



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 798 758**

⑮ Int. Cl.:

**A01N 37/18** (2006.01)  
**C07K 1/00** (2006.01)  
**C07H 21/02** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2008 PCT/US2008/007111**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2008 WO08153933**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 08768187 (0)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 2173373**

---

⑮ Título: **Proteínas variantes de empalme HER2 y HER3 solubles, oligonucleótidos de cambio de empalme y su uso en el tratamiento de enfermedades**

⑩ Prioridad:

**06.06.2007 US 942319 P  
20.08.2007 US 956887 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.12.2020**

⑦ Titular/es:

**SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (50.0%)  
215 First Street  
Cambridge, MA 02142, US y  
THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT  
CHAPEL HILL (50.0%)**

⑦ Inventor/es:

**KOLE, RYSZARD;  
SAZANI, PETER y  
WAN, JING**

⑦ Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 798 758 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas variantes de empalme HER2 y HER3 solubles, oligonucleótidos de cambio de empalme y su uso en el tratamiento de enfermedades

- 5 Campo de la invención
- La presente invención se refiere en general a los campos de la química y bioquímica de proteínas y nucleótidos, y a la biotecnología y la medicina. Más específicamente, se relaciona con antagonistas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), ácidos nucleicos procedentes de los receptores del factor de crecimiento epidérmico y su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, tal como cáncer.
- 10 Antecedentes de la invención
- 15 El cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres, además del cáncer de piel. En 2006, de acuerdo con el National Cancer Institute, aproximadamente 41.000 mujeres por año en los Estados Unidos mueren a causa de la enfermedad. Según las tasas actuales, el 13,2 % de las mujeres nacidas hoy serán diagnosticadas con cáncer de seno en algún momento de sus vidas. La investigación intensiva ha llevado a avances en el diagnóstico y el tratamiento; sin embargo, todavía existen problemas graves, que incluyen tasas de curación bajas, efectos adversos sustanciales y resistencia a determinadas terapias. Dado que el cáncer de mama es un grupo de enfermedades, cada una de las cuales tiene propiedades moleculares distintas, los fármacos dirigidos molecularmente han surgido como importantes agentes terapéuticos contra el cáncer en los últimos años.
- 20 En el 25-30 % de los cánceres de mama, la amplificación y la sobreexpresión del gen del receptor del factor de crecimiento HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, también conocido como neu/erbB2) se asocia con una agresividad aumentada del tumor y un alto riesgo de recaída y muerte (Slamon, D., et al., 1987, *Science* 235:177; Yarden, Y., 2001, *Oncology* 1:1). Este oncogén codifica una tirosina cinasa del receptor transmembrana de 185 kilodalton (kDa). Como uno de los cuatro miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), HER2 se distingue de varias maneras. Primero, HER2 es un receptor huérfano. No se ha identificado ligando de alta afinidad. Segundo, HER2 es un compañero preferido para otros miembros de la familia del EGFR (HER1/EGFR, HER3 y HER4) para la formación de heterodímeros, que muestran una alta afinidad de ligando y una actividad de señalización superior. Tercero, el HER2 de longitud completa sufre escisión proteolítica, que libera un dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) soluble. Se ha demostrado que la eliminación del ECD representa un mecanismo de activación alternativo del HER2 de longitud completa tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que deja un fragmento anclado a la membrana con actividad cinasa. El papel central de HER2 en la señalización de la familia del EGFR se correlaciona con su implicación en la oncogénesis de varios tipos de cánceres, tales como el cáncer de mama, de ovario, de colon y gástrico, independientemente de su nivel de expresión (Slamon, D., et al., 1989, *Science* 244:707; Hynes, N., et al., 1994, *Biochem. Biophys. Acta.* 1198:165). HER2 también puede hacer que las células tumorales sean resistentes a determinados quimioterápicos (Pegram, M., et al., 1997, *Oncogene* 15:537). Dado su papel vital en la tumorigénesis, HER2 es una diana importante para la terapéutica del cáncer.
- 25 Como receptor de membrana celular, HER2 está compuesto por un dominio extracelular (ECD) (632 aminoácidos), un dominio transmembrana (22 aminoácidos) y un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa (580 aminoácidos). Como se transcribió inicialmente, el pre-ARNm para HER2 contiene 27 exones y 26 intrones. El ARNm de HER2 completamente empalmado del cual se han empalmado los intrones está compuesto por 27 exones. Tras la expresión, la proteína HER2 se transloca a la superficie celular. Activada a través de la homodimerización constitutiva y la heterodimerización estimulada por ligando, la proteína HER2 dirige las etapas posteriores en la transducción de señales, que afectan el crecimiento celular, la supervivencia y la diferenciación.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- HER2 ha sido validado como una diana terapéutica para varias neoplasias epiteliales, que incluyen las que se originan en la mama, los pulmones y el colon. Actualmente solo hay un producto terapéutico aprobado por la FDA para el cáncer de mama HER2 positivo, Herceptin® (Colomer, R., et al., 2001, *Cancer Investigation* 19:49). Herceptin es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular de HER2 con alta afinidad ( $K_d = 5$  nM). Solo o en combinación con quimioterapia, se ha demostrado que Herceptin inhibe la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan HER2 (Slamon, D., et al., 2001, *N. Engl. J. Med.* 344:783; Baselga, J., et al., 1998, *Cancer Research* 58:2825).
- Sin embargo, este reactivo terapéutico basado en anticuerpos tiene determinadas limitaciones. Primero, su efecto inhibidor se limita al HER2 que se muestra en la superficie celular; las moléculas intracelulares de HER2 todavía están disponibles para la señalización mitógena. Segundo, Herceptin se puede unir y, por lo tanto, "neutralizar" mediante ECD circulantes que se liberan mediante proteólisis de HER2 unido a membrana (Brodowicz, T., et al., 1997, *Int. J. Cancer* 73:875). Finalmente, como con muchos otros fármacos, el tratamiento prolongado con Herceptin conduce a una resistencia adquirida (Kute, T., et al., 2004, *Cytometry Part A* 57A:86). Se demostró que otro anticuerpo anti-HER2, pertuzumab, en un ensayo clínico de fase II tiene actividad en el cáncer de ovario (Gordon, M.S., et al., 2006, *J. Clin. Oncol.* 24:4324).

Se han informado al menos dos autoinhibidores de HER2, traducidos de especies de ARNm de HER2 empalmadas alternativamente. Estos son HER2-68 y HER2-100. La retención del intrón 8 en el ARNm de HER2 produce un ARNm variante que codifica una proteína HER2 de 68 kDa, HER2-68 o herstatina. La retención del intrón 15 produce un ARNm variante que codifica una proteína HER2 truncada de 100 kDa, HER2-100. Ambas variantes de empalme de HER2 son solubles y actúan como inhibidores dominantes negativos de HER2, muy probablemente mediante la interferencia con la dimerización del receptor.

Cuando HER2-100 se sobreexpresa en células MCF-7 de cáncer de mama, la proliferación espontánea y la formación de colonias en agar suave mediada por heregulina de las células MCF-7 disminuye (Aigner, et al., 2001, Oncogene, 20(17):2101). Las rutas de señalización cadena abajo también se ven afectadas negativamente.

La variante de 68 kDa, o herstatina, se ha caracterizado con más detalle. Tras la expresión en células tumorales, la herstatina se secreta y se une a las células presentadoras de HER2 con alta afinidad ( $K_d = 14$  nM); La herstatina también se une a HER1 y HER4. La herstatina interfiere con la actividad de HER2 y otros miembros de la familia del EGFR y, por lo tanto, interfiere con su transducción de señales cadena abajo. Se ha informado que la herstatina causa la detención del crecimiento tumoral y la inhibición del crecimiento celular de cáncer de mama. La herstatina supera la resistencia al tamoxifeno en las células de cáncer de mama HER2 positivas (Justman, Q., et al., 2003, J. Biol. Chem. 277:20618; Jhabvala-Romero, F., et al., 2003, Oncogene 22:8178). Por lo tanto, la herstatina se ha reconocido como un prometedor candidato a fármaco contra el cáncer (Stix, G., 2006, Scientific American 294:60). Tanto con HER2-100 como con herstatina, se ha observado una pérdida progresiva de su expresión en tumores más avanzados.

HER3 (receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano, erbB3) es una proteína receptora que juega un papel importante en la regulación del crecimiento celular normal. HER3 carece de una actividad cinasa intrínseca y se basa en la presencia de HER2 para transducir señales a través de la membrana celular. Como se transcribió inicialmente, el pre-ARNm para HER3 contiene 28 exones y 27 intrones. El ARNm de HER3 completamente empalmado, del cual se han empalmado los intrones, está compuesto por 28 exones.

Se han informado dos variantes de empalme naturales de HER3, p45 y p85. Ambas son proteínas solubles, secretadas y truncadas generadas a través de un empalme alternativo del pre-ARNm de HER3. Los ARNm que codifican para cada una de estas variantes de empalme no permiten la traducción de la proteína HER3 de longitud completa y, en su lugar, generan proteínas truncadas. En particular, la forma p85 resulta de la retención del intrón 13 (Figura 12). Estas proteínas bloquean la activación estimulada por heregulina de HER3, HER2 y HER4, inhibiendo así el crecimiento de células a través de la ruta de señalización del EGFR. Usando una forma truncada negativa dominante de HER3 para inhibir la señalización de HER2/HER3, es posible proteger contra la fibrosis pulmonar (Nethery, D.E., et al., 2005, J. Appl. Physiol. 99:298).

#### Sumario de la invención

La invención incluye, en un aspecto, una proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) aislada y soluble que carece de la región codificada por el exón 15 del transcrito de ARNm de longitud completa del gen HER2, y truncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 16 del transcrito HER2. La proteína consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6 o los aminoácidos 23-584 de la SEQ ID NO: 6, y la proteína puede estar pegilada, es decir, derivatizada con cadenas de polietilenglicol, para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, por ejemplo, tiempo de circulación en la sangre.

También se divulga, como parte de la invención, una secuencia codificante para la proteína HER2 soluble anterior. La secuencia codificante corresponde a un ARNm de HER2 procesado que carece del exón 15, con el exón 14 unido directamente al exón 16, y puede tomar la forma de un ARNm de HER2 procesado, el ADNc correspondiente o un vector que contiene la secuencia codificante. Una secuencia codificante ejemplar es aquella que tiene al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 % de homología de secuencia con la SEQ ID NO: 5, o esa porción de la secuencia que termina en un codón de parada dentro del exón 16.

Un aspecto de la invención está dirigido al uso de una proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) aislada y soluble de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o codificada por un ácido nucleico de la reivindicación 3 o 4 para inhibir la proteína HER2 de longitud completa *in vitro*, que comprende poner en contacto una célula que expresa la proteína HER2 de longitud completa con la proteína HER2, o codificada por un ácido nucleico como se especifica anteriormente.

Se divulga además en el presente documento un método para tratar a un sujeto femenino que tiene un cáncer de ovario o de mama caracterizado por la sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). El método incluye las etapas de

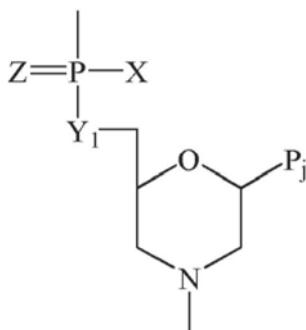
(i) administrar al sujeto, una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína soluble del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) que carece de la región codificada por el exón 15 del transcrito de

ARNm de longitud completa del gen HER2, y truncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 16 del transcripto HER2, y

(ii) continuar la administración, a intervalos periódicos, hasta obtener un punto final definido en el estado del cáncer. La proteína HER2 soluble empleada en el método es como se describió anteriormente. Más en general, el método puede aplicarse al tratamiento de otras enfermedades o afecciones proliferativas celulares.

En el presente documento se divulga adicionalmente un compuesto oligonucleotídico de cambio de empalme que comprende un oligonucleótido que contiene entre 12-30 bases y al menos 12 bases contiguas complementarias a una región del sitio de empalme de donante o receptor del exón 15 contenida dentro de la SEQ ID NO: 15 del transcripto de ARNm de longitud completa de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). El oligonucleótido puede contener entre 12 y 25 bases y una secuencia de al menos 12 bases contiguas complementarias a una región contenida en las SEQ ID NO: 44 o 45, ambas contenidas en la SEQ ID NO: 15. El oligonucleótido, puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), 2'O-metoxietil oligorribonucleótido, o un oligonucleótido morfolino de fosforodiamidato. El compuesto puede incluir, además, conjugado con el extremo 5' o 3' del oligonucleótido, un polipéptido rico en arginina eficaz para promover la captación del compuesto en las células. Los ejemplos de péptidos ricos en arginina incluyen los identificados por las SEQ ID NO: 52-67, y preferentemente los identificados por las SEQ ID NO: 56-60 y 62.

En una realización general, el compuesto está compuesto por subunidades morfolinas y enlaces entre subunidades que contienen fósforo que unen un nitrógeno morfolino de una subunidad a un carbono exocíclico en 5' de una subunidad adyacente. Las subunidades de morfolino se pueden unir mediante enlaces de fosforodiamidato que tienen la estructura:



donde  $Y_1 = 0$ ,  $Z = 0$ ,  $P_j$  es una fracción de apareamiento de base de purina o pirimidina eficaz para unirse, mediante enlace de hidrógeno específico de base, a una base en un polinucleótido, y  $X$  es un amino o alquilamino, que incluye dialquilamino.

Se divulga además en el presente documento un método para tratar a un sujeto femenino que tiene un cáncer de ovario o de mama caracterizado por la sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), mediante las etapas de:

(i) administrar al sujeto, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido que contiene entre 12-30 bases y al menos 12 bases contiguas complementarias a una región del sitio de empalme de donante o receptor del exón 15 contenida dentro de la SEQ ID NO: 15 del transcripto de ARNm de longitud completa de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), y (ii) continuar la administración, a intervalos periódicos, hasta obtener un punto final definido en el estado del cáncer. El compuesto oligonucleotídico empleado en el método puede tener las características indicadas anteriormente. Más en general, el método puede aplicarse al tratamiento de otras enfermedades o afecciones proliferativas celulares.

El método puede incluir además administrar al sujeto, una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína soluble del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) que carece de la región codificada por el exón 15 del transcripto de ARNm de longitud completa del gen HER2, y truncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 16 del transcripto HER2.

Además se divulga en el presente documento una proteína del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3) aislada y soluble que carece de la región que codifica uno de (i) exón 13 del transcripto de ARNm de longitud completa del gen HER3, y truncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 15 del transcripto HER3, (ii) exón 14 del transcripto de ARNm de longitud completa del gen HER3, y truncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 15 del transcripto de HER3, o (iii) exón 15 del transcripto de ARNm de longitud completa del gen HER3, y truncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 16 del transcripto HER3. La proteína puede tener una secuencia que sea al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 % homóloga a una de (i) SEQ ID NO: 8 o aminoácidos 20-541 de la SEQ ID NO: 8, (ii) SEQ ID NO: 10 o aminoácidos 20-555 de la SEQ ID NO: 10, o (iii) SEQ ID NO: 12 o aminoácidos 20-569 de la SEQ ID NO: 12. La proteína HER3 soluble puede estar

pegilada, es decir, derivatizada con cadenas de polietilenglicol, para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, por ejemplo, tiempo de circulación en la sangre.

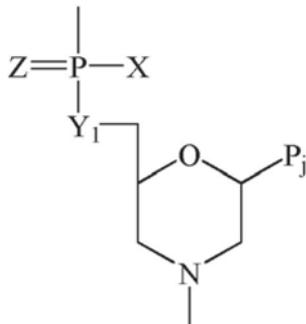
En el presente documento se divulga además una secuencia codificante para la proteína HER3 soluble anterior. La secuencia codificante corresponde a un ARNm de HER3 procesado (i) que carece del exón 13, con el exón 12 unido directamente al exón 14, (ii) que carece del exón 14, con el exón 13 unido directamente al exón 15, o (iii) sin exón 15, con el exón 14 unido directamente al exón 16, y puede tomar la forma de un ARNm de HER3 procesado, el ADNc correspondiente o un vector que contiene la secuencia codificante. Las secuencias codificantes ejemplares son aquellas que tienen al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 % de homología de secuencia con las SEQ ID NO: 7, 9 u 11, o esa porción de la secuencia que termina en un codón de parada dentro del exón 15 (para las SEQ ID NO: 7 y 9), o un codón de parada dentro del exón 16 (para la SEQ ID NO: 11).

Se divulga además en el presente documento un método para tratar a un sujeto femenino que tiene un cáncer de ovario o de mama caracterizado por la sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). El método incluye las etapas de

- (i) administrar al sujeto, una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína soluble del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3) que carece de la región que codifica uno de (i) exón 13 del transcrito de ARNm de longitud completa del gen HER3, y truncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 15 del transcrito HER3, (ii) exón 14 del transcrito de ARNm de longitud completa del gen HER3, y truncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 15 del transcrito de HER3, o (iii) exón 15 del transcrito de ARNm de longitud completa del gen HER3, y truncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 16 del transcrito HER3, y
- (ii) continuar la administración, a intervalos periódicos, hasta obtener un punto final definido en el estado del cáncer. La proteína HER2 soluble empleada en el método es como se describió anteriormente. Más en general, el método puede aplicarse al tratamiento de otras enfermedades o afecciones proliferativas celulares.

En el presente documento se divulga adicionalmente un compuesto oligonucleotídico de cambio de empalme que comprende un oligonucleótido que contiene entre 12-30 bases y al menos 12 bases contiguas complementarias a una de (i) una región del sitio de empalme de donante o receptor del exón 13 contenida dentro de la SEQ ID NO: 16 del transcrito de ARNm de longitud completa de la proteína del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3); (ii) una región del sitio de empalme de receptor o donante del exón 13 contenida dentro de la SEQ ID NO: 16 del transcrito de ARNm de longitud completa de la proteína del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3); o (iii) una región del sitio de empalme de receptor o donante del exón 15 contenida dentro de la SEQ ID NO: 16 del transcrito de ARNm de longitud completa de la proteína del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3). El oligonucleótido puede contener entre 12 y 25 bases y una secuencia de al menos 12 bases contiguas complementarias a una región contenida dentro de una de las SEQ ID NO: 46-51, todas las cuales están contenidas en la SEQ ID NO: 16. El oligonucleótido, puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), 2'-O-metoxietil oligorribonucleótido, o un oligonucleótido morfolino de fosforodiamidato (PMO). El compuesto puede incluir, además, conjugado con el extremo 5' o 3' del oligonucleótido, un polipéptido rico en arginina eficaz para promover la captación del compuesto en las células. Los ejemplos de péptidos ricos en arginina incluyen los identificados por las SEQ ID NO: 52-67, y preferentemente los identificados por las SEQ ID NO: 56-60 y 62.

En una realización general, el compuesto está compuesto por subunidades morfolinas y enlaces entre subunidades que contienen fósforo que unen un nitrógeno morfolino de una subunidad a un carbono exocíclico en 5' de una subunidad adyacente. Las subunidades de morfolino se pueden unir mediante enlaces de fosforodiamidato que tienen la estructura:



donde  $Y_1 = O$ ,  $Z = O$ ,  $P_j$  es una fracción de apareamiento de base de purina o pirimidina eficaz para unirse, mediante enlace de hidrógeno específico de base, a una base en un polinucleótido, y  $X$  es un amino o alquilamino, que incluye dialquilamino.

Se divulga además en el presente documento un sujeto femenino que tiene un cáncer de ovario o de mama

caracterizado por la sobreexpresión del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3), mediante las etapas de:

5 (i) administrar al sujeto, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido que contiene entre 12-30 bases y al menos 12 bases contiguas complementarias a una de (i) una  
10 región del sitio de empalme de donante o receptor del exón 13 contenida dentro de la SEQ ID NO: 16 del transcripto de ARNm de longitud completa de la proteína del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3); (ii) una región del sitio de empalme de receptor o donante del exón 13 contenida dentro de la SEQ ID NO: 16 del transcripto de ARNm de longitud completa de la proteína del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3); o (iii) una región del sitio de empalme de receptor o donante del exón 15 contenida dentro de la SEQ ID NO: 16 del transcripto de ARNm de longitud completa de la proteína del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3), y  
15 (ii) continuar la administración, a intervalos periódicos, hasta obtener un punto final definido en el estado del cáncer. El compuesto oligonucleotídico empleado en el método puede tener las características indicadas anteriormente. Más en general, el método puede aplicarse al tratamiento de otras enfermedades o afecciones proliferativas celulares.

20 El método puede incluir además administrar al sujeto, una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína soluble del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) que carece de la región que codifica el exón 15 del transcripto de ARNm de longitud completa del gen HER2, y truncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 16 del transcripto HER2.

25 Estos y otros objetos y características de la invención serán más evidentes en su totalidad cuando la siguiente Descripción detallada de la invención se lea junto con los dibujos adjuntos.

25 Breve descripción de los dibujos

30 FIG. 1: Los oligonucleótidos (barras) dirigidos hacia el exón 15 provocan la inducción de un nuevo ARNm de HER2 que carece del exón 15, de modo que los exones cadena abajo, incluido el exón 16 que codifica el dominio transmembrana, tienen un marco de lectura incorrecto que introduce un codón de parada en el exón, tal como se indica.

35 FIG. 2: Las células SK-BR-3 se transfecaron con la concentración indicada (50 o 150 nM) del oligonucleótido indicado. Veinticuatro horas después, se aisló el ARN total y se usó RT-PCR para amplificar un fragmento de ARNm de HER2. Los transcriptos completos de Her2 están representados por una banda de 307 pb (mHER2), y los transcriptos que carecen del exón 15 están representados por una banda de 246 pb (sHER2). LF, solo Lipofectamine™ 2000; U, células no tratadas.

40 FIG. 3: Las células SK-BR-3 se transfecaron con la concentración indicada (10, 20, 40, 80, 100, 150 nM) de oligonucleótido 111, M111 o L111 como se describe en la Figura 2.

45 FIG. 4: Las células SK-BR-3 se transfecaron con la concentración indicada (25, 50, 100 nM) de SS0111 como se describe en la Figura 2. Después de 48 horas, los lisados se analizaron mediante transferencia Western para A) escisión de polí(ADP ribosa) polimerasa (PARP) y B) expresión de proteína mHER2. LF, solo Lipofectamine™ 2000; U, células no tratadas.

50 FIG. 5: Las células MCF-7 se transfecaron con plásmidos de expresión de mamífero que contenían ADNc de Δ15HER2 (sHER2). Después de 48 horas, los lisados celulares y los medios extracelulares se analizaron mediante transferencia Western. La proteína sHER2 no glucosilada (~ 64 kD) y glucosilada (~ 80 kD) se detectó en el lisado (Lisado) y en los medios extracelulares (Medios), respectivamente.

55 FIG. 6: Las células MCF-7 se transfecaron con el plásmido sHER2, o un plásmido de control que expresa β-galactosidasa. Los medios extracelulares se transfirieron luego a los medios extracelulares de las células SK-BR-3 cultivadas y se incubaron durante 48 horas. Las células SK-BR-3 se analizaron luego para A) escisión de PARP (Figura 6A) y B) expresión de mHER2 como en las figuras anteriores (Figura 6B). Las células SK-BR-3 se trataron con proteína Δ15HER2-His purificada a las concentraciones designadas y se analizaron para HER2, HER3 y su estado de fosforilación (Figura 6C). La Figura 6D muestra la inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 por el tratamiento con la proteína Δ15HER2-His después de 72 horas de incubación analizadas por un ensayo MTS. Se muestran las medias 6 desviaciones estándar de triplicados.

60 FIG. 7: Los oligonucleótidos dirigidos hacia elementos de empalme (Flechas) provocan la inducción de los nuevos ARNm de HER3 indicados, de modo que los exones cadena abajo tienen un marco de lectura incorrecto, lo que conduce a variantes de empalme de HER3 truncadas solubles que se terminan, como lo indican las flechas sobre los extremos cadena abajo de los receptores solubles.

65 FIG. 8: Las células MCF-7 se transfecaron con 100 nM de SSO indicado. Después de 24 horas, se aisló el ARN total y se usó RT-PCR para amplificar un fragmento de ARNm de HER3. Los transcriptos completos de HER3 están representados por una banda de 619 pb (HER3), y los transcriptos que carecen del exón 13 están representados por una banda de 486 pb (Δ13HER3).

70 FIG. 9: Las células MCF-7 se transfecaron con el SSO indicado como en la Figura 8. Los transcriptos de HER3 de longitud completa están representados por una banda de 353 pb, y los transcriptos que carecen del exón 14 (Δ14HER3) o el exón 15 (Δ15HER3) están representados por bandas de 262 pb y 198 pb, respectivamente.

75 FIG. 10: Las células SK-BR-3 se transfecaron con 100 nM del SSO indicado como se describe en las figuras

anteriores. Después de 48 horas, se midió la viabilidad celular y se expresó como porcentaje de células no tratadas.

FIG. 11: Se presenta la secuencia de una porción del gen HER2 humano. La secuencia que se muestra es desde el medio del intrón 14 hasta una porción del exón 16. Las secuencias de exón están subrayadas y en negrita. El codón de parada en el exón 16 para la proteína Δ15HER2 está encuadrado.

FIG. 12: Se presenta la secuencia de una porción del gen HER3 humano. La secuencia que se muestra es desde el medio del intrón 12 hasta una porción del exón 16. Las secuencias de exón están subrayadas y en negrita.

FIG. 13A-C: Estructuras ejemplares de un oligómero de morfolino unido a fosforodiamidato (PMO) (Figura 13A), un PMO conjugado con péptidos (PPMO) (Figura 13B) y un PMO conjugado con péptidos que tiene enlaces catiónicos entre subunidades (PPMO+) (Figura 13C). Aunque en la Figura 13C se ilustran varios tipos de enlaces catiónicos, un oligómero PMO+ o PPMO+ normalmente incluirá solo un tipo de enlace catiónico.

FIG 13D-G: Segmento de subunidad repetido de cuatro oligonucleótidos morfolinos ejemplares, designados D a G.

FIG 14A-B: Actividad de corrección de empalme en órganos de ratones transgénicos EGFP-654 tratados con diversos péptidos transportadores-PMO dirigidos a EGFP-654, medidos en glándula de mamífero (Figura 14A) y ovario y próstata (Figura 14B).

#### Descripción detallada de los dibujos

##### 20 I Definiciones:

Como se usa en el presente documento, las expresiones "receptor del factor de crecimiento epidérmico", "receptor de EGF" y "EGFR" se refieren a proteínas que tienen secuencias de aminoácidos de, o que son sustancialmente similares a, las secuencias de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico de mamífero naturales, preferentemente HER1, HER2, HER3 y HER4. En este contexto, un receptor "natural" o gen para dicho receptor, significa un receptor o gen de longitud completa que se produce en la naturaleza, así como las variaciones alélicas de origen natural de dichos receptores y genes.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "receptor del factor de crecimiento epidérmico soluble", "receptor de EGF soluble" y "sEGFR" se refieren a proteínas solubles cuyas secuencias son, o son sustancialmente, similares a las codificadas por un ARNm procedente de un ARNm de EGFR natural donde se ha omitido un solo exón o se ha retenido un solo intrón durante el empalme.

El término "madura", como se usa en relación con una proteína, significa una proteína expresada en una forma que carece de una secuencia líder o señal que puede codificarse en transcritos de longitud completa de un gen natural.

Los términos "secretada" y "soluble" se usan indistintamente en el presente documento y significan que la proteína es soluble, es decir, que no está unida a la membrana celular. En este contexto, una forma será soluble si, utilizando ensayos convencionales conocidos por un experto en la materia, la mayor parte de esta forma se puede detectar en fracciones que no están asociadas con la membrana, por ejemplo, en sobrenadantes celulares de células lisas o inalteradas o en suero.

El término "estable" significa que la sEGFR es detectable usando ensayos convencionales conocidos por un experto en la técnica, tal como, por ejemplo, transferencias Western o ensayos ELISA de células recolectadas, sobrenadantes celulares o suero.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una enfermedad o afección proliferativa celular" se refiere a una enfermedad, trastorno u otra afección médica que, al menos en parte, resulta de o se ve agravada por un aumento en la división celular o la supervivencia celular o una disminución de la apoptosis. Dichas enfermedades o afecciones incluyen, pero sin limitación, aquellas asociadas con niveles elevados de ligandos del EGFR, niveles elevados de receptores de EGF, o mayor sensibilización o desregulación de una vía de señalización de EGFR, y en particular, niveles elevados de HER2 y/o HER3. La expresión también abarca enfermedades y afecciones para las cuales se ha demostrado que los antagonistas de EGFR conocidos son útiles. Los ejemplos de enfermedades o afecciones proliferativas incluyen, pero sin limitación, cáncer y fibrosis pulmonar. La psoriasis (Wierzbicka, E., et al., 2006, Brit. J. of Dermatol., 155: 207-229) y la retinopatía diabética (Xu, K.P., 2007, Investig. Ophthal. and Visual Sci., 48: 2242-2248) también se pueden tratar con antagonistas de HER2.

Como se usa en el presente documento, la expresión "antagonista de HER2" significa que la proteína es capaz de causar un aumento medible en la citotoxicidad en las células que expresan HER2, ya sea antagonizando directamente la función de HER2 o uniendo e inactivando ligandos del EGFR tales como la heregulina, utilizando ensayos estándar como son bien conocidos en la materia. (Véase, por ejemplo, el ensayo de viabilidad celular en los ejemplos en el presente documento).

Como se usa en el presente documento, la expresión "inducir apoptosis" significa causar la muerte celular mediante apoptosis. La inducción de apoptosis se puede medir utilizando ensayos convencionales conocidos por un experto en la materia. Estos ensayos incluyen, pero sin limitación: i) tinción con anexina V-FITC (Invitrogen) y FACS, que

5 pueden detectar fosfatidilserina exhibida en la superficie de las células que sufren muerte apoptótica; ii) ensayo colorimétrico ApoAlert® CPP32 (Clontech), que detecta la actividad de la proteasa CPP32, un acontecimiento temprano clave en la apoptosis; y iii) transferencia Western para proteínas intracelulares específicas, tales como poli(ADP ribosa) polimerasa (PARP) y ciclina B, que se degradan mediante caspasas durante la apoptosis (Véase, por ejemplo, el ensayo de escisión de PARP en los ejemplos en el presente documento).

10 Como se usa en el presente documento, los términos "transformación" o "transfección" se refieren a la inserción de un ácido nucleico exógeno en una célula, independientemente del método utilizado para la inserción, por ejemplo, lipofección, transducción, infección o electroporación. El ácido nucleico exógeno se puede mantener como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o alternativamente, se puede integrar en el genoma de la célula.

15 Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar a una célula otro ácido nucleico al que se ha unido.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína aislada" se refiere a una proteína o polipéptido que no es de origen natural y está separado de uno o más componentes que están asociados con él en su síntesis o es de origen natural y está separado de uno o más componentes que son naturales asociado a ello.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico que está en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción más grande, que se ha producido a partir de un ácido nucleico aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura, es decir, libre de materiales endógenos contaminantes, y en una cantidad o concentración que permite la identificación y manipulación mediante métodos bioquímicos estándar, por ejemplo, usando un vector de clonación.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína purificada" se refiere a una proteína que está presente en ausencia sustancial de otras proteínas. Sin embargo, dichas proteínas purificadas pueden contener otras proteínas añadidas como estabilizantes, vehículos, excipientes o agentes coterapéuticos. El término "purificado", como se usa en el presente documento, significa preferentemente al menos 80 % en peso seco, más preferentemente en el intervalo de 95-99 % en peso, y lo más preferentemente al menos 99,8 % en peso, de proteína presente, excluyendo proteínas añadidas como estabilizantes, vehículos, excipientes o agentes coterapéuticos.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "alterar el empalme de un pre-ARNm" se refiere a alterar el empalme de una diana celular de pre-ARNm que da como resultado una relación alterada de productos empalmados. Dicha alteración del empalme se puede detectar mediante una variedad de técnicas bien conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, se puede usar RT-PCR en el ARN celular total para detectar la relación de productos de empalme en presencia y ausencia de un SSO.

40 Como se usa en el presente documento, el término "complementario" se usa para indicar un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de modo que se produzca una unión estable y específica entre un oligonucleótido y un ADN o ARN que contiene la secuencia diana. Se entiende en la técnica que la secuencia de un oligonucleótido no necesita ser 100 % complementaria a la de su diana. Por ejemplo, para un SSO hay un grado suficiente de complementariedad cuando, en condiciones que permiten el empalme, se producirá la unión a la diana y se evitará sustancialmente la unión no específica.

45 Como se usa en el presente caso, una proteína o ácido nucleico tiene al menos un porcentaje específico de homología de secuencia con una SEQ ID NO dada, si la proteína o ácido nucleico en cuestión tiene las mismas bases o restos de aminoácidos, en la misma secuencia, en al menos el porcentaje especificado de restos o bases de la SEQ ID NO identificada. Al preparar ácidos nucleicos con al menos un grado dado de homología de secuencia con una secuencia codificante específica, un experto en la materia, con la ayuda de un ordenador, podría generar fácilmente todas las secuencias de ácido nucleico que codificarían una secuencia de proteína dada. Al preparar proteínas con al menos un grado dado de homología de secuencia con una secuencia de proteína específica, un experto en la materia, guiado por un conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, la posición de un resto dado dentro de una proteína, los efectos conocidos de determinados aminoácidos en la conformación de proteínas, y con la ayuda de un ordenador, podrían seleccionar fácilmente determinadas sustituciones de aminoácidos en determinadas posiciones de restos que, con previsibilidad razonable, preservarían las propiedades funcionales de la proteína.

#### IIA. Proteínas variantes de empalme de Her2 y Her3:

60 Una realización de la presente invención es una proteína, ya sea de longitud completa o madura, que está codificada por un ADNc procedente de un gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) natural, particularmente HER2, donde se omite un solo exón en el ADNc, lo que da como resultado una proteína soluble (sEGFR). Además, la sEGFR puede actuar como un antagonista de EGFR, HER2. La "sEGFR de mamífero", de acuerdo con la presente invención, incluye, pero sin limitación, EGFR soluble humana, primate, murina, canina, felina, bovina, ovina, equina y porcina. Asimismo, la sEGFR de mamífero de acuerdo con la presente invención

incluye, pero sin limitación, una secuencia de proteína que resulta de uno o más polimorfismos de un solo nucleótido, siempre que la proteína retenga una actividad biológica comparable a la sEGFR de referencia con la que se está comparando.

- 5 En una realización, la EGFR soluble de mamífero es un HER2 de mamífero, preferentemente un HER2 humano. En particular, en el ADNc para esta proteína, el exón 14 es seguido directamente por el exón 16 y, como resultado, se omite el exón 15 (Figura 11). Para HER2 humano soluble, dos ejemplos no limitantes de esta realización están dados mediante Δ15HER2 que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 6 y Δ15HER2 maduro (aminoácidos 23-584 de la SEQ ID NO: 6) que carece de la secuencia señal.
- 10 En el presente documento, se divulga adicionalmente que, la EGFR soluble de mamífero puede ser un HER3 de mamífero, preferentemente un HER3 humano. En un aspecto de esta realización, el exón 12 es seguido directamente por el exón 14 y como resultado se omite el exón 13 (Figura 12). Para HER3 humano soluble, dos ejemplos no limitantes de esta realización están dados mediante Δ13HER3 que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 8 y Δ13HER3 maduro (aminoácidos 20-541 de la SEQ ID NO: 8) que carece de la secuencia señal. En otro aspecto, el exón 13 es seguido directamente por el exón 15 y como resultado se omite el exón 14 (Figura 12). Para HER3 humano soluble, dos ejemplos no limitantes de esta realización están dados mediante Δ14HER3 que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 10 y Δ14HER3 maduro (aminoácidos 20-555 de la SEQ ID NO: 10) que carece de la secuencia señal. En otro aspecto más, el exón 14 es seguido directamente por el exón 16 y como resultado se omite el exón 15 (Figura 12). Para HER3 humano soluble, dos ejemplos no limitantes de esta realización están dados mediante Δ15HER3 que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 12 y Δ15HER3 maduro (aminoácidos 20-569 de la SEQ ID NO: 12) que carece de la secuencia señal.
- 15 25 Las proteínas de la presente invención también incluyen aquellas proteínas que se modifican químicamente. La modificación química de una proteína se refiere a una proteína donde al menos uno de sus restos de aminoácidos se modifica mediante procesos naturales, tales como el procesamiento u otras modificaciones postraduccionales, o mediante técnicas de modificación química conocidas en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, acetilación, acilación, amidación, ADP-ribosilación, glucosilación, metilación, pegilación, prenilación, fosforilación o conjugación de colesterol.
- 30

#### IIB. Expresión y purificación de proteínas:

- 35 Cuando se usan células de mamífero o de insecto, la sEGFR expresada adecuadamente se secretará en los medios extracelulares. La proteína se recupera de los medios, y se concentra y purifica usando técnicas bioquímicas estándar. Después de la expresión en células de mamífero mediante transducción lentivírica o AAV, transfección de plásmidos o cualquier procedimiento similar, o en células de insecto después de la transducción baculovírica, los medios extracelulares de estas células se concentran usando filtros de concentración con un límite de peso molecular apropiado, tal como unidades de filtración Amicon®.
- 40 Cuando sEGFR se expresa en cultivo bacteriano, se puede purificar mediante técnicas bioquímicas estándar. Las bacterias se lisan, y el extracto celular que contiene la sEGFR se desalía y se concentra.
- 45 En cualquier caso, la sEGFR se puede purificar mediante cromatografía de afinidad. El uso de cromatografía en columna con una matriz de afinidad que comprende un ligando EGFR se puede usar para purificar variantes de empalme de HER3. Como alternativa, se puede añadir un marcador de purificación de afinidad a los extremos N o C de la sEGFR. Por ejemplo, un marcador de polihistidina (marcador His), que es un motivo de aminoácidos con al menos seis histidinas, se puede usar para este propósito (Hengen, P., 1995, Trends Biochem. Sci. 20:285-86). La adición de un marcador His se puede lograr mediante la adición en marco de una secuencia de nucleótidos que codifica el marcador His directamente al extremo 5' o 3' del marco de lectura abierto de sEGFR en un vector de expresión. Cuando se incorpora un marcador His a la proteína, se emplea una columna de afinidad de níquel o cobalto para purificar la sEGFR marcada, y el marcador His opcionalmente se puede escindir luego. Otros marcadores de purificación de afinidad adecuados y métodos de purificación de proteínas con esos marcadores son bien conocidos en la técnica.
- 50 55 Como alternativa, se puede utilizar un esquema de purificación no basado en afinidad, que implica el fraccionamiento de los extractos de sEGFR en una serie de columnas que separan las proteínas en función del tamaño (cromatografía de exclusión de tamaño), carga (cromatografía de intercambio aniónico y catiónico) e hidrofobia (cromatografía de fase inversa). Se puede utilizar la cromatografía líquida de alto rendimiento para facilitar estas etapas.

#### IIC. Uso de proteínas para el tratamiento de enfermedades proliferativas:

- 60 En el presente documento, se divulga adicionalmente que, sEGFR puede administrarse a un paciente, preferentemente un ser humano, para tratar enfermedades proliferativas dependientes de HER2, tal como cáncer. En el tratamiento de seres humanos, se prefiere el uso de EGFR humana soluble. La sEGFR de la presente

invención se puede administrar mediante inyección en bolo, infusión continua, liberación sostenida de implantes u otras técnicas adecuadas. Normalmente, la sEGFR terapéutica se administrará en forma de una composición que comprende proteína purificada junto con vehículos, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. Dichos vehículos no serán tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas. Habitualmente, la preparación de dichas composiciones implica combinar la sEGFR con tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos, proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes, tales como EDTA, glutatión y otros estabilizadores y excipientes. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero no específica son diluyentes apropiados ejemplares. Preferentemente, el producto se formula como un liofilizado usando soluciones de excipientes apropiadas, por ejemplo, sacarosa, como diluyentes. También se pueden añadir conservantes, tales como el alcohol bencílico. La cantidad y la frecuencia de administración dependerán, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y la gravedad de la indicación que se está tratando, la respuesta deseada, la condición del paciente, etc.

En el presente documento, se divulga adicionalmente que la sEGFR puede administrarse sistémicamente en cantidades terapéuticamente eficaces que varían preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg/semana a aproximadamente 100 mg/kg/semana. En realizaciones preferidas, sEGFR se administra en cantidades que varían de aproximadamente 0,5 mg/kg/semana a aproximadamente 50 mg/kg/semana. Para administración local, las dosis varían preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg por inyección.

20 **IID. Métodos de tratamiento que usan las proteínas variantes de empalme**

En el presente documento se divulga adicionalmente el uso de proteínas como se establece anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar a un paciente afectado por un trastorno proliferativo que implica una actividad excesiva de EGFR, preferentemente HER2, tal como se analiza a continuación. En la fabricación de un medicamento de acuerdo con la presente invención, las proteínas de la presente invención se mezclan normalmente con, entre otros, un vehículo aceptable. El vehículo debe, por supuesto, ser aceptable en el sentido de ser compatible con otros ingredientes en la formulación y no debe ser perjudicial para el paciente. El vehículo puede ser sólido o líquido. Las proteínas de la presente invención se incorporan en formulaciones, que se pueden preparar mediante cualquiera de las técnicas de farmacia bien conocidas que consisten esencialmente en mezclar los componentes, que incluyen opcionalmente uno o más ingredientes terapéuticos accesorios.

Las formulaciones divulgadas en el presente documento pueden comprender soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas de los compuestos activos, cuyas preparaciones son preferentemente isotónicas con la sangre del receptor previsto y esencialmente libres de pirógenos. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir, pero sin limitación, agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en envases de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo, viales y ampollas selladas, y se pueden almacenar en condiciones de criodesecado (liofilizadas) que requieren solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección inmediatamente antes de su uso.

En las formulaciones, los ácidos nucleicos y las proteínas como se divultan en el presente documento pueden estar contenidos dentro de una partícula o vesícula, tal como un liposoma o microcristal, que pueden ser adecuados para administración parenteral. Las partículas pueden ser de cualquier estructura adecuada, tales como dendríticas, hiperramificadas, unilaminares o plurilaminares, siempre que contengan los ácidos nucleicos y las proteínas de la presente invención. Los lípidos cargados positivamente, tal como N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio metilsulfato, o "DOTAP", son particularmente preferidos para dichas partículas y vesículas. La preparación de dichas partículas lipídicas es bien conocida (Véanse las referencias en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.976.879 col. 6).

50 **IIIA. Ácidos nucleicos variantes de empalme:**

Una realización de la presente invención es un ácido nucleico que codifica una proteína, ya sea de longitud completa o madura, que está codificada por un ADNc procedente de un gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), particularmente HER2, donde se omite un solo exón en el ADNc, lo que da como resultado una proteína soluble. Además, la proteína codificada puede actuar como un antagonista de HER2.

Dichas secuencias se proporcionan preferentemente en forma de un marco de lectura abierto ininterrumpido mediante secuencias internas no traducidas, o intrones, que están normalmente presentes en genes eucariotas. También se puede usar ADN genómico que contiene las secuencias relevantes. En una realización, el ácido nucleico es un ARNm o un ADNc. En otra realización, es ADN genómico.

En una realización, la EGFR soluble de mamífero es un HER2 de mamífero, preferentemente un HER2 humano. Para HER2 humano soluble, dos ejemplos no limitantes de esta realización son ácidos nucleicos que codifican el Δ15HER2 que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 6 y Δ15HER2 maduro (aminoácidos 23-584 de la SEQ ID NO: 6) que carece de la secuencia señal. Ejemplos de las secuencias de estos ácidos

nucleicos Δ15HER2 son, sin limitación, los nucleótidos 1-1752 de la SEQ ID NO: 5, que incluye la secuencia señal y los nucleótidos 67-1752 de la SEQ ID NO: 5, que carece de la secuencia señal.

En el presente documento, se divulga adicionalmente que, la EGFR soluble de mamífero puede ser un HER3 de mamífero, preferentemente un HER3 humano. Para HER3 humano soluble, dos ejemplos no limitantes de esta realización son ácidos nucleicos que codifican el Δ13HER3 que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 8 o Δ13HER3 maduro (aminoácidos 20-541 de la SEQ ID NO: 8) que carece de la secuencia señal. Ejemplos de las secuencias de estos ácidos nucleicos Δ13HER3 son, sin limitación, los nucleótidos 1-1623 de la SEQ ID NO: 7, que incluye la secuencia señal y los nucleótidos 58-1623 de la SEQ ID NO: 7, que carece de la secuencia señal.

Para HER3 humano soluble, dos ejemplos no limitantes adicionales de esta realización son ácidos nucleicos que codifican el Δ14HER3 que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 10 o Δ14HER3 maduro (aminoácidos 20-555 de la SEQ ID NO: 10) que carece de la secuencia señal. Ejemplos de las secuencias de estos ácidos nucleicos Δ14HER3 son, sin limitación, los nucleótidos 1-1665 de la SEQ ID NO: 9, que incluye la secuencia señal y los nucleótidos 58-1665 de la SEQ ID NO: 9, que carece de la secuencia señal.

Para HER3 humano soluble, otros dos ejemplos no limitantes de esta realización son ácidos nucleicos que codifican el Δ15HER3 que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 12 o Δ15HER3 maduro (aminoácidos 20-569 de la SEQ ID NO: 12) que carece de la secuencia señal. Ejemplos de las secuencias de estos ácidos nucleicos Δ15HER3 son, sin limitación, los nucleótidos 1-1707 de la SEQ ID NO: 11, que incluye la secuencia señal y los nucleótidos 58-1707 de la SEQ ID NO: 11, que carece de la secuencia señal.

Las bases de los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser las bases convencionales citosina, guanina, adenina y uracilo o timidina. Opcionalmente, se pueden usar bases modificadas.

Los ácidos nucleicos adecuados de la presente invención incluyen numerosas características químicas alternativas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos adecuados de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aquellos en donde al menos uno de los restos de fosfato que hacen puentes internucleotídicos es un fosfato modificado, tal como fosforioato, metilfosfonato, metilfosfonato, fosforomorfolidato, fosforopiperazidato y fosforoamidato.

Los ácidos nucleicos de la presente invención también incluyen, pero sin limitación, aquellos en donde al menos uno de los nucleótidos es un análogo de ácido nucleico.

Los ácidos nucleicos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, modificaciones de los ácidos nucleicos que implican unir químicamente a los ácidos nucleicos una o más fracciones o conjugados. Dichas fracciones incluyen, pero sin limitación, fracciones lipídicas tales como fracciones de colesterol, ácido cólico, un tioéster, por ejemplo, hexil-S-trilitiol, un tiocolésterol, una cadena alifática, por ejemplo, dodecandiol o restos undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato, una cadena de poliamina o polietilenglicol, un ácido acético adamantano, una fracción palmitica, una fracción de octadecilamina o hexilaminocarbonil oxicolesterol.

#### IIIB. Vectores de expresión y de terapia génica

En el presente documento además se divultan vectores de expresión para amplificar o expresar ADN que codifica las proteínas anteriores de la presente invención, así como células hospedadoras transformadas con los vectores de expresión anteriores. Los vectores de expresión son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o procedentes de ADNc que codifican EGFR de mamífero soluble, particularmente HER2 o HER3, o análogos bioequivalentes unidos operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados procedentes de genes de mamífero, microbios, virus o insectos. Una unidad transcripcional comprende generalmente un conjunto de (a) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, tales como, promotores o potenciadores transcripcionales, (b) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína y (c) secuencias de inicio y terminación de la transcripción y la traducción adecuadas. Dichos elementos reguladores pueden incluir una secuencia de operador para controlar la transcripción y una secuencia que codifica sitios de unión a ARNm ribosómico adecuados. Además, se puede incorporar la capacidad de replicarse en un hospedador, generalmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes.

Las regiones de ADN se enlazan operativamente cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder de secreción) está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como parte de un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si se posiciona de manera que permite la traducción. Generalmente, ligado operativamente significa contiguo y, en el caso de líderes de secreción, contiguo y en el marco de lectura. Los elementos estructurales previstos para su uso en sistemas de expresión en levaduras incluyen preferentemente una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedadora. Como

alternativa, cuando se expresa una proteína recombinante sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un resto de metionina N-terminal. Opcionalmente, este resto puede escindirse posteriormente de la proteína expresada para proporcionar un producto final.

5 El ADN del EGFR de mamífero soluble se expresa o amplifica en un sistema de expresión recombinante que comprende un monocultivo sustancialmente homogéneo de microorganismos hospedadores adecuados, por ejemplo, bacterias tales como *E. coli* o levaduras tales como *S. cerevisiae*, que han integrado de manera estable (mediante transformación o transfección) una unidad transcripcional recombinante en ADN cromosómico o que portan la unidad transcripcional recombinante como un componente de un plásmido residente. Los sistemas de expresión recombinantes tal como se definen en el presente documento expresarán proteínas heterólogas ya sea constitutivamente o tras la inducción de los elementos reguladores unidos a la secuencia de ADN o al gen sintético a expresar.

10 Las células hospedadoras transformadas son células que se han transformado o transfectado con vectores EGFR de mamífero solubles construidos usando técnicas de ADN recombinante. Las células hospedadoras transformadas normalmente expresan sEGFR, pero las células hospedadoras transformadas para clonar o amplificar el ADN de sEGFR no necesitan expresar sEGFR. Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de EGFR soluble de mamífero incluyen procariotas, levaduras, hongos o células eucariotas superiores. Los procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen, pero sin limitación, líneas celulares de insectos y mamíferos establecidas. Los sistemas de traducción sin células también se pueden emplear para producir EGFR soluble de mamífero usando ARN procedentes de las construcciones de ADN de la presente invención. Los vectores de clonación y expresión apropiados para usar con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero son bien conocidos en la técnica.

15 20 25 30 35 Los hospedadores procariotas de expresión pueden ser útiles para la expresión de sEGFR que no se somete a un procesamiento postraduccional extenso. Los vectores de expresión procariotas generalmente comprenden uno o más marcadores fenotípicos seleccionables, por ejemplo, un gen que codifica proteínas que confieren resistencia a los antibióticos o suministran un requerimiento autotrófico, y un origen de replicación reconocido por el hospedador para asegurar la amplificación dentro del hospedador. Los hospedadores procariotas adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y varias especies del género *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, aunque otros también se pueden emplear como una opción.

40 45 Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano procedente de plásmidos disponibles comercialmente que comprenden elementos genéticos del bien conocido vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). Estas secciones de "cadena principal" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural que se va a expresar. pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y, por lo tanto, proporciona medios simples para identificar células transformadas. Dichos vectores comerciales incluyen, por ejemplo, la serie de vectores pET de Novagen® (EMD Biosciences, Inc., Madison, Wis.).

50 55 60 65 Los promotores comúnmente utilizados en vectores de expresión microbianos recombinantes incluyen el sistema promotor de lactosa y el promotor λ PL, el promotor T7 y el promotor lac T7. Un sistema de expresión bacteriano particularmente útil, el sistema pET Novagen® (EMD Biosciences, Inc., Madison, Wis.) emplea un promotor T7 o lac T7 y una cepa de *E. coli*, tal como BL21 (DE3) que contiene una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa T7.

70 75 80 85 90 Las proteínas sEGFR también se pueden expresar en hospedadores de levadura y hongos, preferentemente del género *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*. También se puede emplear levadura de otros géneros, como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura generalmente contendrán un origen de replicación del plásmido de levadura de 2m o una secuencia de replicación autónoma (ARS, por sus siglas en inglés), promotor, ADN que codifica sEGFR, secuencias para la poliadenilación y terminación de la transcripción y un gen de selección. Preferentemente, los vectores de levadura incluirán un origen de replicación y un marcador seleccionable que permita la transformación tanto de levadura como de *E. coli*, por ejemplo, el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y *S. cerevisiae* TRP1 o URA3, que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano o uracilo, respectivamente, y un promotor procedente de un gen de levadura altamente expresado para inducir la transcripción de una secuencia estructural cadena abajo. La presencia de la lesión TRP1 o URA3 en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona luego un ambiente eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano o uracilo, respectivamente.

95 100 105 110 115 Las secuencias promotoras adecuadas en vectores de levadura incluyen los promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras son bien conocidos en la técnica.

120 Los vectores de levadura preferidos se pueden ensamblar usando secuencias de ADN de pUC18 para selección y

replicación en *E. coli* (gen Amp<sup>r</sup> y origen de replicación) y secuencias de ADN de levadura que incluyen un promotor ADH2 reprimible por glucosa y un líder de secreción de factor  $\alpha$ . El líder del factor  $\alpha$  de levadura, que dirige la secreción de proteínas heterólogas, se puede insertar entre el promotor y el gen estructural que se va a expresar. La secuencia líder se puede modificar para contener, cerca de su extremo 3', uno o más sitios de restricción útiles para facilitar la fusión de la secuencia líder con genes extraños. Los expertos en la técnica conocen protocolos de transformación de levadura adecuados.

Las cepas hospedadoras transformadas mediante vectores que comprenden el promotor ADH2 se pueden cultivar para la expresión en un medio rico que consiste en extracto de levadura al 1 %, peptona al 2 % y glucosa al 1 % o 4 % complementada con 80  $\mu$ g/ml de adenina y 80  $\mu$ g/ml de uracilo. La supresión del promotor ADH2 se produce al agotarse la glucosa de los medios. Los sobrenadantes de levadura brutos se cosechan mediante filtración y se mantienen a 4 °C antes de la purificación adicional.

También se emplean ventajosamente diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto para expresar la proteína sEGFR. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero es particularmente preferida porque dichas proteínas están generalmente plegadas correctamente, modificadas de manera adecuada y son completamente funcionales. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono y otras líneas celulares capaces de expresar un vector apropiado que incluyen, por ejemplo, células L, tales como L929, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), HeLa y líneas celulares BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos, tales como un origen de replicación, un promotor adecuado, por ejemplo, el promotor CMVie, el promotor de beta-actina de pollo, o el promotor compuesto hEF1-HTLV, y el potenciador unido al gen que se va a expresar, y otras secuencias no transcritas flanqueantes en 5' o 3', y secuencias no traducidas en 5' o 3', tales como sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme y secuencias de terminación de la transcripción. Los expertos en la técnica conocen sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto.

Las secuencias de control de la transcripción y la traducción en vectores de expresión para usar en la transformación de células de vertebrados pueden ser proporcionadas por fuentes víricas. Por ejemplo, los promotores y potenciadores utilizados comúnmente proceden de Polioma, Adenovirus 2, Virus del simio 40 (SV40), citomegalovirus humano, tal como el promotor CMVie, HTLV, tal como el promotor compuesto hEF1-HTLV. Las secuencias de ADN procedentes del genoma vírico de SV40, por ejemplo, origen SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, empalme y sitios de poliadenilación se pueden usar para proporcionar los otros elementos genéticos requeridos para la expresión de una secuencia de ADN heteróloga.

Además, se pueden utilizar promotores EGFR genómicos de mamífero, tales como secuencias de control y/o señal, siempre que dichas secuencias de control sean compatibles con la célula hospedadora elegida.

En el presente documento, se divulga adicionalmente que, los vectores de expresión recombinantes que comprenden ADNc de sEGFR pueden integrarse de manera estable en el ADN de una célula hospedadora.

En el presente documento, se divulga además un método para tratar una enfermedad o afección proliferativa mediante la administración de sEGFR a un sujeto, disminuyendo así la actividad de HER2. Otra realización es un método para tratar una enfermedad o afección proliferativa mediante la administración a un sujeto de un vector de expresión que codifica sEGFR, disminuyendo así la actividad de HER2. Otra realización es un método para producir sEGFR.

Los siguientes aspectos de la presente invención se aplican a las realizaciones anteriores.

Los métodos, ácidos nucleicos, proteínas y formulaciones de la presente invención también son útiles como herramientas *in vitro* o *in vivo*.

En el presente documento, se divulga adicionalmente que, la apoptosis en células de mamífero se puede inducir mediante la administración a las células de mamífero, en una cantidad y en condiciones suficientes para inducir apoptosis, ácidos nucleicos, proteínas y formulaciones de la presente invención.

En el presente documento, se divulga adicionalmente que la materia divulgada se puede usar para tratar cualquier afección en la que el médico tiene la intención de limitar el efecto de una ruta de señalización que implica EGFR. En particular, las formulaciones de la presente invención se pueden usar para tratar una enfermedad proliferativa. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, cáncer y fibrosis pulmonar. En una realización, la afección es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, pulmón, ovario, gástrico y colon. En una realización, la afección es un cáncer que es resistente a quimioterapia. Los usos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, el tratamiento de enfermedades para las cuales los antagonistas de HER2 conocidos, tales como Herceptin, Herstatin y pertuzumab, han demostrado ser útiles.

**IIIC. Uso de vectores de expresión para aumentar los niveles de un antagonista de HER2 en un mamífero:**

En el presente documento se divulga además un proceso para aumentar los niveles de un antagonista de HER2 en un mamífero. El proceso incluye la etapa de transformar células del mamífero con un vector de expresión descrito en el presente documento, que impulsa la expresión de sEGFR como se describe en el presente documento.

- 5 El proceso es particularmente útil en mamíferos grandes tales como mascotas domésticas, aquellos utilizados para la producción de alimentos y primates. Mamíferos grandes ejemplares son perros, gatos, caballos, vacas, ovejas, ciervos y cerdos. Primates ejemplares son monos, simios y seres humanos.
- 10 Las células de mamífero se pueden transformar *in vivo* o *ex vivo*. Cuando se transforma *in vivo*, el vector de expresión se administra directamente al mamífero, tal como mediante inyección. Los medios para transformar células *in vivo* son bien conocidos en la técnica. Cuando se transforman *ex vivo*, las células se eliminan del mamífero, se transforman *ex vivo*, y las células transformadas se vuelven a implantar en el mamífero.

15 IV. Composiciones y preparaciones farmacéuticas:

- En el presente documento además se divultan composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas o ácidos nucleicos anteriores.
- 20 Los ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención se pueden mezclar, encapsular, conjugar o asociar de otra manera con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas y moléculas dirigidas a receptores, en forma de formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción.
- 25 Las formulaciones divulgadas en el presente documento comprenden ácidos nucleicos o proteínas en un vehículo fisiológica o farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Por lo tanto, las formulaciones para usar como se divultan en el presente documento incluyen, pero sin limitación, aquellas adecuadas para administración parenteral, incluyendo inyección o infusión intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraarticular o intramuscular, así como aquellas adecuadas para administración tópica, oftálmica, vaginal, oral, rectal o pulmonar (incluida la inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluso administración mediante nebulizador, intratraqueal e intranasal). Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. La ruta de administración más adecuada en cualquier caso dado puede depender del sujeto, la naturaleza y la gravedad de la afección que se está tratando, y el compuesto activo particular que se está utilizando.
- 35 Las composiciones farmacéuticas como se divultan en el presente documento incluyen, pero sin limitación, sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables, es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto original y no presentan propiedades toxicológicas no deseadas. Ejemplos de dichas sales son (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; y (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido palmitico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico y similares.

45 V. Oligómeros de cambio de empalme (SSO):

- 50 En otro aspecto, la presente invención emplea oligonucleótidos de cambio de empalme u oligómeros de cambio de empalme (SSO, por sus siglas en inglés) para controlar el empalme alternativo de HER2 o HER3 de modo que se aumente la cantidad de una forma soluble y, opcionalmente, se disminuya la cantidad de la forma de membrana integral. Los métodos y composiciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades asociadas con una actividad excesiva de HER2.
- 55 En el presente documento, se divulga además un método para tratar una enfermedad o afección proliferativa mediante la administración de SSO a un paciente. Los SSO que se administran alteran el empalme de un pre-ARNm para producir una forma soluble de HER2 o HER3. , La forma soluble es Δ15HER2, Δ13HER3, , Δ14HER3, , la forma soluble es Δ15HER3, o la forma p85 de HER3.
- 60 Asimismo, se divulga un método para producir una forma soluble de HER2 o HER3 en una célula mediante la administración de SSO a la célula. Además, se divulga un método para inducir apoptosis en células de mamífero mediante la administración de SSO a la célula de mamífero.
- 65 La longitud del SSO (es decir, el número de monómeros en el oligómero) es similar a un oligonucleótido antisentido (ASON, por sus siglas en inglés), normalmente entre aproximadamente 8 y 30 nucleótidos. El SSO puede estar entre aproximadamente 10 a 30, más preferentemente 15 a 25, nucleótidos. El método se puede llevar a la práctica con

SSO compuestos por varias químicas que se hibridan con ARN, pero que no activan la destrucción del ARN diana por la ARNasa H, como lo hacen los oligonucleótidos antisentido 2'-desoxi convencionales. La invención se puede llevar a la práctica usando oligómeros de ácido nucleico modificados en 2'O, tal como donde el 2'O se reemplaza con -O-CH<sub>3</sub>, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH o -F, donde 2'O-metilo (2'-OMe) o se prefiere 2'O-metiloxetilo (MOE). Las nucleobases no necesitan estar unidas a azúcares. Se pueden usar los llamados oligómeros de ácido nucleico peptídico u oligómeros basados en morfolina. Una comparación de estas diferentes características químicas de enlace se encuentra en Sazani, P. et al., 2001, Nucleic Acids Res. 29:3695 y en Crooke, S. T. (2008) Antisense Drug Technology, Boca Ratón, CRC Press. La expresión oligonucleótido de cambio de empalme (SSO) está destinado a cubrir las formas anteriores. El SSO descrito en los ejemplos incluye oligómeros 2'-OMe y MOE. Será obvio para un experto en la técnica que se pueden usar químicas oligoméricas adicionales para llevar a la práctica el método que incluye oligómeros de morfolino unidos a fosforodiamidato (PMO, por sus siglas en inglés) u oligómeros de ácido nucleico bloqueado (LNA) como se describe a continuación.

Los SSO de esta invención se pueden hacer a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la técnica se puede usar adicionalmente o alternativamente. Es bien sabido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

Las bases del SSO pueden ser las bases convencionales de citosina, guanina, adenina y uracilo o timidina. Como alternativa, se pueden usar bases modificadas. De particular interés son las bases modificadas que aumentan la afinidad de unión. Un ejemplo no limitante de bases modificadas preferidas es los llamados nucleótidos de pinza G o de 9-(aminoetoxi)fenoxazina, análogos de citosina que forman 4 enlaces de hidrógeno con guanosina. (Flanagan, W.M., et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96:3513; Holmes, S.C., 2003, Nucleic Acids Res. 31:2759). Los ejemplos específicos de otras bases incluyen, pero sin limitación, 5-metilcitosina (<sup>Me</sup>C), isocitosina, pseudoisocitosina, 5-(1-propinil)-citosina, 5-bromouracilo, 5-(1-propinil)-uracilo, 5-propinil-6, 5-metiltiazoleuracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, 2,6-diaminopurina, 7-propino-7-deazaadenina, 7-propino-7-deazaguanina y 2-cloro-6-aminopurina.

Los expertos en la materia apreciarán la relación entre los oligonucleótidos antisentido gapmers y los SSO. Los gapmers son ASON que contienen una región activadora de RNasa H (normalmente un fosforotioato de 2'-desoxirribonucleósido) que está flanqueada por oligómeros resistentes a la nucleasa no activadores. En general, cualquier química adecuada para las secuencias flanqueantes en un ASON gapmer se puede usar en un SSO. Por razones similares, las químicas de ASON que inducen la actividad de RNasa H y no contienen oligómeros resistentes a nucleasas flanqueantes tampoco son apropiadas como SSO.

#### VA. Oligómeros de morfolino fosforodiamidato como SSO

Un ejemplo de una química SSO preferida incluye oligonucleótidos de morfolino que tienen enlaces de cadena principal que contienen fósforo como se ilustra en las Figuras 13A-13G. También se prefiere un oligonucleótido de morfolino unido a fosforodiamidato (PMO) tal como se muestra en la Figura 13C, que se modifica, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, para contener grupos cargados positivamente en, preferentemente, un 10 %-50 % de sus enlaces de la cadena principal. Los oligonucleótidos de morfolino con enlaces de la cadena principal sin carga, incluidos los oligonucleótidos antisentido, se detallan, por ejemplo, en (Summerton, J. y D. Weller (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7(3): 187-95) y en las patentes copropiedad de los Estados Unidos N.º 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.521.063 y 5.506.337, todas las cuales se incorporan expresamente en el presente documento como referencia.

Las propiedades importantes de las subunidades basadas en morfolino incluyen: 1) la capacidad de unirse en una forma oligomérica mediante enlaces de la cadena principal estables, sin carga o con carga positiva; 2) la capacidad de soportar una base nucleotídica (por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo e inosina) de modo que el polímero formado se pueda hibridar con un ácido nucleico diana de base complementaria, que incluye ARN diana, valores de Tm superiores a aproximadamente 45 °C en oligonucleótidos relativamente cortos (por ejemplo, 10-15 bases); 3) la capacidad del oligonucleótido para transportarse activa o pasivamente a células de mamífero; y 4) la capacidad del oligonucleótido antisentido: ARN heteroduplex para resistir la degradación de ARNasa y RNasa H, respectivamente.

Cadenas principales ejemplares para oligonucleótidos antisentido de la materia reivindicada incluyen los tipos de subunidades de morfolino mostrados en las Figuras 13D-G, cada uno unido por un enlace de subunidad que contiene fósforo sin carga o con carga positiva. La Figura 13D muestra un enlace que contiene fósforo que forma la cadena principal de la unidad de repetición de cinco átomos, donde los anillos de morfolino están unidos mediante un enlace de fosfoamida de 1 átomo. La Figura 13E muestra un enlace que produce una cadena principal de unidad de repetición de 6 átomos. En esta estructura, el átomo Y que une el carbono morfolino en 5' al grupo fósforo puede ser azufre, nitrógeno, carbono o, preferentemente, oxígeno. La fracción X colgante del fósforo puede ser flúor, un alquilo o alquilo sustituido, un alcoxi o alcoxi sustituido, un tioalcoxi o tioalcoxi sustituido, o nitrógeno no sustituido, monosustituido o disustituido, incluyendo estructuras cíclicas, tales como morfolinas o piperidinas. Alquilo, alcoxi y tioalcoxi incluyen preferentemente 1-6 átomos de carbono. Las fracciones Z son azufre u oxígeno, y son

preferentemente oxígeno.

Los enlaces que se muestran en las Figuras 13F y 13G están diseñados para cadenas principales de unidad de longitud de 7 átomos. En la Estructura 13F, la fracción X es como en la Estructura 13E, y la fracción Y puede ser

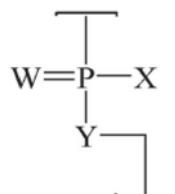
5 metileno, azufre o, preferentemente, oxígeno. En la Estructura 13G, las fracciones X e Y son como en la Estructura 13E. Los oligonucleótidos de morfolino particularmente preferidos incluyen aquellos compuestos por estructuras de subunidades de morfolino de la forma mostrada en la Figura 13E, donde X = NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, o 1-piperazina u otro grupo cargado, Y = O y Z = 0.

10 Como se ha indicado anteriormente, el oligonucleótido sustancialmente sin carga puede modificarse, de acuerdo con un aspecto de la invención, para incluir enlaces cargados, por ejemplo, hasta aproximadamente 1 por cada 2-5 enlaces sin carga, tal como aproximadamente 4-5 por cada 10 enlaces sin carga. Se puede ver una mejora óptima en la actividad antisentido cuando aproximadamente un 25 % de los enlaces de la cadena principal son catiónicos.

15 La mejora subóptima se ve normalmente con un número pequeño, por ejemplo, 10-20 % de enlaces catiónicos, y cuando el número de enlaces catiónicos está en el intervalo del 50-80 %, y normalmente por encima de aproximadamente un 60 %, la especificidad de secuencia de la unión antisentido a su diana puede verse comprometida o perdida.

20 Los compuestos antisentido se pueden preparar mediante síntesis en fase sólida por etapas, empleando métodos detallados en las referencias citadas anteriormente, y a continuación con respecto a la síntesis de oligonucleótidos que tienen una mezcla o enlaces de la cadena principal catiónicos y no cargados. En algunos casos, puede ser deseable añadir fracciones químicas adicionales al compuesto antisentido, por ejemplo, para mejorar la farmacocinética o para facilitar la captura o detección del compuesto. Dicha fracción puede estar unida covalentemente, normalmente a un extremo del oligómero, de acuerdo con métodos sintéticos estándar. Por ejemplo, la adición de una fracción de polietilenglicol u otro polímero hidrófilo, por ejemplo, uno que tenga 10-100 subunidades monoméricas, puede ser útil para mejorar la solubilidad. Uno o más grupos cargados, por ejemplo, grupos cargados aniónicos tales como un ácido orgánico, pueden mejorar la captación celular. Se puede unir una fracción informadora, tal como fluoresceína o un grupo radiomarcado, para fines de detección. Como alternativa, el marcador informador unido al oligómero puede ser un ligando, tal como un antígeno o biotina, capaz de unirse a un anticuerpo marcado o estreptavidina. Al seleccionar una fracción para la unión o modificación de un compuesto antisentido, generalmente es deseable seleccionar compuestos químicos de grupos que sean biocompatibles y que puedan ser tolerados por un sujeto sin efectos secundarios indeseables.

25 30 35 Como se ha indicado anteriormente, el compuesto antisentido se puede construir opcionalmente para contener un número seleccionado de enlaces catiónicos intercalados con enlaces no cargados del tipo descrito anteriormente. Los enlaces entre subunidades, tanto sin carga como catiónicos, son preferentemente enlaces que contienen fósforo, que tienen la estructura:



40 donde

W es S u O, y es preferentemente O,

X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> u OR<sup>6</sup>,

Y = O o NR<sup>7</sup>, y cada uno de dichos enlaces en el oligómero se selecciona de:

45 (a) enlace sin carga (a), donde cada uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior;

(b1) enlace catiónico (b1), donde X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> e Y = O, y NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> representa un grupo piperazino opcionalmente sustituido, de modo que R<sup>1</sup>R<sup>2</sup> = -CHR<sub>1</sub>CHR<sub>2</sub>(R<sup>3</sup>)(R<sup>4</sup>)CHR<sub>3</sub>CHR<sub>4</sub>-, donde

50 cada R es independientemente H o CH<sub>3</sub>, R<sup>3</sup> es H, CH<sub>3</sub>, o un par de electrones, y R<sup>4</sup> es H, CH<sub>3</sub>, o un par de electrones, y

R<sup>5</sup> se selecciona de H, alquilo inferior, por ejemplo, CH<sub>3</sub>, C(=NH)NH<sub>2</sub>, Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, y [C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>H, donde: Z es C(O) o un enlace directo, L es un enlazador opcional de hasta 18 átomos de longitud, preferentemente de hasta 12 átomos, y más preferentemente de hasta 8 átomos de longitud, con enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo del mismo de uno o dos carbonos, y m es de 1 a 6, preferentemente de 1 a 4;

55 (b2) enlace catiónico (b2), donde X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> e Y = O, R<sup>1</sup> = H o CH<sub>3</sub>, y R<sup>2</sup> = LNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, donde L, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son como se definieron anteriormente, y R<sup>5</sup> es H, alquilo inferior o (alcoxi)alquilo inferior; y

60 (b3) enlace catiónico (b3), donde Y = NR<sup>7</sup> y X = OR<sup>6</sup>, y R<sup>7</sup> = LNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, donde L, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son como se definieron anteriormente, y R<sup>6</sup> es H o alquilo inferior;

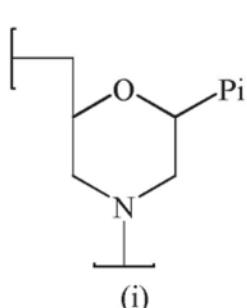
5 y al menos uno de dichos enlaces se selecciona de enlaces catiónicos (b1), (b2), y (b3).

Preferentemente, el oligómero incluye al menos dos enlaces consecutivos de tipo (a) (es decir, enlaces no cargados). En otras realizaciones, al menos un 5 % de los enlaces en el oligómero son enlaces catiónicos (es decir, tipo (b1), (b2) o (b3)); por ejemplo, de un 10 % a un 60 % y, preferentemente, un 20-50 % de enlaces pueden ser enlaces catiónicos.

10 En una realización, al menos un enlace es del tipo (b1), donde, preferentemente, cada R es H, R<sup>4</sup> es H, CH<sub>3</sub> o un par de electrones, y R<sup>3</sup> se selecciona de H, alquilo inferior, por ejemplo, CH<sub>3</sub>, C(=NH)NH<sub>2</sub> y C(O)-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. Las dos últimas realizaciones de R<sup>3</sup> proporcionan una fracción de guanidino, unida directamente al anillo de piperazina, o colgante a un grupo enlazador L, respectivamente. Para facilitar la síntesis, la variable Z en R<sup>3</sup> es preferentemente C(O) (carbonilo), tal como se muestra.

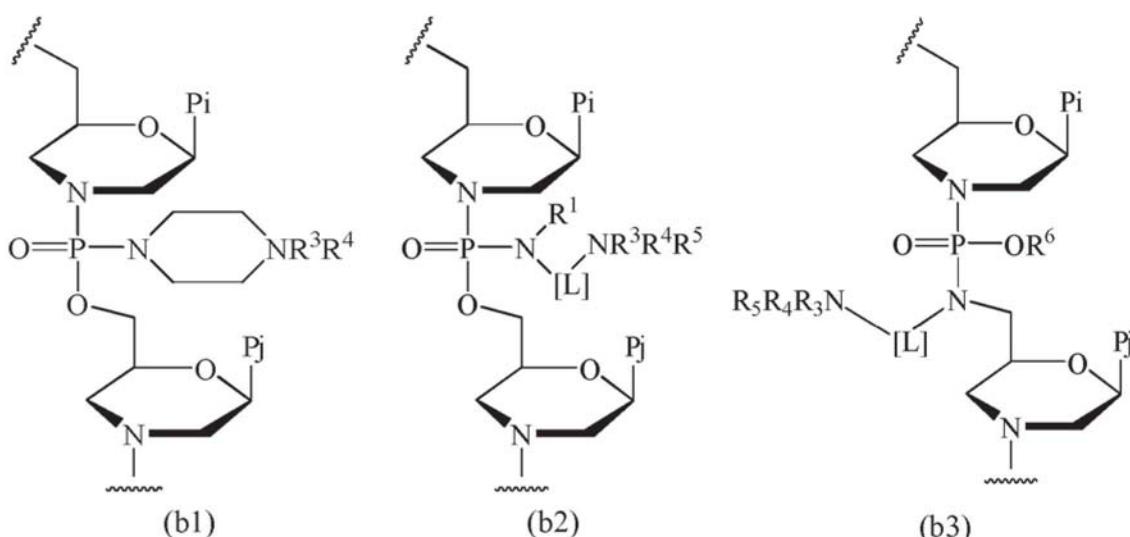
15 El grupo enlazador L, como se ha indicado anteriormente, contiene enlaces en su cadena principal seleccionados de alquilo (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), alcoxi (-C-O-) y alquilamino (por ejemplo, CH<sub>2</sub>-NH-), con la condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, aquellos adyacentes a carbonilo o nitrógeno) sean átomos de carbono. Aunque los enlaces ramificados (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>-CHCH<sub>3</sub>-) son posibles, el enlazador preferentemente no está ramificado. En una realización, el enlazador es un enlazador de hidrocarburos. Dicho enlazador puede tener la estructura -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, donde n es 1-12, preferentemente 2-8, y más preferentemente 2-6.

20 Las subunidades morfolinas tienen la estructura:



25 donde Pi es una fracción de emparejamiento de bases, y los enlaces representados anteriormente conectan el átomo de nitrógeno de (i) al carbono 5 de una subunidad adyacente. Las fracciones de emparejamiento de bases Pi pueden ser iguales o diferentes, y generalmente están diseñadas para proporcionar una secuencia que se une a un ácido nucleico diana.

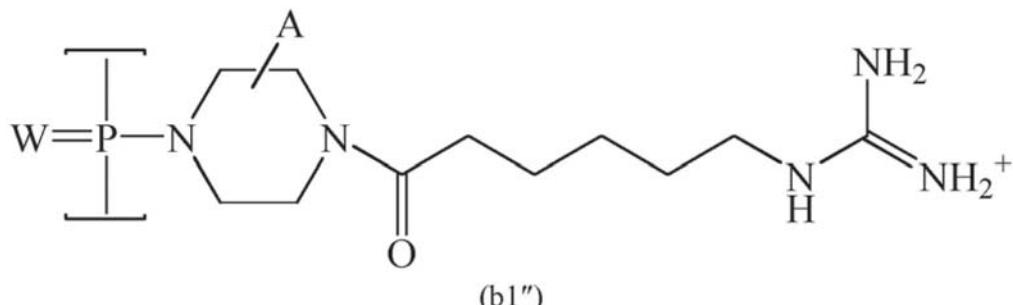
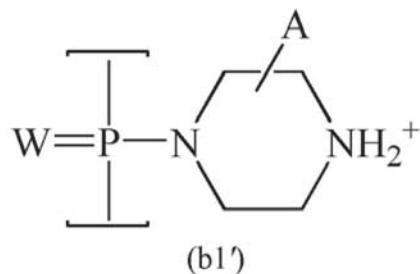
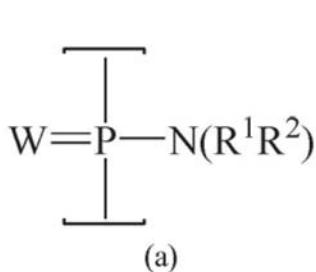
30 El uso de realizaciones de los tipos de enlace (b1), (b2) y (b3) anteriores para unir las subunidades morfolinas puede ilustrarse gráficamente de la siguiente manera:



35 Preferentemente, todos los enlaces catiónicos en el oligómero son del mismo tipo; es decir, todo de tipo (b1), todo de tipo (b2) o todo de tipo (b3).

En otras realizaciones, los enlaces catiónicos se seleccionan de los enlaces (b1') y (b1'') como se muestra a continuación, donde (b1') se denomina en el presente documento como un enlace "Pip" y (b1'') se denomina en el

presente documento como un enlace "GuX":.



5

En las estructuras anteriores, W es S u O, y es preferentemente O; cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior, y es preferentemente metilo; y A representa hidrógeno o un sustituyente no interferente en uno o más átomos de carbono en (b1') y (b1''). Preferentemente, los carbonos del anillo en el anillo de piperazina no están sustituidos; sin embargo, pueden incluir sustituyentes no interferentes, tales como metilo o flúor. Preferentemente, como máximo uno o dos átomos de carbono están así sustituidos.

En otras realizaciones, al menos un 10 % de los enlaces son del tipo (b1') o (b1''); por ejemplo, de un 10 %-60 % y preferentemente de un 20 % a un 50 %, de los enlaces pueden ser del tipo (b1') o (b1'').

15

En otras realizaciones, el oligómero no contiene enlaces del tipo (b1') anterior. Como alternativa, el oligómero no contiene enlaces de tipo (b1) donde cada R es H, R<sup>3</sup> es H o CH<sub>3</sub>, y R<sup>4</sup> es H, CH<sub>3</sub> o un par de electrones.

20

Las subunidades morfolinas también pueden estar unidas mediante enlaces intersubunidades no basadas en fósforo, como se describe adicionalmente a continuación, donde al menos un enlace se modifica con un grupo catiónico colgante como se describió anteriormente.

25

Se podrían usar otros enlaces análogos de oligonucleótidos que no están cargados en su estado no modificado pero que también podrían llevar un sustituyente de amina colgante. Por ejemplo, un átomo de nitrógeno en 5' en un anillo de morfolino podría emplearse en un enlace de sulfamida o un enlace de urea (donde el fósforo se reemplaza con carbono o azufre, respectivamente) y modificarse de manera análoga al átomo de nitrógeno en 5' en la estructura (b3) anterior.

30

Se proporcionan oligómeros que tienen cualquier número de enlaces catiónicos, incluidos oligómeros con enlaces completamente catiónicos. Preferentemente, sin embargo, los oligómeros no están cargados o están parcialmente cargados, teniendo, por ejemplo, un 10 %-80 %. En realizaciones preferidas, aproximadamente de un 10 % a un 60 % y, preferentemente, de un 20 % a un 50 % de los enlaces son catiónicos.

35

En una realización, los enlaces catiónicos están intercalados a lo largo de la cadena principal. Los oligómeros parcialmente cargados contienen preferentemente al menos dos enlaces no cargados consecutivos; es decir, el oligómero preferentemente no tiene un patrón estrictamente alternativo a lo largo de toda su longitud.

40

También se consideran oligómeros que tienen bloques de enlaces catiónicos y bloques de enlaces no cargados; por ejemplo, un bloque central de enlaces no cargados puede estar flanqueado por bloques de enlaces catiónicos, o viceversa. En una realización, el oligómero tiene aproximadamente regiones 5', 3' y centrales de igual longitud, y el porcentaje de enlaces catiónicos en la región central es mayor que aproximadamente un 50 %, preferentemente mayor que aproximadamente un 70 %.

45

Los oligómeros para usar en aplicaciones antisentido generalmente varían en longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 subunidades, más preferentemente de aproximadamente 10 a 30 subunidades, y normalmente de 15 a 25 bases. Por ejemplo, un oligómero de la invención que tiene 19-20 subunidades, una longitud útil para un compuesto antisentido, idealmente puede tener de dos a diez, por ejemplo, de cuatro a ocho, enlaces catiónicos, y el

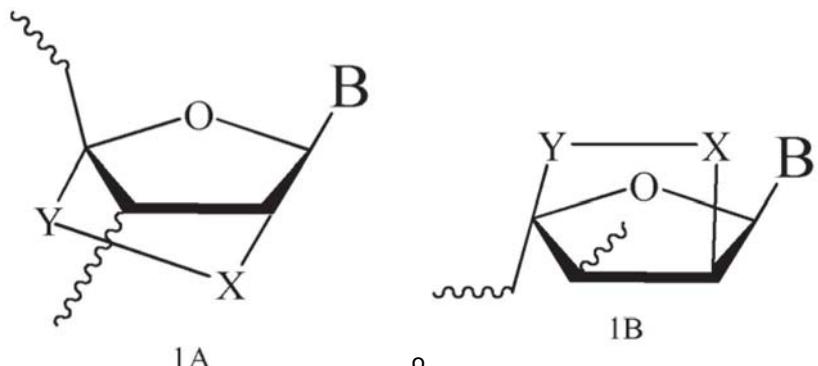
resto enlaces no cargados. Un oligómero que tiene 14-15 subunidades puede idealmente tener de dos a cinco, por ejemplo, 3 o 7, enlaces catiónicos y el resto enlaces no cargados.

Cada estructura de anillo de morfolino soporta una fracción de emparejamiento de bases, para formar una secuencia de fracciones de emparejamiento de bases que está normalmente diseñada para hibridarse con una diana antisentido seleccionada en una célula o en un sujeto que está siendo tratado. La fracción de emparejamiento de bases puede ser una purina o pirimidina que se encuentra en el ADN o ARN natural (A, G, C, T o U) o un análogo, tal como hipoxantina (el componente base del nucleósido inosina) o 5-metil citosina.

10 VB. Ácidos nucleicos bloqueados como SSO

Otra química preferida apropiada para los SSO se proporciona por los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) (Koshkin, A.A., et al., 1998, Tetrahedron 54:3607; Obika, S., et al., 1998, Tetrahedron Lett. 39:5401). Como se usa en el presente documento, las expresiones "unidad de LNA", "monómero de LNA", "resto de LNA", "unidad de ácido nucleico bloqueado", "monómero de ácido nucleico bloqueado" o "resto de ácido nucleico bloqueado", se refieren a un análogo de nucleósido bicíclico. Las unidades de LNA y los métodos de su síntesis se describen, entre otros, en los documentos WO 99/14226, WO 00/56746, WO 00/56748, WO 01/25248, WO 02/28875, WO 03/006475 y WO 03/095467. La unidad LNA también se puede definir con respecto a su fórmula química. Por tanto, una "unidad de LNA", como se usa en el presente documento, tiene la estructura química que se muestra en la Fórmula 1 a continuación:

Fórmula 1



25 en donde,

X se selecciona del grupo que consiste en O, S y NRH, donde R es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; Y es (-CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, donde r es un número entero de 1-4; y

30 B es una base de origen natural o no natural como se describió anteriormente.

En una realización preferida, r es 1 o 2, y en una realización más preferida r es 1.

35 Cuando se emplean nucleótidos de LNA en un SSO, se prefiere que los nucleótidos no de LNA también estén presentes. Los nucleótidos de LNA tienen afinidades de hibridación tan altas que puede haber una unión no específica significativa, lo que puede reducir la concentración eficaz del SSO libre. Cuando se usan nucleótidos de LNA, se pueden alternar convenientemente con 2'-desoxinucleótidos. El patrón de alternancia no es crítico. Se pueden usar nucleótidos alternos, dinucleótidos alternos o patrones mixtos, por ejemplo, LDLDLD o LLDLLD o LDDLDD. Por ejemplo, una realización contiene una secuencia de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en:

40 LdlddlLddldldlL, LdldllLddllLdil, LMLMMMLMMMLMLL, LMLMLLLMMMLLLMLL, LFLFFLLFFLFLFL, LFLFLLLFFLFL, Lddldddldl, dldddldld, dldddldld, LMMLMMMLML, MLMMMLMMML, MMLMMMLMMML, LFLFLFLFFL, FLFFLFFLFF, FFLFFLFFLFF, dldldldldl, Ldldldldl, MLMLMLMLML, LMLMLMLML, FLFLFLFLFL, LFLFLFLFL, donde L es una unidad de LNA, d es una unidad de ADN, M es 2'MOE, F es 2'flúor.

45 Cuando se mezclan 2'-desoxinucleótidos o 2'-desoxinucleósidos fosforotioatos con nucleótidos de LNA, es importante evitar la activación de la RNasa H. Se espera que entre aproximadamente un tercio y dos tercios de los nucleótidos de LNA de un SSO sean adecuados para evitar la activación de la RNasa H. Cuando se usan modificaciones que aumentan la afinidad, que incluyen, pero sin limitación, nucleótidos de LNA o de pinza G, la persona experta reconocerá que puede ser necesario aumentar la proporción de dichas modificaciones que aumentan la afinidad.

50 Numerosos ejemplos adicionales de químicas alternativas que no activan la RNasa H están disponibles. Por

ejemplo, los SSO adecuados pueden ser oligonucleótidos en los que al menos uno de los restos de fosfato que forma puentes internucleotídicos es un fosfato modificado, tal como metilfosfonato, metilfosfonotioato, fosforomorfolidato, fosforopiperazidato y fosforoamidato. Por ejemplo, cada uno de los restos de fosfato que forman puentes internucleotídicos se puede modificar como se describe. En otro ejemplo no limitante, dichos SSO son oligonucleótidos en los que al menos uno de los nucleótidos contiene una fracción alquilo inferior 2' (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo e isopropilo). Por ejemplo, cada uno de los nucleótidos se puede modificar como se describe. (Véanse las referencias en la patente de los Estados Unidos 5.976.879 col. 4). Para usar *in vivo*, se prefieren los enlaces de fosforotioato.

- 5 10 La longitud del SSO será de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 bases de longitud. Los expertos en la materia aprecian que cuando se usan modificaciones químicas que aumentan la afinidad, el SSO puede ser más corto y aún retener la especificidad. Los expertos en la materia apreciarán además que se impone un límite superior en el tamaño del SSO por la necesidad de mantener un reconocimiento específico de la secuencia diana, y evitar la autohbridación del SSO por la estructura secundaria y por la necesidad de entrar en la célula. Estas limitaciones implican que un SSO de longitud creciente (más allá de una determinada longitud que dependerá de la afinidad del SSO) se encontrará con mayor frecuencia como menos específico, inactivo o poco activo.
- 15

#### VC. Modificaciones químicas y conjugados de SSO

- 20 Los SSO de la invención incluyen, pero sin limitación, modificaciones del SSO que implican unir químicamente al SSO una o más fracciones o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del SSO. Dichas fracciones incluyen, pero sin limitación, péptidos, fracciones lipídicas tales como fracciones de colesterol, ácido cólico, un tioéster, por ejemplo, hexil-S-trilitiol, un tiocolsterol, una cadena alifática, por ejemplo, dodecandiol o restos undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato, una cadena de poliamina o polietilenglicol, un ácido acético adamantano, una fracción palmítica, una fracción de octadecilamina o hexilaminocarbonil oxicolesterol.
- 25

Una modificación química preferida de SSO incluye una fracción oligonucleotídica conjugada con una fracción de transporte de péptido rica en arginina eficaz para mejorar el transporte del compuesto a las células. La fracción de transporte se une preferentemente a un extremo del oligómero, tal como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 13B y 13C. La fracción de transporte de péptidos comprende preferentemente de 6 a 16 subunidades seleccionadas de subunidades X', subunidades Y' y subunidades Z', donde

- 30 35 (a) cada subunidad X' representa independientemente lisina, arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un  $\alpha$ -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de la estructura  $R^1N=C(NH_2)R^2$ , donde  $R^1$  es H o R;  $R^2$  es R, NH<sub>2</sub>, NHR o NR<sub>2</sub>, donde R es alquilo inferior o alquenilo inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno;  $R^1$  y  $R^2$  pueden formar juntos un anillo; y la cadena lateral está unida a dicho aminoácido a través de  $R^1$  o  $R^2$ ;
- 40 (b) cada subunidad Y' representa independientemente un aminoácido neutro -C(O)-(CHR)<sub>n</sub>-NH-, donde n es de 2 a 7 y cada R es independientemente H o metilo; y
- (c) cada subunidad Z' representa independientemente un  $\alpha$ -aminoácido que tiene una cadena lateral de aralquilo neutro;
- 45 en donde el péptido comprende una secuencia representada por uno de (X'Y'X')<sub>p</sub>, (X'V')<sub>m</sub>, y (X'Z'Z')<sub>p</sub>, donde p es de 2 a 5 y m es de 2 a 8.

En realizaciones seleccionadas, para cada X', la fracción de cadena lateral es guanidilo, como en la subunidad de aminoácidos arginina (Arg). En otras realizaciones, cada Y' es -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CHR-NH-, donde n es de 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y' es una subunidad del ácido 6-aminohexanoico, abreviada en el presente documento como Ahx; cuando n es 2 y R es H, Y' es una subunidad de  $\beta$ -alanina, abreviada en el presente documento como B.

- 50 55 Los péptidos preferidos de este tipo incluyen aquellos que comprenden dímeros de arginina que se alternan con subunidades Y' únicas, donde Y' es preferentemente Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula (RY'R)<sub>p</sub> o la fórmula (RRY')<sub>p</sub>, donde Y' es preferentemente Ahx. En una realización, Y' es una subunidad del ácido 6-aminohexanoico, R es arginina y p es 4.

En una realización adicional, cada Z' es fenilalanina, y m es 3 o 4.

- 60 65 El péptido conjugado se une preferentemente a un extremo del oligómero a través de un enlazador Ahx-B, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de  $\beta$ -alanina, tal como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 13B y 13C.

En realizaciones seleccionadas, para cada X', la fracción de cadena lateral se selecciona independientemente del grupo que consiste en guanidilo (HN=C(NH<sub>2</sub>)NH-), amidinilo (HN=C(NH<sub>2</sub>)C<), 2-aminodihidropirimidilo, 2-aminotetrahidropirimidilo, 2-aminopiridinilo y 2-aminopirimidonilo, y se selecciona preferentemente de guanidilo y

amidinilo. En una realización, la fracción de cadena lateral es guanidilo, como en la subunidad de aminoácidos arginina (Arg).

Las subunidades Y' son contiguas, en el sentido de que ninguna subunidad X' interviene entre subunidades Y', o intercaladas individualmente entre subunidades X'. Sin embargo, la subunidad de enlace puede estar entre las subunidades Y'. En una realización, las subunidades Y' están en un extremo del transportador; en otras realizaciones, están flanqueadas por subunidades X'. En realizaciones preferidas adicionales, cada Y' es -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CHR-NH-, donde n es de 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y' es una subunidad del ácido 6-aminohexanoico, abreviada en el presente documento como Ahx. En realizaciones seleccionadas de este grupo, 5 cada X' comprende una fracción de cadena lateral de guanidilo, como en una subunidad de arginina. Los péptidos preferidos de este tipo incluyen aquellos que comprenden dímeros de arginina que se alternan con subunidades Y' únicas, donde Y' es preferentemente Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula (RY'R)<sub>4</sub> o la fórmula (RRY')<sub>4</sub>, donde Y' es preferentemente Ahx. En el último caso, el análogo de ácido nucleico está preferentemente 10 unido a una subunidad Y' terminal, preferentemente en el extremo C, tal como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 13B y 13C. El enlazador preferido es de la estructura AhxB, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de β-alanina.

Se ha demostrado que las fracciones de transporte descritas anteriormente mejoran en gran medida la entrada 20 celular de oligómeros unidos, en relación con la captación del oligómero en ausencia de la fracción de transporte unida, y en relación con la captación mediante una fracción de transporte unida que carece de las subunidades hidrófobas Y'. Dicha captación mejorada se evidencia preferentemente mediante al menos un aumento doble, y preferentemente un aumento de cuatro veces, en la captación del compuesto en células de mamífero con respecto a la captación del agente mediante una fracción de transporte unida que carece de las subunidades hidrófobas Y'. La captación se mejora preferentemente al menos veinte veces, y más preferentemente cuarenta veces, con respecto al 25 compuesto no conjugado.

Un beneficio adicional de la fracción de transporte es su capacidad esperada para estabilizar un pareado entre un compuesto antisentido y su secuencia de ácido nucleico diana, presumiblemente en virtud de la interacción 30 electrostática entre la fracción de transporte cargada positivamente y el ácido nucleico cargado negativamente. El número de subunidades cargadas en el transportador es inferior a 14, como se indicó anteriormente, y preferentemente entre 8 y 11, ya que un número demasiado alto de subunidades cargadas puede conducir a una reducción en la especificidad de secuencia.

El uso de transportadores peptídicos ricos en arginina (es decir, péptidos que penetran en las células) son 35 particularmente útiles en la práctica de la presente invención. Se ha demostrado que determinados transportadores peptídicos son altamente eficaces en la administración de compuestos antisentido a los leucocitos primarios (Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007) J. Immunological Methods 325(1-2): 114-126). Asimismo, en comparación con otros transportadores peptídicos conocidos como Penetratin, los transportadores peptídicos descritos en el 40 presente documento, cuando se conjugan con una PMO antisentido, demuestran una capacidad mejorada para alterar el empalme de varios transcritos de genes (Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007) J. Immunological Methods 325(1-2): 114-126). Especialmente preferidos son los péptidos de transporte P007 y CPO6062 enumerados a continuación en la Tabla 3 (SEQ ID NOS: 62 y 53, respectivamente).

Ejemplos de transportadores peptídicos, incluyendo los enlazadores (B o AhxB), se dan a continuación en la Tabla 1. 45 Las secuencias preferidas son las designadas P007 (SEQ ID NO: 62) y CPO6020 (SEQ ID NO: 53). También se prefieren, en la presente invención, los transportadores peptídicos identificados como las SEQ ID NO: 48-50. Como se describe en el Ejemplo 4, estos péptidos mostraron una administración superior a los tejidos mamarios (SEQ ID NOS: 56-58) y de ovario (SEQ ID NO: 58) y pueden resultar valiosos cuando los tejidos cancerosos procedentes de esos tejidos se dirigen con el SSO de la presente invención.

50 Tabla 1. Transportadores peptídicos ejemplares para administración intracelular de PMO

Péptido	Secuencia (N terminal a C terminal)	SEQ ID
R <sub>8</sub> XB	RRRRRRRR-XB	52
(RXRRBR) <sub>2</sub> -XB	RXRRBRRRXRRBR-XB	53
(RXR) <sub>3</sub> RBR-XB	RXRRXRRXRRBR-XB	54
(RB) <sub>5</sub> RXRBRX-B	RBRBRBRBRBRXRBRX-B	55
(RBRBRBRX) <sub>2</sub> -X	RBRBRBRXRBRBRBRX-X	56
X-(RB) <sub>3</sub> RX(RB) <sub>3</sub> RX	XRBRRBRBRXRBRBRBR-X	57

(continuación)

Péptido	Secuencia (N terminal a C terminal)	SEQ ID
(RBRX) <sub>4</sub> B	RBRXRBRXRBRXRBRX-B	58
(RB) <sub>4</sub> (RX) <sub>4</sub> B	RBRBRBRBRXRXRXRX-B	59
RX(RB) <sub>2</sub> RX(RB) <sub>3</sub> RX-X	RXRBRBRXRBRBRBRX	60
(rXr) <sub>4</sub>	rXrrXrrXrrXr-XB	61
(RAhxR) <sub>4</sub> AhxB	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB	62
(RRAhx) <sub>4</sub> B	RRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	63
(AhxRR) <sub>4</sub> AhxB	AhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	64
(RAhx) <sub>6</sub> B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	65
(RAhx) <sub>8</sub> B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	66
(RAhxR) <sub>3</sub> AhxB	RAhxRRAhxRRAhxRAhxB	67

No es necesario que todas las posiciones en un SSO dado estén modificadas de manera uniforme y, de hecho, se pueden incorporar más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas en un solo compuesto o incluso en un solo nucleósido dentro de un SSO.

5 Los SSO se pueden mezclar, encapsular, conjugar o asociar de otra manera con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptores, en forma de formulación oral, rectal, tópica u otra, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción.

10 Los expertos en la materia aprecian que la diferenciación celular incluye, pero sin limitación, la diferenciación del empalmosoma. En consecuencia, la actividad de cualquier SSO particular puede depender del tipo de célula en la que se introducen. Por ejemplo, los SSO que son eficaces en un tipo de célula pueden ser ineficaces en otro tipo de célula.

15 VD. Métodos y aplicaciones de los SSO

Los métodos, oligonucleótidos y formulaciones de la presente invención también son útiles como herramientas *in vitro* o *in vivo* para examinar el empalme en genes humanos o animales. Dichos métodos se pueden llevar a cabo mediante los procedimientos descritos en el presente documento, o modificaciones de los mismos que serán evidentes para los expertos.

20 Se divulga en el presente documento que los SSO divulgados en el presente documento se pueden usar para tratar cualquier afección en la que el profesional médico pretenda inducir apoptosis en células, o inhibir la proliferación de células, o inhibir la ruta de señalización activada por un EGFR, particularmente HER2. En particular, el tema divulgado en el presente documento se puede usar para tratar una enfermedad o afección proliferativa. La afección puede ser un cáncer. La enfermedad puede ser fibrosis pulmonar. La afección puede ser un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, pulmón, ovario, gástrico y colon. La afección puede ser un cáncer que es resistente a quimioterapia.

25 30 Se divulga adicionalmente en el presente documento un tratamiento de enfermedades para las que los antagonistas de HER2 conocidos tales como Herceptin, Herstatin y pertuzumab, han demostrado ser útiles.

35 40 La administración del SSO a los sujetos se puede lograr utilizando procedimientos desarrollados para la administración de ASON. Los ASON se han administrado con éxito a animales experimentales y sujetos humanos mediante administración intravenosa en solución salina en dosis tan altas como 6 mg/kg tres veces por semana (Yacsyh, B.R., et al., 2002, Gut 51:30 (anti-ICAM-1 ASON for treatment of Crohn's disease); Stevenson, J., et al., 1999, J. Clinical Oncology 17:2227 (anti-RAF-1 ASON targeted to PBMC)). Se ha informado de la farmacocinética de ASON fosforotioato de 2'O-MOE, dirigida hacia TNF- $\alpha$  (Geary, R.S., et al., 2003, Drug Metabolism and Disposition 31:1419). También se ha informado de la eficacia sistémica de las moléculas mixtas de LNA/ADN (Fluiter, K., et al., 2003, Nucleic Acids Res. 31:953).

45 La actividad sistémica de los SSO en un sistema modelo de ratón se investigó utilizando los compuestos fosforotioatos 2'O-MOE, PMO y PNA. Se observó actividad significativa en todos los tejidos investigados, excepto el cerebro, el estómago y la dermis (Sazani, P., et al., 2002, Nature Biotechnology 20, 1228).

En general, cualquier método de administración que sea útil en tratamientos antisentido convencionales se puede

usar para administrar los SSO de la invención. Para probar el SSO en células cultivadas, se puede usar cualquiera de las técnicas que se han desarrollado para probar ASON o SSO.

- Además, se divultan en el presente documento formulaciones que comprenden SSO en un vehículo fisiológica o farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Por lo tanto, las formulaciones incluyen, pero sin limitación, aquellas adecuadas para administración parenteral que incluyen inyección o infusión intraperitoneal, intraarticular, intravenosa, intraarterial, subcutánea o intramuscular, así como aquellas adecuadas para administración tópica, oftálmica, vaginal, oral, rectal o pulmonar (incluida la inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo administración mediante nebulizador, intratraqueal, intranasal). Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. La ruta de administración más adecuada en cualquier caso dado puede depender del sujeto, la naturaleza y la gravedad de la afección que se está tratando, y el compuesto activo particular que se está utilizando.
- Las composiciones farmacéuticas como se divultan en el presente documento incluyen, pero sin limitación, sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables, es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto original y no presentan propiedades toxicológicas no deseadas. Ejemplos de dichas sales son (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio,  $\text{NH}_4^+$ , magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; y (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico y similares.
- En el presente documento se divulga el uso de SSO que tienen las características establecidas anteriormente para la preparación de un medicamento para aumentar la proporción de una forma soluble en mamífero de HER-2 o HER-3 a su forma unida a la membrana correspondiente, en un paciente afectado por un trastorno proliferativo, tal como se ha tratado anteriormente. En la fabricación de un medicamento de acuerdo con la invención, los SSO se mezclan normalmente con, entre otros, un vehículo aceptable. El vehículo debe, por supuesto, ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente en la formulación y no debe ser perjudicial para el paciente. El vehículo puede ser sólido o líquido. Los SSO se incorporan en las formulaciones de la invención, que se pueden preparar mediante cualquiera de las técnicas de farmacia bien conocidas que consisten esencialmente en mezclar los componentes, que incluyen opcionalmente uno o más ingredientes terapéuticos accesorios.
- Se divulga en el presente documento que las formulaciones pueden comprender soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas de los compuestos activos, cuyas preparaciones son preferentemente isotónicas con la sangre del receptor previsto y esencialmente libres de pirógenos. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir, pero sin limitación, agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en envases de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo, viales y ampollas selladas, y se pueden almacenar en condiciones de criodesecado (liofilizadas) que requieren solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección inmediatamente antes de su uso.
- En la formulación, los SSO pueden estar contenidos dentro de una partícula o vesícula, tal como un liposoma o microcristal, que pueden ser adecuados para administración parenteral. Las partículas pueden ser de cualquier estructura adecuada, tal como unilaminar o plurilaminar, siempre que los SSO estén contenidos en ellas. Los lípidos cargados positivamente, tal como N-[1-(2,3-dioleoloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio metilsulfato, o "DOTAP", son particularmente preferidos para dichas partículas y vesículas. La preparación de dichas partículas lipídicas es bien conocida. [Véanse las referencias en la patente de los Estados Unidos 5.976.879 col. 6]
- El SSO se puede dirigir a cualquier elemento o combinación de elementos que regulen el empalme, incluyendo el sitio de empalme en 3', el sitio de empalme en 5', el punto de ramificación, la zona de polipirimidina, los potenciadores de empalme exónico, los silenciadores de empalme exónico, los potenciadores de empalme intrónico y los silenciadores de empalme intrónicos.
- En el presente documento se divulga que los expertos en la materia pueden apreciar que el tema divulgado tal como se dirige hacia el HER2 humano se puede llevar a la práctica usando SSO que tienen una secuencia que es complementaria a al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, preferentemente entre 10 y 20, nucleótidos de las porciones del gen HER2 humano que comprende el exón 15 y sus intrones adyacentes. La SEQ ID NO: 15 contiene la secuencia del exón 15 de HER2 humano y 50 nucleótidos adyacentes de los intrones flanqueantes. Por ejemplo, los SSO dirigidos al HER2 humano pueden tener una secuencia seleccionada de las secuencias con actividad de cambio de empalme enumeradas en la Tabla 2. Los SSO que se dirigen a (es decir, son complementarios a) las regiones de exón e intrón adyacentes del Exón 15 en el pre-ARNm de HER2 (SEQ ID NO: 15) son útiles en la práctica de la invención. Más preferidos son los SSO que se

dirigen al pre-ARNm de HER2 en la proximidad de las uniones de donador y aceptor de empalme de exón 15. Estas regiones de secuencia diana se definen como 50 nucleótidos cadena arriba (es decir, en 5') y cadena abajo (es decir, en 3') de las uniones aceptador y donante de empalme (SEQ ID NO: 44 y 45, respectivamente).

5 Se divulga en el presente documento que el tema dirigido hacia HER3 humano se puede llevar a la práctica usando SSO que tienen una secuencia que es complementaria a al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, preferentemente entre 10 y 20, nucleótidos de las porciones del gen HER3 humano que comprende los exones 13, 14 y 15 y sus intrones adyacentes, así como la región que contiene la señal de poliadenilación en el exón 28. La SEQ ID NO: 16 contiene la secuencia HER3 humana de los exones 13 a 15, incluidos los intrones intervinientes y 50 nucleótidos adyacentes de los intrones flanqueantes. La SEQ ID NO: 17 contiene la secuencia de la región que contiene la señal de poliadenilación en el exón 28 de HER3 humano. Por ejemplo, los SSO dirigidos al HER3 humano pueden tener una secuencia seleccionada de las secuencias con actividad de cambio de empalme enumeradas en la Tabla 3. Los SSO que se dirigen a (es decir, son complementarios a) las regiones del exón y el intrón adyacente del pre-ARNm de HER3 en la proximidad de los exones 13, 14 y 15 (SEC ID NO: 16) son útiles en la práctica de la invención. Más preferidos son los SSO que se dirigen al pre-ARNm de HER3 en la proximidad de las uniones de donador y aceptor de empalme de los exones 13, 14 y 15. Estas regiones de secuencia diana preferidas se definen como 50 nucleótidos cadena arriba (es decir, en 5') y cadena abajo (es decir, en 3') de las uniones aceptador y donante de empalme (SEQ ID NO: 46 a 51, respectivamente).

20 Cuando se usan modificaciones que aumentan la afinidad, que incluyen, pero sin limitación, nucleótidos de LNA o de pinza G, la persona experta reconoce que la longitud del SSO se puede reducir de manera correspondiente. El patrón de alternancia de LNA y nucleótidos convencionales no es importante.

25 Los expertos en la materia también reconocerán que la selección de secuencias de SSO debe hacerse con cuidado para evitar un SSO autocomplementario, que puede llevar a la formación de estructuras pareadas "en horquilla" parciales. Además, se debe evitar el alto contenido de GC para minimizar la posibilidad de emparejamiento de bases no específico. Asimismo, también deben evitarse los SSO que coinciden con genes inespecíficos, como lo revela, por ejemplo, BLAST.

30 En algunas situaciones, se puede preferir seleccionar una secuencia de SSO que pueda dirigirse a un ser humano y al menos a otra especie. Estos SSO se pueden usar para probarlos y optimizarlos en las otras especies antes de usarse en seres humanos, por lo que son útiles para la autorización y el desarrollo de fármacos.

35 Los expertos en la materia apreciarán que se pueden hacer varias omisiones, adiciones y modificaciones a la invención descrita anteriormente sin apartarse del alcance de la invención, y todas esas modificaciones y cambios están destinados a caer dentro del alcance de la invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas. Todas las referencias, citas de secuencia, patentes, solicitudes de patentes u otros documentos citados se incorporan en el presente documento como referencia.

40 Ejemplo 1

#### Materiales y métodos

45 *Cultivo y transfecciones celulares:* Las células SK-BR-3 se mantuvieron en medio 5A de McCoy complementado con suero bovino fetal al 10 %. Las células MCF-7 se mantuvieron en medios esenciales modificados complementados con suero bovino fetal al 10 %, piruvato de sodio 1 mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM. Para la transfección, el tratamiento, las células se colocaron en placas en 2 ml de medio en placas de 6 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo, o en 1 ml de medio en placas de 24 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo y se transfecaron 24 horas después. Los oligonucleótidos formaron complejos, a las concentraciones indicadas, con Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), y los complejos de lípidos catiónicos se aplicaron a las células de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 *RT-PCR:* el ARN total se aisló 24 horas después de la transfección, mediante la recogida de las células en 800 ml de reactivo TRI (Molecular Research Center, Inc.). Se usaron aproximadamente 200 ng de ARN por reacción con la enzima rTth (PerkinElmer Life Sciences) en presencia de Cy5-AP3-dCTP (GE Healthcare) 0,02 mM y cebadores directos e inversos que flanquean la región de ARNm diana. La mezcla de reacción se incubó a 70 °C, 15 minutos para la etapa de RT seguida de PCR: 95 °C, 3 minutos, 1 ciclo; 22 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto; y extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR se separaron en un gel de poliacrilamida TBE-urea prefabricado al 10 % (Invitrogen), y las bandas se visualizaron en el generador de imágenes de modo variable Typhoon™ (GE Healthcare). La densidad de las bandas se cuantificó con el programa informático ImageQuant™ (GE Healthcare).

65 *Ensayo de viabilidad celular:* La viabilidad celular después del tratamiento con oligonucleótido se midió mediante el ensayo CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Las células ( $\sim 2 \times 10^4$ /pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, las células se transfecaron con 100 nM de los SSO indicados.

Después de 48 horas, se añadió el reactivo CellTiter 96® AQ<sub>queous</sub> One Solution en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. La placa se incubó a 37 °C durante 1-4 horas. La absorbencia se registró a 490 nm utilizando un lector de placas de 96 pocillos. La viabilidad celular se normalizó a células no tratadas.

5 **Ensayo de escisión de PARP:** Se sembraron células en placas de 6 pocillos y se transfectaron con los SSO designados. Después de 48 horas, las células se cosecharon en tampón RIPA (tampón de ensayo de precipitación radioinmunitaria; Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 al 1 %, SDS al 0,1 % y desoxicolato de sodio al 1 %) (Sigma) y una mezcla de inhibidores de proteasa (Sigma). La proteína total (20 mg) se sometió a electroforesis en un gel NuPAGE Novex Bis-Tris (Invitrogen) al 4-12 % y se electrotransfirió a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen). Las membranas se bloquearon durante 30 minutos con tampón de bloqueo StartingBlock (PBS) (Pierce) y se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo monoclonal PARP de ratón (dilución 1:10.000; Invitrogen), seguido de incubación de 2 horas con anticuerpos secundarios antirratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (1:100.000; Invitrogen). Las transferencias se desarrollaron con reactivos ECL Plus™ (GE Healthcare) y se expusieron a película Kodak. Las proteínas PARP de longitud completa y escindidas migraron a ~ 116 y 85 kDa, respectivamente.

20 **Construcciones de plásmidos y purificación de la proteína Δ15HER2-His:** La secuencia Δ15HER2 se transcribió inversamente y se amplificó a partir del ARN total aislado de las células SK-BR-3 tratadas con SSO111. Los cebadores directo e inverso utilizados fueron CACCATGGAGCTGGCGGCCT (SEQ ID NO: 68) y TCCAGGTCCACACAGCGGTCC (SEQ ID NO: 69), respectivamente. La secuencia Δ15HER2 se clonó en el pcDNA™3.1, un vector de expresión TOPO direccional (Invitrogen), que codifica seis restos de histidina en el extremo carboxi de la proteína expresada. El plásmido de expresión Δ15HER2-His se transfectó en células MCF-7 con Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) en medio sin suero. Después de 48 horas, el medio se recogió, se concentró, se purificó con columnas de centrifugación HisPur™ Cobalt (Pierce) y se desaló utilizando columnas de centrifugación Zeba™ Desalt para producir la proteína soluble Δ15HER2-His. La pureza de la proteína se confirmó mediante SDS-PAGE, y el rendimiento se determinó mediante el ensayo de Bradford. La inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 mediante la proteína Δ15HER2-His se evaluó colocando células a -2X10<sup>4</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 24 horas, y luego se trataron con proteína Δ15HER2-His 60, 120 o 240 nM durante 72 horas. La viabilidad celular se normalizó a células simuladas y se analizó usando el reactivo de solución acuosa CellTiter 96® (Promega).

35 **Transferencias Western:** Las células transfectadas se cosecharon 48 horas después de la transfección (o en los puntos temporales indicados) en tampón RIPA (tampón de ensayo de precipitación radioinmunitaria Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 al 1 %, SDS al 0,1 % y desoxicolato de sodio al 1 %) (Sigma) y una mezcla de inhibidores de proteasa (Sigma). La proteína total (20 mg para PARP, β-actina, HER2, p-HER2, HER3 y p-HER3) de las células se sometió a electroforesis en un gel Bis-Tris prefabricado (Invitrogen) al 4-10 % y se electrotransfirió a membranas de difluoruro de polivinilideno. Las membranas se bloquearon durante 30 minutos en el tampón de bloqueo StartingBlock (PBS) (Pierce) y se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo políclonal anti-erbB2 de conejo (dilución 1:1000; Abcam), anticuerpo políclonal anti-erbB3 de conejo (dilución 1:1000; Abcam), anticuerpo políclonal fosfo-HER2/erbB2 (Tyr877) de conejo (dilución 1:4000; Cell Signaling), anticuerpo monoclonal fosfo-HER3/erbB3 (Tyr1289) de conejo (dilución 1:4000; Cell Signaling), o anticuerpo monoclonal anti-PARP de ratón (dilución 1:1000; Invitrogen), seguido de 1 hora de incubación con anticuerpos secundarios anticoncejo (dilución 1:100.000; Abcam) o antirratón (dilución 1:100.000; Invitrogen) conjugados con peroxidasa de rábano picante. Las transferencias se desarrollaron con reactivos ECL™ Plus (GE Healthcare) y se expusieron a película Kodak. HER2, HER3, PARP de longitud completa, PARP escindido y β-actina migraron a ~ 180, 185, 116, 85, 42 kDa, respectivamente. La β-actina se utilizó como control de carga.

## Ejemplo 2

### 50 Variantes de empalme HER2

Se sintetizaron ejemplos de oligonucleótidos de cambio de empalme (SSO) que contienen enlaces internucleotídicos de fosforotioato y dirigidos a regiones de pre-ARNm de HER2 humano (Figura 1, Tabla 2).

55 **Tabla 2: Oligonucleótidos de cambio de empalme dirigidos a HER2**

SEQ ID.	Nombre	Secuencia (5'-3')	Modificación	Actividad
18	106	ggg cag aaa aga ttt gtg gg	2'-OMe, PS	+
19	107	cac act ggt cag cct cct gg	2'-OMe, PS	+
20	108	gcc aca cac tgg tca gcc tc	2'-OMe, PS	+
21	109	ctc acg agt ggg tgc agt tg	2'-OMe, PS	+

(continuación)

SEQ ID.	Nombre	Secuencia (5'-3')	Modificación	Actividad
22	110	gtt gga ctc acg agt ggg tg	2'-OMe, PS	+
23	111	gac cgt tgg act cac gag tg	2'-OMe, PS	+
24	M111	gac cgt tgg act cac gag tg	MOE, PS	+
25	L111	CgTtGgAcTcAcGaGt	Mayúscula: LNA; minúscula: desoxirribosa, PS	+

2'-OMe, 2'-O-metil oligorribonucleótido; MOE, 2'-O-metoxietil oligorribonucleótido; LNA, oligonucleótido de ácido nucleico bloqueado; PS, enlace internucleótido de fosforotioato.

Estos oligonucleótidos se transfecaron en células SK-BR-3 de cáncer de mama humano con el reactivo de transfección catiónico Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Después de 24 horas, se recogió el ARN total y se usó RT-PCR para determinar la proporción de HER2 que carece del exón 15 (sHER2) y ARNm de HER2 (mHER2) de longitud completa.

Como se muestra en la Figura 2 y la Figura 3, estos SSO, especialmente SSO111, (SEQ ID NO: 23) provocaron la omisión del exón 15, lo que condujo a niveles reducidos de ARNm de mHER2 y niveles aumentados de ARNm de sHER2. Esta misma secuencia también fue eficaz para omitir el exón 15 de una manera dependiente de la dosis, cuando se sintetizó como un oligómero de 2'-OMe (SEQ ID NO: 23), un MOE (SEQ ID NO: 24) o un LNA (SEQ ID NO: 25) (Figura 3).

SSO111 (SEQ ID NO. 23) se transfeció en células de cáncer de mama humano SK-BR-3 con el reactivo de transfección catiónica Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas, las células se recogieron en tampón de lisis RIPA (Sigma) y los lisados se analizaron mediante transferencia Western para la escisión de la polí(ADP ribosa) polimerasa (PARP) y la expresión de la proteína mHER2 (Figura 4). PARP está implicada en la reparación del ADN y se escinde mediante caspasas al principio de la apoptosis. Por lo tanto, la escisión de PARP es indicativa de apoptosis. La regulación positiva inducida por SSO111 de la proteína sHER2 provocó la inducción de la escisión de la polí(ADP ribosa) polimerasa (PARP), un marcador apoptótico, en células SK-BR-3 transfecadas (Figura 4A) y una regulación negativa simultánea de la proteína mHER2 (Figura 4B).

El ADNc que codifica Δ15HER2 (sHER2) se clonó en un vector de expresión de mamífero, que luego se transfeció y se expresó en células MCF-7. Después de 48 horas, los lisados celulares y los medios extracelulares concentrados se recogieron y analizaron mediante transferencia Western para detectar la presencia de isoformas de HER2. La proteína sHER2 no glucosilada (~ 64 kDa) y glucosilada (~ 80 kDa) se detectó solo en células transfecadas con plásmido sHER2, en los lisados (Lisado) y medios extracelulares (Medios), respectivamente (Figura 5). Como se muestra en la Figura 5, la proteína sHER2 fue producida, procesada y secretada a partir de células.

Los medios extracelulares de las células MCF-7 que expresan sHER2 se transfirieron a los medios de las células SK-BR-3. Después de 48 horas, las células se recogieron en tampón de lisis RIPA (Sigma) y los lisados se analizaron mediante transferencia Western para la escisión de PARP y la expresión de la proteína mHER2 (Figura 6). La incubación con sHER2 dio como resultado la inducción de apoptosis en esas células, como se muestra en los ensayos de escisión de PARP (Figura 6A). La aplicación de la proteína sHER2 exógena a las células SK-BR-3 cultivadas también causó una reducción en los niveles de expresión de HER2 (Figura 6B). En relación con la intensidad de la banda mHER2 para células SK no tratadas, las intensidades de banda para β-gal, control (C) y sHER2 fueron 82 %, 92 % y 73 %, respectivamente.

Se aplicó una versión clonada y purificada de la proteína sHER2 que porta un marcador 6-His en el extremo C (Δ15HER2-His) en concentraciones de 60, 120 o 240 nM a los medios de cultivo de células SK-BR-3, y después de 48 horas de incubación, las células se analizaron mediante transferencia Western para HER2, HER3 y su estado de fosforilación. Las concentraciones crecientes de proteína Δ15HER2-His disminuyeron la proteína HER2 total en las células hasta en un 80 %, mientras que la HER2 fosforilada (p-HER2) disminuyó hasta un 80 % en Δ15HER2-His 240 nM. De acuerdo con la importancia establecida de HER2 en la fosforilación de HER3 en las células SK-BR-3, la HER3 fosforilada (p-HER3) también disminuyó de forma dependiente de la dosis en paralelo con la proteína HER2, mientras que el efecto sobre HER3 fue mínimo (Figura 6C). Las densidades de las bandas que se muestran en los geles de la Figura 6 se cuantificaron con el programa informático ImageQuant™ (GE Healthcare). La inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 mediante el tratamiento con la proteína Δ15HER2-His después de 72 horas de incubación se analizó mediante el ensayo MTS. La inhibición se evaluó colocando células a ~ 2X10<sup>4</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 24 horas, y luego se trataron con proteína Δ15HER2-His 60, 120 o 240 nM durante 72 horas. La viabilidad celular se normalizó a células simuladas y se analizó usando el reactivo de solución acuosa CellTiter 96® (Promega). En la Figura 6D se muestra la media ± desviación estándar de triplicados (Figura 6D). El tratamiento con la proteína Δ15HER2-His disminuyó la viabilidad de las células SK-BR-3 de una manera dependiente de la dosis.

## Ejemplo 3

Variantes de empalme HER3

- 5 Se sintetizaron ejemplos de oligonucleótidos de cambio de empalme (SSO) que contienen enlaces internucleotídicos de fosforotioato y dirigidos a regiones de pre-ARNm de HER3 humano (Figura 7, Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos de cambio de empalme dirigidos a HER3

SEQ ID.	Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio diana de HER3	Modificación
26	1	GGGCACTTCCAAGTCCTGA	Supuesto sitio de ramificación	2'-OMe, PS
27	2	GTCACTTCCAAGTCCTGACC	Supuesto sitio de ramificación	2'-OMe, PS
28	3	CACTTCCAAGTCCTGACCTT	Supuesto sitio de ramificación	2'-OMe, PS
29	4	CTTCCAAGTCCTGACCTCA	Supuesto sitio de ramificación	2'-OMe, PS
30	5	CCCTTACTGTACCCATTAG	Sitio de empalme en 5' del intrón 13	2'-OMe, PS
31	6	CTCCCCTTACTGTACCCATT	Sitio de empalme en 5' del intrón 13	2'-OMe, PS
32	7	TGGCTCCCCTTACTGTACCC	Sitio de empalme en 5' del intrón 13	2'-OMe, PS
33	8	CTCGAGGCTCCCTGTAGTGG	Sitio de empalme en 3' del intrón 13	2'-OMe, PS
34	9	ATTCTCGAGGCTCCCTGTAG	Sitio de empalme en 3' del intrón 13	2'-OMe, PS
35	10	CAAATTCTCGAGGCTCCCTG	Sitio de empalme en 3' del intrón 13	2'-OMe, PS
36	11	CTAGTATACCGAGCCATTGC	Sitio de empalme en 5' del intrón 14	2'-OMe, PS
37	12	GTGCTACTAGTATACCGAGC	Sitio de empalme en 5' del intrón 14	2'-OMe, PS
38	13	CAAGTATCAGAGCCCTGAGT	Sitio de empalme en 3' del intrón 14	2'-OMe, PS
39	14	TTATCCCCTCACTGACCCCT	Sitio de empalme en 5' del intrón 15	2'-OMe, PS
40	15	TATTATCCCCTCACTGACCC	Sitio de empalme en 5' del intrón 15	2'-OMe, PS
41	16	ATTTCATCTTTAAGGCTC	Sitio de señal de PoliA	2'-OMe, PS
42	17	CTGGATCTACTGCTTAATT	Sitio de señal de PoliA	2'-OMe, PS

2'-OMe, 2'-O-metil oligorribonucleótido; PS, enlace internucleotídico de fosforotioato.

- 10 Estos oligonucleótidos se transfecaron en células MCF-7 de cáncer de mama humano con el reactivo de transfección catiónico Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Después de 24 horas, se recogió el ARN total y se usó RT-PCR para determinar la relación de variantes de empalme y ARNm de HER3 de longitud completa. Como se muestra en la Figura 8, determinados SSO causaron la omisión del exón 13 (por ejemplo, SSO 5 (SEQ ID NO: 30) y 6 (SEQ ID NO: 31)), lo que condujo a niveles reducidos de ARNm de HER3 y niveles aumentados de ARNm de Δ13HER3. Como se muestra en la Figura 9, los SSO 8, 9 y 10 (SEQ ID NO: 33 a 35, respectivamente) indujeron todos ARNm de Δ14HER3, mientras que el SSO 13 (SEQ ID NO: 38) indujo ARNm de Δ15HER3.
- 15 Las células SK-BR-3 se transfecaron con 100 nM de SSO 1 a 17 (SEQ ID NO: 26 a 42). Después de 48 horas, se midió la viabilidad celular mediante la adición de reactivo MTS (Promega) (Figura 10). Como se muestra en la Figura 10, la inducción de variantes de empalme de HER3 en células SK-BR-3 mediante los SSO, incluyendo los SSO 8, 9 y 10 (SEQ ID NO: 33 a 35, respectivamente), todos los cuales inducen ARNm de Δ14HER3, causó una viabilidad celular reducida en comparación con las células simuladas o no transfecadas.
- 20 Ejemplo 4
- 25

Evaluación de PMO conjugados con péptido transportador en el ratón transgénico EGFP-654

5 Un PMO (654;5'-GCT ATT ACC TTA ACC CAG-3'; SEQ ID NO: 43) diseñado para restaurar el empalme correcto en el gen de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP, por sus siglas en inglés) se conjugó con varios péptidos transportadores (SEQ ID NO: 44-54) para producir PMO conjugados con péptidos (P-PMO) y se evaluó *in vivo* por su actividad de corrección de empalme y toxicidad en el modelo de ratón transgénico EGFP-654 (Sazani, P., F. Gemignani, et al. (2002) Nat Biotechnol 20(12): 1228-33). En este modelo, el gen EGFP-654 que codifica EGFP funcional se interrumpe mediante un intrón mutado empalmado de forma aberrante, y la captación celular de P-PMO dirigidos por EGFP-654 se puede evaluar mediante la detección por RT-PCR del producto de empalme EGFP-654 restaurado en tejidos.

10 15 Se inyectaron ratones transgénicos EGFP-654 hembras intraperitonealmente una vez al día durante 4 días consecutivos con solución salina o una dosis de 12,5 mg/kg de P-PMO. Después del tratamiento el día 4, el corazón, músculos, hígado, riñón, pulmones, intestino delgado, colon, estómago, glándula mamaria, timo, bazo, ovario, piel, médula ósea y cerebro se recogieron y se evaluó el ARN extraído mediante RT-PCR y densitometría de productos de PCR para el porcentaje de productos de empalme corregidos del gen EGFP-654 en tejidos frente a controles de diafragma con corrección de empalme de EGFP-654 al 100 %.

20 25 En las Figuras 14A y 14B se muestra la restauración de productos de empalme EGFP funcionales después del tratamiento con diversos P-PMO basados en el análisis RT-PCR de tejidos seleccionados, incluyendo los tejidos de mama y ovario. La captación óptima del péptido transportador para los tejidos mamarios (SEQ ID NO: 56-58) y de ovario (SEQ ID NO: 58) basados en estos y resultados similares se resume en la Tabla 4 a continuación (indicada por un \*). Otros ejemplos de administración de péptidos específicos de tejido de oligonucleótidos antisentido se describen en Sazani, et al, Mol Therapy (2008), en prensa)

Tabla 4: Captación de péptidos transportadores en tejidos

Tejido (%)	Péptidos óptimos para dirigirse a tejidos: SEQ ID NO.										
	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
Glándula mamaria ( $\geq 60\%$ )					*	*	*				
Ovario ( $> 60\%$ )							*				

## Listado de secuencias

30 SEQ ID NO: 1 (ADN de HER2 humano de longitud completa)

SEQ ID NO: 2 (proteína HER2 humana de longitud completa)

MELAALCRWGLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLY  
QGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVTQGYVIAHNQVRQVPLQRLRIVRGQTQ  
LFEDNYALAVLDNGDPLNNTPVTGASPGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLC  
YQDTILWWDIFHKNNQLALTLDNTNSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQLSLTRT  
VCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFNHSIGICEHCPALVT  
YNTDTFESMPNPEGRTFGASCVTACPYNLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDEGT  
QRCEKCSKPCARVCYGLGMELREVRAVTSANIQEFAAGCKKIFGSLAFLPESFDGD  
PASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLVDLQFQNLQVIRGRILHNGAY  
SLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTLFCVHTVWPWDQLFRNPHQALLHTA  
NRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPQTCVNCQFLRGQECVEECRVLQGLP  
REYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKP  
DLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILL  
VVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRLIKETE  
LRKVVLGSGAFGTVYKGWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMA  
GVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMQIA  
KGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKV  
PIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGER  
LPQPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGP  
ASPLDSTFYRSLEDDDMGLVDAEYLVQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRS  
TRSGGGDLTLGEPSEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAKGLQLSPHTDPS  
PLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSQPEYVNQPDVRQPPSPREGPLPAARPAG  
ATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTQGGAAPQPHPPPFSFDNL  
YYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGVDPV

SEQ ID NO: 3 (ADN de HER3 humano de longitud completa)

atgaggggcgaacgacgcctgcagggtctggcttgcagtcgtggccgggctccgagggtggcaacttcag  
gcagtgtgcctggactctgaatggcctgagtgaccggcgatgtcagaaccataccagacactgtacaagctacgaga  
gggtgagggtgtatgggaaaccttgcattgtgcacggacacaatgcgcacccctccctgcagtgattcgagaagtg  
acaggctatgtccctgtggccatgaatgaattctacttaccattgcacccactccgcgtggcgagggaccacggatc  
gggaagttgcacatctgtcatgttgcattataacaccaactccgcacgcgtcgccagctccgtactcagtcaccgag  
attctgcaggggggtttatattgagaagaacgataagttgcacatggacacaatgtactggagggacatgtgagggaccga  
gatgtcagatgtggtaaggacaatggcagaagctgtccccctgtcatgggttgcagggggcgatgtgggtcctggat  
cagaagactgcacatgtgaccaagaccatctgtcctcgtatgttgcactgtttggcccaaccccaaccaggctgc  
atgtgagtgccggggctgcacggccctcaggacacagactgtttgcgcggacttcaatgcacagtgaggcctgtta  
cctgcgtccacagcctgtctacaacaagtaacttccagctggacccaaatccccacaccaagttcagtgatggaggat  
gtgtagccagctgtccccataacttgtggatcaaaacatctgtcagggcctgtcctcgtacaagatggagtagataaaa  
tgggtcaagatgtggcacttgtgggactatgtcccaaaacccgtgtgagggacaggctgtggagccgttccagactgt  
gactcgagcaacattgtgatgttgcactgcaccaagatctggcaacttctgtatcaccggcctcaatggagacccc  
tggcacaagatccctggccctggaccacagagaagtcataatgttccggacagtacgggagatcacaggtaacatccagtc  
ctggcccccacatgcacaacttcgttgcataaccattggaggcagaacgcctcataacccgggttcattgt  
tgatcatgaagaactgtcatgcacatctggcctcgtacaaggaaatttagtgcgtggcgtatcatataagtgcacatagg  
cagctctgttgcaccactttgaactggaccaagggtctggggcctacggaaagagcgtactagacatcaagcataatggc  
cgccgagagactgcgtggcagaggcaaaatgtgtgacccactgtgtcctctggggatgtggggccaggccctggcgt  
gttgtcctgtcgaattatagccgaggaggtctgtgaccactgcacattctgtatggggagcgtcggcagaatttgc  
ggccgaatgttctctccacccggaaatgcacccatggagggactgcacatgcacatggctggcgtctgatctgt  
aatgtgcacccatccatgtggccactgtgtgagcatggccatgcacatggctggcgtctgatctgt  
ccagatgtcagaatgaatgtggccctgcacatgacactgcacccagggtgtaaaggaccagacgtcaagacttgttag  
aacactgtgtgtcatgcggcaaaacccatgtacaatggcttgcactgtatgcacggattgttagtgcatttcat  
actttctctactggcgtggccggattcagaataaaaggctatggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgt  
ggaccccaactgtgagaaggctaaactgttgcacatgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccat  
gtttggactgtgcacaaagggtgtggatccctgagggtgaatcaatcaagatccactgtcattaaagtcat  
gtggcgttgcacccatgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgt  
actatgcacccatgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgt  
ctggggccacagctgtcacaactgggagttacaatgcacccatgttgcacccatgcacatggctggcgtactgt  
ctggctggccaaactgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgt  
aagcagctgtatatacgatgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgt  
tgatgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc  
agacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgt  
ttgtatgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc  
agagagagatgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc  
gccagaactgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc  
cagttggacacttaatgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc  
ggagctgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc  
ctggcatcagactgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc  
aggagccggagccacggccacggccatgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc  
caccgggttagagagatgttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc  
ccttgcacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc  
gcacagtccacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggctggcgtactgtgacccatgcacatggc

tctggcagcacacagagtgtccactccacccatcatgcccactgcaggcacaactccagatgaagactatgaatata  
gaatcgcaacagagatggagggtggctctgggggtgattatgcagccatggggcctgcccagcatctgagcaagggtatgaaga  
gatgagagctttcagggcctggacatcaggcccccatgtccattatgcccctaaaaactctacgttagcttagaggctacaga  
ctctgccttgataaccctgattactgcatagcaggctttcccaaggctatgtccagagaacgtaa

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNSQAVCPGLNGLSVTGAENQYQTL  
KLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVV  
RGTQVYDGKFAIFVMLNYNTSSHARQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTI  
DWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWPGPSEDCQTLTKTICAPQCNG  
HCFGPNPNCCHDECAGGCSPQDTDCFACRFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTQFQ  
LEPNPHTKYQYGGVCVASCPhNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGG  
LCPKACEGTGSGSRFQTVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPE  
KLNVFRTVREITGYLNIQSWPPhMHNFNSVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVT  
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTERLDIKHNRPRRDCVAE  
GKVCDPLCSSGGCWPGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHEAECFS  
CHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVGLGAKGPIYKYPDV  
QNECRPCHENCTQGCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLTMALTVIAGLVVIFMMLGG  
TFLYWRGRRIQNKRAMRRYLERGESIEPLDPSEKANKVLARIFKETELRKLKVLS  
GVFGTVHKGVWIPEGESIKIPVCIKVIEDKSGRQSFQAVTDHMLAIGSLDHAHVRL  
LGLCPGSSLQLVTQYLPLGSLLDHVRQHRGALGPQLLNWGVQIAKGMYYLEH  
GMVHRNLAARNVLLKSPSQVQVADFGVADLLPPDDKQLLYSEAKTPIKWMALESI  
HFGKYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAEPYAGLRLAEVPDLLEKGERLAQPQICTI  
DVYMMVMVKCWMIDENIRPTFKELANEFRMARDPPRYLVIKRESGPGIAPGPEPH  
GLTNKKLEEVELEPELDLDDLEAEEDNLATTLSALSPLVGTLNPRPGQSLLSP  
SSGYMPMNQGNLGESCQESAVGSSSERCPVSLHPMPRGCLASESSEGHVTGSEA  
ELQEKVSMCRSRSRSRSPRPGDSAYHSQRHSLLTPVTPLSPPGLEEEDVNGYVMP  
DTHLKGTSSREGTLSVGLSSVLTGTEEEDEEYEYEMNRRRRHSPPHPPRPSLEE  
LGYEYMDVGSDLSASLGSTQSCPLHPVPIMPTAGTTPDEDYEYEMNRQRDGGGG  
DYAAMGACPASEQGYEEMRAFQGPGHQAPHVHYARLKTLSLEATDSAFDNPDY  
WHSRLFPKANAQRT

SEQ ID NO: 5 (ADN de A15HER2 humano)

SEQ ID NO: 6 (proteína A15HER2 humana)

MELAALCRWGLLLALLPPGAEST+QVCTGTDMLKRLPASPETHLDMLRHL  
YQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSQLDIQEVTQGYVLIAHNQVRQVLQRLRIVRGT  
QLFEDNYALAVLDNGDPLNNTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQL  
CYQDTILWKDIFHKNNQLALTLDNTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQLSLTR  
TVCAGGCARCKGPLTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFNHNHGICELHCPALV  
TYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNLSTDVGSTLVCPLHNQEVTAEKG  
TQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEAGCKKIFGSLAFLPESFDG  
DPASNTAPLQPEQLQVFETLEITGYLYISAWPDSDLSDVFQNLQVIRGRILHNGA  
YSLTLQGLGISWGLRSLRELGSGLALIHNTLHLCFVHTVWPWDQLFRNPHQALLHT  
ANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGL  
PREYVNARHCLPCHPCECPQNGSVTCFGPLCGPG

SEQ ID NO: 7 (ADN de A13HER3 humano)

atgaggcgaaacgacgctctgcagggtctgggctgtttcagcctggccgggctccgaggtggcaactctcag  
gcagtgtcctggactctgaatggcctgaggtgtacccggcgtctgagaaccaataccagacactgtacaagctctacgaga  
ggtgtgaggtggatgggaacctttagattgtctacgggacacaatgcccacccctccctgcagtggattcgagaagtg  
acaggctatgtcctcgccatgaatgaattctacttaccattgcccacccctccggtgcgagggaccaggctacgat  
gggaagttgcacatctcgcatgttaactataacaccaactccagccacgctctgcgccagctccgtactcagtcaccgag  
attctgtcaggggtgttatattgagaagaacgataagcttgcacatggacacaattgactggagggacatcgtgagggaccga  
gatgctgagatgtgtgaaggacaatggcagaagctgtccccctgtcatgaggttcaagggcgtctgggtctggat  
cagaagactgccagacattgaccaagaccatctgtcctcagtgtaatggtaactgtttggcccaaccccaaccaggctgtcc  
atgatgagtgtccggggctgcctcaggacacagactgcttgcctgcggcacttcaatgacagtggagccctgtgt  
cctcgctgtccacagccttgcataacaagactaactttccagctgaaacccaaatcccacaccaagtatcagtgatggaggagtt  
gtgtagccagctgtccccataacttgtggatcaaacatctgtcaggcctgtctgacaagatggaagttagataaaaa  
tgggctcaagatgtgagccctgtggggactatgtccaaagccctgtgagggacaggctctggagccctccagactgt  
gactcgagcaacattgtggattgtgaactgcaccaagatctggcaacccctgtcatcaccggcctcaatggagacccc  
tggcacaagatccctggaccaggagaagctcaatgtctccggacagtgacggagatcacaggtaacatccagtc  
ctggccggccccacatgcacaacttcagttttccaaattgacaaccattggaggcagaagccctacaacccgggcttcattgt  
tgatcatgaagaacttgaatgtcacaatctgtggctccgatccctgaagggaaattagtgtctggcgtatctataatgtgccaatagg  
cagctctgtaccaccactttgaactggaccaagggtctccgggctacggaaagagcgtactagacatcaagcataatccgc  
cgccgagagactgccccggcctgagaatttgcctgaggccgaatcttcctggccacccggaatgccaacccatggaggg  
caactgcccacatgcaatggctggctgtatacttgtcaatgtcccatttcgagatggcccaacccactgtgtga

SEQ ID NO: 8 (proteína A13HER3 humana)

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGD  
AENQYQTLKYLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYV  
LVAMNEFSTLPLPNLRVV  
RGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSHALRQLRTQLTEILSGGVYIE  
KNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCP  
CHEVCKGRCWPGPSEDCQTLTKTICAPQCNG  
HCFGP  
PNQCC  
HDECAGG  
CSGPQ  
DTCFAC  
RFNDSG  
ACVPR  
CPQPLV  
YNKLT  
FQLE  
PNPHT  
KYQYGG  
GCVASC  
PHNF  
VVDQ  
TSC  
VRA  
CPPDK  
MEVD  
KNGL  
KMCE  
PCGG  
LCP  
KACE  
GTG  
GSRF  
QTV  
DSS  
NID  
G  
FVN  
CTK  
ILGN  
LD  
FLIT  
GLNG  
DPW  
HKI  
PAL  
DPE  
KLN  
VFRT  
VRE  
ITGY  
LYN  
IQS  
W  
PPHM  
HNFS  
V  
FSNL  
TTI  
G  
GRSL  
Y  
NRGF  
SLL  
IM  
K  
NL  
NT  
SLG  
FRSL  
KEIS  
AG  
RIY  
ISAN  
RQL  
CYH  
HSLN  
W  
TKV  
LRG  
PTE  
ERLD  
I  
KHN  
RPR  
RDC  
GSL  
ENL  
PMR  
PNAS  
PATRN  
ANP  
WRAL  
PHAM  
RAL  
LIL  
V  
LNV  
PIF  
EMG  
PTV

5

SEQ ID NO: 9 (ADN de A14HER3 humano)

SEQ ID NO: 10 (proteína A14HER3 humana)

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLKYLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCTLTKTICAPQCNGHCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTDCFACRFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTFLQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPhNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPhMHNFNSVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCDPLCSSGGCWGPQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGALILVNVPIFEMGPTV

SEQ ID NO: 11 (ADN de A15HER3 humano)

SEQ ID NO: 12 (proteína A15HER3 humana)

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLY  
KLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVV  
RGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTI  
DWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCTLTKTICAPQCNG  
HCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTDCFACRHFDNSGACVPRCPQPLVYNKLTFQ  
LEPNPHTKYQYGGVCVASCPhNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGG  
LCPKACEGTGSGSRFQTVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPE  
KLNVFRTVREITGYLNIQSWPPhMHNFVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKLNVT  
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHSLNWTKVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAE  
GKVCDPLCSSGGCWGPQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHAEAECFS  
CHPECOPMEGTATCNGSV

SEQ ID NO: 13 (ADN de p85-HER3 humano)

atgatgagtgtgcggggggctgctaggccctcaggacacagactgcttgcctgcggcacttcaatgacagtggagccctgtac  
cctcgctgtccacagccttgtacaacaagctaacttccagctggaaacccaatccccacccaagttatcgtatggaggagtt  
gtgtagccagctgtccccataacttgcggatcaaacatcctgtcaggccctgcctcgtacaagatggaagtag  
ataaaaaatgggctcaagatgtgtgagccctgtggggactatgtccaaagccctgtgagggaaacaggctctggagcccttca  
gactgtggactcgagcaacattgtggatttgtgactgcaccaagatcctggcaacctggactttctgatcaccggcctcaatgg  
agacccctggcacaagatccctgcctggaccaggagaagtcataatgttccggacagtacggagatcacaggttacactgaac  
atccagtcctggcccccacatgcacaacttcagtgttttccaatttgcacaaccattggaggcagaagcccttacaaccgggct  
tctcatgtgtgatcatgaagaacttgcacatctctgggcttccgatccctgaaggaaattagtgtctgggctatctatataagt  
ccaataggcagctgttaccaccactttgaactggaccaagggtcttgcgggctacggaaagagcgtactagacatcaagca  
taatcgccgcgcagagactgcgtggcagagggcaaagtgtgacccactgtgcctctggggatgtctgggcccaggcc  
ctggtcagtgttgcctgtcggaaattatagccgaggaggtgtgtgacccactgcacacttctgaatgggtacagtaagggag  
ccagtcaaggatgggtgggggtggggccctgcaatggaaactgttcagggtggcataacaataa

SEQ ID NO: 14 (proteína p85-HER3 humana)

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLY  
KLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVV  
RGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTI  
DWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCTLTKTICAPQCNG  
HCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTDCFACRFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTFQ  
LEPNPHTKYQYGGVCVASCPhNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGG  
LCPKACEGTGSGSRFQTVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPE  
KLNVFRTVREITGYLNIQSWPPhMHNFVFNSNLTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVT  
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHSLNWTKVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAE  
GKVCDPLCSSGGCWGPQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGYSKGSQSRMGGG  
GALQWNCSGGIQ

5

SEQ ID NO: 15 (gen HER2 humano a partir de parte del intrón 14 a través de parte del intrón 15; el exón está subrayado)

10

SEQ\_ID NO: 16 (gen HER3 humano a partir de parte del intrón 12 a través de parte del intrón 15; los exones están subrayados)

cttgctgggagtcctcagactcttcataaccacccaccccttccagtgccagagggcaaagtgtgacccactgtctctggggatctggggcccaggeccctggcagtgcttgctgtcgaaattatagccgaggagggtctgtgtgaccactgcaactttctgaatgggtacagtaaggggagccagtcagatgggtgggggtggggccctgcaatggaaactgttcaggttggcataacaataaaagtcttagacagcttctgcatgtgccttgggattgaggttaggagacctgtgggtgtgagatcgagcataagggtcaggacttggaaagtgcaccccccctcccttattcccactacaggagccctcgagaatttgcctgagggccgaatgtttctctgcacccggaaatgccaacccatggaggcactgcccacatgcaatggctggtatactagtagcaccaggatctccaaaggagacagagaagggcaatacttgagcatctgggaatgatatggctaaggatagcacagagaggccagataatgctaggggcctgcagatagaagatcctgaatgtctgggtggctttgtgggaggtatggaaattgacctggatctgattctccctgacccctctctccactcagggtctgtacttgtctcaatgtgcccattttcgagatggggcccaactgtgtgagcactgccccatgg

15

agtccctaggtgccaaggggccaaatctacaagtacccagatgttcagaatgaatgtcgccctgcatgagaactgcacccaggggtcagtgtatgggataataaggagaggggtcaggtggaaagggttaggagca

SEQ ID NO: 17 (HER3 humano a partir de parte del exón 28)

Gccagcacttggaggctgagatggaaagatcacttgagcccagaattagagataagcctatggaaacatagcaag  
acactgtctctacaggggaaaaaaaaaaaaactgagcctaaagagatgaaataattaagcagtagatccaggatgcaaaat  
cctcccaattcctgtgc

Oligonucleótidos antisentido		
SEQ ID.	Nombre	Secuencia (5'-3')
18	106	ggg cag aaa aga ttt gtg gg
19	107	cac act ggt cag cct cct gg
20	108	gcc aca cac tgg tca gcc tc
21	109	ctc acg agt ggg tgc agt tg
22	110	gtt gga ctc acg agt ggg tg
23	111	gac cgt tgg act cac gag tg
24	M111	gac cgt tgg act cac gag tg
25	L111	CgTtGgAcTcAcGaGt
26	1	GGGTCACTCCAAGTCCTGA
27	2	GTCACTCCAAGTCCTGACC
28	3	CACTTCCAAGTCCTGACCTT
29	4	CTTCCAAGTCCTGACCTCA
30	5	CCCTTACTGTACCCATTCA
31	6	CTCCCCTTACTGTACCCATT
32	7	TGGCTCCCCTTACTGTACCC
33	8	CTCGAGGCTCCCTGTAGTGG
34	9	ATTCTCGAGGCTCCCTGTAG
35	10	CAAATTCTCGAGGCTCCCTG
36	11	CTAGTATACCGAGCCATTGC
37	12	GTGCTACTAGTATACCGAGC
38	13	CAAGTATCAGAGCCCTGAGT
39	14	TTATCCCCTCACTGACCCCT
40	15	TATTATCCCCTCACTGACCC
41	16	ATTTCATCTTTAAGGCTC
42	17	CTGGATCTACTGCTTAATT
43	654	GCTATTACCTTAACCCAG
Dianas de unión de empalme		
44	HER2-Ex15SA	cctgggggtgcagtgccagccccccacaaatctttctgcc ccccccaggaggctgaccagtgtgtggcctgtgcccact <u>ataaggacccctcccttctg</u>

(continuación)

Dianas de unión de empalme		
SEQ ID.	Nombre	Secuencia (5'-3')
45	HER2-Ex15SD	<u>ccagatgaggaggggcgcatgc</u> <u>ccagccttgc</u> <u>ccatcaac</u> <u>tgcacccactc</u> gtgagtccaaacggtttctgcagaaagga ggactttcattcagggt
46	HER3-Ex13SA	cttgctgggagtccctcagactcctccataaccaccaccctc ttccag <u>ttgc</u> agaggcaa <u>agtgtgt</u> gaccactgtgctc <u>ctctggggatgtgg</u>
47	HER3-Ex13SD	<u>aattata</u> gcgaggagggtgtctgtgtgaccactgcaact <u>ttctgaatgg</u> gtacagtaaggggagccagtcaaggatggg tgggggtggggccctgcaat
48	HER3-Ex14SA	aaggtcaggacttggaaagtgaccccccctcccttattcccc actacaggg <u>agectcgagaat</u> ttgccc <u>catgaggccgaat</u> <u>gcttcctgc</u> ccacccgg
49	HER3-Ex14SD	<u>gccacccggaaatgccaaccatgggg</u> actgccaaca <u>tgcaatgg</u> ctcggtatacttagtagcaccaggatctccaagg gagacagagaaggggcaatac
50	HER3-Ex15SA	ggaattgacctggatctgattttctgacccctctttcca ctcagg <u>gctctgataactt</u> gtgctcaatgtgcc <u>catttcgat</u> <u>atggggccccactg</u>
51	HER3-Ex15SD	<u>ccagatgttcagaatgaatgtcgccctgc</u> catgagaac <u>tgcacccagggtc</u> agtgtggataataaggagagggg gtcagg <u>tggaaagggtaggagca</u>

Transportadores peptídicos ejemplares para administración intracelular de PMO

Péptido	Secuencia (N terminal a C terminal)	SEQ ID
R <sub>8</sub>	RRRRRRRR-XB	52
(RXRRBR) <sub>2</sub> -XB (CPO6062)	RXRRBRXRRBR-XB	53
(RXR) <sub>3</sub> RBR-XB	RXRRXRRXRRBR-XB	54
(RB) <sub>5</sub> RXRBRX-B	RBRBRBRBRBRXRBRX-B	55
(RBRBRBRX) <sub>2</sub> -X	RBRBRBRXRBRBRBRX-X	56
X-(RB) <sub>3</sub> RX(RB) <sub>3</sub> RX	XRB RBRBRBRXRBRBRBR-X	57
(RBRX) <sub>4</sub> B	RBRXRB RBRXRBRX-B	58
(RB) <sub>4</sub> (RX) <sub>4</sub> B	RBRBRBRXRXRXRX-B	59
RX(RB) <sub>2</sub> RX(RB) <sub>3</sub> RX-X	RXRB RBRBRXRB RBRBRX	60
(rXr) <sub>4</sub>	rXrrXrrXrrXr-XB	61
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx B (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB	62
(RRAhx) <sub>4</sub> B	RRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	63
(AhxRR) <sub>4</sub> Ahx B	AhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	64

(continuación)

Péptido	Secuencia (N terminal a C terminal)	SEQ ID
(RAhx) <sub>6</sub> B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	65
(RAhx) <sub>8</sub> B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	66
(RAhxR) <sub>3</sub> AhxB	RAhxRRAhxRRAhxRAhxB	67

X se refiere al ácido 6-aminohexanoico

## LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> AVI BioPharma, Inc. KOLE, Ryszard SAZANI, Peter WAN, Jing

10 <120> PROTEÍNAS VARIANTES DE EMPALME HER2 Y HER3 SOLUBLES,  
OLIGONUCLEOTIDOS DE CAMBIO DE EMPALME, Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES

15 <130> 504508088WO0

20 <140> A asignar  
<141> 06/06/2008

25 <150> US 60/942.319  
<151> 06/06/2007

30 <150> US 60/956.887  
<151> 20/08/2007

<160> 69

35 <170> FastSEQ para Windows, Versión 4.0

40 <210> 1  
<211> 3768  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 1

atggagctgg	cggccttgg	ccgctgggg	ctcctcctcg	ccctcttgcc	ccccggagcc	60
gcgagcaccc	aagtgtcac	cggcacagac	atgaagctgc	ggctccctgc	cagtcccgag	120
acccacctgg	acatgctccg	ccacctctac	cagggctgcc	aggtggtgca	gggaaacctg	180
gaactcacct	acctgcccac	caatgccagc	ctgtccttcc	tgcagggat	ccaggaggtg	240
cagggctacg	tgctcatcgc	tcacaaccaa	gtgaggcagg	tcccactgca	gaggctgcgg	300
attgtgcgag	gcacccagct	cttgaggac	aactatgcc	tggccgtgct	agacaatgga	360
gaccgcgtga	acaataccac	ccctgtcaca	ggggcctccc	caggaggcct	gcgggagctg	420
cagttcgaa	gcctcacaga	gatctgaaa	ggaggggtct	tgatccagcg	gaaccccccag	480
ctctgttacc	aggacacgt	tttggaaag	gacatcttcc	acaagaacaa	ccagctggct	540
ctcacactga	tagacaccaa	ccgctctcg	gcctgccacc	cctttctcc	gatgtgtaa	600
ggctcccgct	gctggggaga	gagttctgag	gattgtcaga	gcctgacgct	cactgtctgt	660
gccgggtggct	gtgcccgtg	caaggggcca	ctgcccactg	actgtgcct	tgagcagtgt	720
gctgcccgt	gcacgggccc	caagcactt	gactgcctgg	cctgcctcca	ttcaaccac	780
agtggcatct	gtgagctgc	ctgcccagcc	ctggtcacct	acaacacaga	cacgtttgag	840
tccatgccc	atcccgaggg	ccgtataca	ttcggcgcca	gctgtgtac	tgcctgtccc	900
tacaactacc	tttctacgg	cgtggatcc	tgcaccctcg	tctggccct	gcacaaccaa	960
gaggtgacag	cagaggatgg	aacacagcg	tgtgagaagt	gcagcaagcc	ctgtgcccga	1020
gtgtgtatg	gtctgggcat	ggagcaactt	cgagaggtg	ggcagttac	cagtgcctaat	1080
atccaggagt	ttgctggctg	caagaagatc	tttggggagcc	tggcatttct	gccggagagc	1140
tttggatgggg	accacgcctc	caacactgccc	ccgctccagc	cagagcagct	ccaagtgttt	1200
gagactctgg	aagagatcac	aggtaaccta	tacatctcg	catggccgga	cagcctgcct	1260
gacctcagcg	tcttccagaa	cctgcaagta	atccggggac	gaattctgca	aatggcgcc	1320
tactcgctga	ccctgcaagg	gctggcattc	agctggctgg	ggctgcgtc	actgaggaa	1380
ctgggcagtg	gactggccct	catccaccat	aacacccacc	tctgcttcgt	gcacacggtg	1440
ccctgggacc	agcttcccg	gaacccgcac	caagctctgc	tccacactgc	caaccggcca	1500
gaggacgagt	gtgtgggcga	gggcctggcc	tgccaccagc	tgtgcgtcccg	agggcactgc	1560
tgggttccag	ggcccaccca	gtgtgtcaac	tgcagccagt	tccttcgggg	ccaggagtgc	1620

gtggaggaat	gccgagtact	gcaggggctc	cccagggagt	atgtgaatgc	caggcactgt	1680
ttgccgtgcc	accctgagtg	tcagccccag	aatggctcag	tgacctgttt	tggaccggag	1740
gctgaccagt	gtgtggcctg	tgcccactat	aaggaccctc	ccttctgcgt	ggcccgctgc	1800
cccagcggtg	tgaaaacctga	cctctcctac	atgcccacatct	ggaagttcc	agatgaggag	1860
ggcgcatgcc	agccttgc	catcaactgc	accactcct	gtgtggac	gatgacaag	1920
ggctgccc	ccgagcagag	agccagccct	ctgacgtcca	tcatctctgc	ggtggttggc	1980
attctgctgg	tcgtggtctt	gggggtggc	tttggatcc	tcataaagcg	acggcagcag	2040
aagatccgga	agtacacgat	gcggagactg	ctgcaggaaa	cggagctggt	ggagccctg	2100
acacctagcg	gagcgatgcc	caaccaggcg	cagatgcgga	tcctgaaaga	gacggagctg	2160
aggaaggtga	aggtgcttg	atctggcgct	tttggcacag	tctacaaggg	catctggatc	2220
cctgatgggg	agaatgtgaa	aattccagtg	gccatcaaag	tggtgaggga	aaacacatcc	2280
cccaaagcca	acaaagaaat	cttagacgaa	gcatacgta	tggctgggt	gggctccca	2340
tatgtctccc	gccttctggg	catctgcctg	acatccacgg	tgcagctggt	gacacagctt	2400
atgccctatg	gctgcctt	agaccatgtc	cgggaaaacc	gcccgcct	gggctccag	2460
gacctgctga	actgggttat	gcagattgcc	aagggatga	gctacctgga	ggatgtgcgg	2520
ctcgtacaca	gggacttggc	cgctcggAAC	gtgctggtca	agagtccaa	ccatgtcaaa	2580
attacagact	tcgggctggc	tcggctgctg	gacattgacg	agacagagta	ccatgcagat	2640
ggggcaagg	tgcccatcaa	gtggatggcg	ctggagtca	ttctccgccc	gcccgttacc	2700
caccagagt	atgtgtggag	ttatggtgt	actgtgtgg	agctgatgac	ttttgggccc	2760
aaaccttacg	atgggatccc	agccccggag	atccctgacc	tgctggaaaa	gggggagcgg	2820
ctgcccagc	cccccatctg	caccattgat	gtctacatga	tcatggtcaa	atgtggatg	2880
attgactctg	aatgtcgccc	aagattccgg	gagttgggt	ctgaattctc	ccgcatggcc	2940
agggacccccc	agcgctttgt	gttcatccag	aatgaggact	tggggccagc	cagtcccttg	3000
gacagcacct	tctaccgctc	actgtctggag	gacgatgaca	tggggac	ggtggatgct	3060
gaggagtatc	ttgtacccca	gcaggccttc	ttctgtccag	accctgcccc	gggcgcgtgg	3120
ggcatggtcc	accacagga	ccgcagctca	tctaccagga	gtggcggtgg	ggacctgaca	3180
ctagggctgg	agccctctg	agaggaggcc	cccaggtctc	cactggcacc	ctccgaaggg	3240
gctggctccg	atgtat	ttgtgac	ctg	gtaatatgtg	3300	
ctccccacac	atgaccc	ccctctacag	cggtac	gggacccac	3360	
ccctctgaga	ctgtatggct	cg	gtggac	3420		
aaccagccag	atgttgcggc	ccagcc	gtggaga	3480		
cgacctgctg	gtgccact	ggaaaggccc	aagactct	3540		
gtcaaagacg	ttttgc	ttggggtgcc	gtggagaacc	3600		
ggaggagctg	ccc	ccacc	ccgact	3660		
tattactggg	cc	ctgc	gacac	3720		
cctacggcag	aga	cc	caa	3768		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1255

5

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 2

Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
1														15	
Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys
														20	30
Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His
														35	45
Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr
														50	60
Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val
														65	80
Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu
														85	95
Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr
														100	110
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro
														115	125
Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser
														130	140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln  
 145 150 155 160  
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn  
 165 170 175  
 Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys  
 180 185 190  
 His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser  
 195 200 205  
 Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys  
 210 215 220  
 Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu  
 245 250 255  
 His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val  
 260 265 270  
 Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg  
 275 280 285  
 Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu  
 290 295 300  
 Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln  
 305 310 315 320  
 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys  
 325 330 335  
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu  
 340 345 350  
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys  
 355 360 365  
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp  
 370 375 380  
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe  
 385 390 395 400  
 Glu Thr Leu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro  
 405 410 415  
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg  
 420 425 430  
 Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu  
 435 440 445  
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly  
 450 455 460  
 Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val  
 465 470 475 480  
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr  
 485 490 495  
 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His  
 500 505 510  
 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys  
 515 520 525  
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys  
 530 535 540  
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys  
 545 550 555 560  
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys  
 565 570 575  
 Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp  
 580 585 590  
 Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu  
 595 600 605  
 Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln  
 610 615 620  
 Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys

## ES 2 798 758 T3

625	630	635	640
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser			
645	650	655	
Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly			
660	665	670	
Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg			
675	680	685	
Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly			
690	695	700	
Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu			
705	710	715	720
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys			
725	730	735	
Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile			
740	745	750	
Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu			
755	760	765	
Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg			
770	775	780	
Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu			
785	790	795	800
Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg			
805	810	815	
Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly			
820	825	830	
Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala			
835	840	845	
Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe			
850	855	860	
Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp			
865	870	875	880
Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg			
885	890	895	
Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val			
900	905	910	
Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala			
915	920	925	
Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro			
930	935	940	
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met			
945	950	955	960
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe			
965	970	975	
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu			
980	985	990	
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu			
995	1000	1005	
Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu			
1010	1015	1020	
Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly			
1025	1030	1035	1040
Gly Met Val His His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly			
1045	1050	1055	
Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Ala Pro Arg			
1060	1065	1070	
Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly			
1075	1080	1085	
Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His			
1090	1095	1100	
Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu			
1105	1110	1115	1120

Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln  
 1125 1130 1135  
 Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro  
 1140 1145 1150  
 Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu  
 1155 1160 1165  
 Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val  
 1170 1175 1180  
 Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln  
 1185 1190 1195 1200  
 Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala  
 1205 1210 1215  
 Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala  
 1220 1225 1230  
 Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr  
 1235 1240 1245  
 Leu Gly Leu Asp Val Pro Val  
 1250 1255

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 4029

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 3

atgaggcgca	acgacgctct	gcaggtgctg	ggcttgcttt	tcagcctggc	ccggggctcc	60
gaggtgggca	actctcaggc	agtgtgtcct	gggactctga	atggcctgag	tgtgaccggc	120
gatgctgaga	accaataccca	gacactgtac	aagctctacg	agagggtgtga	ggtgtgtatg	180
gggaaccttg	agattgtgtc	cacgggacac	aatgccgacc	tctccttcct	gcagtggatt	240
cgagaagtga	caggctatgt	cctcgtggcc	atgaatgaat	tctctactct	accattgccc	300
aacctccgcg	ttgtgcgagg	gaccaggc	tacgatggga	agtttgcctat	cttcgtcatg	360
ttgaactata	acaccaactc	cagccacgct	ctgcgccagc	tccgcttgac	tcaagtcacc	420
gagattctgt	cagggggtgt	ttatattgag	aagaacgata	agctttgtca	catggacaca	480
attgactgga	gggacatcg	gagggaccga	gatgctgaga	tagtggtaa	ggacaatggc	540
agaagctgtc	ccccctgtca	tgaggtttgc	aaggggcgtat	gctggggtcc	tggatcagaa	600
gactgccaga	cattgaccaa	gaccatctgt	gctcctcagt	gtaatggta	ctgctttggg	660
cccaacccca	accagtgtc	ccatgatgag	tgtgcgggg	gctgctcagg	ccctcaggac	720
acagactgtc	ttgcctgccc	gcacttcaat	gacagtggag	cctgtgtacc	tcgctgtcca	780
cagcctcttgc	tctacaacaa	gctaacttgc	cagctggaa	ccaatcccc	caccaagttat	840
cagtatggag	gagtttgcgt	agccagctgt	ccccataact	ttgtggtaa	tcaaacatcc	900
tgtgtcaggc	cctgtcctcc	tgacaagatg	gaagtagata	aaaatggct	caagatgtgt	960
gagccttgc	ggggactatgt	tcccaagcc	tgtgaggaaa	caggctctgg	gagccgcttc	1020
cagactgtgg	actcgagcaa	cattgatgga	tttgcgtact	gcaccaagat	cctgggcaac	1080
ctggactttc	tgatcaccgg	cctcaatggc	gaccctgtgc	acaagatccc	tgccctggac	1140
ccagagaagc	tcaatgtc	ccggacagta	cgggagatca	caggttaccc	gaacatccag	1200
tcctggccgc	cccacatgca	caacttcgt	gtttttcca	atttgcacaa	cattggaggc	1260
agaaggctct	acaaccgggg	cttctcattg	ttgatcatga	agaacttgc	tgtcacatct	1320
ctgggcttcc	gatccctgaa	ggaaattgt	gttggcgt	tctatataag	tgccaaatagg	1380
cagctctgt	accaccactc	tttgcgttgc	accaagggtc	ttcgggggccc	tacggaagag	1440
cgactagaca	tcaaggatcaa	tcggccgcgc	agagactgc	tggcagaggg	caaagtgtgt	1500
gaccctactgt	gttcctctgg	gggatgttgc	ggcccaggcc	ctggcgttgc	tttgcctgt	1560
cgaattata	gccgaggagg	tgtctgtgt	acccactgca	actttctgaa	tggggagct	1620
cgagaatttg	cccatgaggc	cgaatgttc	tcctgcccacc	cggaatgcca	acccatggag	1680
ggcactgcca	catgcaatgg	ctcgggtctt	gatacttgc	ctcaatgtgc	ccatgttgc	1740
gatggggccc	actgtgtgag	cagctgtccc	catggagttcc	taggtgc	ggggccaaatc	1800
tacaagtacc	cagatgttca	gaatgaatgt	cgcccctgccc	atgagaactg	cacccagggg	1860
tgtaaaggac	cagagcttca	agactgttta	ggacaaacac	tggtgcgtat	cgccaaaacc	1920
catctgacaa	tggctttgac	agtgtatgc	ggatttgcgt	tgatgttcat	gatgtgggc	1980
ggcacttttc	tctactggcg	tggcgcgg	attcagaata	aaaggctat	gaggcgatac	2040
ttggAACGGG	gtgagagcat	agagctctg	gacccctgt	agaaggctaa	caaagtcttg	2100
gccagaatct	tcaaagagac	agagctaagg	aagtttaaag	tgcttggctc	gggtgtctt	2160

ggaactgtgc acaaaggagt	gtggatccct	gagggtgaat	caatcaagat	tccagtctgc	2220
attaaagtca ttgaggacaa	gagtggacgg	cagagtttc	aagctgtgac	agatcatatg	2280
ctggccattg gcagcctgga	ccatcccac	attgttaaggc	tgctggact	atgcccagg	2340
tcatctctgc agcttgtcac	tcaatatttgc	cctctgggtt	ctctgctgga	tcatgtgaga	2400
caacaccggg gggcactggg	gccacagctg	ctgctcaact	ggggagtaca	aattgccaag	2460
ggaatgtact accttgagga	acatggtatg	gtgcatagaa	acctggctgc	ccgaaacgtg	2520
ctactcaagt caccagtc	ggttcaggtg	gcagattttgc	gtgtggctga	cctgctgcct	2580
cctgatgata agcagctgtc	atacagttag	gccaagactc	caattaagtgc	gatggccctt	2640
gagagtatcc accttgggaa	atacacacac	cagagttagtgc	tctggagctc	tggtgtgaca	2700
gtttgggagt tgatgacctt	cggggcagag	ccctatgcag	ggctacgatt	ggctgaagta	2760
ccagacactgc tagagaaggg	ggagcgggttgc	acagcccccc	agatctgcac	aattgtatgtc	2820
tacatggtgc tggtaaggct	ttggatgatt	gatgagaaca	ttcgcccaac	ctttaaagaa	2880
ctagccaatg agttcaccag	gatggcccgaa	gaccaccac	ggtatctgg	cataaaagaga	2940
gagagtggc ctggaatagc	ccctggccca	gagccccatg	gtctgacaaa	caagaagcta	3000
gaggaagtag agctggagcc	agaactagac	ctagacctag	acttggaaagc	agaggaggac	3060
aacctggcaaa ccaccacact	gggctccgc	ctcagcctac	cagttggaaac	acttaatcg	3120
ccacgtggga gccagagcct	tttaagtccat	tcatctggat	acatgcccatt	gaaccaggg	3180
aatcttgggg agtcttgc	ggagtctgc	gtttctggg	gcagtaacg	gtgccccctg	3240
ccagtctctc tacacccaa	gccacgggaa	tgcctggcat	cagagtcatc	agagggggcat	3300
gtaacaggct ctgaggctga	gctccaggag	aaagtgtcaa	tgttaggg	ccggagcagg	3360
agccggagcc cacggccac	cggagatagc	gcctaccatt	cccagcgcca	cagtctgc	3420
actcctgtta ccccactctc	cccacccggg	ttagaggaag	aggatgtcaa	cggttatgtc	3480
atgccagata cacacctaa	aggtactccc	tcctccggg	aaggcaccct	ttcttcagtg	3540
ggtctcaagt ctgtcctggg	tactgaagaa	gaagatgaag	atgaggagta	tgaatacatg	3600
aaccggagga gaaggcacag	tccacccat	cccccttaggc	caagttccct	tgaggagctg	3660
ggttatgagt acatggatgt	ggggtcagac	ctcagtcct	ctctggcag	cacacagagt	3720
tgcccactcc accctgtacc	catcatgccc	actgcaggca	caactccaga	tgaagactat	3780
gaatatatga atccggcaac	agatggaggt	ggtcctgggg	gtgattatgc	agccatgggg	3840
gcctgcccag catctgagca	agggtatgaa	gagatgagag	cttttcaggg	gcctggacat	3900
caggcccccc atgtccattat	tgccgccta	aaaactctac	gtagcttaga	ggctacagac	3960
tctgcctttg ataaccctga	ttactggcat	agcaggctt	tcccaaggc	taatgcccag	4020
agaacgtaa					4029

&lt;210&gt; 4

5 &lt;211&gt; 1342

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 4

10

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

Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly  
 180 185 190  
 Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr  
 195 200 205  
 Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn  
 210 215 220  
 Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp  
 225 230 235 240  
 Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val  
 245 250 255  
 Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu  
 260 265 270  
 Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala  
 275 280 285  
 Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala  
 290 295 300  
 Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys  
 305 310 315 320  
 Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser  
 325 330 335  
 Gly Ser Arg Phe Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val  
 340 345 350  
 Asn Cys Thr Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu  
 355 360 365  
 Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Lys Leu  
 370 375 380  
 Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln  
 385 390 395 400  
 Ser Trp Pro Pro His Met His Asn Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr  
 405 410 415  
 Thr Ile Gly Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg Gly Phe Ser Leu Leu Ile  
 420 425 430  
 Met Lys Asn Leu Asn Val Thr Ser Leu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu  
 435 440 445  
 Ile Ser Ala Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg Gln Leu Cys Tyr  
 450 455 460  
 His His Ser Leu Asn Trp Thr Lys Val Leu Arg Gly Pro Thr Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Arg Leu Asp Ile Lys His Asn Arg Pro Arg Arg Asp Cys Val Ala Glu  
 485 490 495  
 Gly Lys Val Cys Asp Pro Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys Trp Gly Pro  
 500 505 510  
 Gly Pro Gly Gln Cys Leu Ser Cys Arg Asn Tyr Ser Arg Gly Gly Val  
 515 520 525  
 Cys Val Thr His Cys Asn Phe Leu Asn Gly Glu Pro Arg Glu Phe Ala  
 530 535 540  
 His Glu Ala Glu Cys Phe Ser Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Met Glu  
 545 550 555 560  
 Gly Thr Ala Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Asp Thr Cys Ala Gln Cys  
 565 570 575  
 Ala His Phe Arg Asp Gly Pro His Cys Val Ser Ser Cys Pro His Gly  
 580 585 590  
 Val Leu Gly Ala Lys Gly Pro Ile Tyr Lys Tyr Pro Asp Val Gln Asn  
 595 600 605  
 Glu Cys Arg Pro Cys His Glu Asn Cys Thr Gln Gly Cys Lys Gly Pro  
 610 615 620  
 Glu Leu Gln Asp Cys Leu Gly Gln Thr Leu Val Leu Ile Gly Lys Thr  
 625 630 635 640  
 His Leu Thr Met Ala Leu Thr Val Ile Ala Gly Leu Val Val Ile Phe  
 645 650 655  
 Met Met Leu Gly Gly Thr Phe Leu Tyr Trp Arg Gly Arg Arg Ile Gln

## ES 2 798 758 T3

660	665	670
Asn Lys Arg Ala Met Arg Arg Tyr	Leu Glu Arg Gly Glu Ser Ile Glu	
675	680	685
Pro Leu Asp Pro Ser Glu Lys Ala Asn Lys Val	Leu Ala Arg Ile Phe	
690	695	700
Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Leu Lys Val	Leu Gly Ser Gly Val Phe	
705	710	715
Gly Thr Val His Lys Gly Val Trp Ile	Pro Glu Gly Glu Ser Ile Lys	
725	730	735
Ile Pro Val Cys Ile Lys Val Ile Glu Asp	Lys Ser Gly Arg Gln Ser	
740	745	750
Phe Gln Ala Val Thr Asp His Met	Leu Ala Ile Gly Ser Leu Asp His	
755	760	765
Ala His Ile Val Arg Leu Leu Gly	Leu Cys Pro Gly Ser Ser Leu Gln	
770	775	780
Leu Val Thr Gln Tyr	Leu Pro Leu Gly Ser	Leu Leu Asp His Val Arg
785	790	795
Gln His Arg Gly Ala Leu Gly	Pro Gln Leu Leu Leu Asn Trp Gly Val	
805	810	815
Gln Ile Ala Lys Gly Met Tyr	Tyr Leu Glu His Gly Met Val His	
820	825	830
Arg Asn Leu Ala Ala Arg Asn Val	Leu Leu Lys Ser Pro Ser Gln Val	
835	840	845
Gln Val Ala Asp Phe Gly Val	Ala Asp Leu Leu Pro Pro Asp Asp Lys	
850	855	860
Gln Leu Leu Tyr Ser Glu Ala Lys	Thr Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu	
865	870	875
Glu Ser Ile His Phe Gly Lys	Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser	
885	890	895
Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu	Leu Met Thr Phe Gly Ala Glu Pro Tyr	
900	905	910
Ala Gly Leu Arg Leu Ala Glu	Val Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu	
915	920	925
Arg Leu Ala Gln Pro Gln	Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val Met	
930	935	940
Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Glu	Asn Ile Arg Pro Thr Phe Lys Glu	
945	950	955
Leu Ala Asn Glu Phe Thr Arg	Met Ala Arg Asp Pro Pro Arg Tyr Leu	
965	970	975
Val Ile Lys Arg Glu Ser Gly	Pro Ile Ala Pro Gly Pro Glu Pro	
980	985	990
His Gly Leu Thr Asn Lys Lys	Leu Glu Val Glu Leu Glu Pro Glu	
995	1000	1005
Leu Asp Leu Asp Leu Asp	Leu Glu Ala Glu Glu Asp Asn Leu Ala Thr	
1010	1015	1020
Thr Thr Leu Gly Ser Ala	Leu Ser Leu Pro Val Gly Thr Leu Asn Arg	
1025	1030	1035
Pro Arg Gly Ser Gln Ser	Leu Leu Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Met Pro	
1045	1050	1055
Met Asn Gln Gly Asn Leu Gly	Gl Ser Cys Gln Glu Ser Ala Val Ser	
1060	1065	1070
Gly Ser Ser Glu Arg Cys Pro	Arg Pro Val Ser Leu His Pro Met Pro	
1075	1080	1085
Arg Gly Cys Leu Ala Ser	Glu Ser Ser Glu Gly His Val Thr Gly Ser	
1090	1095	1100
Glu Ala Glu Leu Gln Glu	Lys Val Ser Met Cys Arg Ser Arg Ser Arg	
1105	1110	1115
Ser Arg Ser Pro Arg Pro	Arg Gly Asp Ser Ala Tyr His Ser Gln Arg	
1125	1130	1135
His Ser Leu Leu Thr Pro Val	Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly Leu Glu	
1140	1145	1150

Glu Glu Asp Val Asn Gly Tyr Val Met Pro Asp Thr His Leu Lys Gly  
 1155 1160 1165  
 Thr Pro Ser Ser Arg Glu Gly Thr Leu Ser Ser Val Gly Leu Ser Ser  
 1170 1175 1180  
 Val Leu Gly Thr Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Tyr Met  
 1185 1190 1195 1200  
 Asn Arg Arg Arg His Ser Pro Pro His Pro Pro Arg Pro Ser Ser  
 1205 1210 1215  
 Leu Glu Glu Leu Gly Tyr Glu Tyr Met Asp Val Gly Ser Asp Leu Ser  
 1220 1225 1230  
 Ala Ser Leu Gly Ser Thr Gln Ser Cys Pro Leu His Pro Val Pro Ile  
 1235 1240 1245  
 Met Pro Thr Ala Gly Thr Thr Pro Asp Glu Asp Tyr Glu Tyr Met Asn  
 1250 1255 1260  
 Arg Gln Arg Asp Gly Gly Pro Gly Gly Asp Tyr Ala Ala Met Gly  
 1265 1270 1275 1280  
 Ala Cys Pro Ala Ser Glu Gln Gly Tyr Glu Glu Met Arg Ala Phe Gln  
 1285 1290 1295  
 Gly Pro Gly His Gln Ala Pro His Val His Tyr Ala Arg Leu Lys Thr  
 1300 1305 1310  
 Leu Arg Ser Leu Glu Ala Thr Asp Ser Ala Phe Asp Asn Pro Asp Tyr  
 1315 1320 1325  
 Trp His Ser Arg Leu Phe Pro Lys Ala Asn Ala Gln Arg Thr  
 1330 1335 1340

<210> 5  
 <211> 1755  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

atggagctgg	cggccttgtg	ccgctggggg	ctcctcctcg	ccctcttgcc	ccccggagcc	60
gcgagcaccc	aagtgtcac	cggcacagac	atgaagctgc	ggctccctgc	cagtcccgag	120
acccacctgg	acatgctccg	ccacctctac	cagggctgcc	aggtggtgca	gggaaacctg	180
gaactcacct	acctgcccac	caatgccagc	ctgtccttcc	tgcaggatat	ccaggaggtg	240
cagggctacg	tgtctcatcgc	tcacaaccaa	gtgaggcagg	tcccactgca	gaggctgcgg	300
attgtgcgag	gcaccccagct	cttgaggac	aactatgccc	tggccgtgct	agacaatgga	360
gaccgcgtga	acaataccac	ccctgtcaca	ggggcctccc	caggaggcct	gcgggagctg	420
cagcttcgaa	gcctcacaga	gatctgaaa	ggaggggtct	tgatccagcg	gaaccccccag	480
ctctgctacc	aggacacgat	tttggaaag	gacatcttcc	acaagaacaa	ccagctggct	540
ctcacactga	tagacaccaa	ccgctctcg	gcctgccacc	cctgttctcc	gatgtgttaag	600
ggctcccgt	gctggggaga	gagttcttag	gattgtcaga	gcctgacgct	cactgtctgt	660
gcccgtggct	gtgcccgtg	caaggggcca	ctgcccactg	actgctgcca	tgagcagtgt	720
gctgccggct	gcacgggccc	caagcactt	gactgcctgg	cctgcctcca	cttcaaccac	780
agtggcatct	gtgagctgca	ctgcccagcc	ctggtcaccc	acaacacaga	cacgtttgag	840
tccatgcca	atcccgaggg	ccggtataca	ttcggcgcca	gctgtgtgac	tgcctgtccc	900
tacaactacc	tttctacgga	cgtggatcc	tgcaccctcg	tctgccccct	gcacaaccaa	960
gaggtgacag	cagaggatgg	aacacagcgg	tgtgagaagt	gcagcaagcc	ctgtgcccga	1020
gtgtgctatg	gtctgggcat	ggagcaactt	cgagaggtga	gggcagttac	cagtgc当地	1080
atccaggagt	ttgctggctg	caagaagatc	tttgggagcc	tggcatttct	gccggagagc	1140
tttgcgtgggg	acccagcctc	caacactgccc	ccgctccagc	cagagcagct	ccaagtgttt	1200
gagactctgg	aagagatcac	agttaccta	tacatctcg	catggccgga	cagcctgcct	1260
gacctcagcg	tcttccagaa	cctgcaagta	atccggggac	gaattctgca	caatggcgcc	1320
tactcgctga	ccctgcaagg	gctggcattc	agctggctgg	ggctgcgtc	actgaggaa	1380
ctggcgtgt	gactggccct	catccaccat	aacaccacc	tctgcttcgt	gcacacggtg	1440
ccctgggacc	agcttcccg	gaacccgcac	caagctctgc	tccacactgc	caaccggcca	1500
gaggacgagt	gtgtggcga	gggcctggcc	tgccaccagc	tgtgcgtcc	agggcactgc	1560
tgggtccag	ggcccaccca	gtgtgtcaac	tgcagccagt	tccttcgggg	ccaggagtg	1620
gtggaggaat	gccgagact	gcaggggctc	cccaggaggt	atgtgaatgc	cagggactgt	1680
ttgcccgtgcc	accctgagtg	tcagccccag	aatggctcag	tgacctgttt	tggaccgctg	1740
tgtggacctg	gatga					1755

5

<210> 6  
 <211> 584  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
 20 25 30  
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His  
 35 40 45  
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr  
 50 55 60  
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val  
 65 70 75 80  
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu  
 85 90 95  
 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr  
 100 105 110  
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro  
 115 120 125  
 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln  
 145 150 155 160  
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn  
 165 170 175  
 Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys  
 180 185 190  
 His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser  
 195 200 205  
 Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys  
 210 215 220  
 Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu  
 245 250 255  
 His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val  
 260 265 270  
 Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg  
 275 280 285  
 Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu  
 290 295 300  
 Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln  
 305 310 315 320  
 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys  
 325 330 335  
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu  
 340 345 350  
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys  
 355 360 365  
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp  
 370 375 380  
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe  
 385 390 395 400  
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro  
 405 410 415  
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg  
 420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu  
 435 440 445  
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly  
 450 455 460  
 Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val  
 465 470 475 480  
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr  
 485 490 495  
 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His  
 500 505 510  
 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys  
 515 520 525  
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys  
 530 535 540  
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys  
 545 550 555 560  
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys  
 565 570 575  
 Phe Gly Pro Leu Cys Gly Pro Gly  
 580

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1626

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 7

atgagggcga acgacgctct	gcagggcgtg	ggcttgcttt	tcagcctggc	ccggggctcc	60
gaggtggca actctcaggc	agtgtgtcct	gggactctga	atggcctgag	tgtgaccggc	120.
gatgctgaga accaatacca	gacactgtac	aagctctacg	agaggtgtga	ggtgtgtatg	180
gggaaccttg agattgtct	cacggacac	aatgccgacc	tctccttcct	gcagtggatt	240
cgagaagtga caggctatgt	cctcggtggc	atgaatgaat	tctctactct	accattggcc	300
aacctcccg	tggtgcgagg	gacccaggc	tacgatggga	agtttgcatt	360
ttgaactata acaccaactc	cagccacgt	ctgcgcccagc	tccgcttgc	tcaagctcacc	420
gagattctgt caggggggt	ttatatttag	aagaacgata	agctttgtca	catggacaca	480
attgacttgg	gggacatcgt	gagggaccga	gatgctgaga	tagtggtaa	540
agaagctgtc	ccccctgtca	tgaggttgc	aaggggcgt	gctggggtcc	600
gactgccaga	cattgaccaa	gaccatctgt	gctcctca	tgcgtttggg	660
cccaacccca	accagtgtc	ccatgatgag	tgtgccccgg	gctgctcagg	720
acagactgtc	ttgcctggc	gcacttaat	gacagtggag	cctgtgtacc	780
cagcctcttgc	tctacaacaa	gctaactttc	cagctggAAC	ccaatcccc	840
cagtatggag	gagtttgtgt	agccagctgt	ccccataact	ttgtggtaa	900
tgtgtcaggg	cctgtcctcc	tgacaagatg	gaagtagata	tc当地acatcc	960
gagccttgg	ggggactatg	tcccaaagcc	tgtgaggaa	caggctctgg	1020
cagactgtgg	actcgagcaa	cattgatgga	tttgtgaact	gacccaagat	1080
ctggactttc	tgatcaccgg	cctcaatgg	gacccctggc	acaagatccc	1140
ccagagaagc	tcaatgtctt	ccggacagta	cgggagatca	cagttacct	1200
tcctggccgc	cccacatgca	caacttcagt	gtttttcca	gaacatccag	1260
agaagctct	acaacccgggg	cttctcattg	ttgatcatga	atggacaac	1320
ctgggcttcc	gatccctgaa	ggaaattagt	gctggggcgt	cattggaggc	1380
cagctctgt	accaccactt	tttgaactgg	accaggtgc	tgtcacatct	1440
cgactagaca	tcaagcataa	tcggccgcgc	agagactgc	ggagcctcga	1500
atgagggcga	atgtttctcc	tgccacccgg	aatgccaacc	gaatttgc	1560
gcaatggctc	gggctctgat	acttgtgtc	aatgtgcca	ttttcgagat	1620
gtgtga					1626

10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 541

&lt;212&gt; PRT

15

<213> *Homo sapiens*

## ES 2 798 758 T3

&lt;400&gt; 8

Met	Arg	Ala	Asn	Asp	Ala	Leu	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu
1					5				10						15
Ala	Arg	Gly	Ser	Glu	Val	Gly	Asn	Ser	Gln	Ala	Val	Cys	Pro	Gly	Thr
					20				25						30
Leu	Asn	Gly	Leu	Ser	Val	Thr	Gly	Asp	Ala	Glu	Asn	Gln	Tyr	Gln	Thr
					35				40						45
Leu	Tyr	Lys	Leu	Tyr	Glu	Arg	Cys	Glu	Val	Val	Met	Gly	Asn	Leu	Glu
					50				55						60
Ile	Val	Leu	Thr	Gly	His	Asn	Ala	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Trp	Ile
					65				70						80
Arg	Glu	Val	Thr	Gly	Tyr	Val	Leu	Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Ser	Thr
					85				90						95
Leu	Pro	Leu	Pro	Asn	Leu	Arg	Val	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Val	Tyr	Asp
					100				105						110
Gly	Lys	Phe	Ala	Ile	Phe	Val	Met	Leu	Asn	Tyr	Asn	Thr	Asn	Ser	Ser
					115				120						125
His	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Thr	Gln	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Ser
					130				135						140
Gly	Gly	Val	Tyr	Ile	Glu	Lys	Asn	Asp	Lys	Leu	Cys	His	Met	Asp	Thr
					145				150						160
Ile	Asp	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Arg	Asp	Arg	Asp	Ala	Glu	Ile	Val	Val
					165				170						175
Lys	Asp	Asn	Gly	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Cys	His	Glu	Val	Cys	Lys	Gly
					180				185						190
Arg	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Thr	Leu	Thr	Lys	Thr
					195				200						205
Ile	Cys	Ala	Pro	Gln	Cys	Asn	Gly	His	Cys	Phe	Gly	Pro	Asn	Pro	Asn
					210				215						220
Gln	Cys	Cys	His	Asp	Glu	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Pro	Gln	Asp
					225				230						240
Thr	Asp	Cys	Phe	Ala	Cys	Arg	His	Phe	Asn	Asp	Ser	Gly	Ala	Cys	Val
					245				250						255
Pro	Arg	Cys	Pro	Gln	Pro	Leu	Val	Tyr	Asn	Lys	Leu	Thr	Phe	Gln	Leu
					260				265						270
Glu	Pro	Asn	Pro	His	Thr	Lys	Tyr	Gln	Tyr	Gly	Gly	Val	Cys	Val	Ala
					275				280						285
Ser	Cys	Pro	His	Asn	Phe	Val	Val	Asp	Gln	Thr	Ser	Cys	Val	Arg	Ala
					290				295						300
Cys	Pro	Pro	Asp	Lys	Met	Glu	Val	Asp	Lys	Asn	Gly	Leu	Lys	Met	Cys
					305				310						320
Glu	Pro	Cys	Gly	Gly	Leu	Cys	Pro	Lys	Ala	Cys	Glu	Gly	Thr	Gly	Ser
					325				330						335
Gly	Ser	Arg	Phe	Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Val
					340				345						350
Asn	Cys	Thr	Lys	Ile	Leu	Gly	Asn	Leu	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr	Gly	Leu
					355				360						365
Asn	Gly	Asp	Pro	Trp	His	Lys	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Pro	Glu	Lys	Leu
					370				375						380
Asn	Val	Phe	Arg	Thr	Val	Arg	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ile	Gln
					385				390						400
Ser	Trp	Pro	Pro	His	Met	His	Asn	Phe	Ser	Val	Phe	Ser	Asn	Leu	Thr
					405				410						415
Thr	Ile	Gly	Gly	Arg	Ser	Leu	Tyr	Asn	Arg	Gly	Phe	Ser	Leu	Leu	Ile
					420				425						430
Met	Lys	Asn	Leu	Asn	Val	Thr	Ser	Leu	Gly	Phe	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu
					435				440						445
Ile	Ser	Ala	Gly	Arg	Ile	Tyr	Ile	Ser	Ala	Asn	Arg	Gln	Leu	Cys	Tyr
					450				455						460
His	His	Ser	Leu	Asn	Trp	Thr	Lys	Val	Leu	Arg	Gly	Pro	Thr	Glu	Glu
					465				470						480

Arg	Leu	Asp	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Pro	Arg	Arg	Asp	Cys	Gly	Ser	Leu
485									490						495
Glu	Asn	Leu	Pro	Met	Arg	Pro	Asn	Ala	Ser	Pro	Ala	Thr	Arg	Asn	Ala
500									505						510
Asn	Pro	Trp	Arg	Ala	Leu	Pro	His	Ala	Met	Ala	Arg	Ala	Leu	Ile	Leu
515									520						525
Val	Leu	Asn	Val	Pro	Ile	Phe	Glu	Met	Gly	Pro	Thr	Val			
530									535						540

5 <210> 9  
 <211> 1668  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 9

atgagggcga	acgacgctct	gcaggtgctg	ggcttgcttt	ttagcctggc	ccggggctcc	60
gagggtggca	actctcaggc	agtgtgtcct	gggactctga	atggcctgag	tgtgaccggc	120
gatgctgaga	accaatacca	gacactgtac	aagctctacg	agaggtgtga	gtgtgtgtatg	180
gggaaccttg	agattgtgct	cacgggacac	aatgccgacc	tctccttcct	gcagtggtatt	240
cgagaagtga	caggctatgt	cctcgtggcc	atgaatgaat	tctctactct	accattgccc	300
aacctcccg	ttgtgcgagg	gaccaggc	tacgatggga	agtttccat	ttcgtcatg	360
ttgaactata	acaccaactc	cagccacgct	ctgcgcgcage	tccgcttgcac	ttagctcacc	420
gagattctgt	caggggggtgt	ttatatttag	aaaacgata	agctttgtca	catggacaca	480
attgacttga	gggacatcgt	gagggaccga	gatgctgaga	tagtggtaa	ggacaatggc	540
agaagctgtc	ccccctgtca	tgaggttgc	aaggggcgat	gctggggtcc	tggatcagaa	600
gactgccaga	cattgaccaa	gaccatctgt	gctcctcagt	gtaatggtca	ctgctttggg	660
cccaaccca	accagtgtc	ccatgatgag	tgtgcgggg	gctgctcagg	ccctcaggac	720
acagactgtc	ttgcctgcgc	gcacttcaat	gacagtggag	cctgtgtacc	tcgctgtcca	780
cagcctcttgc	tctacaacaa	gctaacttgc	cagctggaa	ccaatcccc	caccaagtat	840
cagtatggag	gagtttgcgt	agccagctgt	ccccataact	ttgtggtaa	tcaaacatcc	900
tgtgtcaggg	cctgtcctcc	tgacaagatg	gaagtagata	aaaatggct	caagatgtgt	960
gaggcctgtg	ggggactatg	tcccaaagcc	tgtgagggaa	caggctctgg	gagccgcttc	1020
cagactgtgg	actcgagcaa	cattgatgga	tttgcgtact	gcaccaagat	cctggcaac	1080
ctggactttc	tgatcacccg	cctcaatgga	gaccctggc	acaagatccc	tgccctggac	1140
ccagagaagc	tcaatgtctt	ccggacagta	cgggagatca	caggttacct	gaacatccag	1200
tcctggccgc	cccacatgca	caacttcagt	gtttttccca	atttgacaac	cattggaggc	1260
agaagctct	acaaccgggg	cttctcatttgc	ttgatcatga	agaacttga	tgtcacatct	1320
ctgggcttcc	gatccctgaa	ggaaattagt	gttggcgta	tctatataag	tgccaatagg	1380
cagctctgtc	accaccactc	tttgcgtact	accaaggtgc	ttcgggggccc	tacgaaagag	1440
cgactagaca	tcaagcataa	tcggccgcgc	agagactgcg	tggcagagg	caaagtgtgt	1500
gaccctgtc	gctcctctgg	gggatgctgg	ggcccaggcc	ctggcgtact	tttgcctgt	1560
cgaaattata	gccgaggagg	tgtctgtgt	accactgca	actttctgaa	tggggctctg	1620
atacttgc	tcaatgtgcc	catttcgag	atggggccca	ctgtgtga		1668

15 <210> 10  
 <211> 555  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

ES 2 798 758 T3

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu  
1 5 10 15  
Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr  
20 25 30  
Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr  
35 40 45  
Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu  
50 55 60  
Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile  
65 70 75 80  
Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr

85	90	95
Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val	Arg Gly Thr Gln Val	Tyr Asp
100	105	110
Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met	Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser	
115	120	125
His Ala Leu Arg Gln Leu Arg	Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser	
130	135	140
Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys	Leu Cys His Met Asp Thr	
145	150	155
Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg	Asp Ala Glu Ile Val Val	
165	170	175
Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro	Cys His Glu Val Cys Lys Gly	
180	185	190
Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln	Thr Leu Thr Lys Thr	
195	200	205
Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe	Gly Pro Asn Pro Asn	
210	215	220
Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly	Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp	
225	230	235
Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe	Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val	
245	250	255
Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val	Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu	
260	265	270
Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln	Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala	
275	280	285
Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp	Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala	
290	295	300
Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys	Asn Gly Leu Lys Met Cys	
305	310	315
Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys	Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser	
325	330	335
Gly Ser Arg Phe Gln Thr Val Asp Ser	Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val	
340	345	350
Asn Cys Thr Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe	Leu Ile Thr Gly Leu	
355	360	365
Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile Pro Ala	Leu Asp Pro Glu Lys Leu	
370	375	380
Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile	Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln	
385	390	395
Ser Trp Pro Pro His Met His Asn Phe	Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr	
405	410	415
Thr Ile Gly Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg	Gly Phe Ser Leu Leu Ile	
420	425	430
Met Lys Asn Leu Asn Val Thr Ser	Leu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu	
435	440	445
Ile Ser Ala Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala	Asn Arg Gln Leu Cys Tyr	
450	455	460
His His Ser Leu Asn Trp Thr Lys Val	Leu Arg Gly Pro Thr Glu Glu	
465	470	475
Arg Leu Asp Ile Lys His Asn Arg Pro	Arg Asp Cys Val Ala Glu	
485	490	495
Gly Lys Val Cys Asp Pro Leu Cys Ser	Ser Gly Gly Cys Trp Gly Pro	
500	505	510
Gly Pro Gly Gln Cys Leu Ser Cys Arg Asn	Tyr Ser Arg Gly Gly Val	
515	520	525
Cys Val Thr His Cys Asn Phe Leu Asn	Gly Ala Leu Ile Leu Val Leu	
530	535	540
Asn Val Pro Ile Phe Glu Met	Gly Pro Thr Val	
545	550	555

## ES 2 798 758 T3

<211> 1710  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5 &lt;400&gt; 11

atgagggcga	acgacgctct	gcaggtgctg	ggcttgcttt	tcagcctggc	ccggggctcc	60
gaggtggca	actctcagc	agtgtgtcct	gggactctga	atggcctgag	tgtgaccggc	120
gatgtgaga	accaatacca	gacactgtac	aagctctacg	agaggtgtga	ggtggatgat	180
ggaaaccttg	agattgtgt	cacgggacac	aatgccgacc	tctccttct	gcagtggatt	240
cgagaagtga	caggctatgt	cctcggtggcc	atgaatgaat	tctctactct	accattgccc	300
aaccccccgc	ttgtgcgagg	gaccaggc	tacgatggga	agtttgc	cttcgtcatg	360
ttgaatactac	acaccaactc	cagccacgct	ctgcgc	tccgcttgc	tcagctcacc	420
gagattctgt	caggggggtgt	ttatattgag	aagaacgata	agctttgtca	catggacaca	480
attgtatgg	gggacatctgt	gagggaccga	gatgtgaga	tagtggtaa	ggacaatggc	540
agaagctgtc	ccccctgtca	tgagggttgc	aaggggcgat	gctggggtcc	tggatcagaa	600
gactgccaga	cattgaccaa	gaccatctgt	gctcctca	gtaatggtca	ctgccttggg	660
cccaacccca	accagtgtc	ccatgatgag	tgtgcgggg	gctgctcagg	ccctcaggac	720
acagactgt	ttgcctgcg	gcacttcaat	gacagtggag	cctgtgtacc	tcgctgtcca	780
cagcctcttgc	tctacaacaa	gctaacttgc	cagctggaa	ccaatccccca	caccaagtat	840
cagtatggag	gagtttgcgt	agccagctgt	ccccataact	ttgtggtgga	tcaaacatcc	900
tgtgtcagg	cctgtcttcc	tgacaagatg	gaagtagata	aaaatggct	caagatgtgt	960
gagcctgtg	ggggactatg	tcccaaagcc	tgtgagggaa	caggtctgg	gagccgcttc	1020
cagactgtgg	actcgagcaa	cattgatgga	tttgcgtact	gacccaagat	cctggggcaac	1080
ctggactttc	tgatcaccgg	cctcaatgg	gaccctgtgc	acaagatccc	tgccttggac	1140
ccagagaagc	tcaatgtctt	ccggacagta	cgggagatca	cagttacct	gaacatccag	1200
tcctggccgc	cccacatgca	caacttca	gtttttcca	atttgcacaa	cattggaggc	1260
agaagctct	acaacccggg	cttctcattg	ttgatcatg	agaacttgaa	tgtcacatct	1320
ctgggcttcc	gatccctgaa	ggaaatttagt	gctgggcgt	tctatataag	tgccaatagg	1380
cagctctgt	accaccactc	tttgcactgg	accaagggtc	ttcggggg	tacggaagag	1440
cgactagaca	tcaagcataa	tcggccgc	agagactgc	tggcagaggg	caaagtgtgt	1500
gaccactgt	gctccctgg	gggatgctgg	ggcccaggcc	ctggc	cttgcctgt	1560
cgaaattata	gccgaggagg	tgtctgtgt	accactgca	acttctgaa	tggggagcct	1620
cgagaatttg	cccatgagggc	cgaatgtt	tcctgcccacc	cggaatgcca	accatggag	1680
ggcactgcca	catgcaatgg	ctcggtgtaa				1710

<210> 12  
 <211> 569  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 &lt;400&gt; 12

15

Met	Arg	Ala	Asn	Asp	Ala	Leu	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu
1					5				10					15	
Ala	Arg	Gly	Ser	Glu	Val	Gly	Asn	Ser	Gln	Ala	Val	Cys	Pro	Gly	Thr
									20					25	
Leu	Asn	Gly	Leu	Ser	Val	Thr	Gly	Asp	Ala	Glu	Asn	Gln	Tyr	Gln	Thr
									35					40	
Leu	Tyr	Lys	Leu	Tyr	Glu	Arg	Cys	Glu	Val	Val	Met	Gly	Asn	Leu	Glu
									50					55	
Ile	Val	Leu	Thr	Gly	His	Asn	Ala	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Trp	Ile
									65					70	
Arg	Glu	Val	Thr	Gly	Tyr	Val	Leu	Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Ser	Thr
									85					90	
Leu	Pro	Leu	Pro	Asn	Leu	Arg	Val	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Val	Tyr	Asp
									100					105	
Gly	Lys	Phe	Ala	Ile	Phe	Val	Met	Leu	Asn	Tyr	Asn	Thr	Asn	Ser	Ser
									115					120	
His	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Thr	Gln	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Ser
									130					135	
Gly	Gly	Val	Tyr	Ile	Glu	Lys	Asn	Asp	Lys	Leu	Cys	His	Met	Asp	Thr
									145					150	
														155	
															160

Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val  
 165 170 175  
 Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly  
 180 185 190  
 Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr  
 195 200 205  
 Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn  
 210 215 220  
 Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp  
 225 230 235 240  
 Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val  
 245 250 255  
 Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu  
 260 265 270  
 Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala  
 275 280 285  
 Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala  
 290 295 300  
 Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys  
 305 310 315 320  
 Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser  
 325 330 335  
 Gly Ser Arg Phe Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val  
 340 345 350  
 Asn Cys Thr Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu  
 355 360 365  
 Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Lys Leu  
 370 375 380  
 Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln  
 385 390 395 400  
 Ser Trp Pro Pro His Met His Asn Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr  
 405 410 415  
 Thr Ile Gly Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg Gly Phe Ser Leu Leu Ile  
 420 425 430  
 Met Lys Asn Leu Asn Val Thr Ser Leu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu  
 435 440 445  
 Ile Ser Ala Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg Gln Leu Cys Tyr  
 450 455 460  
 His His Ser Leu Asn Trp Thr Lys Val Leu Arg Gly Pro Thr Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Arg Leu Asp Ile Lys His Asn Arg Pro Arg Arg Asp Cys Val Ala Glu  
 485 490 495  
 Gly Lys Val Cys Asp Pro Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys Trp Gly Pro  
 500 505 510  
 Gly Pro Gly Gln Cys Leu Ser Cys Arg Asn Tyr Ser Arg Gly Gly Val  
 515 520 525  
 Cys Val Thr His Cys Asn Phe Leu Asn Gly Glu Pro Arg Glu Phe Ala  
 530 535 540  
 His Glu Ala Glu Cys Phe Ser Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Met Glu  
 545 550 555 560  
 Gly Thr Ala Thr Cys Asn Gly Ser Val  
 565

<210> 13  
 <211> 1689  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

atgagggcga acgacgctct gcaggtgctg ggcttgcttt tcagcctggc ccggggctcc	60
gaggtggca actctcaggc agtgtgcct gggactctga atggcctgag tgtgaccggc	120
gatgctgaga accaatacca gacactgtac aagctctacg agagggtgtga ggtgggtatg	180
gggaaccttg agattgtgct cacggacac aatgccgacc tctccttcct gcagtggatt	240
cgagaagtga caggtatgt cctcggtggc atgaatgaat tctctactct accattgcc	300
aacctcccgcg tggtgcgagg gacccaggc tacgatggga agtttgcctt cttcgatcg	360
ttgaactata acaccaactc cagccacgct ctgcgcgcagc tccgcttgac tcagtcacc	420
gagattctgt caggggggtgt ttatattgag aagaacgata agctttgtca catggacaca	480
attgactgga gggacatcgt gagggaccga gatgctgaga tagtgggtgaa ggacaatggc	540
agaagctgtc cccctgtca tgaggttgc aaggggcgat gctggggtcc tggatcagaa	600
gactgccaga cattgaccaa gaccatctgt gtcctcagt gtaatggtca ctgctttggg	660
cccaacccca accagtgtc ccatgatgag tggccgggg gctgtcagg ccctcaggac	720
acagactgtc ttgcctgccc gcacttcaat gacagtggag cctgtgtacc tcgctgtcca	780
cagcctcttg tctacaacaa gctaacttgc cagctggAAC ccaatccca caccaagtat	840
cagtatggag gagtttgcgt agccagctgt ccccatataact ttgtgggttga tcaaacatcc	900
tgtgtcaggg cctgtcctcc tgacaagatg gaagtagata aaaatgggct caagatgtgt	960
gagccttgc gggactatg tcccaagcc tggggaa caggctctgg gagccgcttc	1020
cagactgtgg actcgagcaa cattgatggc ttgtgaact gcaccaagat cctggcaac	1080.
ctggactttc tgatcaccgg cctcaatggc gacccctggc acaagatccc tggccctggac	1140
ccagagaagc tcaatgtctt cggacagta cgggagatca caggttacct gaacatccag	1200
tcctggccgc cccacatgca caacttcagt gtttttcca atttgacaac cattggaggc	1260
agaagccctt acaaccgggg cttctcattt ttgatcatga agaacttggaa tgtcacatct	1320
ctgggcttcc gatccctgaa gaaattagt gctgggcgtt tctatataag tgccaatagg	1380
cagctctgtt accaccactc ttgtactgg accaagggtgc ttggggggcc tacggaaagag	1440
cgaactagaca tcaagcataa tcggccgcgc agagactgcg tggcagaggg caaaagtgtgt	1500
gaccactgt gtcctctgg gggatgtgg ggcccaggcc ctggcgttgc ctgtcctgt	1560
cggaaattata gccgaggagg tgtctgtgtt acccactgca actttctgaa tgggtacagt	1620
aaggggagcc agtcaaggat ggggtgggggt gggccctgc aatgaaactg ttcaggtggc	1680
atacaataa	1689

5 <210> 14  
 <211> 562  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr  
 20 25 30  
 Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr  
 35 40 45  
 Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu  
 50 55 60  
 Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile  
 65 70 75 80  
 Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr  
 85 90 95  
 Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp  
 100 105 110  
 Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser  
 115 120 125  
 His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser  
 130 135 140  
 Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr  
 145 150 155 160  
 Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val  
 165 170 175  
 Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly  
 180 185 190  
 Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr  
 195 200 205  
 Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn

210	215	220													
Gln	Cys	His	Asp	Glu	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Pro	Gln	Asp	
225				230					235					240	
Thr	Asp	Cys	Phe	Ala	Cys	Arg	His	Phe	Asn	Asp	Ser	Gly	Ala	Cys	Val
					245				250					255	
Pro	Arg	Cys	Pro	Gln	Pro	Leu	Val	Tyr	Asn	Lys	Leu	Thr	Phe	Gln	Leu
					260				265					270	
Glu	Pro	Asn	Pro	His	Thr	Lys	Tyr	Gln	Tyr	Gly	Gly	Val	Cys	Val	Ala
					275				280					285	
Ser	Cys	Pro	His	Asn	Phe	Val	Val	Asp	Gln	Thr	Ser	Cys	Val	Arg	Ala
					290				295					300	
Cys	Pro	Pro	Asp	Lys	Met	Glu	Val	Asp	Lys	Asn	Gly	Leu	Lys	Met	Cys
					305				310					315	320
Glu	Pro	Cys	Gly	Gly	Leu	Cys	Pro	Lys	Ala	Cys	Glu	Gly	Thr	Gly	Ser
						325				330					335
Gly	Ser	Arg	Phe	Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Val
					340				345					350	
Asn	Cys	Thr	Lys	Ile	Leu	Gly	Asn	Leu	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr	Gly	Leu
					355				360					365	
Asn	Gly	Asp	Pro	Trp	His	Lys	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Pro	Glu	Lys	Leu
					370				375					380	
Asn	Val	Phe	Arg	Thr	Val	Arg	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ile	Gln
					385				390					395	400
Ser	Trp	Pro	Pro	His	Met	His	Asn	Phe	Ser	Val	Phe	Ser	Asn	Leu	Thr
						405				410					415
Thr	Ile	Gly	Gly	Arg	Ser	Leu	Tyr	Asn	Arg	Gly	Phe	Ser	Leu	Leu	Ile
						420				425					430
Met	Lys	Asn	Leu	Asn	Val	Thr	Ser	Leu	Gly	Phe	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu
						435				440					445
Ile	Ser	Ala	Gly	Arg	Ile	Tyr	Ile	Ser	Ala	Asn	Arg	Gln	Leu	Cys	Tyr
					450				455					460	
His	His	Ser	Leu	Asn	Trp	Thr	Lys	Val	Leu	Arg	Gly	Pro	Thr	Glu	Glu
					465				470					475	480
Arg	Leu	Asp	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Pro	Arg	Arg	Asp	Cys	Val	Ala	Glu
					485				490					495	
Gly	Lys	Val	Cys	Asp	Pro	Leu	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro
					500				505					510	
Gly	Pro	Gly	Gln	Cys	Leu	Ser	Cys	Arg	Asn	Tyr	Ser	Arg	Gly	Gly	Val
					515				520					525	
Cys	Val	Thr	His	Cys	Asn	Phe	Leu	Asn	Gly	Tyr	Ser	Lys	Gly	Ser	Gln
					530				535					540	
Ser	Arg	Met	Gly	Gly	Gly	Ala	Leu	Gln	Trp	Asn	Cys	Ser	Gly	Gly	
					545				550					555	560
Ile	Gln														

<210> 15  
<211> 261  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

cctgggggtg	tcagtgccag	ccccccacaa	atctttctg	cccccccaag	gaggctgacc	60
agtgtgtggc	ctgtgcccac	tataaggacc	ctcccttctg	cgtggccgc	tgccccagcg	120
gtgtgaaacc	tgacctctcc	tacatgccc	tctggaagtt	tccagatgag	gagggcgcac	180
gccagcccttgc	ccccatcaac	tgcaccact	cgtgagtc	acggctttt	ctgcagaaag	240
gaggactttc	ctttcagggg	t				261

<210> 16  
<211> 893  
<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

cttgctggga	gtcctcagac	tcctctccta	accaccctt	tccttcag	tggcagaggg	60
caaagtgtgt	gaccactgt	gctcctctgg	gggatgctgg	ggcccaggcc	ctggtcagtg	120
cttgcctgt	cgaaattata	gccgaggagg	tgtctgtgt	acccactgca	actttctgaa	180
tgggtacagt	aaggggagcc	agtcaaggat	gggtgggggt	ggggccctgc	aatggaactg	240
ttcaggtggc	atacaataaa	agtctttaga	cagtttctg	catgtgcctt	ggtgggattg	300
aggtaggaga	cctgtggttg	tgagatcgga	gcatgaaggt	caggacttgg	aagtgcaccc	360
cccctccctt	tattcccac	tacagggagc	ctcgagaatt	tgcccatgag	gccgaatgct	420
tctcctgcca	ccccgaatgc	caaccatgg	agggcactgc	cacatgcaat	ggctcggtat	480
actagtagca	ccagggatctc	caagggagac	agagaagggg	caatacttgg	agcatctggg	540
gaatgatatg	gctaaggata	gcacagagag	gccagataat	gctagggcct	gcagatagaa	600
gatcctgaat	gtctgggttg	gtctttgctg	ggaggtatgg	aattgacctt	gggatctgat	660
tcttcctgac	cttctcttt	ccactcaggg	ctctgatact	tgtgctcaat	gtgcccattt	720
tcgagatggg	ccccactgtg	tgagcagctg	ccccatggg	gctcttaggtg	ccaagggccc	780
aatctacaag	tacccagatg	ttcagaatga	atgtcgcccc	tgccatgaga	actgcaccca	840
ggggtcagtg	atggataat	aaggagaggg	ggtcaggtgg	aagggttagga	gca	893

5

<210> 17

<211> 180

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

gccagcaett	tgggaggctg	agatgggaag	atcacttgag	cccagaatta	gagataagcc	60
tatggaaaca	tagcaagaca	ctgtctcac	agggaaaaaa	aaaaaaagaa	actgagcctt	120
aaagagatga	aataaattaa	gcagtagatc	caggatgcaa	aatcctccca	attcctgtgc	180

15

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Oligonucleótidos sintéticos

25

<400> 18

gggcagaaaa gatttgtgg

20

30

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos sintéticos

35

<400> 19

cacactggtc agcctcctgg

20

40

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Oligonucleótidos sintéticos

<400> 20

	gccacacact ggtcagcctc	20
5	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
15	<400> 21 ctcacgagtg ggtcagttg	20
20	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
30	<400> 22 gttggactca cgagtgggtg	20
35	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
45	<400> 23 gaccgttggaa ctcacgagtg	20
50	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
60	<400> 24 gaccgttggaa ctcacgagtg	20
65	<210> 25 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	16
	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 25 cgttggactc acgagt	
	<210> 26 <211> 20	
	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 26	

	gggtcaactc caagtcctga	20
5	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
15	<400> 27 gtcacttcca agtcctgacc	20
20	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
30	<400> 28 cacttccaag tcctgacatt	20
35	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
45	<400> 29 cttccaagtc ctgacattca	20
50	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
60	<400> 30 cccttactgt acccattcag	20
65	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 31 ctccccctac tgtacccatt	20
	<210> 32 <211> 20	
	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 32	

	tggcccccct tactgtaccc	20
5	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
10	<400> 33 ctcgaggctc cctgtatgtgg	20
15	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
20	<400> 34 attctcgagg ctccctgttag	20
25	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
30	<400> 35 caaattctcg aggctccctg	20
35	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
40	<400> 36 ctagtatacc gagccattgc	20
45	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
55	<400> 37 gtgtacttag tataccgagc	20
55	<210> 38 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
65	<400> 38	

	caagtatcag agccctgagt	20
5	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
15	<400> 39 ttatccatc actgaccct 20.	
20	<210> 40 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
30	<400> 40 tattatccca tcactgaccc	20
35	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
45	<400> 41 atttcatctc ttaaggctc	20
50	<210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
60	<400> 42 ctggatctac tgcttaattt  <210> 43 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	20
	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
55	<400> 43 gctattacct taacccag	18
60	<210> 44 <211> 100 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 44	

	cctgggggtg tcagtgccag ccccccacaa atctttctg cccccccag gaggctgacc	60
	agtgtgtggc ctgtgccac tataaggacc ctcccttctg	100
5	<210> 45	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 45	
10	ccagatgagg agggcgcatg ccagcattgc cccatcaact gcacccactc gtgagtccaa	60
	cggcttttc tgcagaaagg aggacttcc tttcagggtt	100
15	<210> 46	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 46	
20	cttgctggga gtcctcagac tcctctccta acccaccctt tccttccag tggcagaggg	60
	caaagtgtgt gaccactgt gtcctctgg gggatgctgg	100
25	<210> 47	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 47	
30	aattatagcc gaggaggtgt ctgtgtgacc cactgcaact ttctgaatgg gtacagtaag	60
	gggagccagt caaggatggg tgggggtggg gccctgcaat	100
35	<210> 48	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 48	
40	aaggtcagga ctggaaagtg acccccccctt ccctttattt cccactacag ggaggctcga	60
	gaatttgcggc atgaggccga atgcttctcc tgccacccgg	100
	<210> 49	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 49	
45	gccacccgga atgccaaccc atggaggggca ctgccacatg caatggctcg gtataactgt	60
	agcaccagga tctccaaggg agacagagaa gggcaatac	100
50	<210> 50	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

<400> 50

ggaattgacc ttgggatctg attttcctg accttcttc ttccactcag ggctctgata 60  
 cttgtgctca atgtgccat tttcgagatg ggccccactg 100

5 <210> 51  
 <211> 100  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 51

ccagatgttc agaatgaatg tcggccctgc catgagaact gcaccagg gtcagtatg 60  
 ggataataag gagagggggt caggtgaaag ggtaggagca 100

15 <210> 52  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético rico en arginina

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa es beta-alanina

<400> 52

Arg	Xaa	Xaa							
1								10	

35 <210> 53  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido sintético rico en arginina

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2), (8), (13)  
 <223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5), (11), (14)  
 <223> Xaa es beta-alanina

<400> 53

Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg	Xaa
1								10	

5 <210> 54  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2), (5), (8), (13)  
<223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11), (14)  
<223> Xaa es beta-alanina

20 <400> 54

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa  
1 5 10

25 <210> 55  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Péptido sintético rico en arginina

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2), (4), (6), (8), (10), (14), (17)  
<223> Xaa es beta-alanina

40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12), (16)  
<223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

45 <400> 55

Arg Xaa Xaa  
1 5 10 15

50 <210> 56  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2), (4), (6), (10), (12), (14)  
<223> Xaa es beta-alanina

60 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8), (16), (17)  
<223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

5 <400> 56

Arg Xaa Xaa  
1 5 10 15

5

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido sintético rico en arginina

<220>

15

<221> MOD\_RES

<222> (1), (9), (17)

<223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

<220>

20

<221> MOD\_RES

<222> (3), (5), (7), (11), (13), (15)

<223> Xaa es beta-alanina

<400> 57

25

Xaa Arg Xaa  
1 5 10 15

<210> 58

<211> 17

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético rico en arginina

35

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2), (6), (10), (14), (17)

<223> Xaa es beta-alanina

40

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4), (8), (12), (16)

<223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

45

<400> 58

Arg Xaa Xaa  
1 5 10 15

50

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Péptido sintético rico en arginina

<220>

60

<221> MOD\_RES

<222> (2), (4), (6), (8), (17)

<223> Xaa es beta-alanina

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10), (12), (14, (16)  
 <223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico  
 <400> 59

Arg Xaa Xaa  
 1 5 10 15

10 <210> 60  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido sintético rico en arginina

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2), (8), (16)  
 <223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4), (6), (10), (12), (14)  
 <223> Xaa es beta-alanina

30 <400> 60  
 Arg Xaa  
 1 5 10 15

35 <210> 61  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido sintético rico en arginina

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)... (13)  
 <223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)...(14)  
 <223> Xaa es beta-alanina

<400> 61

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa  
 1 5 10

55 <210> 62  
 <211> 14  
 <212> PRT



	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Xaa									
	1			5			10							

5                   <210> 65  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10                  <220>  
<223> Péptido sintético rico en arginina

15                  <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)...(12)  
<223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

20                  <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)...(13)  
<223> Xaa es beta-alanina

25                  <400> 65

	Arg	Xaa	Xaa										
	1			5			10						

30                  <210> 66  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35                  <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)...(14)  
<223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

40                  <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (15)...(15)  
<223> Xaa es beta-alanina

45                  <400> 66

	Arg	Xaa	Xaa										
	1			5			10						15

50                  <210> 67  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55                  <220>  
<223> Péptido sintético rico en arginina

55                  <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)...(10)  
<223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)...(11)  
 <223> Xaa es beta-alanina

5  
 <400> 67

Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg	Xaa	Xaa
1	.			5					10	

10 <210> 68  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Cebador

20 <400> 68  
 caccatggag ctggcggcct 20

25 <210> 69  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador

<400> 69  
 tccaggtcca cacagcggtc c 21

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) aislada y soluble que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6 o los aminoácidos 23-584 de la SEQ ID NO: 6.

5 2. La proteína de la reivindicación 1, que se modifica mediante pegilación.

10 3. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) de acuerdo con la reivindicación 1.

10 4. El ácido nucleico de la reivindicación 3, que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5 o los nucleótidos 67-1755 de la SEQ ID NO: 5.

15 5. Uso de una proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) aislada y soluble de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o codificada por un ácido nucleico de la reivindicación 3 o 4 para inhibir la proteína HER2 de longitud completa *in vitro*,

que comprende poner en contacto una célula que expresa la proteína HER2 de longitud completa con la proteína HER2 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o codificada por un ácido nucleico de la reivindicación 3 o 4.

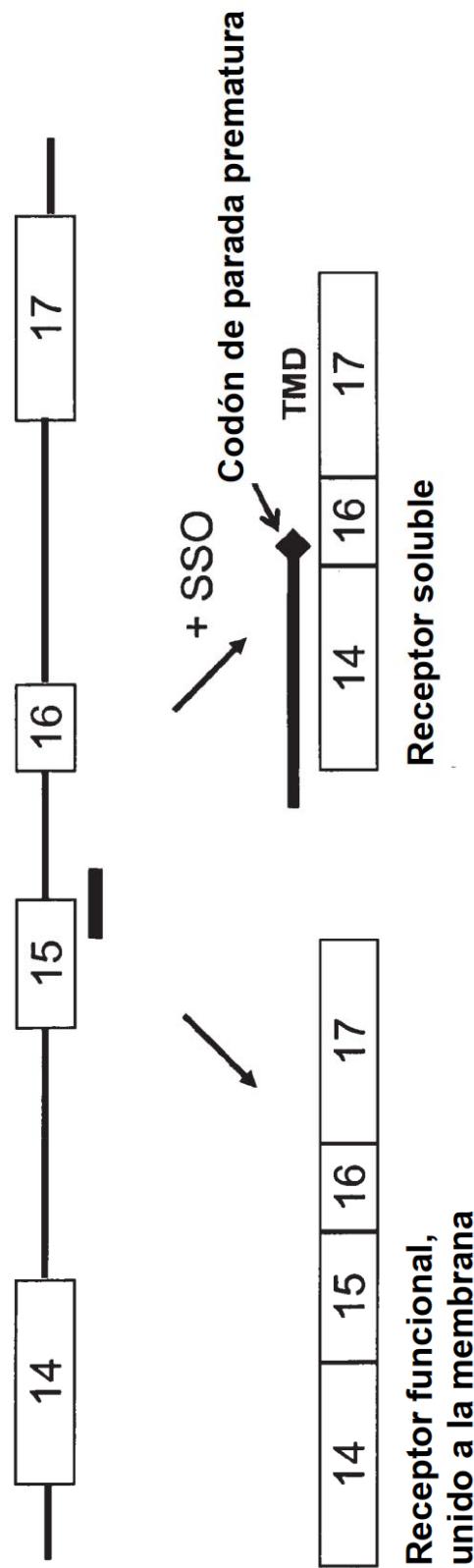
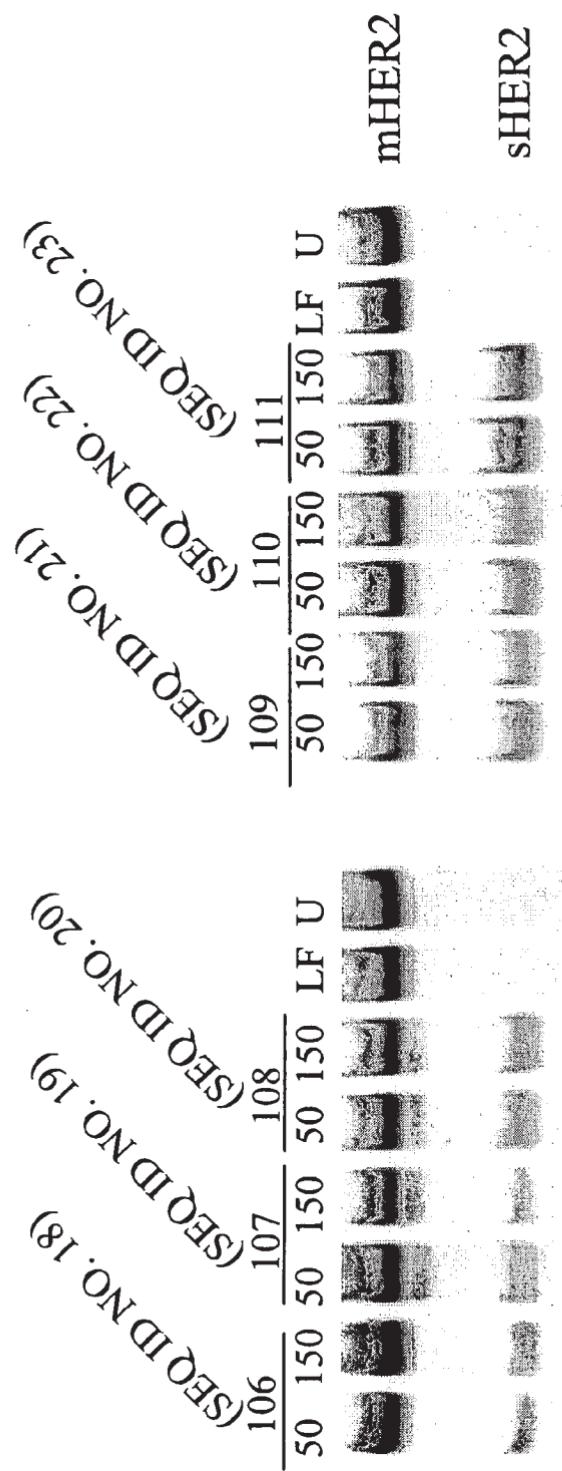
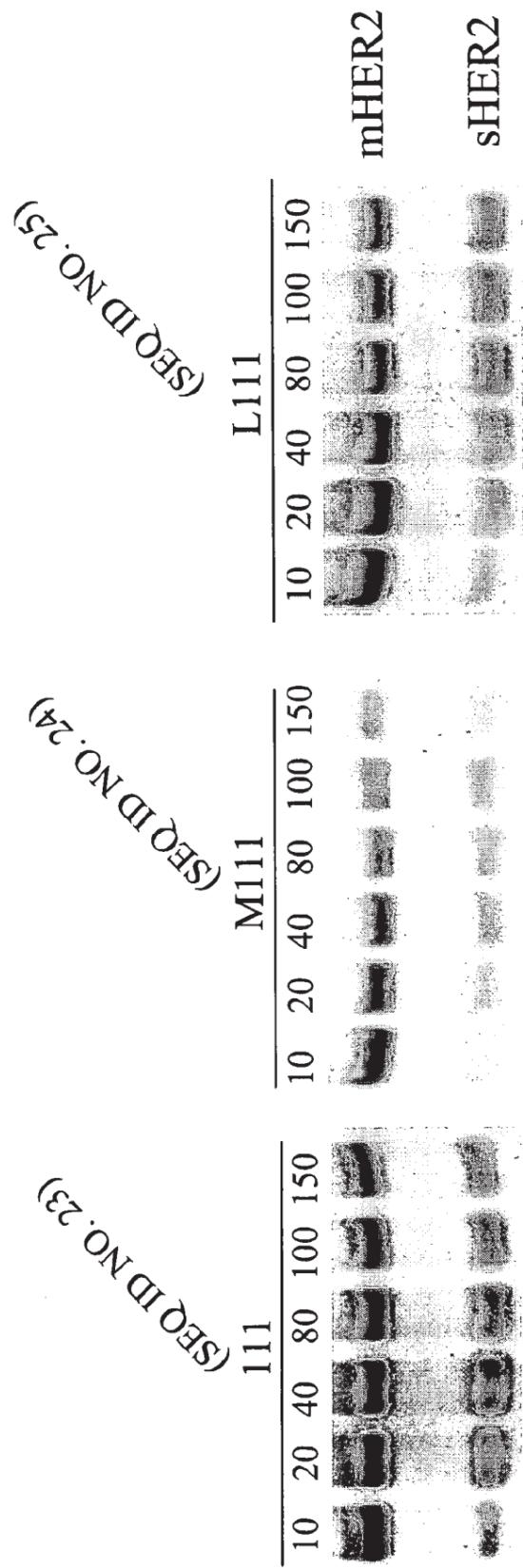


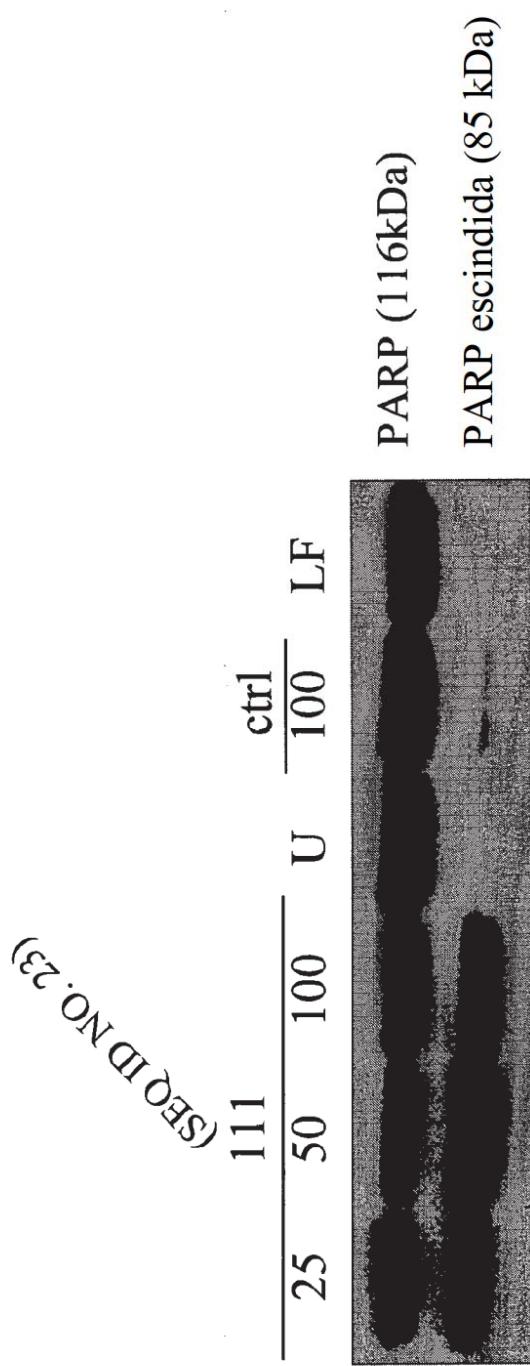
Fig. 1



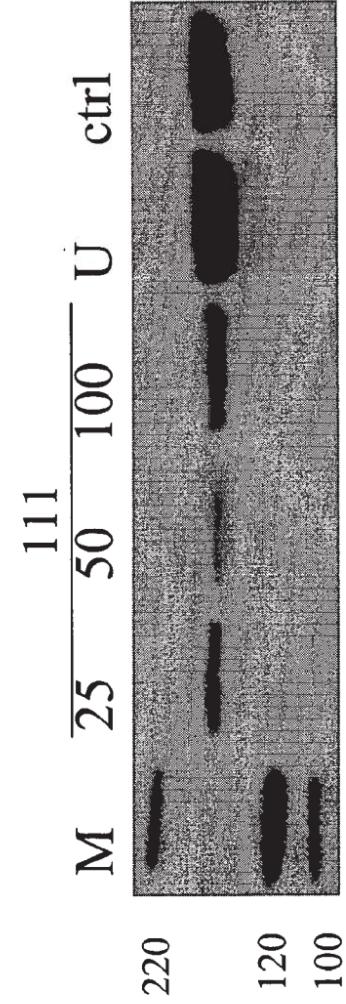
**Fig. 2**



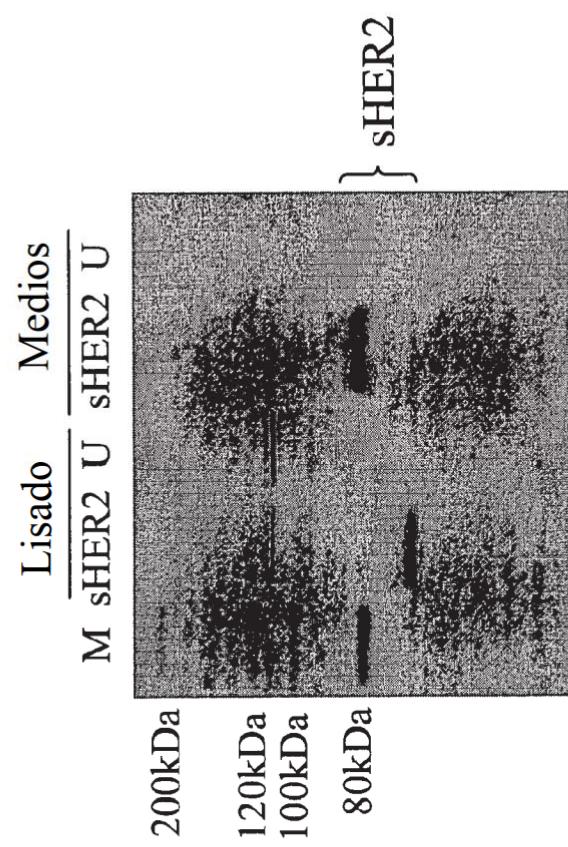
**Fig. 3**



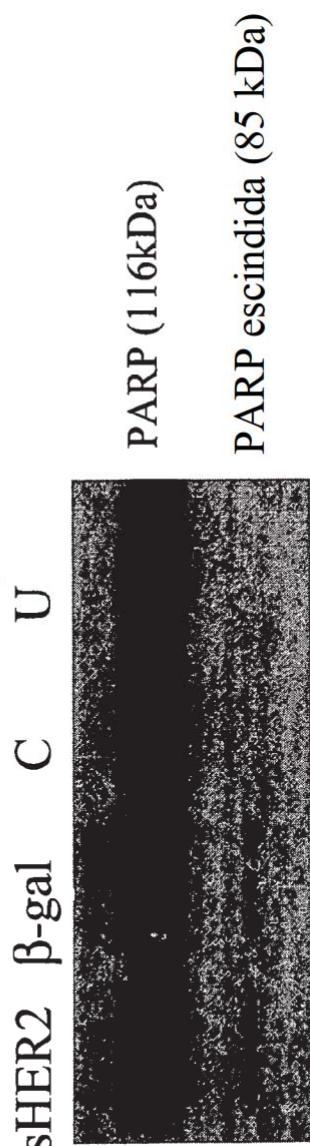
**Fig. 4A**



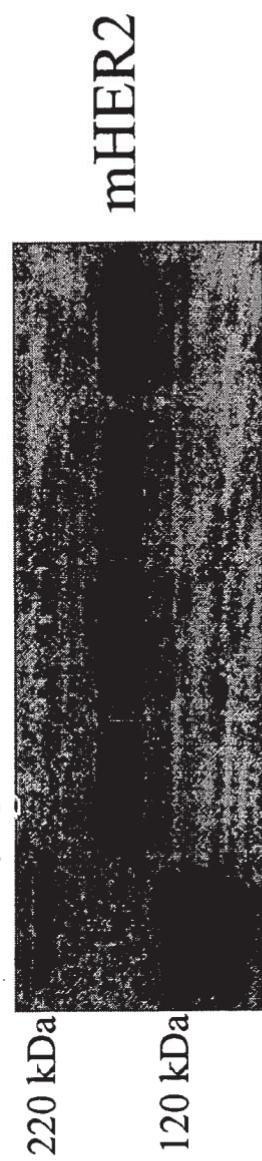
**Fig. 4B**



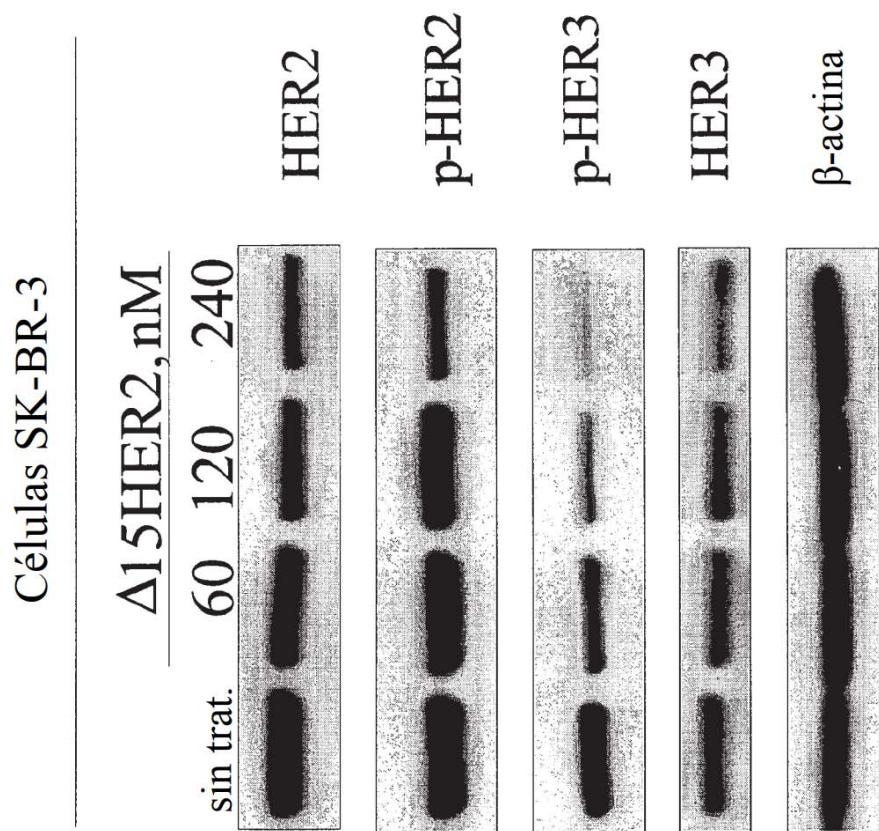
**Fig. 5**



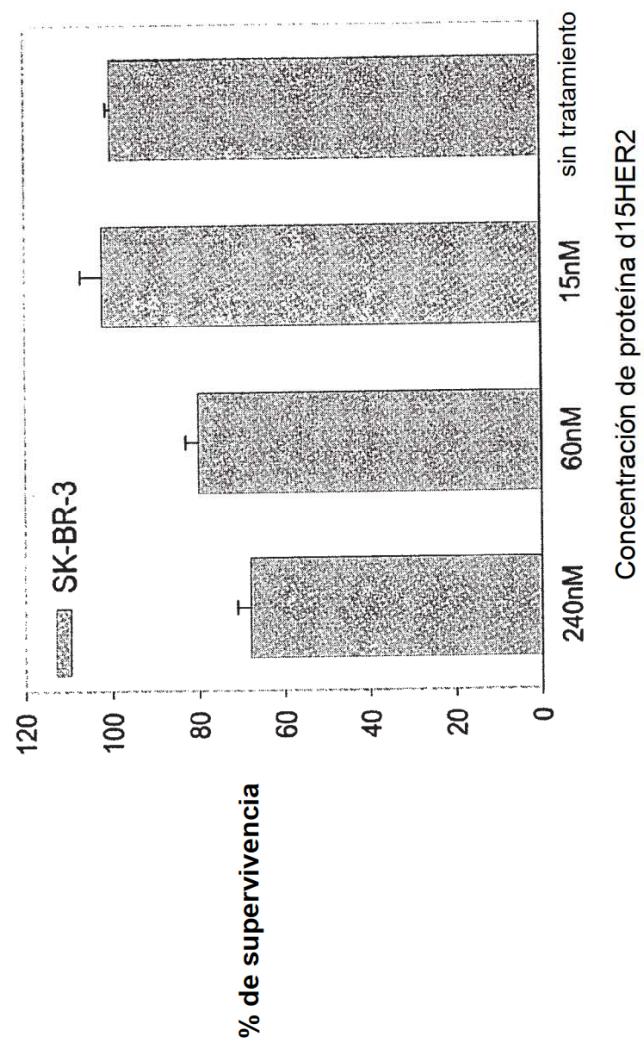
**Fig. 6A**



**Fig. 6B**



**Fig. 6C**



**Fig. 6D**

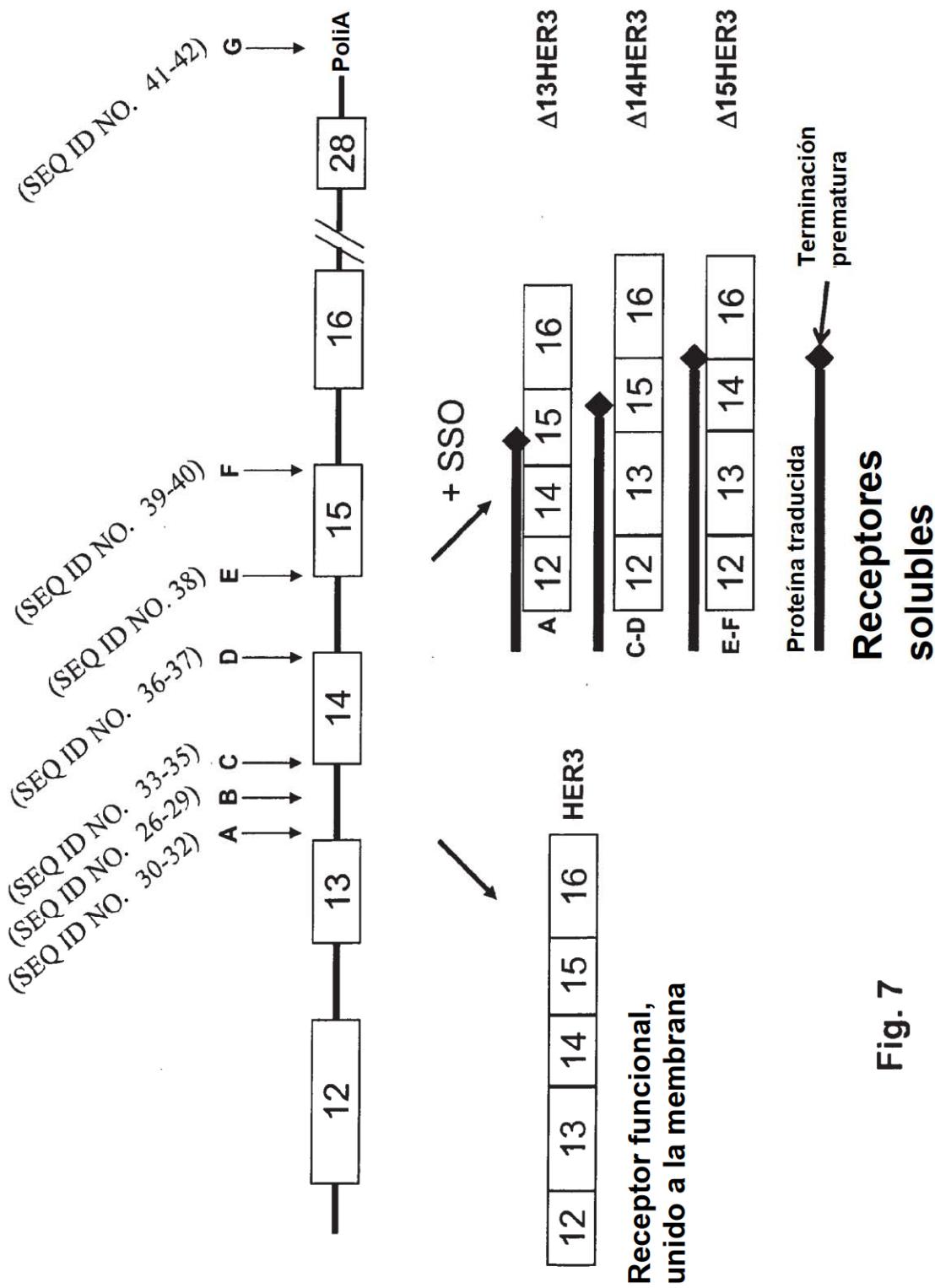
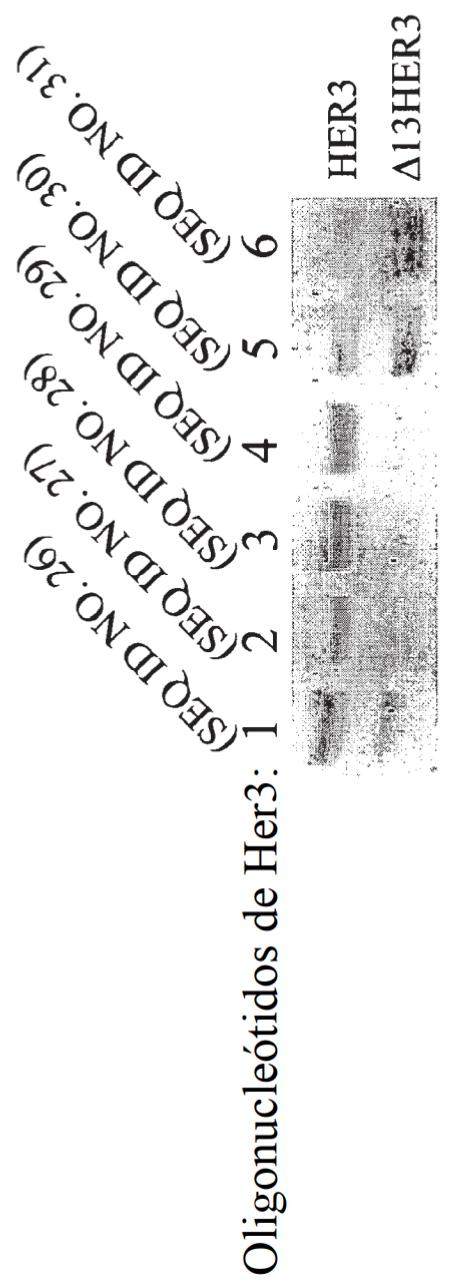
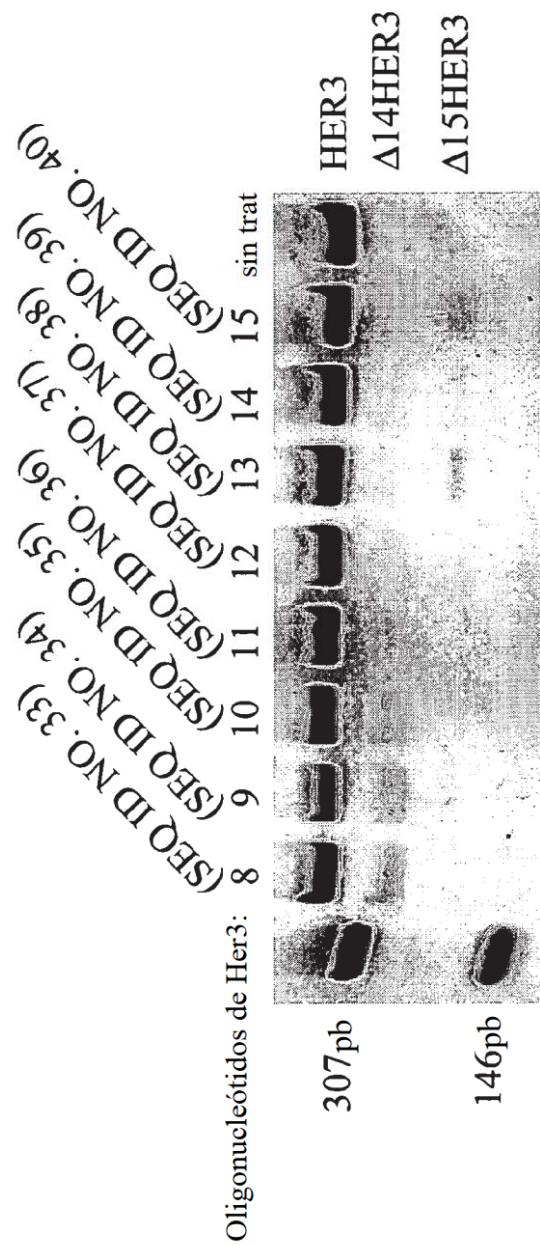


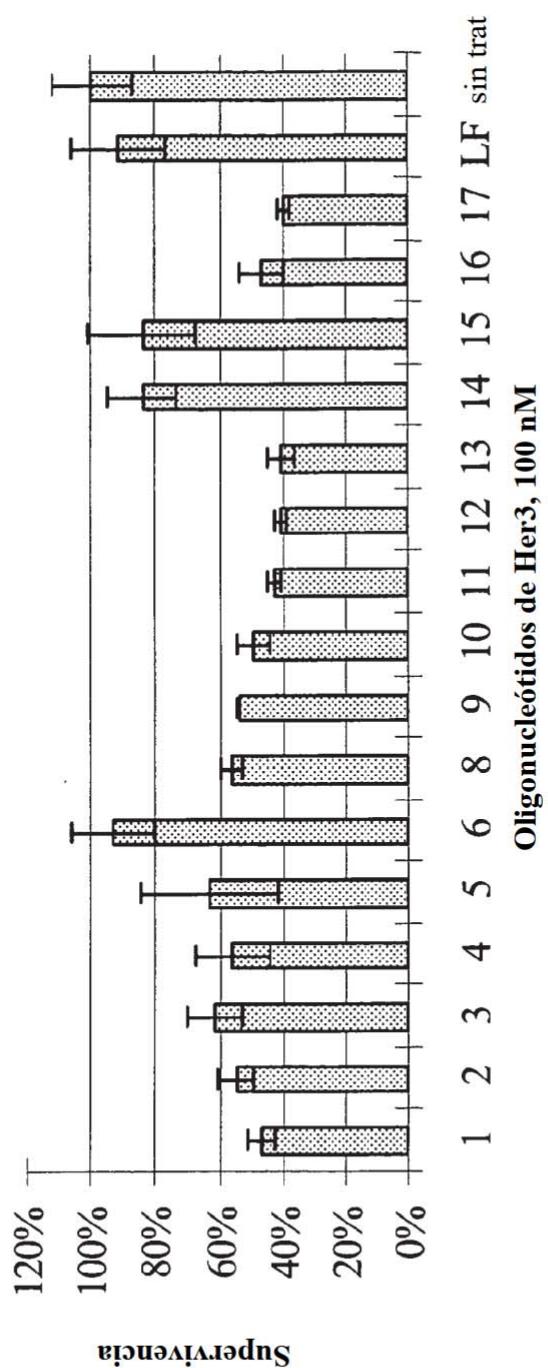
Fig. 7



**Fig. 8**



**Fig. 9**

**Fig. 10**

cctgggggtgtcagtggccagccccccacaaatctttctgcgtggcccgctgcccaggaggccgtgtgt

ggcctgtggccactataaggaccctcccttgcgtggcccgctgcccaggccgtgtgaaacctgac

EXÓN 15

ctctcctacatggccatctggaaagtttccagatgaggaggcgcatgccaggccatcaact

gcacccactcgtagtccaaacggctttcagaaaggaggacttccagggt ...

INTRÓN 15 ... tcccaaggagggtggttccagaattttgatgaggacttttcctgcag

ctgtgtggaccctggatgacaaggccgtgccccccggaggcaggaggccag

Δ15

EXÓN 16

**Fig. 11**

Fig. 12

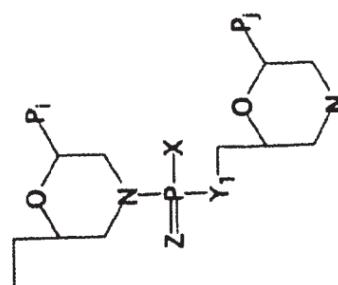


Fig. 13E

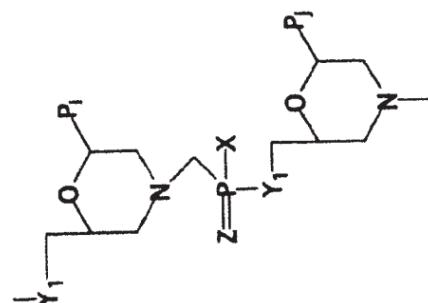


Fig. 13G

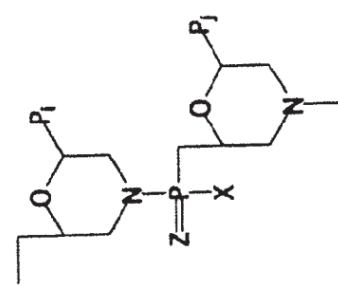


Fig. 13D

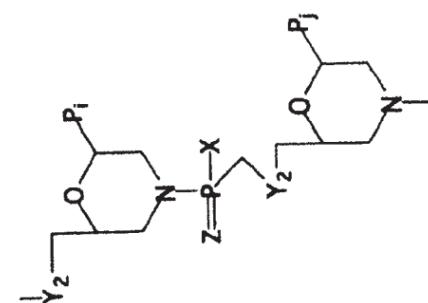


Fig. 13F

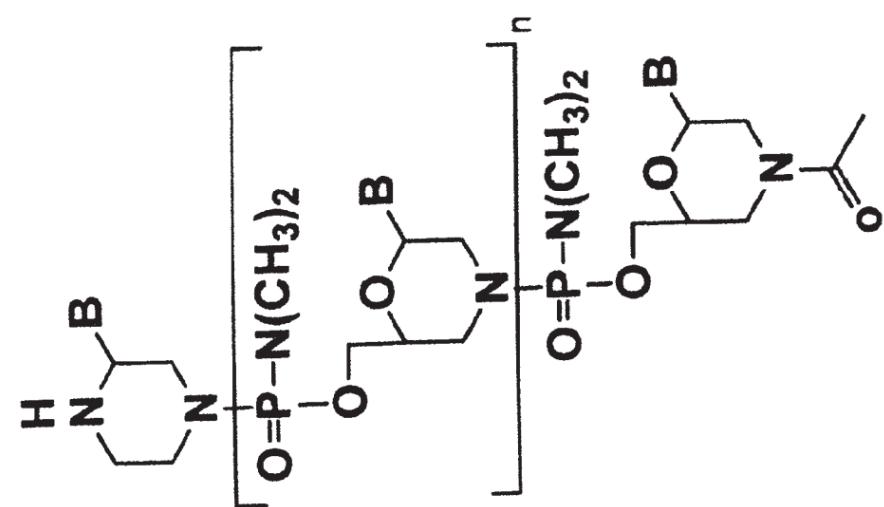


Fig. 13A

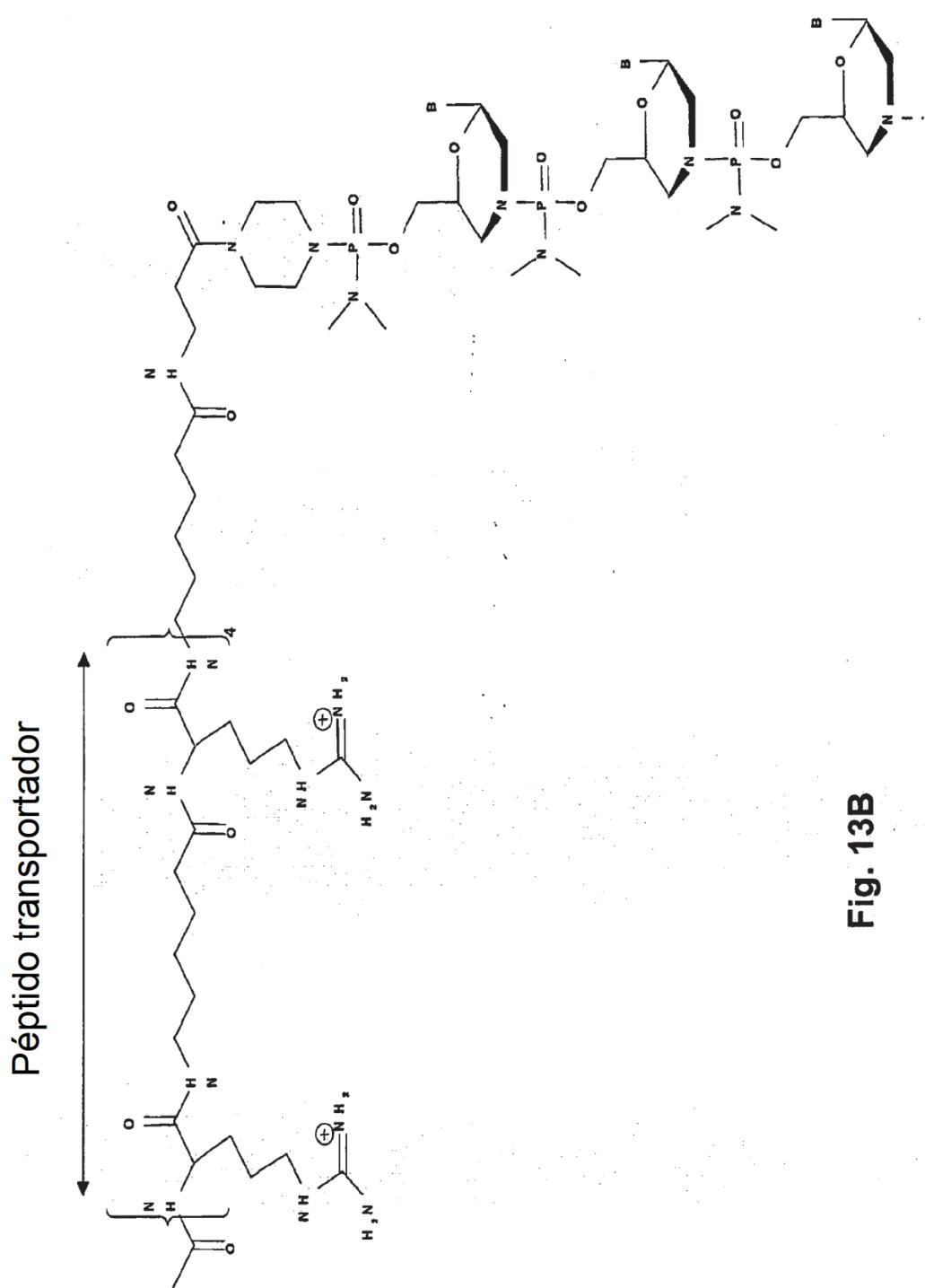


Fig. 13B

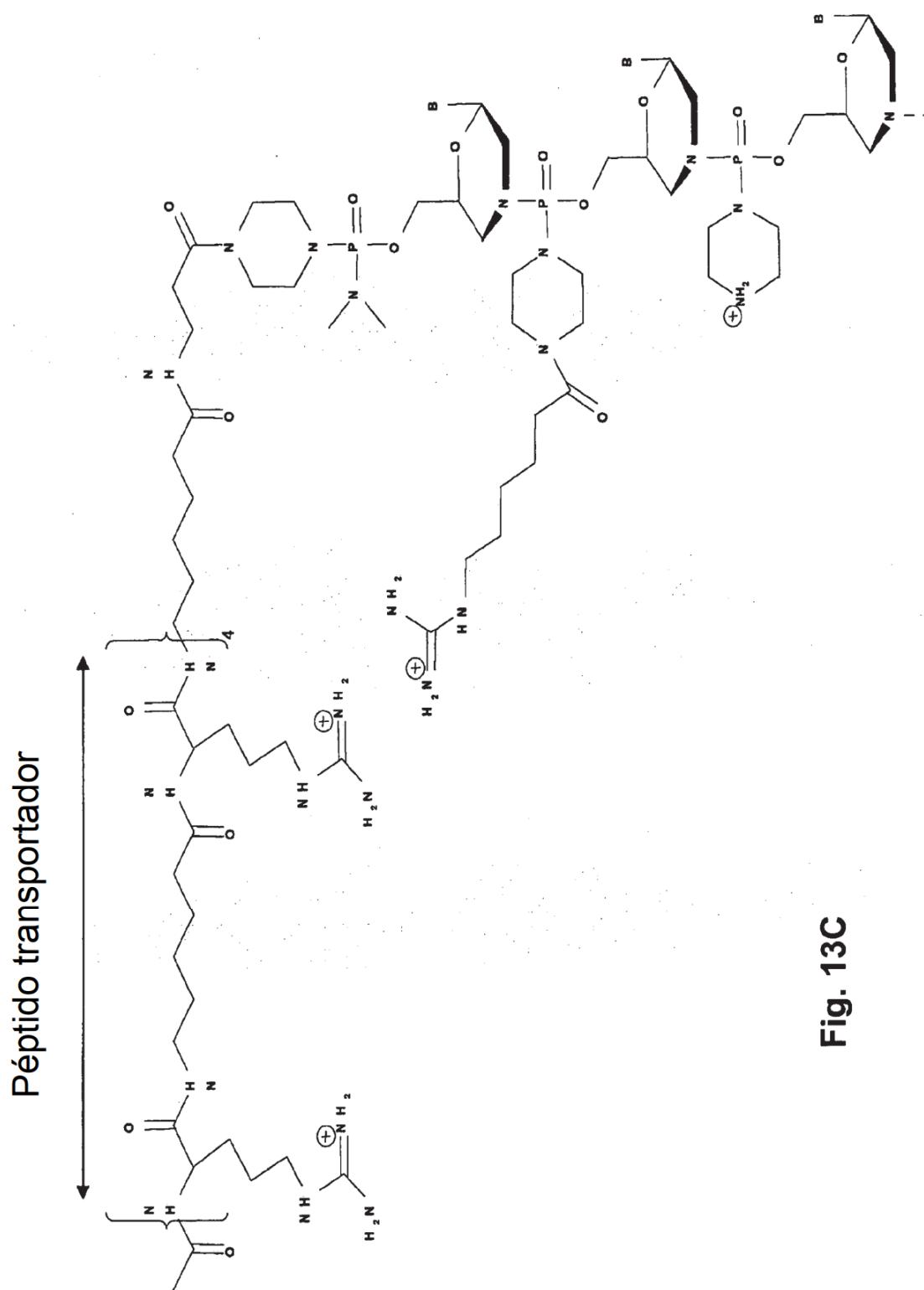


Fig. 13C

## Glándula de mamífero

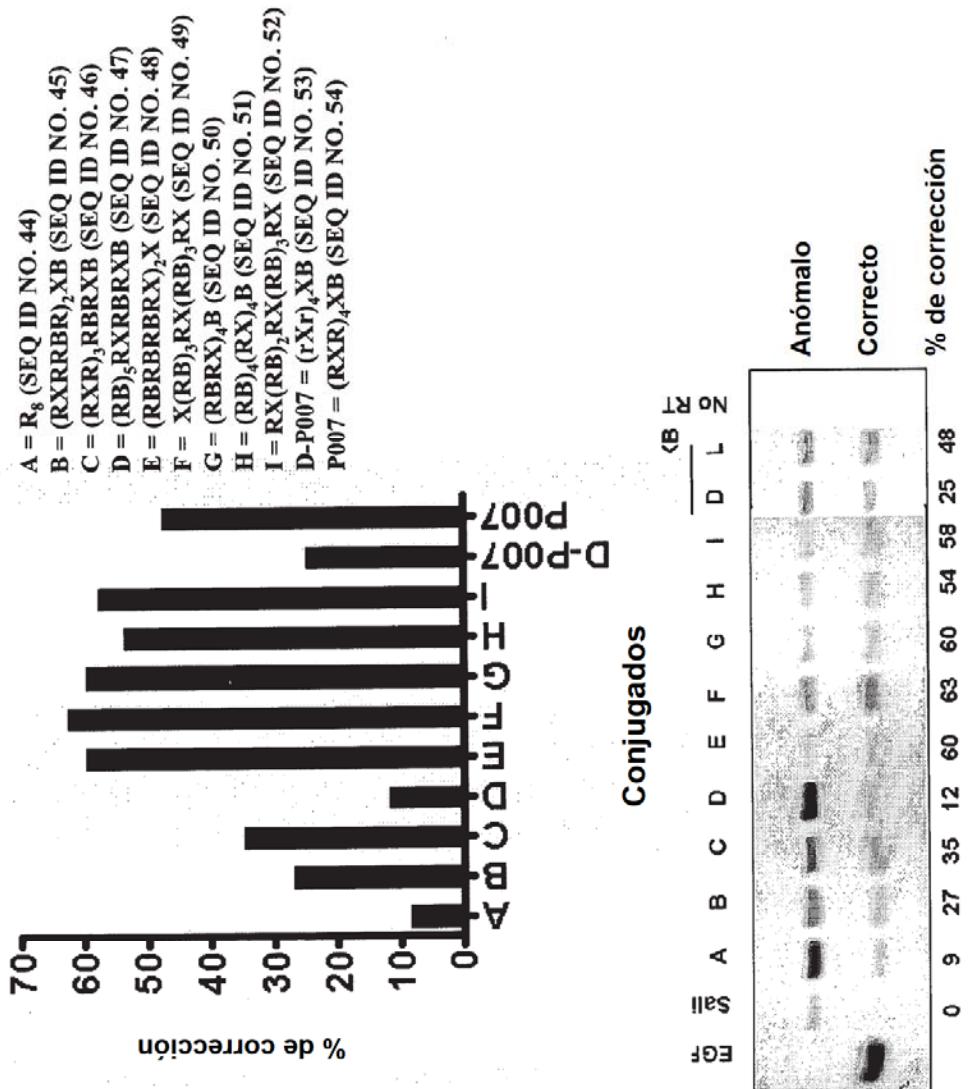
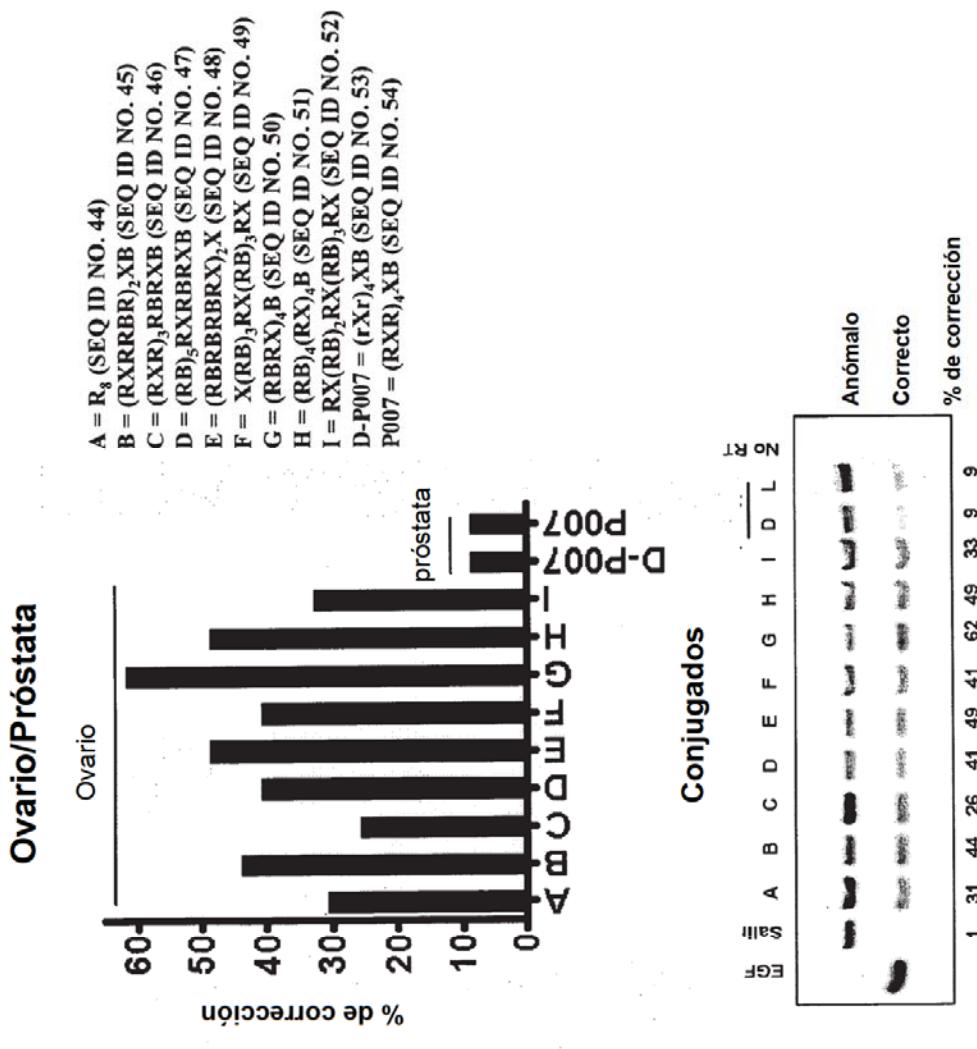


Fig. 14A



Nota: Las muestras A-I son de ovario, pero las muestras D- y L-(RXR)<sub>4</sub>XB son de próstata

**Fig. 14B**