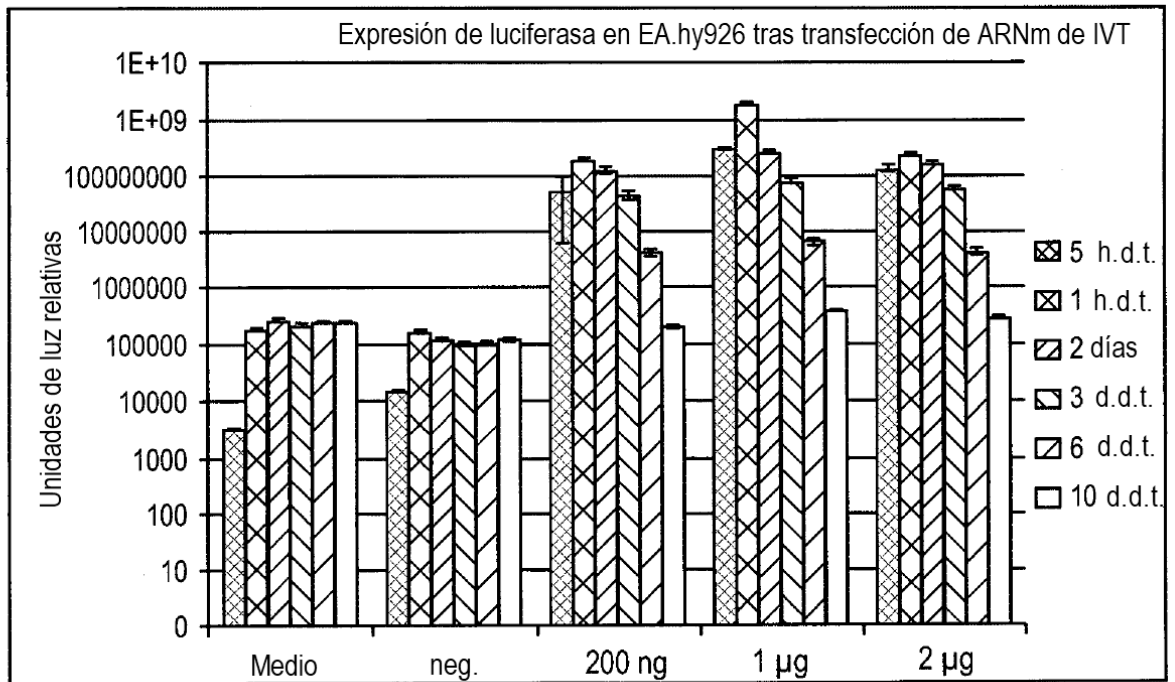


Fig. 5

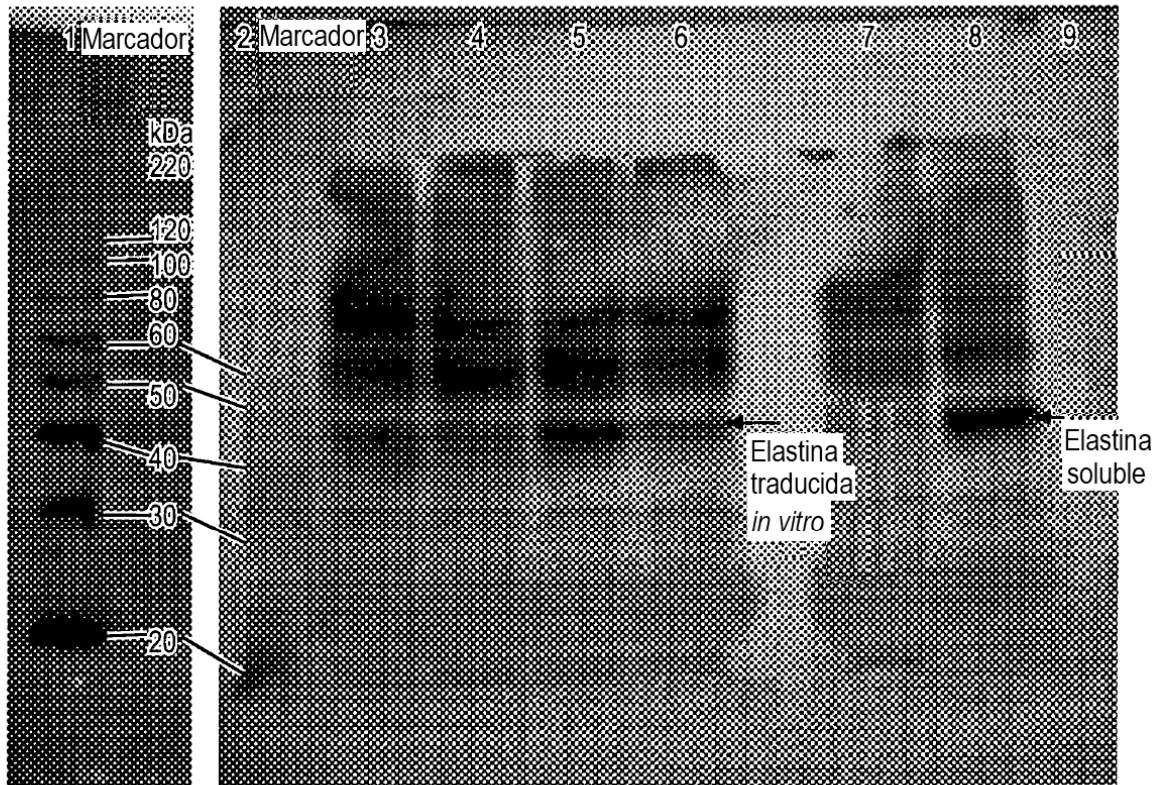


Fig. 6

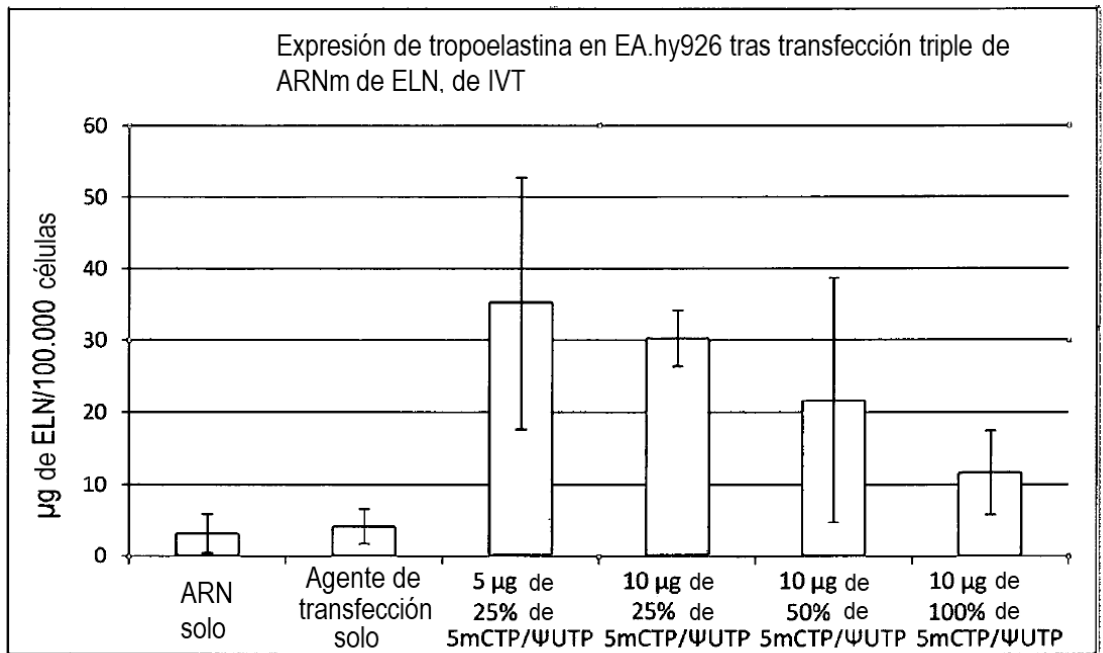


Fig. 7

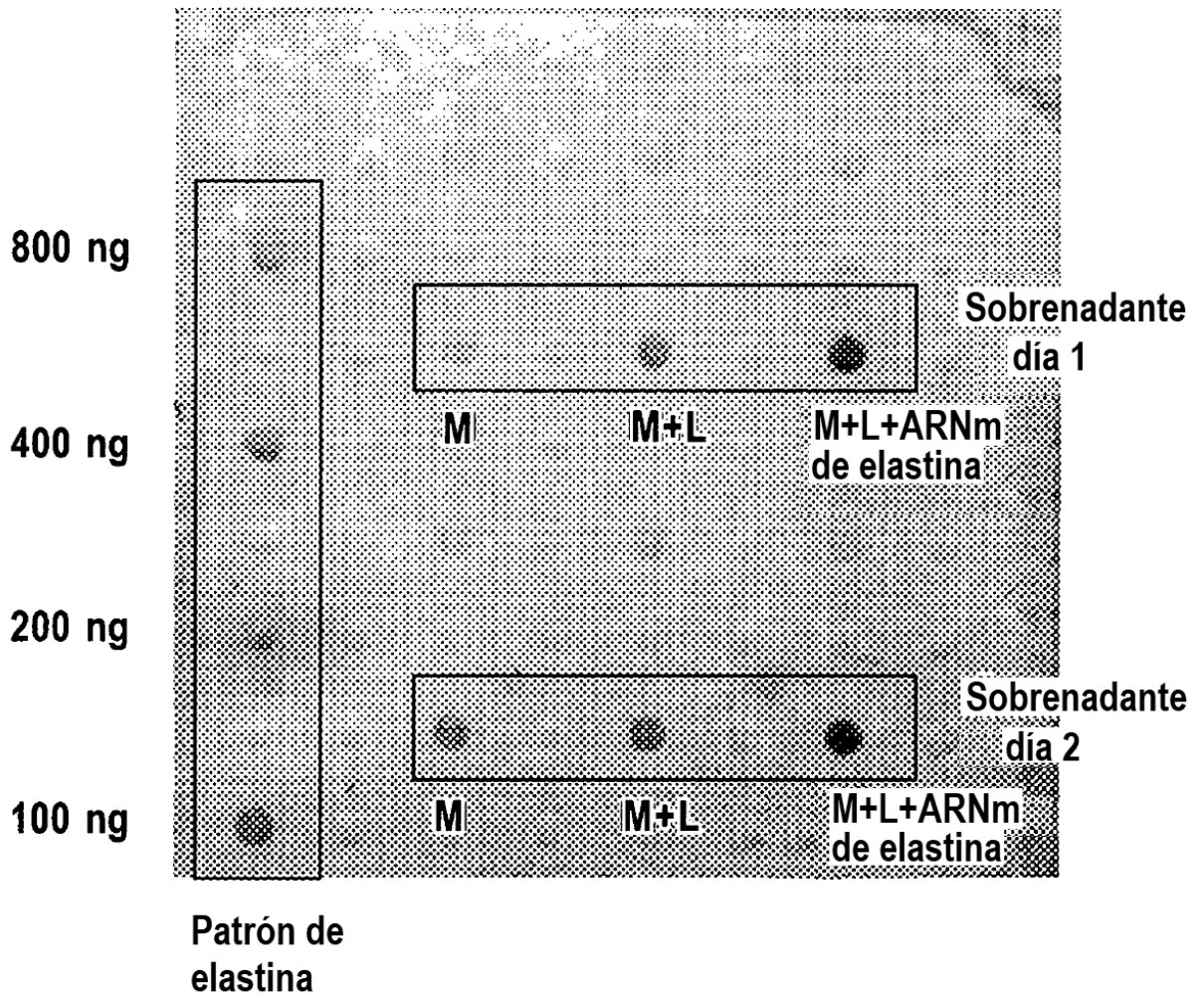


Fig. 8

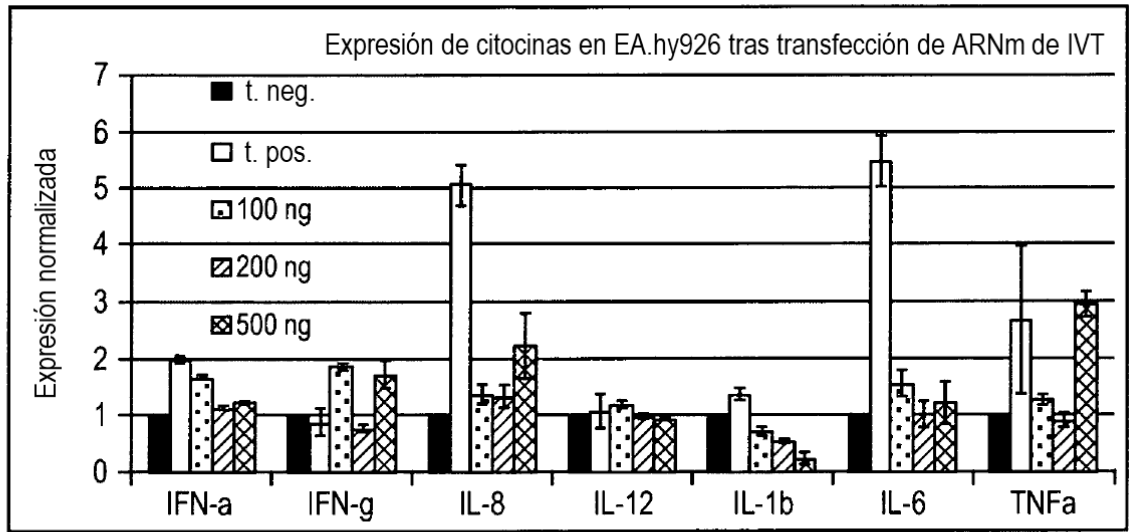


Fig. 9

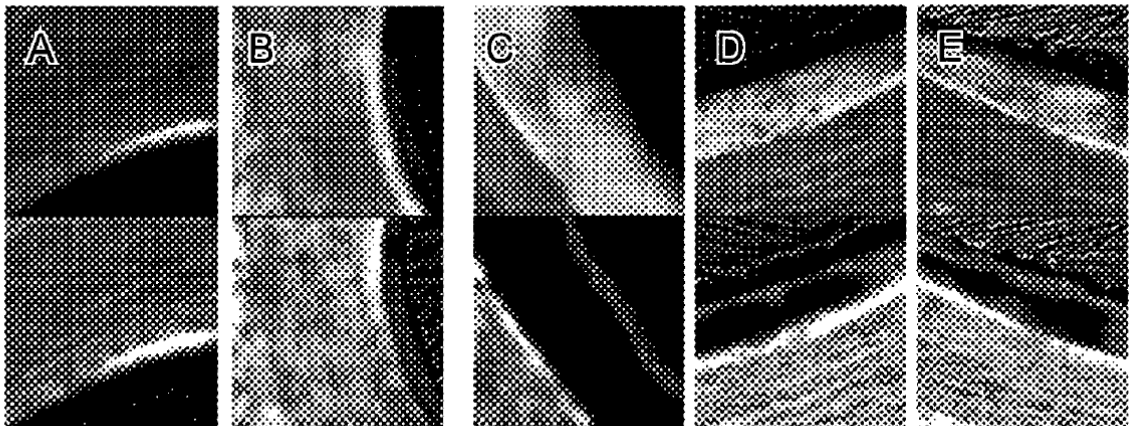


Fig. 10

