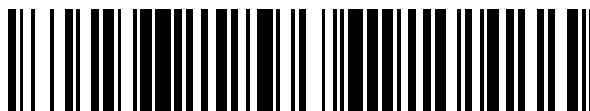


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

A01N 37/18 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

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

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

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

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

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

30 Prioridad:

06.06.2007 US 942319 P
20.08.2007 US 956887 P

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

73 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%)

72 Inventor/es:

KOLE, RYSZARD;
SAZANI, PETER y
WAN, JING

74 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.

Antecedentes de la invención

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.

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 quimioterapéuticos (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.

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.

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 inhibitor 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

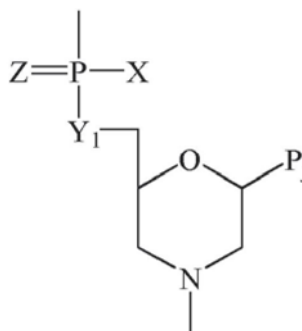
- (i) administrar al sujeto, una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína soluble del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) que carece de la región codificada por el exón 15 del transcrito de

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

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 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. 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.

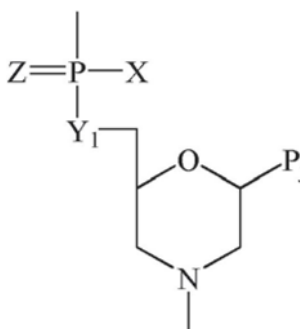
En el presente documento se divulga además una secuencia codificante para la proteína HER3 soluble anterior. La secuencia codificante corresponde a un ARNm de HER3 procesado (i) que carece del exón 13, con el exón 12 unido directamente al exón 14, (ii) que carece del exón 14, con el exón 13 unido directamente 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 la 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 fosfordiamidato (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 fosfordiamidato 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:

- (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 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), 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 que codifica el exón 15 del transcrito de ARNm de longitud completa del gen HER2, y troncada, en su extremo C, en la región codificada por el exón 16 del transcrito HER2.

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.

Breve descripción de los dibujos

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.

FIG. 2: Las células SK-BR-3 se transfectaron 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 transcritos completos de Her2 están representados por una banda de 307 pb (mHER2), y los transcritos que carecen del exón 15 están representados por una banda de 246 pb (sHER2). LF, solo Lipofectamine™ 2000; U, células no tratadas.

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

FIG. 4: Las células SK-BR-3 se transfectaron 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 poli(ADP ribosa) polimerasa (PARP) y B) expresión de proteína mHER2. LF, solo Lipofectamine™ 2000; U, células no tratadas.

FIG. 5: Las células MCF-7 se transfectaron 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.

FIG. 6: Las células MCF-7 se transfectaron 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.

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.

FIG. 8: Las células MCF-7 se transfectaron 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 transcritos completos de HER3 están representados por una banda de 619 pb (HER3), y los transcritos que carecen del exón 13 están representados por una banda de 486 pb (Δ13HER3).

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

FIG. 10: Las células SK-BR-3 se transfectaron 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 $\Delta 15\text{HER2}$ 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

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. Ophthalm. 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

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).

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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:

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.

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 $\Delta 15\text{HER2}$ que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 6 y $\Delta 15\text{HER2}$ maduro (aminoácidos 23-584 de la SEQ ID NO: 6) 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. 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 $\Delta 13\text{HER3}$ que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 8 y $\Delta 13\text{HER3}$ 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 $\Delta 14\text{HER3}$ que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 10 y $\Delta 14\text{HER3}$ 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 $\Delta 15\text{HER3}$ que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 12 y $\Delta 15\text{HER3}$ maduro (aminoácidos 20-569 de la SEQ ID NO: 12) que carece de la secuencia señal.

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.

IIB. Expresión y purificación de proteínas:

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®.

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 desala y se concentra.

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.

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:

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.

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 multidosas, 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 divulgan 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).

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 $\Delta 15$ HER2 que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 6 y $\Delta 15$ HER2 maduro (aminoácidos 23-584 de la SEQ ID NO: 6) que carece de la secuencia señal. Ejemplos de las secuencias de estos ácidos

nucleicos $\Delta 15\text{HER2}$ 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 $\Delta 13\text{HER3}$ que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 8 o $\Delta 13\text{HER3}$ maduro (aminoácidos 20-541 de la SEQ ID NO: 8) que carece de la secuencia señal. Ejemplos de las secuencias de estos ácidos nucleicos $\Delta 13\text{HER3}$ 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 $\Delta 14\text{HER3}$ que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 10 o $\Delta 14\text{HER3}$ maduro (aminoácidos 20-555 de la SEQ ID NO: 10) que carece de la secuencia señal. Ejemplos de las secuencias de estos ácidos nucleicos $\Delta 14\text{HER3}$ 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 $\Delta 15\text{HER3}$ que incluye la secuencia señal como se muestra en la SEQ ID NO: 12 o $\Delta 15\text{HER3}$ maduro (aminoácidos 20-569 de la SEQ ID NO: 12) que carece de la secuencia señal. Ejemplos de las secuencias de estos ácidos nucleicos $\Delta 15\text{HER3}$ 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 fosforotioato, metilfosfonato, metilfosfonotioato, 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 tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, 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 oxicoesterol.

IIIB. Vectores de expresión y de terapia génica

En el presente documento además se divulgan 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.

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.

Las células hospedadoras transformadas son células que se han transformado o transfectado con vectores EGFR de mamífero solubles contruidos 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.

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.

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.).

Los promotores comúnmente utilizados en vectores de expresión microbianos recombinantes incluyen el sistema promotor de lactosa y el promotor λ P_L, 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.

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 2 μ 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.

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.

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

replicación en *E. coli* (gen Amp^r 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 α . El líder del factor α 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 μ g/ml de adenina y 80 μ 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 heterólogo.

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.

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.

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.

IV. Composiciones y preparaciones farmacéuticas:

En el presente documento además se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas o ácidos nucleicos anteriores.

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.

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 divulgan 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.

Las composiciones farmacéuticas como se divulgan 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_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 alginico, ácido poliglútamico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico y similares.

V. Oligómeros de cambio de empalme (SSO):

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.

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 $\Delta 15\text{HER2}$, $\Delta 13\text{HER3}$, $\Delta 14\text{HER3}$, la forma soluble es $\Delta 15\text{HER3}$, o la forma p85 de HER3.

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.

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 RNasa 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-CH₃, -O-CH₂-CH₂-O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH o -F, donde 2'O-metilo (2'-OMe) o se prefiere 2'O-metiloietilo (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 (^{Me}C), isocitosina, pseudoisocitosina, 5-(1-propinil)-citosina, 5-bromouracilo, 5-(1-propinil)-uracilo, 5-propinil-6, 5-metilazoleuracilo, 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 T_m 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 RNasa 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

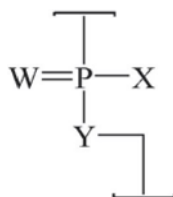
preferentemente oxígeno.

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 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 $X = \text{NH}_2$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, o 1-piperazina u otro grupo cargado, $Y = \text{O}$ y $Z = \text{O}$.

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. 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.

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.

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:



donde

W es S u O, y es preferentemente O,

$X = \text{NR}^1\text{R}^2$ u OR^6 ,

$Y = \text{O}$ o NR^7 , y cada uno de dichos enlaces en el oligómero se selecciona de:

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

(b1) enlace catiónico (b1), donde $X = \text{NR}^1\text{R}^2$ e $Y = \text{O}$, y NR^1R^2 representa un grupo piperazino opcionalmente sustituido, de modo que $\text{R}^1\text{R}^2 = -\text{CHRCHRN}(\text{R}^3)(\text{R}^4)\text{CHRCHR}-$, donde

cada R es independientemente H o CH_3 ,

R^4 es H, CH_3 , o un par de electrones, y

R^3 se selecciona de H, alquilo inferior, por ejemplo, CH_3 , $\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $\text{Z-L-NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, y $[\text{C}(\text{O})\text{CHR}'\text{NH}]_m\text{H}$, 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; (b2) enlace catiónico (b2), donde $X = \text{NR}^1\text{R}^2$ e $Y = \text{O}$, $\text{R}^1 = \text{H}$ o CH_3 , y $\text{R}^2 = \text{LNR}^3\text{R}^4\text{R}^5$, donde L, R^3 y R^4 son como se definieron anteriormente, y R^5 es H, alquilo inferior o (alcoxi)alquilo inferior; y

(b3) enlace catiónico (b3), donde $Y = \text{NR}^7$ y $X = \text{OR}^6$, y $\text{R}^7 = \text{LNR}^3\text{R}^4\text{R}^5$, donde L, R^3 , R^4 y R^5 son como se definieron anteriormente, y R^6 es H o alquilo inferior;

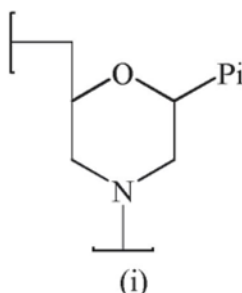
y al menos uno de dichos enlaces se selecciona de enlaces catiónicos (b1), (b2), y (b3).

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.

En una realización, al menos un enlace es del tipo (b1), donde, preferentemente, cada R es H, R^4 es H, CH_3 o un par de electrones, y R^3 se selecciona de H, alquilo inferior, por ejemplo, CH_3 , $C(=NH)NH_2$ y $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$. Las dos últimas realizaciones de R^3 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^3 es preferentemente C(O) (carbonilo), tal como se muestra.

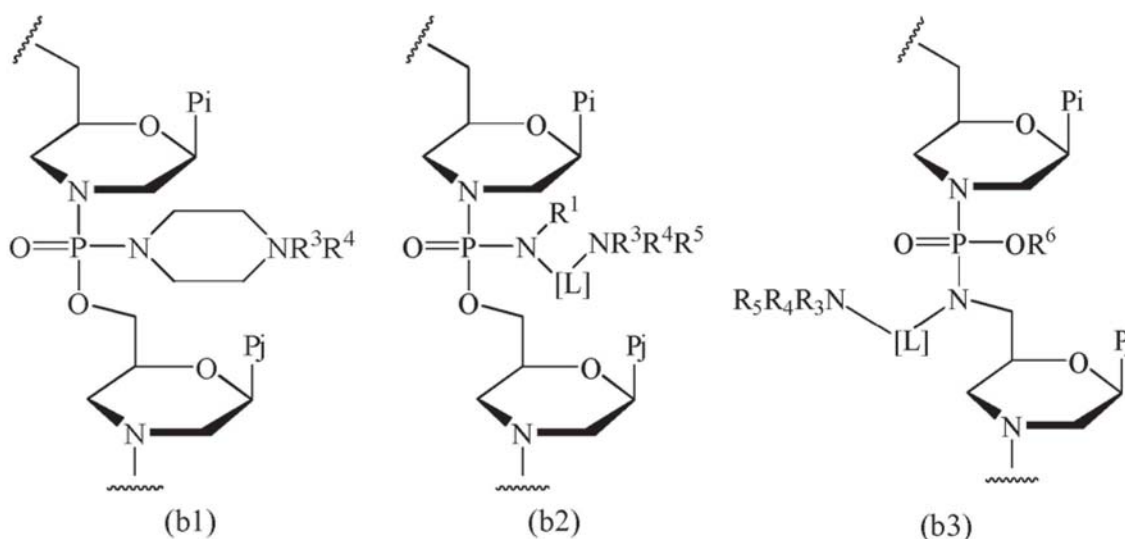
El grupo enlazador L, como se ha indicado anteriormente, contiene enlaces en su cadena principal seleccionados de alquilo (por ejemplo, $-CH_2-CH_2-$), alcoxi ($-C-O-$) y alquilamino (por ejemplo, CH_2-NH-), con la condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, aquellos adyacentes a carbonilo o nitrógeno) sean átomos de carbono. Aunque los enlaces ramificados (por ejemplo, $-CH_2-CH(CH_3)-$) son posibles, el enlazador preferentemente no está ramificado. En una realización, el enlazador es un enlazador de hidrocarburos. Dicho enlazador puede tener la estructura $-(CH_2)_n-$, donde n es 1-12, preferentemente 2-8, y más preferentemente 2-6.

Las subunidades morfolinas tienen la estructura:



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.

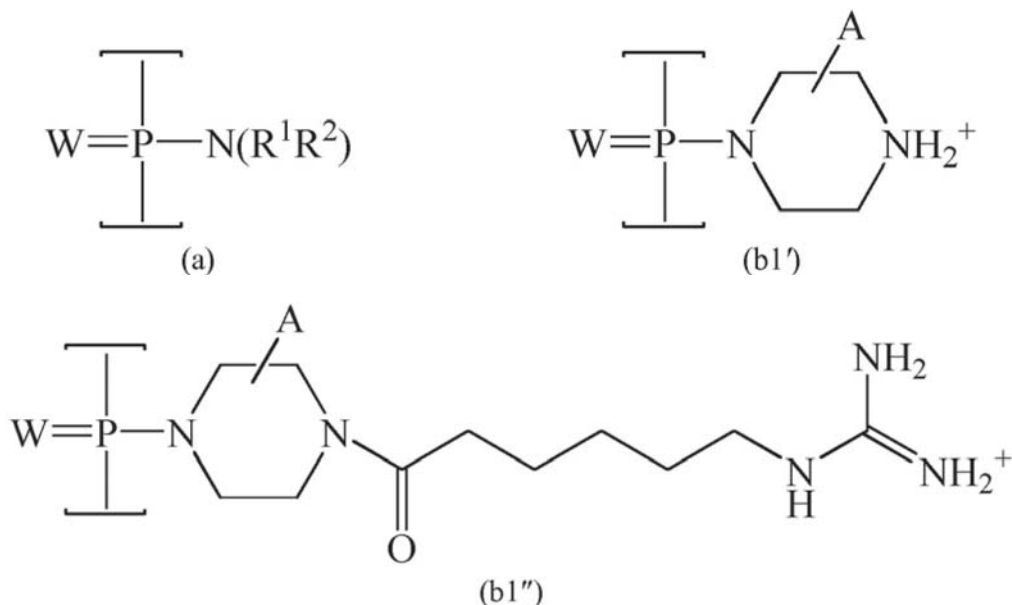
El uso de realizaciones de los tipos de enlace (b1), (b2) y (b3) anteriores para unir las subunidades morfolinas puede ilustrarse gráficamente de la siguiente manera:



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".:



En las estructuras anteriores, W es S u O, y es preferentemente O; cada uno de R¹ y R² 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'').

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, R³ es H o CH₃, y R⁴ es H, CH₃ o un par de electrones.

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.

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.

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.

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.

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 %.

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

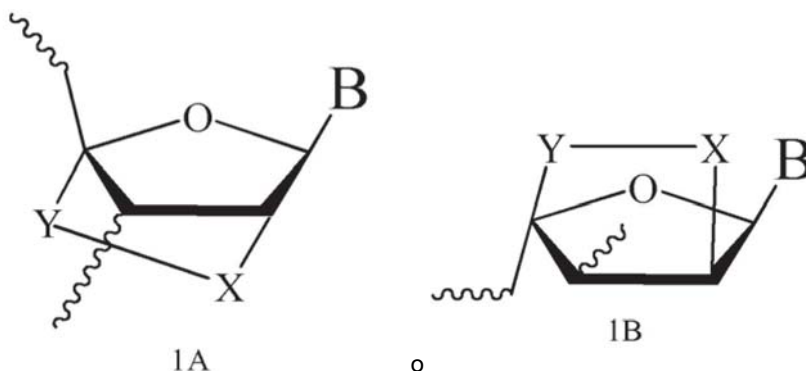
resto enlaces no cargados. Un oligómero que tiene 14-15 subunidades puede idealmente tener de dos a cinco, por ejemplo, 3 o 7, enlaces catiónicos y el resto enlaces no cargados.

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.

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



en donde,

X se selecciona del grupo que consiste en O, S y NRH, donde R es H o alquilo C₁-C₄;

Y es (-CH₂)_r, donde r es un número entero de 1-4; y

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.

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:

LldldLddldldL, LldlLLddILLdL, LMLMMLMMLMMLL, LMLMLLLMMLLMLL, LFLFFLLFFLFLFL, LFLFLLFFLLFLFL, LddldldldL, dldldldld, dldldldld, LMMLMMLMML, LMMLMMLMM, MMLMMLMMLM, LFFLFFLFFL, FLFFLFFLFF, FFLFFLFFL, dldldldL, LldldldL, 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.

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.

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, C₁-C₄, 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.

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 autohibridación 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.

VC. Modificaciones químicas y conjugados de SSO

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 tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, 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-glicerol-3-H-fosfonato, una cadena de poliamina o polietilenglicol, un ácido acético adamantano, una fracción palmítica, una fracción de octadecilamina o hexilaminocarbonil oxicolessterol.

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

- (a) cada subunidad X' representa independientemente lisina, arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de la estructura $R^1N=C(NH_2)R^2$, donde R¹ es H o R; R² es R, NH₂, NHR o NR₂, donde R es alquilo inferior o alqueno inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno; R¹ y R² pueden formar juntos un anillo; y la cadena lateral está unida a dicho aminoácido a través de R¹ o R²;
 - (b) cada subunidad Y' representa independientemente un aminoácido neutro -C(O)-(CHR)_n-NH-, donde n es de 2 a 7 y cada R es independientemente H o metilo; y
 - (c) cada subunidad Z' representa independientemente un α -aminoácido que tiene una cadena lateral de aralquilo neutro;
- en donde el péptido comprende una secuencia representada por uno de (X'Y'X')_p, (X'V')_m, y (X'Z'Z')_p, 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-(CH₂)_n-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 β -alanina, abreviada en el presente documento como B.

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)_p o la fórmula (RRY')_p, 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.

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 β -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(NH₂)NH-), amidinilo (HN=C(NH₂)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 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CHR}-\text{NH}-$, 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, 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 $(\text{RY}'\text{R})_4$ o la fórmula $(\text{RRY}')_4$, donde Y' es preferentemente Ahx. En el último caso, el análogo de ácido nucleico está preferentemente 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 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 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 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 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 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. 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.

Tabla 1. Transportadores peptídicos ejemplares para administración intracelular de PMO

Péptido	Secuencia (N terminal a C terminal)	SEQ ID
R_8XB	RRRRRRRRR-XB	52
$(\text{RXRRBR})_2\text{XB}$	RXRRBRXRBR-XB	53
$(\text{RXR})_3\text{RBR-XB}$	RXRRXRXRBR-XB	54
$(\text{RB})_5\text{RXRBRX-B}$	RBRBRBRBRXRBRX-B	55
$(\text{RBRBRBRX})_2\text{X}$	RBRBRBRXRBRBRBRX-X	56
$\text{X}-(\text{RB})_3\text{RX}(\text{RB})_3\text{RX}$	XRBRBRBRXRBRBRBRX-X	57

(continuación)

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

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 25 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.

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.

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 35 mediante administración intravenosa en solución salina en dosis tan altas como 6 mg/kg tres veces por semana (Yacysyhn, 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- α (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., 40 2003, Nucleic Acids Res. 31:953).

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).

45 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 divulgan 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 divulgan 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_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 alginico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido polilacturónico 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 multidosas, 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-dioleiloxy)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 aceptor y donante de empalme (SEQ ID NO: 44 y 45, respectivamente).

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 aceptor y donante de empalme (SEQ ID NO: 46 a 51, respectivamente).

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.

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.

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.

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.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

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 2×10^5 células/pocillo, o en 1 ml de medio en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo y se transfectaron 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.

RT-PCR: el ARN total se aisló 24 horas después de la transfección, mediante la recogida de las células en 800 µl 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).

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 transfectaron con 100 nM de los SSO indicados.

Después de 48 horas, se añadió el reactivo CellTiter 96® AQueous 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.

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.

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 -2×10^4 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).

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 policlonal anti-erbB2 de conejo (dilución 1:1000; Abcam), anticuerpo policlonal anti-erbB3 de conejo (dilución 1:1000; Abcam), anticuerpo policlonal 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 anticonejo (dilución 1:100.000; Abeam) 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

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).

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	ggt 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 internucleotídico de fosforotioato.				

Estos oligonucleótidos se transfectaron 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 transfectó 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 poli(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 poli(ADP ribosa) polimerasa (PARP), un marcador apoptótico, en células SK-BR-3 transfectadas (Figura 4A) y una regulación negativa simultánea de la proteína mHER2 (Figura 4B).

El ADNc que codifica $\Delta 15\text{HER2}$ (sHER2) se clonó en un vector de expresión de mamífero, que luego se transfectó 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 transfectadas 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 ($\Delta 15\text{HER2}$ -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 $\Delta 15\text{HER2}$ -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 $\Delta 15\text{HER2}$ -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 $\Delta 15\text{HER2}$ -His después de 72 horas de incubación se analizó mediante el ensayo MTS. La inhibición se evaluó colocando células a ~ 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 24 horas, y luego se trataron con proteína $\Delta 15\text{HER2}$ -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 \pm desviación estándar de triplicados (Figura 6D). El tratamiento con la proteína $\Delta 15\text{HER2}$ -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.	Número	Secuencia (5'-3')	Sitio diana de HER3	Modificación
26	1	GGGTCACTTCCAAGTCCTGA	Supuesto sitio de ramificación	2'-OMe, PS
27	2	GTCACCTTCCAAGTCCTGACC	Supuesto sitio de ramificación	2'-OMe, PS
28	3	CACTTCCAAGTCCTGACCTT	Supuesto sitio de ramificación	2'-OMe, PS
29	4	CTTCCAAGTCCTGACCTTCA	Supuesto sitio de ramificación	2'-OMe, PS
30	5	CCCTTACTGTACCCATTGAG	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	TTATCCCATCACTGACCCCT	Sitio de empalme en 5' del intrón 15	2'-OMe, PS
40	15	TATTATCCCATCACTGACCC	Sitio de empalme en 5' del intrón 15	2'-OMe, PS
41	16	ATTTCATCTCTTTAAGGCTC	Sitio de señal de PoliA	2'-OMe, PS
42	17	CTGGATCTACTGCTTAATTT	Sitio de señal de PoliA	2'-OMe, PS
2'-OMe, 2'-O-metil oligorribonucleótido; PS, enlace internucleotídico de fosforotioato.				

- 10 Estos oligonucleótidos se transfectaron 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 $\Delta 13$ HER3. Como se muestra en la Figura 9, los SSO 8, 9 y 10 (SEQ ID NO: 33 a 35, respectivamente) indujeron todos ARNm de $\Delta 14$ HER3, mientras que el SSO 13 (SEQ ID NO: 38) indujo ARNm de $\Delta 15$ HER3.

- 20 Las células SK-BR-3 se transfectaron 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 $\Delta 14$ HER3, causó una viabilidad celular reducida en comparación con las células simuladas o no transfectadas.

- 25 Ejemplo 4

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

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.

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 %.

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 (≥ 60 %)					*	*	*				
Ovario (> 60 %)							*				

Listado de secuencias

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

atggagctggcgctgtgcccgtggggctcctcctcgccctcttgcggggagccgagcaccgaagtgtg
caccggcacagacatgaagctgggctccctgccagtcggagaccacctggacatgtccggccacctaccagggctgcca
gggtgtgagggaaacctggaactcacctacctgcccaccaatgccagcctgtcctcctgcaggatatccaggaggtgcagggc
tacgtgtcatcgctcacaaccaagttaggcaggtcccactgcagaggtgctgggattgtgcgagggcaccagctcttgaggaca
actatgccctggcgtgctagacaatggagaccgctgaacaataccacccctgtcacaggggctccccaggaggcctgctggg
agctgcagcttgaagcctcacagagatcttgaaggaggggtcttgatccagcgggaacccccagctctgtaccaggacacgat
tttgtggaagacatcttcacaagaacaaccagctggctctcacactgatagacaccaaccgctctcgggctgccaccctgttc
tccgatgtgaagggtcccgtgctggggagagagttctgaggattgtcagagcctgacgcgactgtctgtgcccgtggctgtg
cccgtgcaaggggccactgccactgactgctgcatgagcagtgctgctgcccgtgacggggcccaagcactgtgactgcc
tggcctgctccactcaaccacagtggcatctgtgagctgactgcccagccctgtgacactacaacacagacacgttgagtcca
tgcccaatcccaggggccgtatattcggcgccagctgtgtgactgctgctcctacaactacctttctacggagctgggatcct
gcacctgctgctgccccctgcacaaccaagaggtgacagcagaggtggaacacagcgggtgtgagaagtgcagcaagccctgt
ggcgagtgctgtatggtctgggcatggagcacttgcgagaggtgagggcagttaccagtgcgaatatccaggagtttctgctgctg
caagaagatcttgggagcctggcatttctgcccggagagctttagtggggaccagcctcaacactgccccgctcagccagag
cagctccaagtgtttgagactctggaagagatcacaggttacctatacatctcagcatggccggacagcctgctgacctcagcgtc
ttccagaacctgcaagtaatccggggacgaattctgcacaatggcgctactcgtgacctgcaagggtgggcatcagctggct
ggggctgctgctcactgagggaaactgggcagtgactggcctcaccataacaccacactctgcttctgacacaggtgcc
tgggaccagctcttgcgaaccgcaccaagctgctcaccactgccaaccggccagaggacgagtggtgtggcgagggcctg
gctgccaccagctgtgcccggaggcactgtggggctccagggccaccagctgtgtcaactgcagccagttccttggggc
caggagtgctgagggaatgccagtgactgcaggggtcccagggagtgtgaatgccaggcactgttgcctgcccacct
gagtgtagccccagaatggctcagtgacctgtttggaccggaggtgaccagtggtggcctgtgcccactataaggacctcc
cttctgctggtggcctgccccagcgggtgtgaacctgacctctcctacatgccatctggaagttccagatgaggagggcgcat
ggcagcctgccccatcaactgcaccactcctgtgtggacctggatgacaagggtgccccggcgagcagagagccagccctc
tgacgtccatcatctctgctggtgtggcattctgctgctggtcttgggggtgtcttggggtcctcatcaagcgacggcagca
gaagatccgggaagtacacgatgaggagactgctgcaggaaacggagctggtggagccgctgacacctagcggagcagatgcc

aaccaggcgagatgaggatcctgaaagagacggagctgaggaagggtgaagggtgcttgatctggcgctttggcacagtctac
aagggtcagctgagccctgaggggagaatgtgaaaattcagtgccatcaaagtgttgagggaacacatccccaaagcca
acaaagaaatcttagacgaagcatactgtaggtgtgtgggctccccatgtctcccgccttctgggcatctgctgacatcca
cgggtgcagctggtgacacagcttatgccctatggctgctcctttagaccatgtccgggaaaaccgaggacgctgggctcccagga
cctgctgaactggtgtatgcagattgcaagggtgatgactacctggaggatgtgctgctgtacacagggacttggcgctcgg
aacgtgctggtcaagagtccaacctgtcaaaattacagacttgggtgctgctggctgctgacattgacgagacagagtacca
tgagatgggggcaaggtgccatcaagtggatggcgtggagtcattctccggcggttaccaccagagtgatgtgtgg
agttatgtgtgactgtgtggagctgtagcttttggggccaaaccttacgatggatcccagccgggagatccctgacctgtg
gaaaagggggagcggctgccccagcccccatctgcaccattgatgtctacatgatcatggtcaaatgttgatgattgactctgaa
tgtcggccaagattccgggagttgtgtctgaattctccgcagtgccagggacccccagcgttctgtgtcatccagaatgagga
cttgggcccagccagtccttgacagcaccttctaccgctcactgtgaggacgatgacatgggggacctgtgtgagtgctgag
gagtatctgtgacccagcagggtcttctgtccagacctgccccggcgctggggcatgtgtccaccacaggcaccgcagct
catctaccaggagtgccggtggggacctgacactagggctggagccctctgaagaggaggccccaggtctccactggcacct
ccgaagggtgctgctcctgattgtgtgacgtgggaatggggcgagccaagggtgcaaaacctccccacacatgacc
ccagccctctacagcgtgacgtgaggacccacagtaacctgcccctctgagactgatggtacgttggccccctgacctgcag
ccccagcctgaatatgtgaaccagccagatgttcggccccagccccctcggccccgagaggccctctgctgctgcccacct
gctggtgccactctgaaaggcccaagactctccccagggaagaatggggctgtcaagacgttttgccttgggggtgcccgt
ggagaaccccgacttgcacccccaggaggagctgccccctagccccacctctcctgcttgcagccagccttcgacaa
cctctattactgggaccaggaccaccagagcggggggtccaccagcaccttcaaagggacacctacggcagagaacccag
agtacctgggtctggacgtgccagtga

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

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLY
 QGCQVVQGNLELTYPNLSFLQDIQEVQGYVLIHNNQVRQVPLQRLRIVRGTO
 LFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLC
 YQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRT
 VCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALVT
 YNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLCPLHNQEVTAEEDGT
 QRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGD
 PASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFNQLQVIRGRILHNGAY
 SLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTA
 NRPEDECVGEGGLACHQLCARGHCWGPQTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLP
 REYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPGSKVP
 DLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQASPLTSIISAVVGILL
 VVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETE
 LRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMA
 GVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMQIA
 KGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKV
 PIKWMALLESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGER
 LPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSFESRMARDPQRFVVIQNEEDLGP
 ASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSS
 TRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDP
 PLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAG
 ATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTTPQGGAAPQPHPPPAFSPAFDNL
 YYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV

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

atgaggcggaacgacgctctgcaggtgctgggcttgcctttcagcctggccggggctccgaggtgggcaactctcag
gagtgctgctgggactctgaatggcctgagtgtagggcgatgctgagaaccaataccagacactgtacaagctctacgaga
gggtgtaggtggtgatggggaacctgagattgtgctcagggacacaatgccgacctctcttctcagtggtgaggaagt
acaggctatgtcctcgtggccatgaatgaattctactctaccattgcccaacctccgctggtgagggaccaggtctacgat
gggaagtttccatcttctgcatgttgaaactataacaccaactccagccagctctgcgcccagctccgcttgactcagctcaccgag
attctgtcagggggtgtttatattgagaagaacgataagctttgtcacatggacacaattgactggaggggacatcgtgagggaccga
gatgctgagatagtggtgaaggacaatggcagaagctgtccccctgtcatgaggtttgcaagggggcgatgctggggctcctggat
cagaagactgccagacattgaccaagaccatctgtgctcctcagtgtaattgtcactgctttgggccaacccaaccagtgctgcc
atgatgagtggtccgggggctgctcagggccctcaggacacagactgctttgctgcccggcacttcaatgacagtgaggcctgtgta
cctcgtgctccacagcctctgtctacaacaagctaactttccagctggaacccaatccccacaccaagtatcagtatggagagttt
gtgtagccagctgtccccaataactttgtggtggatcaaacatcctgtgtcagggcctgtcctcctgacaagatggagtagataaaaa
tgggctcaagatgtgtgagcctgttggggactatgtccaaagcctgtgagggaacaggctctgggagccgctccagactgtg
gactcgagcaacattgatgatttgaactgcaccaagatcctgggcaacctggactttctgatcaccggcctcaatggagacccc
tggcacaagatccctgcccctggaccagagaagctcaatgtctccggacagtacgggagatcacaggttacctgaacatccagtc
ctggcggccccacatgcacaactcagtgttttccaattgacaacattggaggcagaagcctctacaacggggcttctcattgt
tgatcatgaagaactgaatgtcacatctctgggcttccgatccctgaaggaaattagtgtggcgctatctatataagtccaatagg
cagctctgctaccaccactcttgaactggaccaaggtgcttggggggcctacgggaagagcgactagacatcaagcataatcggc
cgcgagagactgctggcagaggggcaagtggtgtagccactgtgctcctcctgggggatgctggggcccaggccctggtcagt
gcttgcctgctgaaattatagccgaggaggtgtgtgtgtagccactgcaactttctgaatggggagcctcgagaatttggccatga
ggccgaatgcttctcctgccacccggaatgcaacccatggaggggcactgccacatgcaatggctcgggctctgatactgtgtc
aatgtgcccatttctgagatgggccccactgtgtgagcagctgccccatggagtcctaggtgccaaggggccaatctacaagtac
ccagatgttcagaatgaatgtcggccctgccatgagaactgcacccaggggtgtaaaggaccagagcttcaagactgttaggaca
aacactgggtgctgtagcggcaaacccatctgacaatggctttgacagttagtagcaggattggtagtgtatttcatgatgctggggcgc
acttttctactggcgtggggcggcggattcagaataaaaggctatgaggcgatacttgaacggggtagagcatagagcctct
ggaccccagtgagaaggctaacaagtcttggccagaatctcaaaagagacagagctaaggaagcttaagtgttggctcgggt
gtctttggaactgtgcacaaggagtggtggtacccctgagggtgaatcaatcaagattccagctctgattaaagtattaggacaag
agtggacggcagagtttcaagctgtgacagatcatatgctggccattggcagcctggaccatgccacattgtaaggctgctggg
actatgcccagggtcatctctgcagctgtcactcaatattgctcctggttctctgctggatcatgtgagacaacaccggggggca
ctggggccacagctgtgctcaactggggagtacaaattgccaagggaatgtactaccttgaggaaatggtatggtgcatagaaa
cctggctgcccgaacgtgctactcaagtacccagtcaggttcagggtggcagattttggtgtggtgacctgctgctcctctgatgat
aagcagctgctatagctgaggccaagactccaatgaatggtatggcccttgagagtatccatttgggaatacacacaccagag
tgatgtctggagctatggtgtgacagtttgggagttgatgacctcggggcagagccctatgcagggctacgattggtgaagtacc
agacctgctagagaagggggagcggttggcacagcccagatctgcacaattgatgtctacatggtgatggtcaagtgttggatga
ttgatgagaacattgcccaaccttaagaactagccaatgagttaccaggtgcccagagaccaccaggtatctgtgctataa
agagagagagtgggcctggaatagcccctgggcccagagccccatggtctgacaaacaagaagctagaggaagtagagctgga
gccagaactagacctagacctggaagcagaggaggacaacctggcaaccaccacactgggctcggcctcagcctac
cagttggaacacttaatcgccacgtgggagccagagccttttaagtcacatctggatacatgcccataagcagggttaatttgg
gggagcttggcaggagctgtcagtttctgggagcagtgaaagggtgccccctcagctctctacaccaatgccacggggatgc
ctggcatcagagtcacagaggggcatgtaacaggctctgaggctgagctccaggagaaagtgtcaatgttaggagccggagc
aggagccggagcccacggccacgggagatagcgctaccattccagcgccacagctgctgactcctgttacctcctccgggaaggcac
caccgggttagaggaagaggtatgaacgggttatgtcatgcccagatacacacctcaaaaggtactcctcctccgggaaggcac
cctttctcagtggtgtcagttctgtcctgggtactgaagaagaatgaagatgaggagtagaatacatgaaccggaggagaag
gcacagtccacctcatccccctaggccaagtcccttgaggagctgggttatgagtacatggatgtggggtcagacctcagtgctc

tctgggcagcacacagagttgcccactccacctgtacctatcatgcccactgcaggcacaactccagatgaagactatgaatatat
gaatcggaacgagatggaggtgtcctgggggtgattatgcagccatgggggctgcccagcatctgagcaagggtagaaga
gatgagagctttcaggggctggacatcagggcccccatgtccattatgcccgcctaaaaactctacgttagcttagaggctacaga
ctctgctttgataacctgtattactggcatagcaggttttcccaaggctaatgcccagagaacgtaa

MRANDALQVLGLLFSLARGSEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLY
 KLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVV
 RGTQVYDYGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTI
 DWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDQTLTKTICAPQCNG
 HCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDGACVPRCPQPLVYNKLTQ
 LEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGG
 LCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPE
 KLVNFRITVREITGYLNIQSWPPHMHNFVSFNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNV
 SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAE
 GKVCDPLCSSGGCWGPGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHEAECFS
 CHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPVCVSSCPHGVLAGKGPYKYPDV
 QNECRPCHENCTQGCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLTMAITVIAGLVVIFMMLGG
 TFLYWRGRRIQNKRAMRRYLERGESIEPLDPSEKANKVLARIFKETELRKLKVLGS
 GVFGTVHKGVWIPEGESIKIPVCIKVIEDKSGRQSFQAVTDHMLAIGSLDHAHIVRL
 LGLCPGSSLQLVTQYLPLGSLLDHVRQHRGALGPQLLLNWGVQIAKGMYYLEEH
 GMVHRNLAARNVLLKSPSQVQVADFGVADLLPPDDKQLLYSEAKTPIKWMALESI
 HFGKYTHQSDVWSYGVTWELMTFGAEPYAGRLAEVDPDLLEKGERLAQPQICTI
 DVYVMVMVKCWMIDENIRPTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAPGPEPH
 GLTNKKLEEVELEPELDLDLDLEAEEDNLATTTLGSALSLPVGTLNRPRGSQSLLSP
 SSGYMPMNQGNLGESCQESAVSGSSERCPRPVSHPMPRGCLASESSEGHVTGSEA
 ELQEKVSMCRSRSRSPRPRGDSAYHSQRHSLTPVTPLSPGLEEEDVNGYVMP
 DTHLKGTPSSREGTLSSVGLSSVLGTEEEDEDEEYEMNRRRRHSPHPHPPRPSLEE
 LGYEYMDVGSDLASLGSTQSCPLHPVPIMPTAGTTPDEDEYEMNRQRDGGGPGG
 DYAAMGACPASEQGYEEMRAFAQGPGHQAPHVHYARLKTLSLEATDSAFDNPDY
 WHSRLFPKANAQRT

SEQ ID NO: 5 (ADN de A15HER2 humano)

atggagctggcgccctgtgccgctgggggctcctctcgccctcttgcctcccgagccgagcaccacagtggtg
caccggcacagacatgaagctgcggctccctgccagtcctgagaccacctggacatgctccgacacctaccagggtgcca
gggtgtgcagggaaacctggaactcacctacctgccaccaatgccagcctgtccttctgcaggatatccaggaggtgcagggc
tacgtgtcatcgtcacaaccaagtgaggcaggtccactgcagaggctgcggattgtgcgaggcaccagctctttgaggaca
actatgccctggcgtgctagacaatggagacccgctgaacaataccaccctgtcacaggggctccccaggaggcctgcggg
agctgcagctcgaagcctcacagagatctgaaaggaggggtcttgatccagcggaaacccacagctctgctaccaggacacgat
ttgtggaaggacatctccacaagaacaaccagctggctctcacactgatagacaccaaccgctctcgggctgcacccctgttc
tccgatgtgaagggtcccgctgctggggagagagttctgaggattgtcagagcctgacgcgactgtctgtgcgggtggtgtg
cccgtgcaaggggccaactgccactgactgtgcatgagcagtgctgctgggctgcacgggccccaaagcactgtgactgcc
tggcctgctccactcaaccacagtggtcatctgtgagctgactgccagccctgtgtcacctacaacacagacagtttgagtcca
tgcccaatcccgagggcggtatacttggcgccagctgtgtgactgctgtccctacaactacctttctacggacgtgggatcct
gcacctcgtctgccccctgcacaaccaagaggtgacagcagaggatggaacacagcgggtgtgagaagtgcagcaagccctgt

gcccagtggtgtctatggtctgggcatggagcacttgcgagaggtgagggcagttaccagtccaatatccaggagtttgcggctg
caagaagatctttgggagcctggcatttctgccggagagcttggatggggagccagcctccaactgccccgctccagccagag
cagctccaagtgtttgagactctggaagagatcacagggtacatacatctcagcatggccggacagcctgctgacctcagcgtc
ttccagaacctgcaagtaatccggggacgaattctgcacaatggcgctactcgtgacctgcaagggtgggcatcagctggct
ggggctgcgctcactgaggggaactgggcagtggtgactggccctcatccaccataacaccacactctgtctcgtgcacacgggtgcc
tgggaccagctctttcggaacccgcaccaagctctgtccacactgccaacccggccagaggacgagtggtgtggcgagggcctg
gctgcccaccagctgtgcgcccagggcactgctgggtccagggccaccagtggtgtcaactgcagccagttccttcggggc
caggagtgcgtggaggaatccgagtactgcaggggctccccagggagtatgtgaatgccaggcactgtttgccgtgccacct
gagtgtagccccagaatggctcagtgacctgtttggaccgctgtgtggacctggatga

SEQ ID NO: 6 (proteína A15HER2 humana)

MELAALCRWGLLLALLPPGAAS+QVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHL
YQGCQVVQGNLELTYPNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNPVRQVPLQRLRIVRGT
QLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQL
CYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTR
TVCAGGCARCKGPLPTDCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALV
TYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDG
TQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDG
DPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGA
YSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGALIHNNHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHT
ANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGL
PREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPLCGPG

5

SEQ ID NO: 7 (ADN de A13HER3 humano)

atgagggcgaacgacgctctgcaggtgctgggcttgcctttcagcctggccggggctccgaggtgggcaactctcag
gcagtgtgctctgggactctgaatggcctgagtgtagccggcgatgctgagaaccaataccagacactgtacaagctctacgaga
gggtgtgaggtggtgatggggaaccttgagattgtgctcagggacacaaatgccgacctctccttctgcagtggattcgagaagt
acaggctatgtcctcgtggccatgaatgaattctctactctaccattgcccaacctccgcgtggtgcgagggaccaggtctacgat
gggaagtttccatcttcgtcatgttgaaactataacaccaactccagccacgctctgcgcagctccgcttgactcagctaccgag
attctgtcaggggggtgtttatattgagaagaacgataagctttgtcacatggacacaattgactggagggacatcgtgagggaccga
gatgctgagatagtggtgaaggacaatggcagaagctgtcccccctgtcatgaggtttgcaaggggcatgctggggctctggat
cagaagactgccagacattgaccaagaccatctgtgctcctcagtgtaatggctactgctttgggccaacccaaccagtctgccc
atgatgagtgtagccgggggctgctcagggcctcaggacacagactgctttgcctgccggcacttcaatgacagtggagcctgtgta
cctcgtgtccacagcctctgtctacaacaagtaactttccagctggaacccaatccccacaccaagtatcagtatggaggagttt
gtgtagccagctgtcccataactttgtggtggatcaaacatcctgtgtcagggcctgtcctcctgacaagatggaagtataaaaa
tgggctcaagatgtgtgagccttgtggggactatgtcccaaagcctgtgagggaaacaggctctgggagccgcttcagactgtg
gactcgagcaacattgatgattgtgaactgcaccaagatcctgggcaacctggactttctgacaccggcctcaatggagacccc
tggcacaagatccctgcccggaccagagaagctcaatgtcttccggacagtacgggagatcacagggtacctaacaatccagtc
ctggccgccccacatgcacaactcagtggttttccaattgacaaccattggaggcagaagcctctacaaccggggcttctcattgt
tgatcatgaagaacttgaatgtcacatctctgggcttccgatccctgaaggaaattagtctgggctgtatctatataagtccaatagg
cagctctgtaccaccactcttgaactggaccaaggtgtctcgggggcctacggaagagcgactagacatcaagcataatcggc
cgcgagagactgaggggagcctcgagaatttgcccatgagggccgaatgtcttctcctgccaccgggaatgccaacctgagggg
cactgccacatgcaatggctcgggctctgatactgtgctcaatgtgccatttgcagatgggccccactgtgtga

SEQ ID NO: 8 (proteína A13HER3 humana)

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNLSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLY
KLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVV
RGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTI
DWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGEEDCQTLTKTICAPQCNG
HCFGNPNPQCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQLVYNKLTFQ
LEPNPHTKYQYGGVVCVASCPHNFVVDQTSVVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGG
LCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPE
KLVNFRFTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVSFSLNLTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNV
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSNLNWTGLRGPTTEERLDIKHNRPRRDCGSL
ENLPMRPNASPATRNANPWALPHAMARALILVLNVPIFEMGPTV

5

SEQ ID NO: 9 (ADN de A14HER3 humano)

atgagggcgaacgacgctctgcaggtgctgggcttgcctttcagcctggcccggggctccgaggtgggcaactctcag
gcagtgtgctctgggactctgaatggcctgagtgtagccggcgatgctgagaaccaataccagacactgtacaagctctacgaga
gggtgtgaggtgggtgatggggaaccttgagattgtgctcacgggacacaatgccgacctctccttctgcagtggattcgagaagt
acaggctatgtctctgtggccatgaatgaattctactctaccattgcccaacctccgctgggtgaggggacccaggtctacgat
gggaagtgtccatctctgctcatgttgaactataacaccaactccagccacgctctgcgccagctccgcttgactcagctcaccgag
attctgtcaggggggtgtttatattgagaagaacgataagctttgtcacatggacacaattgactggaggacatcgtgagggaccga
gatgctgagatagtggtgaaggacaatggcagaagctgtccccctgctatgaggttgcaggggcgatgctggggctctggat
cagaagactgccagacattgaccaagaccatctgtgctcctcagtgtaattggtcactgctttgggcccaccccaaccagtgtgcc
atgatgagtgtagccgggggctgctcaggccctcaggacacagactgctttgctgcccggcactcaatgacagtggagcctgtgta
cctcgtgtccacagcctctgtctacaacaagctaactttccagctggaaccaatccccacaccaagtatcagtaggaggttt
gtgtagccagctgtccccataactttgtggtgatcaaacatcctgtgtcagggcctgtcctcctgacaagatggaagttagataaaa
tggtctcaagatgtgtgagcctgtgggggactatgtccaaagcctgtgaggggaacaggctctgggagccgcttccagactgtg
gactcaggaacattgatggatttgaactgcaccaagatcctgggcaacctggactttctgatccggccctcaatggagacccc
tggcacaagatccctgcccctggaccagagaagctcaatgtctcggacagtacgggagatcacaggttacctgaacatccagtc
ctggccgccccacatgcacaactcagtggttttccaatttgacaaccattggaggcagaagcctctacaaccggggcttctcattgt
tgatcatgaagaactgaatgtcacatctctgggcttccgacccctgaaggaaattagtgtggcgctatctatataagtccaatagg
cagctctgctaccaccactcttgaactggaccaaggtgcttgggggctacggaagagcgactagacatcaagcataatcggc
cgcgagagactgcgtggcagaggggcaaagtgtgtgacctgtgctcctctgggggatgctggggcccaggccctgtgtagt
gcttgcctgtcgaaattatagccgaggaggtgtgtgtgacctgtgcaactttctgaatggggctctgatacttgtgctcaatgtgc
ccatttctgagatgggccccactgtgtga

SEQ ID NO: 10 (proteína A14HER3 humana)

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLY
KLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVV
RGTQVYDYGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTI
DWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGECDQTLTKTICAPQCNG
HCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQLVYNKLTQFQ
LEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSVVRACPPDKMEVDKNGLKMCPEPCGG
LCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPE
KLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVFSNLTITIGGRSLYNRGSLLIMKNLNV
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHSLNWTQVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAE
GKVC DPLCSSGGCWGP GPQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGALILVLNVPIFEM
GPTV

5

SEQ ID NO: 11 (ADN de A15HER3 humano)

atgagggcgaacgacgctctgcaggtgctgggctgtctttcagcctggcccggggctccgaggtgggcaactctcaggcagtg
gtcctgggactctgaatggcctgagtgtagccggcgatgctgagaaccaataccagacactgtacaagctctacgagaggtgtga
gggtgtgtaggggaaccttgagattgtgctcacgggacacaaatgccgacctctccttctcagtgaggattcgagaagtacaggct
atgtctctgtagccatgaatgaattcttactctaccattgcccaacctccgctggtgtaggggaccaggtctacgatgggaagt
tgccatctctgcatgttgaactataacaccaactccagccagctctgcccagctccgcttgactcagctcaccgagattctgtca
gggggtgtttatattgagaagaacgataagctttgtcatatggacacaattgactggaggacatcgtgagggaccgagatgtga
gtagtggtgaaggacaatggcagaagctgtccccctgtcatgaggtttgcaaggggagctgctggggtcctggatcagaagac
tgccagacattgaccaagaccatctgtgctcctcagtgtaattggtcactgctttgggccaacccaaccagtgctgccatgatgag
gtgcccgggggctgctcaggccctcaggacacagactgctttgctgcccgcacttcaatgacagtgaggcctgtgtacctgctgt
ccacagcctctgtctacaacaagctaactttccagctggaacccaatccccacaccaagtatcagtagggagttgtgttagcca
gctgtccccataactttgtggtggatcaaacatcctgtgtcagggcctgtcctcctgacaagatggaagtagataaaaaatgggctcaa
gatgtgtgagcctgtgggggactatgtccaaagcctgtgagggaacaggctctgggagccgcttcagactgtggactcgagc
aacattgatggattgtgaactgcaccaagatcctgggcaacctggactttctgatcaccggcctcaatggagaccctggcacaag
atccctgccctggaccagagaagctcaatgtcttccggacagtagggagatcacagggtacctaacatccagctcctggccgccc
ccacatgcacaacttcagtggtttttccaatttgacaaccattggaggcagaagcctctacaaccggggcttctcattgtgtgatga
gaacttgatgtcacatctctgggcttccgatccctgaaggaaattagtgctgggctgtatctatataagtgccaataggcagctctgt
accaccactctttgaactggaccaaggtgcttccgggggcttacggaagagcgactagacatcaagcataatcgcccgccgagag
actgctggcagagggcaaagtgtgtgacctgtgtcctctggtgggagctggtgggcccaggccctggcagtgctgtcctgt
cgaaattatagccgaggaggtgtgtgtgacctgtgcaactttctgaatggggagcctcgagaatttgcccatgaggccgaatg
cttctcctgccaccgggaatgccaacccatggagggcactgccacatgcaatggctcggtgtaa

SEQ ID NO: 12 (proteína A15HER3 humana)

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLY
KLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVV
RGTQVYDYGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTI
DWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCQTLTKTICAPQCNG
HCFGNPNPQCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTQ
LEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGG
LCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPE
KLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNT
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHSLNWTKVLRGPTTEERLDIKHNRPRRDCVAE
GKVCDPCLSSGGCWGPGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAEAEFCF
CHPECQPMEGTATCNGSV

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

Atgagggcgaacgacgctctgcaggtgctgggctgtctttcagcctggcccggggctccgaggtgggcaactctca
ggcagtgctgctgggactctgaatggcctgagtgtagccggcgatgctgagaaccaataccagacactgtacaagctctacgag
aggtgtgaggtggtgtaggggaaccttgagattgtgctcacgggacacaaatgccgacctctccttctcagtgaggattcgagaagt
gacaggctatgtcctgtagccatgaatgaattcttactctaccattgcccaacctccgctggtgtaggggaccaggtctacga
tggaagtttgccatcttctcatgttgaactataacaccaactccagccagctctgcccagctccgcttgactcagctcaccgag
attctgtcaggggggtgtttatattgagaagaacgataagctttgtcatatggacacaattgactggagggacatcgtgagggaccga
gatgctgagatagtggtgaaggacaatggcagaagctgtccccctgtcatgaggtttgcaaggggagctgctggggtcctggat
cagaagactgccagacattgaccaagaccatctgtgctcctcagtgtaattggtcactgctttgggccaacccaaccagtgctgcc

atgatgagtgtgccgggggctgctcaggccctcaggacacagactgctttgctgccggcacttcaatgacagtggagcctgtgta
cctcgctgtccacagcctctgtctacaacaagctaactttccagctggaaccaatccccacaccaagtatcagtatggaggagttt
gtgtagccagctgtccccataactttgtggtggatcaaacatcctgtgtcagggcctgtcctcctgacaagatggaagtag
ataaaaatgggctcaagatgtgtgagcctgtgggggactatgtccaaagcctgtgagggaacaggctctgggagccgtcca
gactgtggactcgagcaacattgatgattgtgaactgcaccaagatcctgggcaacctggactttctgacacggcctcaatgg
agaccctggcacaagatccctgacctggaccagagaagctcaatgtctccggacagtacgggagatcacaggttacctgaac
atccagtcctggcgccccacatgcacaactcagtgttttccaattgacaaccattggaggcagaagcctctacaaccggggct
tctcattgtgatcatgaagaactgaatgtcacatctctgggcttcgacccctgaaggaaattagtgtggcgctatctataagt
ccaataggcagctctgtaccaccactttgaactggaccaaggtgcttcgggggctacggaagagcgactagacatcaagca
taatcgccgcgcagagactgctggcagagggcaaggtgtgtgaccactgtgctcctctgggggatgctggggccaggcc
ctggctagtgcttctgtcgaattatagccgaggaggtgtctgtgtgaccactgcaactttctgaatgggtacagtaaggggag
ccagtcaaggatgggtgggggtggggccctgcaatggaactgttcaggtggcatacataa

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

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLY
KLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVV
RGTQVYDQKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTI
DWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCQTLTKTICAPQCNG
HCFGNPNQCCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQLVYNKLTQ
LEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSVRACPPDKMEVDKNGLMCEPCGG
LCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPE
KLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVFSNLTIGGRSLYNRGFSLIMKNLNV
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSNLTWTKVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAE
GKVCPLCSSGGCWGPQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGYSKGSQSRMGGG
GALQWNCSSGGIQ

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)

cctgggggtgtcagtgccagcccccaaatctttctgcccccccaggaggctgaccagtgtgtggcctgtgccc
actataaggaccctcccttctgctggcccgtgccccaggggtgaaaactgacctctctacatgcccatctggaagttt
ccagatgaggagggcgcatgccagccttgccecatcaactgcaaccactcgtgagtccaacggtctttctgcagaaaggagg
acttcccttcaggggt

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)

cttctgtgggagtcctcagactcctctcctaaccaccccttcttccagtgggcagagggcaagtgtgtgaccactg
tgtcctctgggggatgctggggcccaggccctggctcagtgcttctgtcgaattatagccgaggaggtgtctgtgtgac
ccactgcaactttctgaatgggtacagtaaggggagccagtcaggatgggtgggggtggggccctgcaatggaactgttcag
gtggcatacaataaaagtcttttagacagctttctgcatgtgcctgggtgggattgaggtaggagacctgtggtgtgagatcgagca
tgaaggtcaggacttgggaagtgaacccccctcttattccactacagggagcctcgagaatttgcceatgaggccgaatg
cttctctgccaccgggaatgcaacccatggagggcactgccacatgcaatggctcggtatactagtagcaccaggatctcc
aaggagagacagagaaggggcaatacttggagcatctggggaatgataatggctaaggatagcacagagaggccagataatgcta
gggctgcagatagaagatcctgaatgtctgggtgtgtcttctgtgggaggtatggaattgaccttgggatctgattctctgaccttc
tcttccactcagggctctgatacttgtgtcgaatgtgcccattttcgagatgggccccactgtgtgagcagctgccccatgg

agtcctaggtccaagggcccaatctacaagtaccagatgttcagaatgaatgtcgccctgccatgagaactgaccca
ggggtcagtgatgggataataaggagaggggggtcaggtggaagggtaggagca

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

Gccagcactttgggaggctgagatgggaagatcacttgagcccagaattagagataagcctatggaaacatagcaag
acactgtctctacaggggaaaaaaagaaactgagccttaagagatgaaataaattaagcagtagatccaggatgcaaat
cctccaattcctgtgc

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	GGGTCACTTCCAAGTCCTGA
27	2	GTCACCTCCAAGTCCTGACC
28	3	CACTTCCAAGTCCTGACCTT
29	4	CTTCCAAGTCCTGACCTTCA
30	5	CCCTTACTGTACCCATTGAG
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	TTATCCCATCACTGACCCCT
40	15	TATTATCCCATCACTGACCC
41	16	ATTCATCTCTTTAAGGCTC
42	17	CTGGATCTACTGCTTAATT
43	654	GCTATTACCTTAACCCAG
Dianas de unión de empalme		
44	HER2-Ex15SA	cctgggggtgtcagtgccagccccacaaatctttctgcc ccccccaggaggctgaccagtgtgtggcctgtgccact <u>ataaggacctcccttctg</u>

(continuación)

Dianas de unión de empalme		
SEQ ID.	Nombre	Secuencia (5'-3')
45	HER2-Ex15SD	<u>ccagatgaggagggcgcatgccagccttgcccatcaac</u> <u>tgcaccactcgtgagtcacacggctctttctgcagaaagga</u> ggactttccttcaggggt
46	HER3-Ex13SA	cttgctgggagtcctcagactcctcctaaccacccttct ttcagtgccagagggcaaaagtgtgtgaccactgtgtc <u>ctctgggggatgtctg</u>
47	HER3-Ex13SD	<u>aattatagccgaggaggtgtctgtgtgaccactgcaact</u> <u>ttctgaatgggtacagtaaggggagccagtcaggatggg</u> tgggggtggggccctgcaat
48	HER3-Ex14SA	aaggtcaggacttggaagtgacccccctccctttattccc actacagggagcctcgagaatttgcctatgaggccgaat <u>gcttctctgccaccgg</u>
49	HER3-Ex14SD	<u>gccaccgggaatgccaaccatggaggggcactgccaca</u> <u>tgcaatggctcgg</u> tatactagtagcaccagatctccaagg gagacagagaaggggcaatac
50	HER3-Ex15SA	ggaattgaccttgggatctgattcttctgaccttctcttcca ctcagggctctgatacttgtgtcgaatgtgccattttcga <u>gatggggccccactg</u>
51	HER3-Ex15SD	<u>ccagatgttcagaatgaatgtcgccctgccatgagaac</u> <u>tgcaccaggggtcagtgatgggataataaggagagggg</u> gtcaggtggaagggtaggagca

Transportadores peptídicos ejemplares para administración intracelular de PMO

Péptido	Secuencia (N terminal a C terminal)	SEQ ID
R ₈	RRRRRRRR-XB	52
(RXRRBR) ₂ -XB (CPO6062)	RXRRBRXRBR-XB	53
(RXR) ₃ RBR-XB	RXRRXRXRBR-XB	54
(RB) ₅ RXRBRX-B	RBRBRBRBRXRBRX-B	55
(RBRBRBRX) ₂ -X	RBRBRBRXRBRBRBRX-X	56
X-(RB) ₃ RX(RB) ₃ RX	XRBRBRBRXRBRBRBR-X	57
(RBRX) ₄ B	RBRXRBRXRBRXRBRX-B	58
(RB) ₄ (RX) ₄ B	RBRBRBRBRXRXRBRX-B	59
RX(RB) ₂ RX(RB) ₃ RX-X	RXRBRBRXRBRBRBRX	60
(rXr) ₄	rXrrXrrXrrXr-XB	61
(RAhxR) ₄ AhxB (P007)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	62
(RAhx) ₄ B	RAhxRAhxRAhxRAhxB	63
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	64

(continuación)

<u>Péptido</u>	<u>Secuencia (N terminal a C terminal)</u>	<u>SEQ ID</u>
(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	65
(RAhx) ₈ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	66
(RAhxR) ₃ 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
	<170> FastSEQ para Windows, Versión 4.0
	<210> 1
	<211> 3768
	<212> ADN
	<213> <i>Homo sapiens</i>
	<400> 1

ES 2 798 758 T3

atggagctgg	cggccttgtg	ccgctggggg	ctcctcctcg	ccctcttgcc	ccccggagcc	60
gcgagcacc	aagtgtgcac	cggcacagac	atgaagctgc	ggctccctgc	cagtcccag	120
accacactgg	acatgctccg	ccacctctac	cagggctgcc	aggtggtgca	gggaaacctg	180
gaactcacct	acctgccac	caatgccagc	ctgtccttcc	tgcaggatat	ccaggaggtg	240
cagggctacg	tgctcatcgc	tcacaaccaa	gtgaggcagg	tcccactgca	gaggctgcgg	300
attgtgcgag	gcacccagct	ctttgaggac	aactatgccc	tggccgtgct	agacaatgga	360
gacccgctga	acaataccac	ccctgtcaca	ggggcctccc	caggaggcct	gctgggagctg	420
cagcttcgaa	gcctcacaga	gatcttgaaa	ggaggggtct	tgatccagcg	gaacccccag	480
ctctgctacc	aggacacgat	tttgtggaag	gacatcttcc	acaagaacaa	ccagctggct	540
ctcacactga	tagacaccaa	ccgctctcgg	gcctgccacc	cctgttctcc	gatgtgtaag	600
ggctcccgtc	gctggggaga	gagttctgag	gattgtcaga	gcctgacgcg	cactgtctgt	660
gccggtggct	gtgcccgctg	caagggggcca	ctgcccactg	actgctgcc	tgagcagtg	720
gctgccggct	gcacggggccc	caagcactct	gactgcctgg	cctgcctcca	cttcaaccac	780
agtggcatct	gtgagctgca	ctgcccagcc	ctggtcacct	acaacacaga	cacgtttgag	840
tccatgcccc	atcccagagg	ccggtataca	ttcggcgcca	gctgtgtgac	tgctgtccc	900
tacaactacc	tttctacgga	cgtgggatcc	tgcacctcgt	tctgccccct	gcacaaccaa	960
gaggtgacag	cagaggatgg	aacacagcgg	tgtgagaagt	gcagcaagcc	ctgtgcccg	1020
gtgtgctatg	gtctgggcat	ggagcacttg	cgagaggtga	gggcagttac	cagtgccaat	1080
atccaggagt	ttgctggctg	caagaagatc	tttgggagcc	tggcatttct	gccggagagc	1140
tttgatgggg	accagcctc	caacactgcc	ccgctccagc	cagagcagct	ccaagtgttt	1200
gagactctgg	aagagatcac	aggttaccta	tacatctcag	catggccgga	cagcctgcct	1260
gacctcagcg	tcttccagaa	cctgcaagta	atccggggac	gaattctgca	caatggcgcc	1320
tactcgctga	ccctgcaagg	gctgggcate	agctggctgg	ggctgcgctc	actgagggaa	1380
ctgggcagtg	gactggccct	catccaccat	aacaccacc	tctgcttcgt	gcacacgggtg	1440
ccctgggacc	agctctttcg	gaaccgcac	caagctctgc	tccacactgc	caaccggcca	1500
gaggacgagt	gtgtgggcga	gggcctggcc	tgccaccagc	tgtgcgccc	agggcactgc	1560
tggggtccag	ggcccaccca	gtgtgtcaac	tgcagccagt	tccttcgggg	ccaggagtgc	1620

```

gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt 1680
ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740
gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggacctc ccttctgcgt ggcccgtgc 1800
cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgccatct ggaagtttcc agatgaggag 1860
ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc accactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920
ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc ggtggttggc 1980
attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag 2040
aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg 2100
acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg 2160
aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc 2220
cctgatgggg agaatgtgaa aattccagtg gccatcaaag tgttgaggga aaacacatcc 2280
cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggctggtgt gggctcccca 2340
tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt 2400
atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag 2460
gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg 2520
ctcgtaacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca agagtcccaa ccatgtcaaa 2580
attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat 2640
gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccg gcggttcacc 2700
caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc 2760
aaaccttacg atgggatccc agcccgggag atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg 2820
ctgccccagc ccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtcaa atgttggatg 2880
attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagtgtggtg ctgaattctc ccgcatggcc 2940
agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccgag cagtccttg 3000
gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct 3060
gaggagtatc tggtaaccca gcagggcttc ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg 3120
ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca 3180
ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccagggtct cactggcacc ctccgaaggg 3240
gctggctccg atgtatttga tggtagacct ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc 3300
ctccccacac atgaccccag ccctctacag cggtagctg aggacccac agtaccctg 3360
ccctctgaga ctgatggcta cgttgcccc ctagacctga gccccagcc tgaatatgtg 3420
aaccagccag atgttcggcc ccagccccct tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc 3480
cgacctgctg gtgccactct ggaaaggccc aagactctct ccccaggga gaatggggtc 3540
gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacacccag 3600
ggaggagctg cccctcagcc ccacctcct cctgccttca gccagcctt gcacaacctc 3660
tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaagggaca 3720
cctacggcag agaaccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtga 3768

```

<210> 2
 <211> 1255
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 2

```

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	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

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

ES 2 798 758 T3

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 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

<210> 3
 <211> 4029
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

atgagggcga	acgacgctct	gcaggtgctg	ggcttgcttt	tcagcctggc	ccggggctcc	60
gaggtgggca	actctcaggc	agtgtgtcct	gggactctga	atggcctgag	tgtgaccggc	120
gatgctgaga	accaatacca	gacactgtac	aagctctacg	agaggtgtga	ggtggtgatg	180
gggaaccttg	agatttgtgt	cacgggacac	aatgccgacc	tctccttcct	gcagtggatt	240
cgagaagtga	caggctatgt	cctcgtggcc	atgaatgaat	tctctactct	accattgccc	300
aacctccgcg	tgggtgcgagg	gacccaggct	tacgatggga	agtttgccat	cttcgtcatg	360
ttgaactata	acaccaactc	cagccacgct	ctgcgccagc	tccgcttgac	tcagctcacc	420
gagattctgt	caggggggtgt	ttatattgag	aagaacgata	agctttgtca	catggacaca	480
attgactgga	gggacatcgt	gagggaccga	gatgctgaga	tagtggtgaa	ggacaatggc	540
agaagctgtc	ccccctgtca	tgaggtttgc	aaggggcgat	gctgggggtcc	tggatcagaa	600
gactgccaga	cattgaccaa	gaccatctgt	gctcctcagt	gtaatggtca	ctgctttggg	660
cccaacccca	accagtgtgt	ccatgatgag	tgtgccgggg	gctgctcagg	ccctcaggac	720
acagactgct	ttgcctgccc	gcacttcaat	gacagtggag	cctgtgtacc	tcgctgtcca	780
cagcctcttg	tctacaacaa	gctaactttc	cagctggaac	ccaatcccca	caccaagtat	840
cagtatggag	gagtttgtgt	agccagctgt	ccccataact	ttgtggtgga	tcaaacatcc	900
tgtgtcaggg	cctgtcctcc	tgacaagatg	gaagtagata	aaaatgggct	caagatgtgt	960
gagccttggt	ggggactatg	tcccaaagcc	tgtgagggaa	caggctctgg	gagccgcttc	1020
cagactgtgg	actcgagcaa	cattgatgga	tttgtgaact	gcaccaagat	cctgggcaac	1080
ctggactttc	tgatcaccgg	cctcaatgga	gacccctggc	acaagatccc	tgccctggac	1140
ccagagaagc	tcaatgtctt	cgggacagta	cgggagatca	caggttacct	gaacatccag	1200
tcttgccgcg	cccacatgca	caacttcagt	gttttttcca	atttgacaac	cattggaggc	1260
agaagcctct	acaaccgggg	cttctcattg	ttgatcatga	agaacttgaa	tgtcacatct	1320
ctgggcttcc	gatccctgaa	ggaaattagt	gctgggcgta	tctatataag	tgccaatagg	1380
cagctctgct	accaccactc	tttgaactgg	accaaggtgc	ttcggggggc	tacggaagag	1440
cgactagaca	tcaagcataa	tcggccgccc	agagactgcg	tggcagaggg	caaagtgtgt	1500
gacccactgt	gctcctctgg	gggatgctgg	ggcccaggcc	ctgggtcagt	cttgtcctgt	1560
cgaaattata	gccgaggagg	tgtctgtgtg	acccactgca	actttctgaa	tggggagcct	1620
cgagaatttg	cccatgaggc	cgaatgcttc	tcttgccacc	cggaatgcca	acccatggag	1680
ggcactgccca	catgcaatgg	ctcgggctct	gatacttggt	ctcaatgtgc	ccattttcga	1740
gatgggcccc	actgtgtgag	cagctgcccc	catggagtcc	taggtgccaa	gggcccgaatc	1800
tacaagtacc	cagatgttca	gaatgaatgt	cggccctgcc	atgagaactg	cacccagggg	1860
tgtaaaggac	cagagcttca	agactgttta	ggacaaacac	tgggtgctgat	cggcaaaacc	1920
catctgacaa	tggctttgac	agtgatagca	ggattggtag	tgattttcat	gatgctgggc	1980
ggcacttttc	tctactggcg	tgggcgcggg	attcagaata	aaagggctat	gaggcgatac	2040
ttggaacggg	gtgagagcat	agagcctctg	gaccccagtg	agaaggctaa	caaagtcttg	2100
gccagaatct	tcaaagagac	agagctaagg	aagcttaaag	tgcttggtctc	gggtgtcttt	2160

```

ggaactgtgc acaaaggagt gtggatccct gaggggtgaat caatcaagat tccagtctgc 2220
attaaagtca ttgaggacaa gaggaggacgg cagagttttc aagctgtgac agatcatatg 2280
ctggccattg gcagcctgga ccatgcccac attgtaaggc tgctgggact atgcccaggg 2340
tcatctctgc agcttgtcac tcaatatttg cctctgggtt ctctgctgga tcatgtgaga 2400
caacaccggg gggcactggg gccacagctg ctgctcaact ggggagtaga aattgccaaag 2460
ggaatgtact accttgagga acatgggatg gtgcatagaa acctgggctgc ccgaaacgtg 2520
ctactcaagt caccagtcg ggttcagggt gcagattttg gtgtggctga cctgctgcct 2580
cctgatgata agcagctgct atacagttag gccaagactc caattaagtg gatggccctt 2640
gagagtatcc actttgggaa atacacacac cagagttagt tctggagcta tgggtgtgaca 2700
gtttgggagt tgatgacctt cggggcagag ccctatgcag ggctacgatt ggctgaagta 2760
ccagacctgc tagagaaggg ggagcgggtg gcacagcccc agatctgcac aattgatgtc 2820
tacatggtga tgggtcaagt ttggatgatt gatgagaaca ttcgcccac ctttaaagaa 2880
ctagccaatg agttcaccag gatggcccgga gaccaccac ggtatctggt cataaagaga 2940
gagagtgggc ctggaatagc ccctgggcca gagcccatg gtctgacaaa caagaagcta 3000
gaggaagtag agctggagcc agaactagac ctagacctag acttggagc agaggaggac 3060
aacctggcaa ccaccacact gggctccgcc ctcagcctac cagttggaac acttaatcgg 3120
ccacgtggga gccagagcct tttaagtcca tcatctggat acatgcccac gaaccagggt 3180
aatcttgggg agtcttgcca ggagtctgca gtttctggga gcagtgaacg gtgccccgt 3240
ccagtctctc tacaccaat gccacgggga tgcttggcat cagagtcac agaggggcat 3300
gtaacaggct ctgaggctga gctccaggag aaagtgtcaa tgtgtaggag cgggagcagg 3360
agccggagcc cacggccacg cggagatagc gcctaccatt cccagcgcca cagtctgctg 3420
actcctgtta cccactctc cccaccggg ttagaggaag aggatgtcaa cggttatgtc 3480
atgccagata cacacctcaa aggtactccc tcctcccggt aaggcaccct ttcttcagt 3540
ggtctcagtt ctgtcctggg tactgaagaa gaagtgaag atgaggagta tgaatacatg 3600
aaccggagga gaaggcacag tccacctcat cccctaggc caagttccct tgaggagctg 3660
ggttatgagt acatggatgt ggggtcagac ctcagtgcct ctctgggcag cacacagagt 3720
tgcccactcc accctgtacc catcatgccc actgcaggca caactccaga tgaagactat 3780
gaatatatga atcggaacg agatggaggt ggtcctgggg gtgattatgc agccatgggg 3840
gcctgcccag catctgagca agggatgaa gagatgagag cttttcaggg gcctggacat 3900
caggcccccc atgtccatta tgcccgccta aaaactctac gtagcttaga ggctacagac 3960
tctgcctttg ataaccctga ttactggcat agcaggcttt tccccaaggc taatgccag 4020
agaacgtaa 4029

```

<210> 4
 <211> 1342
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

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	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	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
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
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			

			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					720	
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					800	
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	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					880	
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					960	
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	Gly	Ile	Ala	Pro	Gly	Pro	Glu	Pro	
			980					985				990				
His	Gly	Leu	Thr	Asn	Lys	Lys	Leu	Glu	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										

ES 2 798 758 T3

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	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	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

ES 2 798 758 T3

atggagctgg	cggccttggtg	ccgctggggg	ctcctcctcg	ccctcttgcc	ccccggagcc	60
gcgagcacc	aagtgtgcac	cggcacagac	atgaagctgc	ggctccctgc	cagtcccag	120
accacactg	acatgctccg	ccacctctac	cagggtctgc	aggtggtgca	gggaaacctg	180
gaactcacct	acctgcccac	caatgccagc	ctgtccttcc	tgcaggatat	ccaggaggtg	240
cagggtctacg	tgctcatcgc	tcacaaccaa	gtgaggcagg	tcccactgca	gaggctgcgg	300
attgtgcgag	gcacccagct	ctttgaggac	aactatgccc	tggccgtgct	agacaatgga	360
gaccgcctga	acaataccac	ccctgtcaca	ggggcctccc	caggaggcct	gcgggagctg	420
cagcttcgaa	gcctcacaga	gatcttgaaa	ggaggggtct	tgatccagcg	gaacccccag	480
ctctgctacc	aggacacgat	tttgtggaag	gacatcttcc	acaagaacaa	ccagctggct	540
ctcacactga	tagacaccaa	ccgctctcgg	gcctgccacc	cctgttctcc	gatgtgtaag	600
ggctcccgt	gctggggaga	gagttctgag	gattgtcaga	gcctgacgcg	cactgtctgt	660
gccggtggct	gtgcccgtg	caaggggcca	ctgcccactg	actgctgcca	tgagcagtg	720
gctgccggct	gcacggggcc	caagcactct	gactgcctgg	cctgcctcca	cttcaaccac	780
agtggcatct	gtgagctgca	ctgcccagcc	ctggtcacct	acaacacaga	cacgtttgag	840
tccatgcccc	atcccagagg	ccggtataca	tccggcgcca	gctgtgtgac	tgctgtctcc	900
tacaactacc	tttctacgga	cgtgggatcc	tgcaccctcg	tctgccccct	gcacaaccaa	960
gagggtgacag	cagaggatgg	aacacagcgg	tgtgagaagt	gcagcaagcc	ctgtgcccga	1020
gtgtgctatg	gtctgggcat	ggagcacttg	cgagaggtga	gggcagttac	cagtgccaat	1080
atccaggagt	ttgctggctg	caagaagatc	tttgggagcc	tggcatttct	gccggagagc	1140
tttgatgggg	accagcctc	caacactgcc	ccgctccagc	cagagcagct	ccaagtgttt	1200
gagactctgg	aagagatcac	aggttaccta	tacatctcag	catggccgga	cagcctgcct	1260
gacctcagcg	tcttccagaa	cctgcaagta	atccggggac	gaattctgca	caatggcgcc	1320
tactcgctga	ccctgcaagg	gctgggcatc	agctggctgg	ggctgcgctc	actgagggaa	1380
ctgggcagtg	gactggccct	catccaccat	aacacccacc	tctgcttcgt	gcacacggtg	1440
ccctgggacc	agctctttcg	gaacccgcac	caagctctgc	tccacactgc	caaccggcca	1500
gaggacgagt	gtgtgggcca	gggcctggcc	tgccaccagc	tgtgcgccc	agggcactgc	1560
tggggctccag	ggcccaccca	gtgtgtcaac	tgacgccagt	tccttcgggg	ccaggagtgc	1620
gtggaggaat	gccgagtact	gcaggggctc	cccaggaggt	atgtgaatgc	caggcactgt	1680
ttgccgtgcc	accctgagtg	tcagccccag	aatggctcag	tgacctgttt	tggaccgctg	1740
tgtggacctg	gatga					1755

<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

<210> 7
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

atgagggcgca	acgacgctct	gcaggtgctg	ggcttgcttt	tcagcctggc	ccggggctcc	60
gaggtgggca	actctcaggc	agtgtgtcct	gggactctga	atggcctgag	tgtgaccggc	120
gatgctgaga	accaatacca	gacactgtac	aagctctacg	agaggtgtga	ggtggtgatg	180
gggaaccttg	agatttgtct	cacgggacac	aatgccgacc	tctccttctt	gcagtggatt	240
cgagaagtga	caggctatgt	cctcgtggcc	atgaatgaat	tctctactct	accattgccc	300
aacctccgcg	tggtgcgagg	gacccaggct	tacgatggga	agtttgccat	cttcgtcatg	360
ttgaactata	acaccaactc	cagccacgct	ctgcgccagc	tccgcttgac	tcagctcacc	420
gagattctgt	caggggggtgt	ttatattgag	aagaacgata	agctttgtca	catggacaca	480
attgactgga	gggacatcgt	gagggaccga	gatgctgaga	tagtggtgaa	ggacaatggc	540
agaagctgtc	ccccctgtca	tgaggtttgc	aaggggcgat	gctgggggtcc	tggatcagaa	600
gactgccaga	cattgaccaa	gaccatctgt	gctcctcagt	gtaatggtca	ctgctttggg	660
cccaacccca	accagtgtct	ccatgatgag	tgtgccgggg	gctgctcagg	ccctcaggac	720
acagactgct	ttgctgtccg	gcacttcaat	gacagtggag	cctgtgtacc	tcgtgtcca	780
cagcctcttg	tctacaacaa	gctaactttc	cagctggaac	ccaatcccca	caccaagtat	840
cagtatggag	gagtttgtgt	agccagctgt	cccataact	ttgtggtgga	tcaaacatcc	900
tgtgtcaggg	cctgtcctcc	tgacaagatg	gaagtagata	aaaatgggct	caagatgtgt	960
gagccttgtg	ggggactatg	tcccaaagcc	tgtgagggaa	caggctctgg	gagccgcttc	1020
cagactgtgg	actcgagcaa	cattgatgga	tttgtgaact	gcaccaagat	cctgggcaac	1080
ctggactttc	tgatcaccgg	cctcaatgga	gaccctggc	acaagatccc	tgccctggac	1140
ccagagaagc	tcaatgtctt	ccggacagta	cgggagatca	caggttacct	gaacatccag	1200
tcctggccgc	cccacatgca	caacttcagt	gttttttcca	atttgacaac	cattggaggc	1260
agaagcctct	acaaccgggg	cttctcattg	ttgatcatga	agaacttgaa	tgtcacatct	1320
ctgggcttcc	gateccctgaa	ggaaattagt	gctgggctga	tctatataag	tgccaatagg	1380
cagctctgct	accaccactc	tttgaactgg	accaaggtgc	ttcggggggc	tacggaagag	1440
cgactagaca	tcaagcataa	tcggccgcgc	agagactgcg	ggagcctcga	gaatttgccc	1500
atgaggccga	atgcttctcc	tgccaccgcg	aatgcccaacc	catggagggc	actgccacat	1560
gcaatggctc	gggctctgat	acttgtgtct	aatgtgccca	tttctgagat	gggccccact	1620
gtgtga						1626

<210> 8
<211> 541
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 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      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 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

```

ES 2 798 758 T3

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				

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

<400> 9

atgagggcga	acgacgctct	gcaggtgctg	ggcttgcttt	tcagcctggc	ccggggctcc	60
gaggtgggca	actctcaggc	agtgtgtcct	gggactctga	atggcctgag	tgtgaccggc	120
gatgctgaga	accaatacca	gacactgtac	aagctctacg	agaggtgtga	ggtgggtgatg	180
gggaaccttg	agatttgtgt	cacgggacac	aatgccgacc	tctccttcct	gcagtggatt	240
cgagaagtga	caggctatgt	cctcgtggcc	atgaatgaat	tctctactct	accattgccc	300
aacctccgcg	tgggtgcgag	gacccagggtc	tacgatggga	agtttgccat	cttcgtcatg	360
ttgaactata	acaccaactc	cagccacgct	ctgcgccagc	tccgcttgac	tcagctcacc	420
gagattctgt	caggggggtgt	ttatatattgag	aagaacgata	agctttgtca	catggacaca	480
attgactgga	gggacatcgt	gagggaccga	gatgctgaga	tagtgggtgaa	ggacaatggc	540
agaagctgtc	ccccctgtca	tgagggtttgc	aaggggcgat	gctgggggtcc	tggatcagaa	600
gactgccaga	cattgaccaa	gaccatctgt	gctcctcagt	gtaatgggtca	ctgctttggg	660
cccaacccca	accagtgtctg	ccatgatgag	tgtgccgggg	gctgctcagg	ccctcaggac	720
acagactgct	ttgcctgccg	gcacttcaat	gacagtggag	cctgtgtacc	tcgctgtcca	780
cagcctcttg	tctacaacaa	gctaactttc	cagctggaac	ccaatcccca	caccaagtat	840
cagtatggag	gagtttgtgt	agccagctgt	ccccataact	ttgtgggtgga	tcaaacatcc	900
tgtgtcaggg	cctgtcctcc	tgacaagatg	gaagtagata	aaaatgggct	caagatgtgt	960
gagccttgtg	ggggactatg	tcccaaagcc	tgtgagggaa	caggctctgg	gagccgcttc	1020
cagactgtgg	actcgagcaa	cattgatgga	tttgtgaact	gcaccaagat	cctgggcaac	1080
ctggactttc	tgatcaccgg	cctcaatgga	gacccctggc	acaagatccc	tgccctggac	1140
ccagagaagc	tcaatgtctt	ccggacagta	cgggagatca	caggttacct	gaacatccag	1200
tcttgccgcg	cccacatgca	caacttcagt	gttttttcca	atttgacaac	cattggaggc	1260
agaagcctct	acaaccgggg	cttctcattg	ttgatcatga	agaacttgaa	tgtcacatct	1320
ctgggcttcc	gatccctgaa	ggaaattagt	gctgggcgta	tctatataag	tgccaatagg	1380
cagctctgct	accaccactc	tttgaactgg	accaagggtgc	ttcggggggcc	tacggaagag	1440
cgactagaca	tcaagcataa	tcggccgcgc	agagactgcg	tggcagaggg	caaagtgtgt	1500
gacccactgt	gctcctctgg	gggatgctgg	ggcccaggcc	ctggtcagtg	cttgtcctgt	1560
cgaaattata	gccgaggagg	tgtctgtgtg	acccactgca	actttctgaa	tggggctctg	1620
atacttgtgc	tcaatgtgcc	catttttcgag	atgggcccga	ctgtgtga		1668

<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					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	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 <400> 11

```

atgagggcga acgacgctct gcaggtgctg ggcttgcttt tcagcctggc cgggggctcc      60
gaggtgggca actctcaggc agtgtgtcct gggactctga atggcctgag tgtgaccggc      120
gatgctgaga accaatacca gacactgtac aagctctacg agaggtgtga ggtggtgatg      180
gggaaccttg agattgtgct cacgggacac aatgccgacc tctccttcct gcagtggatt      240
cgagaagtga caggctatgt cctcgtggcc atgaatgaat tctctactct accattgccc      300
aacctccgcg tgggtgcgagg gacccaggtc tacgatggga agtttgccat cttcgtcatg      360
ttgaactata acaccaactc cagccacgct ctgcgccagc tccgcttgac tcagctcacc      420
gagattctgt caggggggtgt ttatattgag aagaacgata agctttgtca catggacaca      480
attgactgga gggacatcgt gagggaccga gatgctgaga tagtggtgaa ggacaatggc      540
agaagctgtc cccctgtgca tgaggtttgc aaggggcgat gctgggggtcc tggatcagaa      600
gactgccaga cattgaccaa gaccatctgt gctcctcagt gtaatgggtca ctgctttggg      660
cccaacccca accagtgtct ccatgatgag tgtgccgggg gctgctcagg ccctcaggac      720
acagactgct ttgcctgccg gcacttcaat gacagtggag cctgtgtacc tcgctgtcca      780
cagcctcttg tctacaacaa gctaactttc cagctggaac ccaatcccca caccaagtat      840
cagtatggag gagtttgtgt agccagctgt ccccataact ttgtgggtgga tcaaacatcc      900
tgtgtcaggg cctgtcctcc tgacaagatg gaagtagata aaaatgggct caagatgtgt      960
gagccttgtg ggggactatg tcccaaagcc tgtgagggaa caggctcttg gagccgcttc     1020
cagactgtgg actcgagcaa cattgatgga tttgtgaact gcaccaagat cctggggcaac     1080
ctggactttc tgatcaccgg cctcaatgga gaccctggc acaagatccc tgccctggac     1140
ccagagaatg tcaatgtctt ccggacagta cgggagatca caggttacct gaacatccag     1200
tcctggccgc cccacatgca caacttcagt gttttttcca atttgacaac cattggaggc     1260
agaagcctct acaaccgggg cttctcattg ttgatcatga agaacttgaa tgtcacatct     1320
ctgggcttcc gatccctgaa ggaaattagt gctgggcgta tctatataag tgccaatagg     1380
cagctctgct accaccactc tttgaactgg accaaggtgc ttcggggggcc tacggaagag     1440
cgactagaca tcaagcataa tcggccgcgc agagactgcg tggcagaggg caaagtgtgt     1500
gacccactgt gtcctctctg gggatgctgg ggcccaggcc ctggctcagt cttgtcctgt     1560
cgaaattata gccgaggagg tgtctgtgtg acccactgca actttctgaa tggggagcct     1620
cgagaatttg cccatgaggc cgaatgcttc tcctgccacc cggaatgcca acccatggag     1680
ggcactgcca catgcaatgg ctcggtgtaa

```

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

10

<400> 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             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 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

ES 2 798 758 T3

atgagggcga	acgacgctct	gcaggtgctg	ggcttgcttt	tcagcctggc	ccggggctcc	60
gaggtgggca	actctcaggc	agtgtgtcct	gggactctga	atggcctgag	tgtgaccggc	120

gatgctgaga	accaatacca	gacactgtac	aagctctacg	agaggtgtga	ggtgggtgatg	180
gggaaccttg	agatttgtgt	cacgggacac	aatgccgacc	tctccttcct	gcagtggatt	240
cgagaagtga	caggctatgt	cctcgtggcc	atgaatgaat	tctctactct	accattgccc	300
aacctccgcg	tgggtgcgagg	gacccaggtc	tacgatggga	agtttgccat	cttcgtcatg	360
ttgaactata	acaccaactc	cagccacgct	ctgcgccagc	tccgcttgac	tcagctcacc	420
gagattctgt	caggggggtgt	ttatattgag	aagaacgata	agctttgtca	catggacaca	480
attgactgga	gggacatcgt	gagggaccga	gatgctgaga	tagtggtgaa	ggacaatggc	540
agaagctgtc	ccccctgtca	tgaggtttgc	aaggggcgat	gctgggggtcc	tggatcagaa	600
gactgccaga	cattgaccaa	gaccatctgt	gctcctcagt	gtaatgggtca	ctgctttggg	660
cccaacccca	accagtgtgt	ccatgatgag	tgtgccgggg	gctgctcagg	ccctcaggac	720
acagactgct	ttgcctgccg	gcacttcaat	gacagtggag	cctgtgtacc	tcgctgtcca	780
cagcctcttg	tctacaacaa	gctaactttc	cagctggaac	ccaatcccca	caccaagtat	840
cagtatggag	gagtttgtgt	agccagctgt	ccccataact	ttgtggtgga	tcaaacatcc	900
tgtgtcaggg	cctgtcctcc	tgacaagatg	gaagtagata	aaaatgggct	caagatgtgt	960
gagccttgtg	ggggactatg	tcccaaagcc	tgtgagggaa	caggctctgg	gagccgcttc	1020
cagactgtgg	actcgagcaa	cattgatgga	tttgtgaact	gcaccaagat	cctgggcaac	1080
ctggactttc	tgatcacccg	cctcaatgga	gaccctggc	acaagatccc	tgccctggac	1140
ccagagaagc	tcaatgtctt	ccggacagta	cgggagatca	caggttacct	gaacatccag	1200
tcctggccgc	cccacatgca	caacttcagt	gttttttcca	atttgacaac	cattggaggc	1260
agaagcctct	acaaccgggg	cttctcattg	ttgatcatga	agaacttgaa	tgtcacatct	1320
ctgggcttcc	gatecctgaa	ggaaattagt	gctgggcgta	tctatataag	tgccaatagg	1380
cagctctgct	accaccactc	tttgaactgg	accaagggtgc	ttcggggggcc	tacggaagag	1440
cgactagaca	tcaagcataa	tcggccgcgc	agagactgcg	tggcagaggg	caaagtgtgt	1500
gacccactgt	gctcctctgg	gggatgctgg	ggcccaggcc	ctggtcagtg	cttgtcctgt	1560
cgaaattata	gccgaggagg	tgtctgtgtg	acccactgca	actttctgaa	tgggtacagt	1620
aaggggagcc	agtcaaggat	gggtgggggt	ggggccctgc	aatggaactg	ttcaggtggc	1680
atacaataa						1689

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

<400> 14

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					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 Tyr Ser Lys Gly Ser Gln				
	530	535	540	
Ser Arg Met Gly 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	atctttttctg	cccccccag	gaggctgacc	60
agtgtgtggc	ctgtgcccac	tataaggacc	ctcccttctg	cgtggccgc	tgcccagcg	120
gtgtgaaacc	tgacctctcc	tacatgccca	tctggaagtt	tccagatgag	gagggcgcat	180
gccagccttg	ccccatcaac	tgcacccact	cgtagtcca	acggtctttt	ctgcagaaag	240
gaggactttc	ctttcagggg	t				261

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

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

```

cttgcctggga gtcctcagac tctctctcta acccaccctt tcctttccag tggcagaggg 60
caaagtgtgt gacccactgt gctcctctgg gggatgctgg ggcccaggcc ctggtcagtg 120
cttgtcctgt cgaaattata gccgaggagg tgtctgtgtg acccactgca actttctgaa 180
tggtgtacagt aaggggagcc agtcaaggat ggggtggggg ggggccctgc aatggaactg 240
ttcaggtggc atacaataaa agtctttaga cagctttctg catgtgcctt ggtgggattg 300
aggtaggaga cctgtggttg tgagatcgga gcatgaaggt caggacttgg aagtgacccc 360
ccccccctt tattccccac tacagggagc ctcgagaatt tgcccatgag gccgaatgct 420
tctcctgcca cccggaatgc caacccatgg agggcactgc cacatgcaat ggctcgggat 480
actagtagca ccaggatctc caaggagagc agagaagggg caatacttgg agcatctggg 540
gaatgatatg gctaaggata gcacagagag gccagataat gctagggcct gcagatagaa 600
gacatcgaat gtctgggttg gtctttgctg ggaggtatgg aattgacctt gggatctgat 660
tcttctgac cttctctctt ccactcaggg ctctgatact tgtgctcaat gtgcccattt 720
tcgagatggg cccactgtg tgagcagctg ccccatgga gtcttaggtg ccaaggggccc 780
aatctacaag taccagatg ttcagaatga atgtcggccc tgccatgaga actgcaccca 840
ggggtcagtg atgggataat aaggagaggg ggtcaggtgg aagggtagga gca 893

```

5

<210> 17

<211> 180

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

```

gccagcactt tgggaggctg agatgggaag atcacttgag cccagaatta gagataagcc 60
tatggaaaca tagcaagaca ctgtctctac aggggaaaaa 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

<400> 18

gggcagaaaa gattgtggg

20

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Oligonucleótidos sintéticos

<400> 19

cacactgggc agcctcctgg 20

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Oligonucleótidos sintéticos

45

<400> 20

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

	gggtcacttc caagtcctga	20
5	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 27 gtcacttcca agtcctgacc	20
15	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 28 cacttccaag tctcgacct	20
25	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 29 cttccaagtc ctgacctca	20
35	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 30 cccttactgt acccattcag	20
45	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 31 ctccccttac tgtaccatt	20
55	<210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
65	<400> 32	

	tggtcccct tactgtacc	20
5	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 33 ctcgaggctc cctgtagtgg	20
15	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
25	<400> 34 attctcgagg ctccctgtag	20
30	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
35	<400> 35 caaattctcg aggctccctg	20
40	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
45	<400> 36 ctagtatacc gagccattgc	20
50	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
55	<400> 37 gtgctactag tataccgagc	20
60	<210> 38 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Oligonucleótidos sintéticos	
	<400> 38	

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

ES 2 798 758 T3

	cctgggggtg tcagtgccag cccccacaa atcttttctg cccccccag gaggtgacc agtgtgtggc ctgtgccac tataaggacc ctcccttctg	60 100
5	<210> 45 <211> 100 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 45	
10	ccagatgagg agggcgcatg ccagccttgc cccatcaact gcaccactc gtgagtccaa cggctcttttc tgcagaaagg aggactttcc tttcaggggt	60 100
15	<210> 46 <211> 100 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 46	
20	cttgctggga gtcctcagac tcctctccta acccaccct tcctttccag tggcagaggg caaagtgtgt gaccactgt gtcctcttgg gggatgtgtg	60 100
25	<210> 47 <211> 100 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 47	
30	aattatagcc gaggaggtgt ctgtgtgacc cactgcaact ttctgaatgg gtacagtaag gggagccagt caaggatggg tgggggtggg gccctgcaat	60 100
35	<210> 48 <211> 100 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 48	
40	aaggtcagga cttggaagtg accccccct cctttattc ccactacag ggagcctcga gaatttgccc atgaggccga atgcttctcc tgccaccgg	60 100
45	<210> 49 <211> 100 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 49	
50	gccaccgga atgccaacce atggagggca ctgccacatg caatggctcg gtatactagt agcaccagga tctccaaggg agacagagaa ggggcaatac	60 100
	<210> 50 <211> 100 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 798 758 T3

<400> 50

```
ggaattgacc ttgggatctg attcttctctg accttctctc ttccactcag ggctctgata    60
cttgtgctca atgtgcccac ttctgagatg ggccccactg    100
```

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

10 <400> 51

```
ccagatgttc agaatgaatg tcggccctgc catgagaact gcacccaggg gtcagtgatg    60
ggataataag gagagggggg caggtggaag ggtaggagca    100
```

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

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

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

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

<400> 52

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

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

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

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

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

<400> 53

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

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

 <220>
 <223> Péptido sintético rico en arginina

 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

 <400> 55

 Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa
 1 5 10 15

 45 <210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Péptido sintético rico en arginina

 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

<400> 56

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético rico en arginina

<220>

<221> MOD_RES

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

<223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

<220>

<221> MOD_RES

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

<223> Xaa es beta-alanina

<400> 57

Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético rico en arginina

<220>

<221> MOD_RES

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

<223> Xaa es beta-alanina

<220>

<221> MOD_RES

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

<223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

<400> 58

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético rico en arginina

<220>

<221> MOD_RES

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

<223> Xaa es beta-alanina

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10), (12), (14), (16)
 5 <223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico

 <400> 59

 Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa 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

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

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

 <400> 60
 30
 Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 35
 <210> 61
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)... (13)
 <223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)... (14)
 <223> Xaa es beta-alanina
 50
 <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

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético rico en arginina
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)...(13)
 <223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa es beta-alanina
 15
 <400> 62

 Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
 1 5 10
 20
 <210> 63
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido sintético rico en arginina
 <220>
 <221> MOD_RES
 30
 <222> (3)...(12)
 <223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico
 <220>
 <221> MOD_RES
 35
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa es beta-alanina
 <400> 63

 Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
 1 5 10
 40
 <210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 45
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético rico en arginina
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)...(13)
 <223> Xaa es ácido 6-aminohexanoico
 55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa es beta-alanina
 60
 <400> 64

ES 2 798 758 T3

Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg 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

<400> 65

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

25	<210> 66 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Péptido sintético rico en arginina
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
	<400> 66

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10 15

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

 <220>
 <223> Péptido sintético rico en arginina

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

ES 2 798 758 T3

<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

 <400> 68
 caccatggag ctggcggcct 20
 20
 <210> 69
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 69
 tccaggtcca cacagcggtc c 21
 30

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

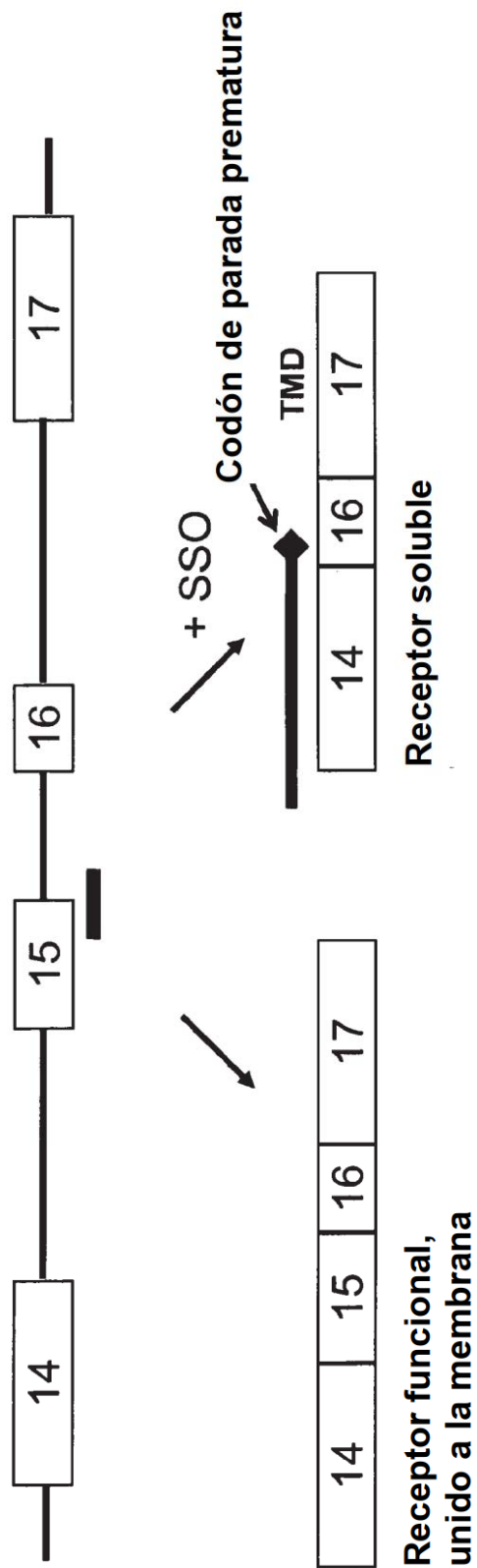


Fig. 1

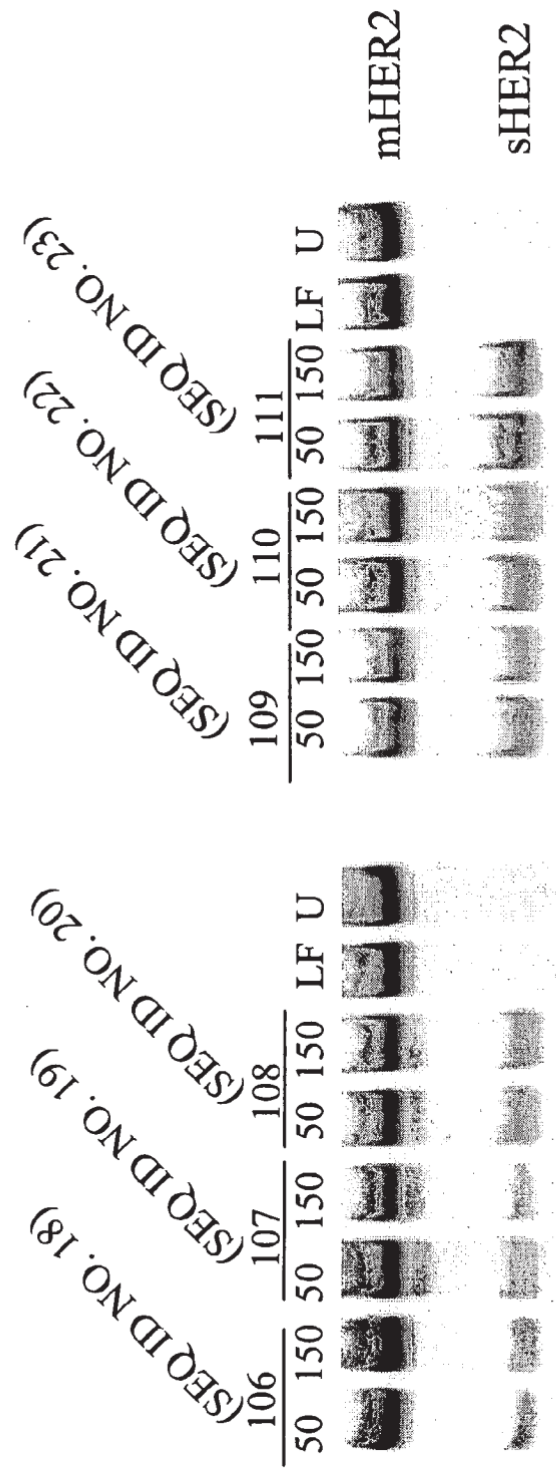


Fig. 2

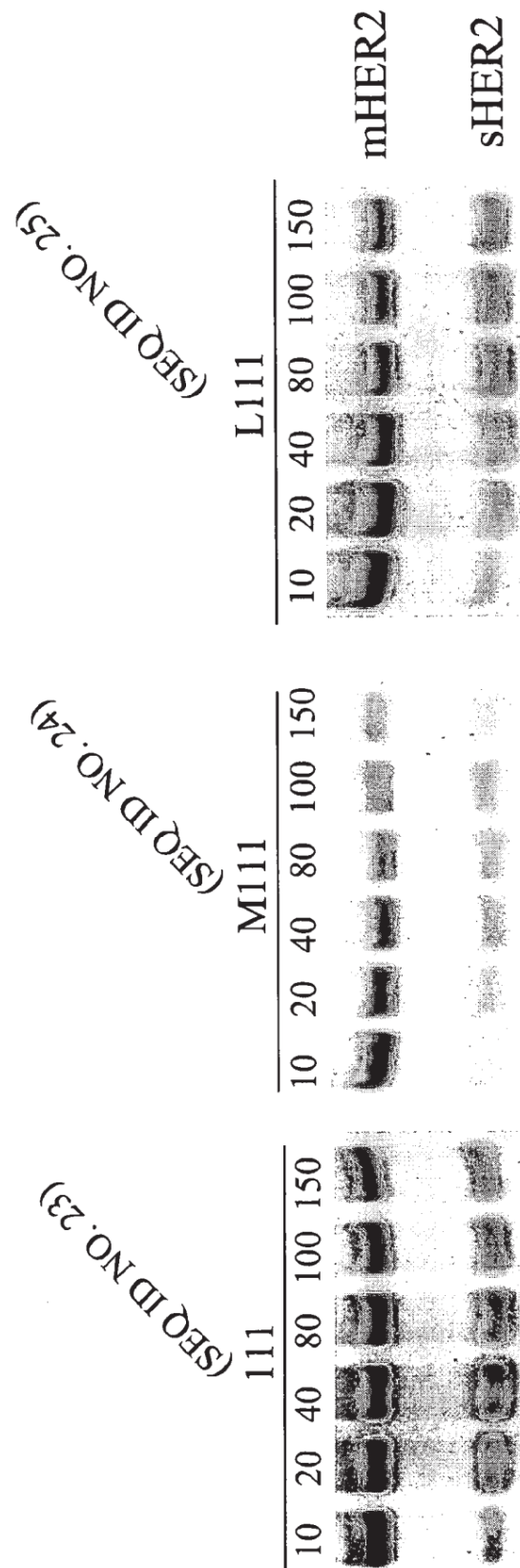


Fig. 3

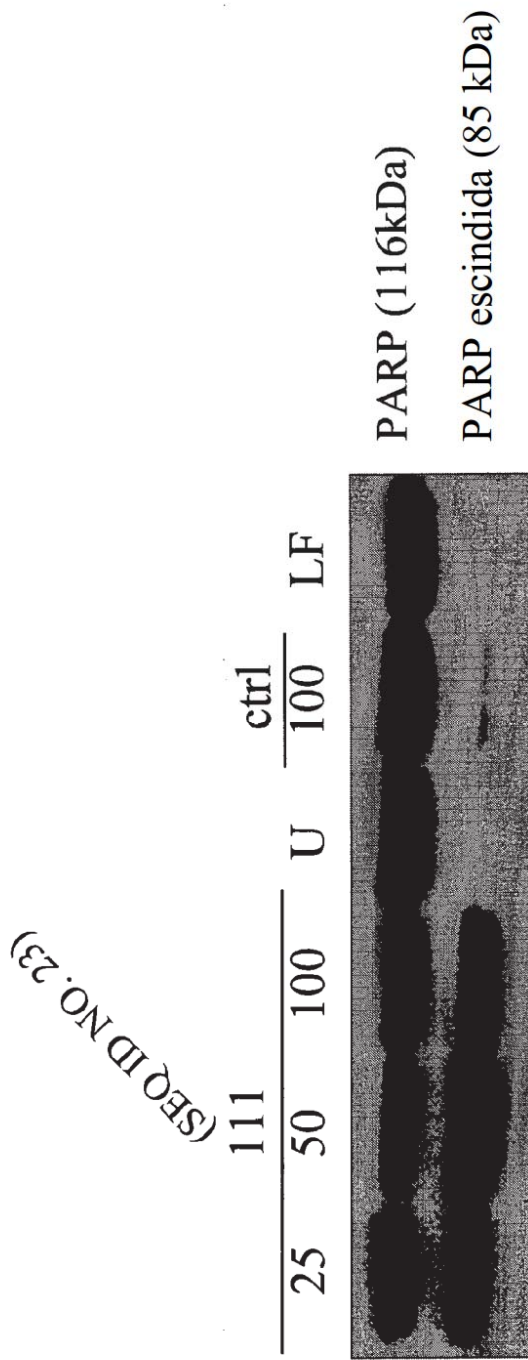


Fig. 4A

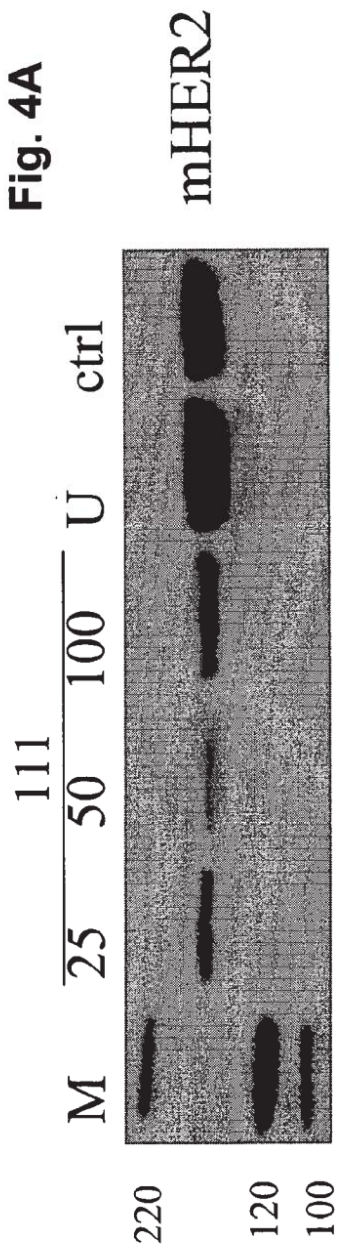


Fig. 4B

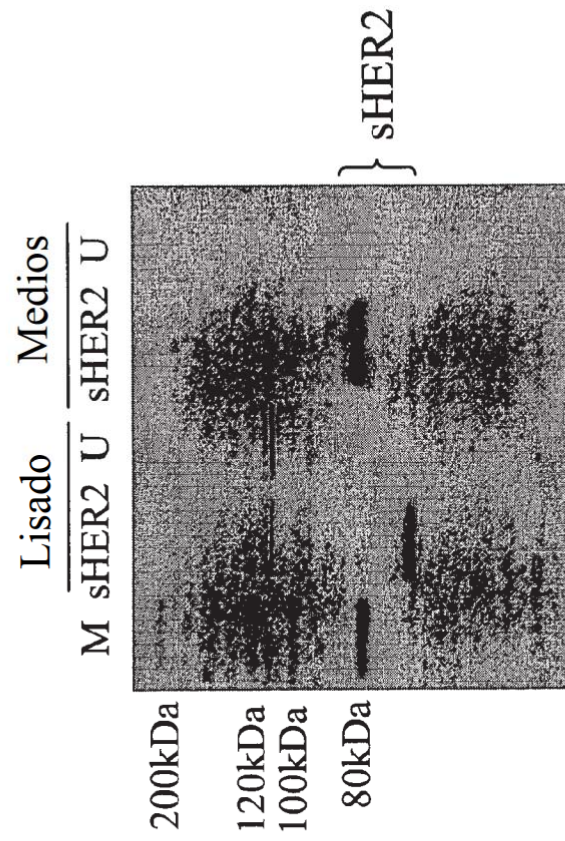


Fig. 5

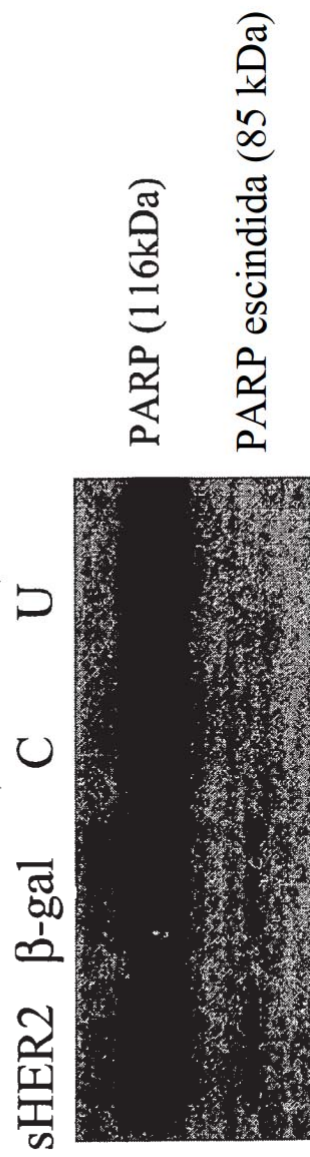


Fig. 6A



Fig. 6B

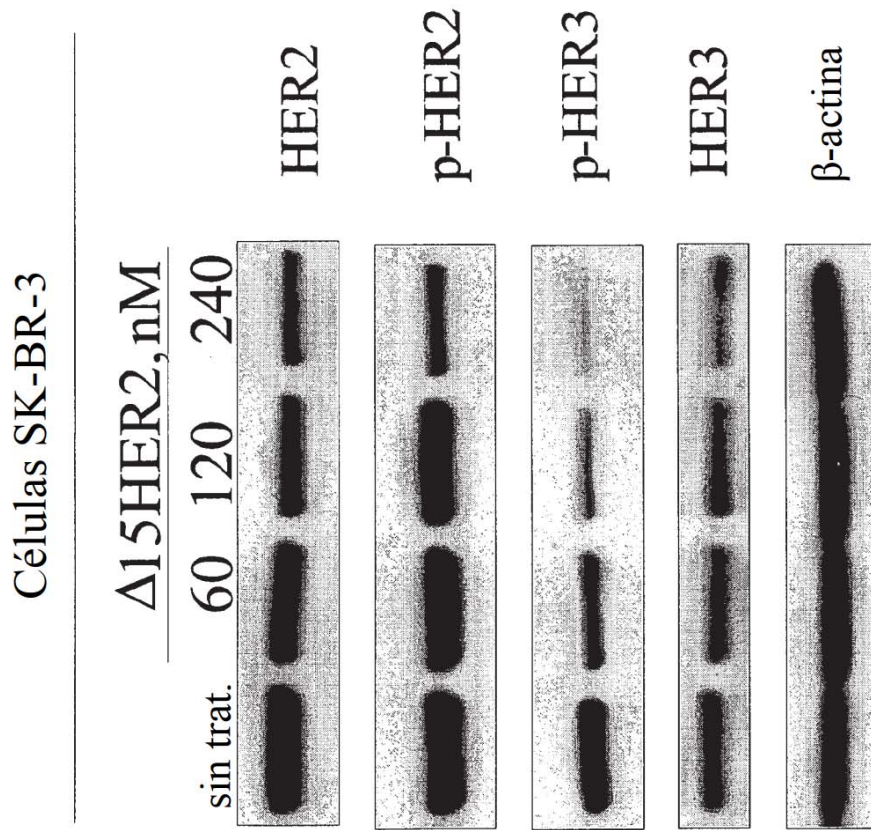


Fig. 6C

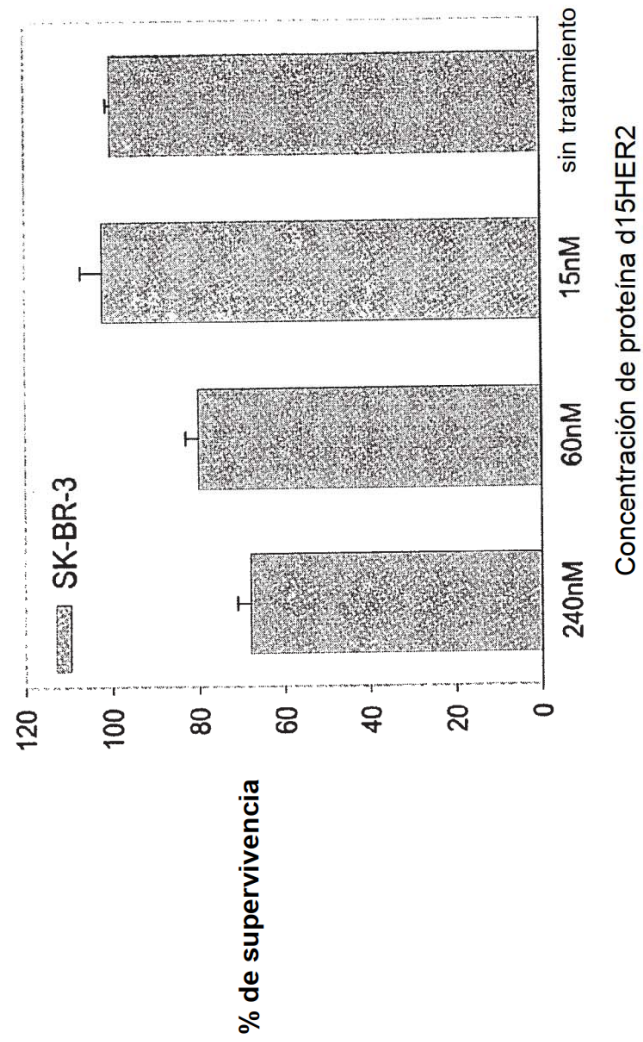


Fig. 6D

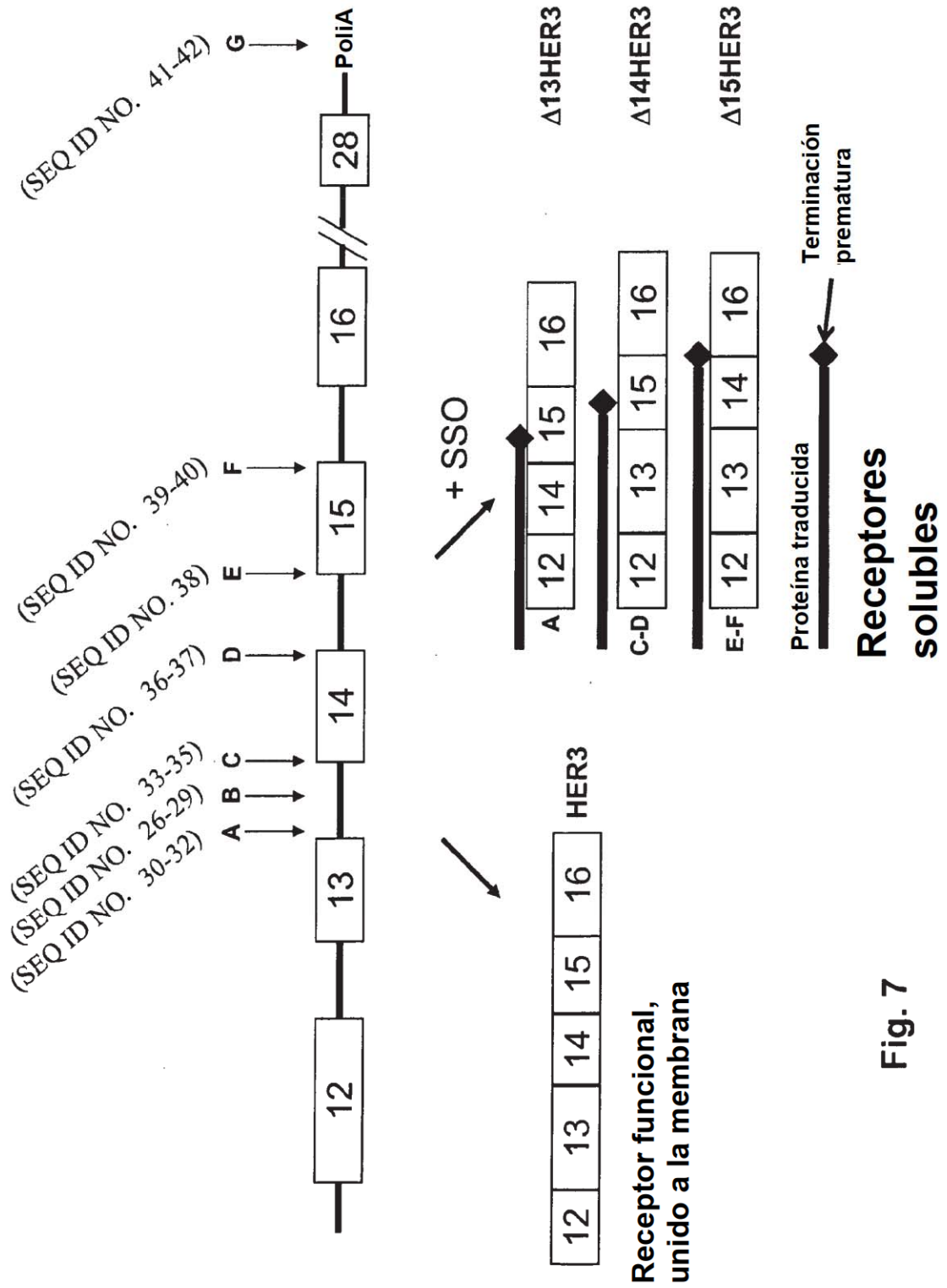


Fig. 7

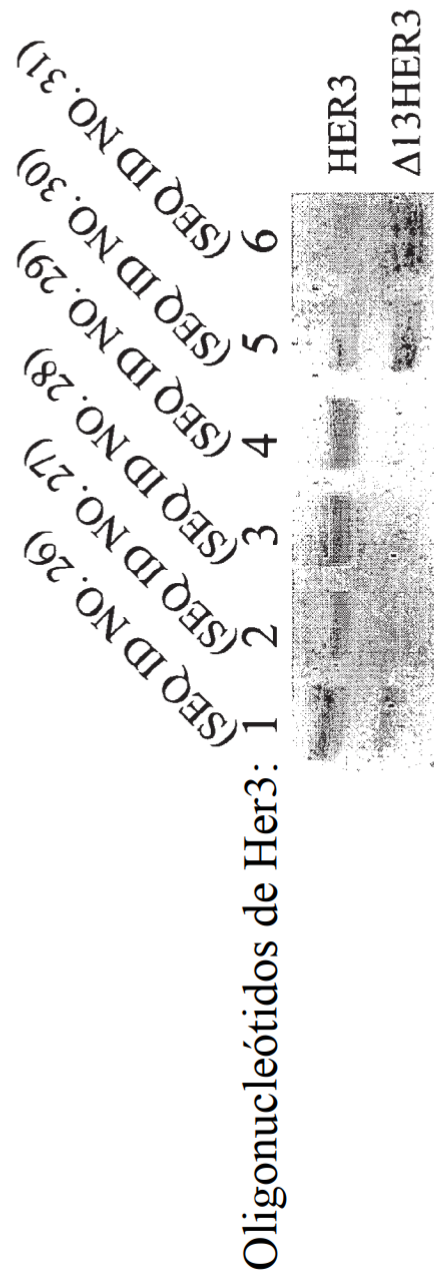


Fig. 8

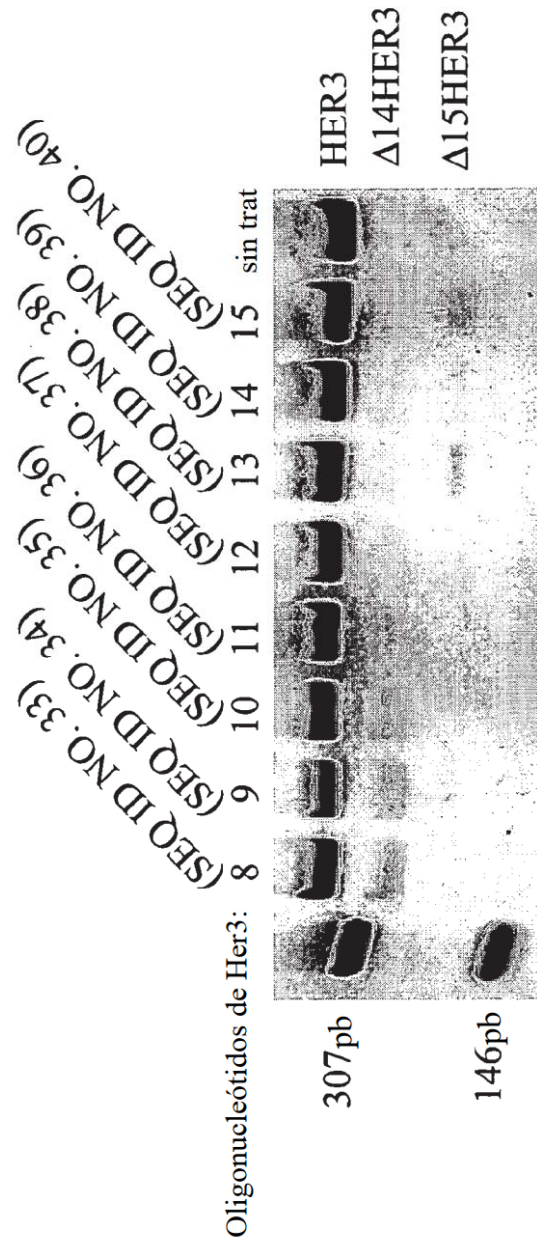


Fig. 9

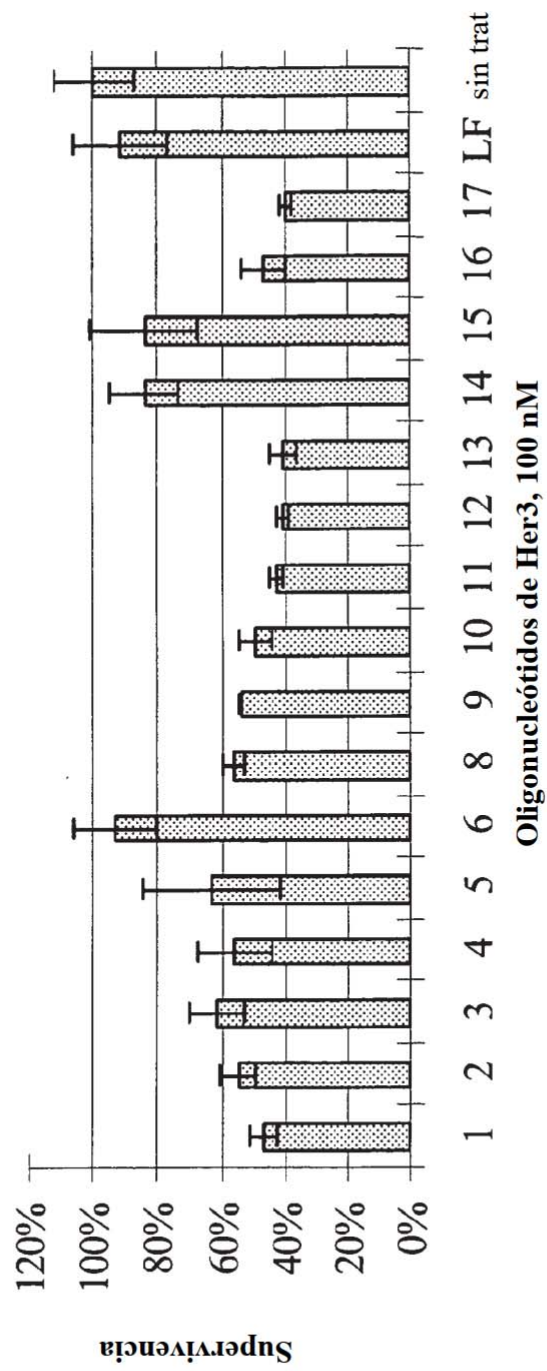


Fig. 10

cctgggggtgtcagtgccagccccccacaaatctttctgccccccccccaggagggctgaccagtggtgt

ggcctgtgccactataaggaccctcccttctgcgtagggccgctgccccagcgggtgtgaaacctgac

EXÓN 15

ctctcctacatgcccatctggaagttccagatgaggaggcgcatgccagccttgccccatcaact

gcaccactcgtgagtccaaagggtctttctgcagaaaggaggactttcctttcaggggt ...

INTRÓN 15 ... tcccaagagggtgttcccagaattgttgatgagactgtttctcctgcag

ctgtgtggacctgga[**tg**]caagggtgccccgcgagcagagagccag
Δ15

EXÓN 16

Fig. 11

cttgctgggagtcctcagactcctctcctaaacccccccttcttccagtggcagagggcacaagtgtgt
gacccactgtgctcctctgggggatgctggggcccccagggcctgggtcagtgctgtcctgtcgaaattata
gccgaggagggtgtctgtgacccactgcaactttctgaatgggtacagtaaggggagccagtcgaaggat
 gggtaggggtggggccctgcaatggaaactgttcaggtggcatacaaataa_{p85}aagtccttagacagcctttctg
 catgtgccttggtagggatgtgagtaggagacctgtgggtgtgtgagatcggagcatgaaggtcaggacttga
 agtgacccccctcctttatttccccactacagggagcctcgagaatttggcccatgagggccgaatgctt
ctcctgccacccgggaatgccaaaccccatggagggcactggcacatgcaatggctcgggtatatactagtagcac
 caggatctccaagggagacagagaaggggcaatacttggagcatctggggaaatgatatatggctaaggatag
 cacagagagggcagataaatgctagggcctggcagatagaagatccttgaaatgtctgggttggctcttgcctgg
 gaggatggaaattgaccttgggatctgtgattcttccctgaccttcttcttccactcaggggctctgatactt
gtgctcaatgtgcccattttcgagatggggcccccactgtgtga_{Δ13, Δ14}gcagctgcccccatggagtcctaggtgc
caaggcccaatctacaagtaccagatgttcagaatgaatgtcggccctgccatgagaactgcacccag
gggtcagtgatgggataataaggagaggggtcaggtggaagggtaggagca ... INTRÓN 15
 ... gagcctctgctgtccaagctctctcatbtaaggtggtgactttcttccctaggtgttaa_{Δ15}aggaccagag
cttcaagactgttttaggacaaaacactgggtgctgatcgg
 EXÓN 16

Fig. 12

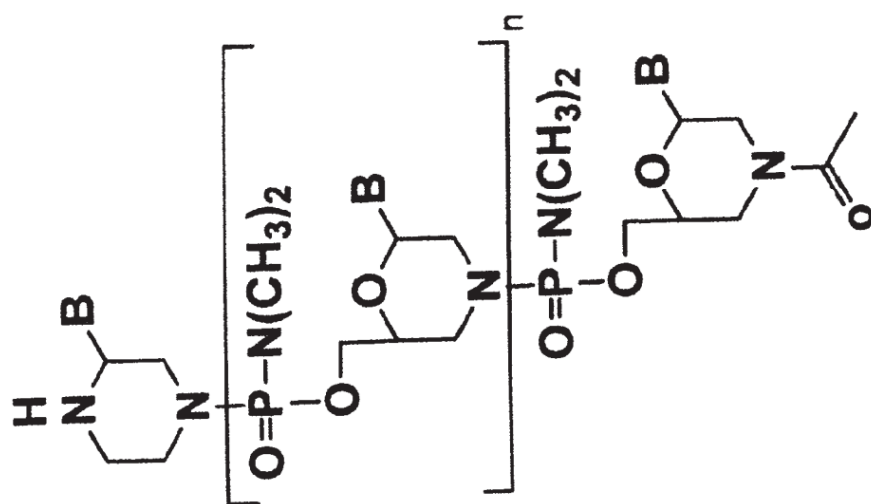
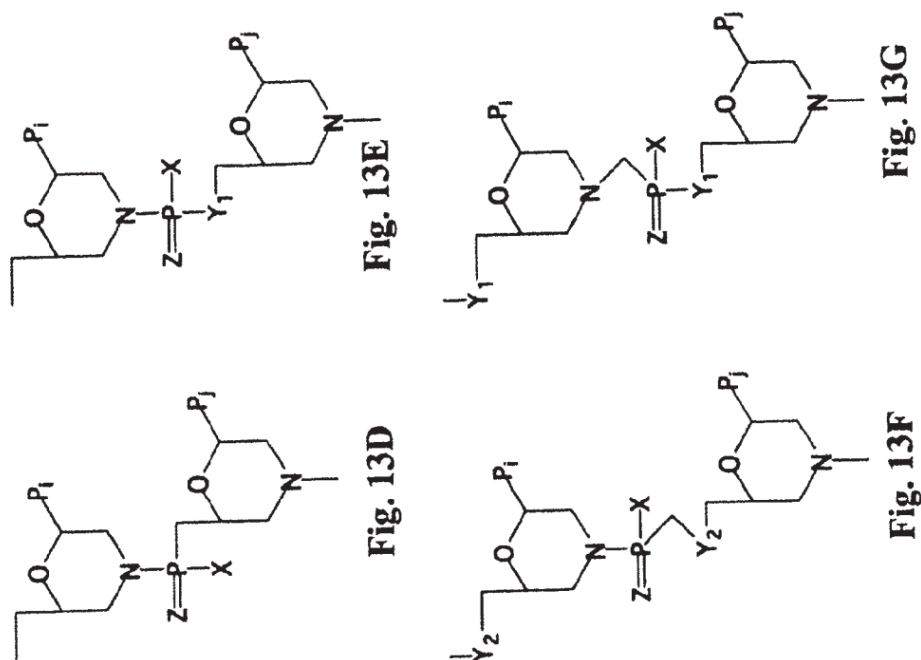


Fig. 13A

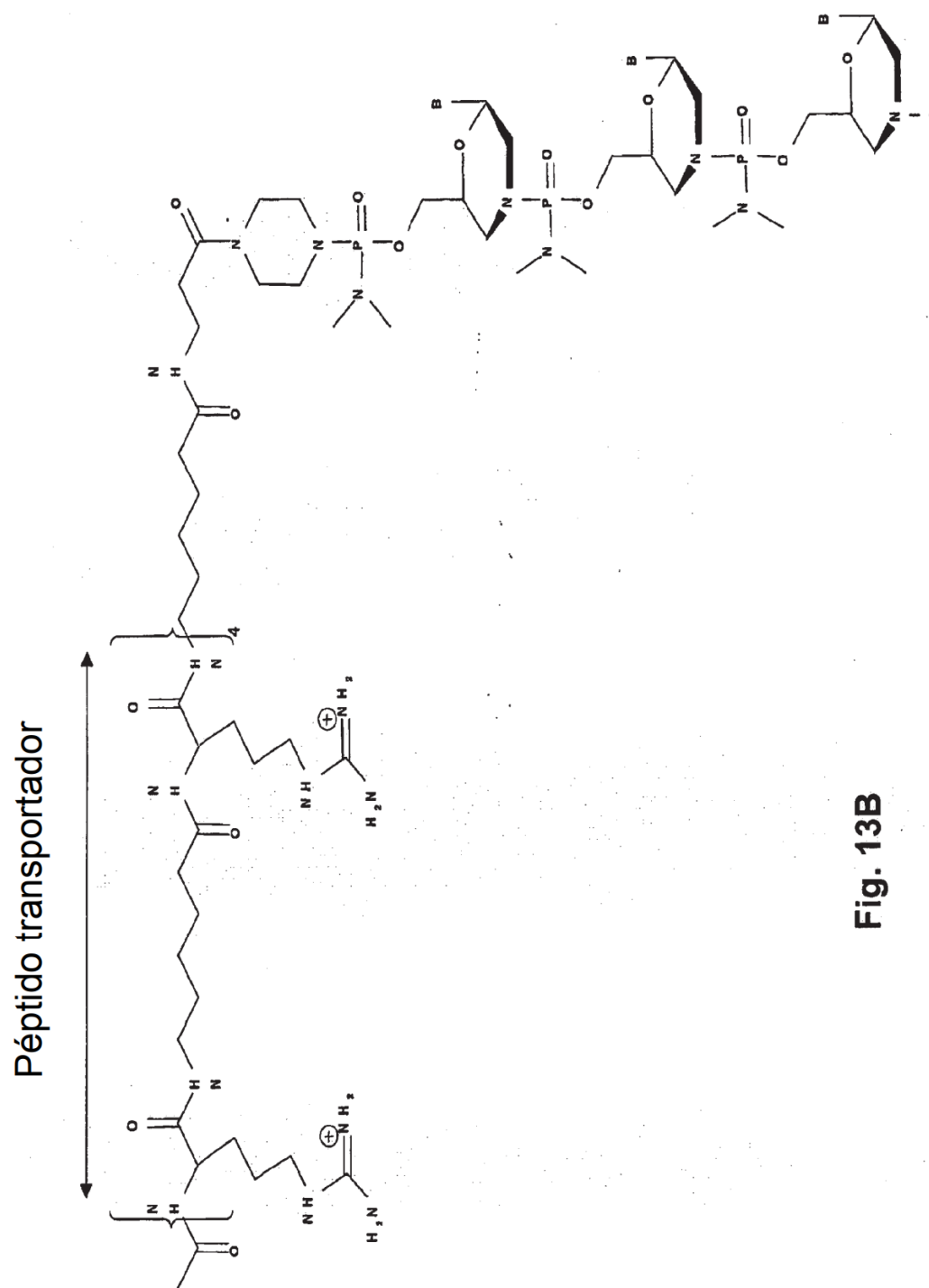


Fig. 13B

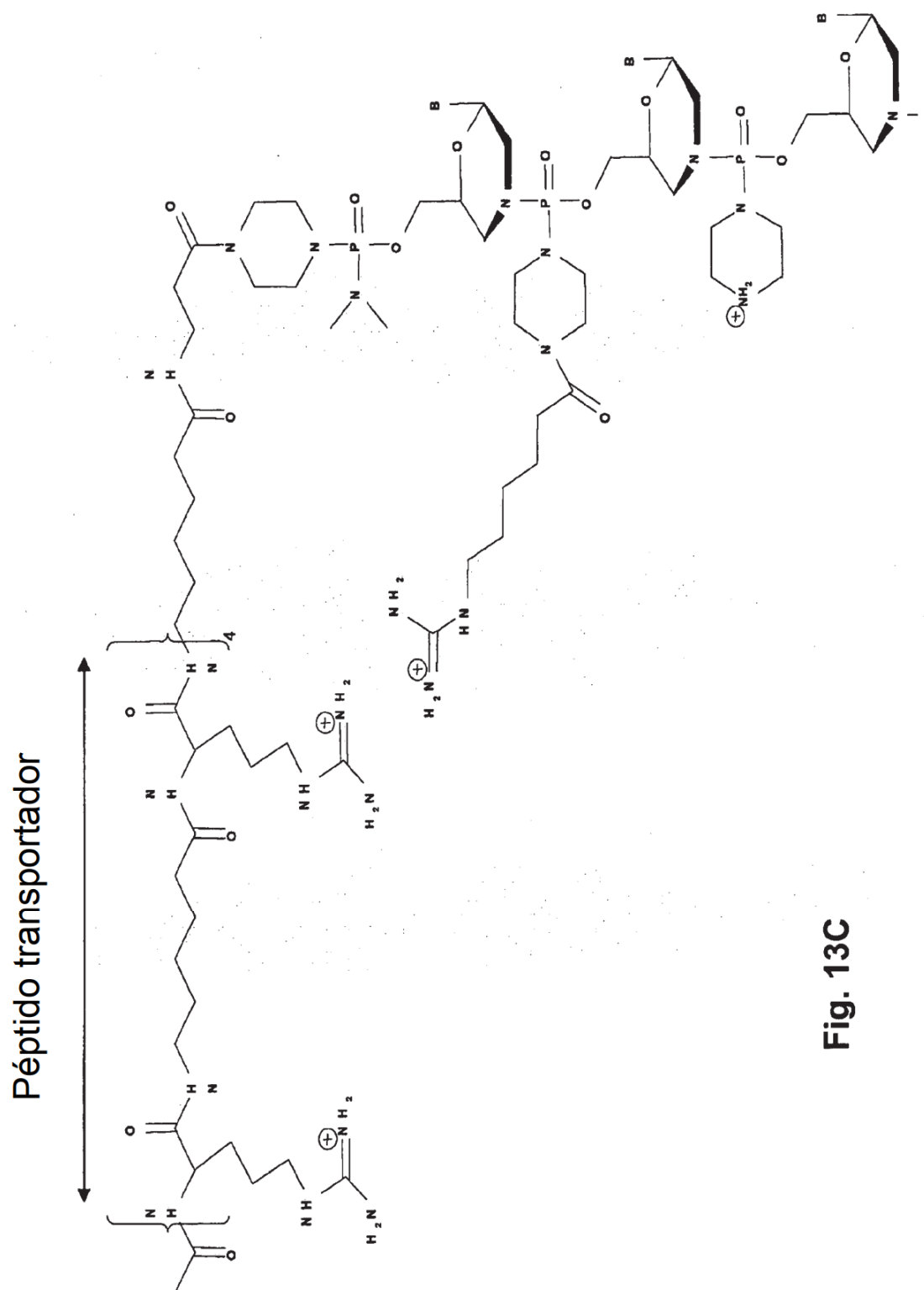


Fig. 13C

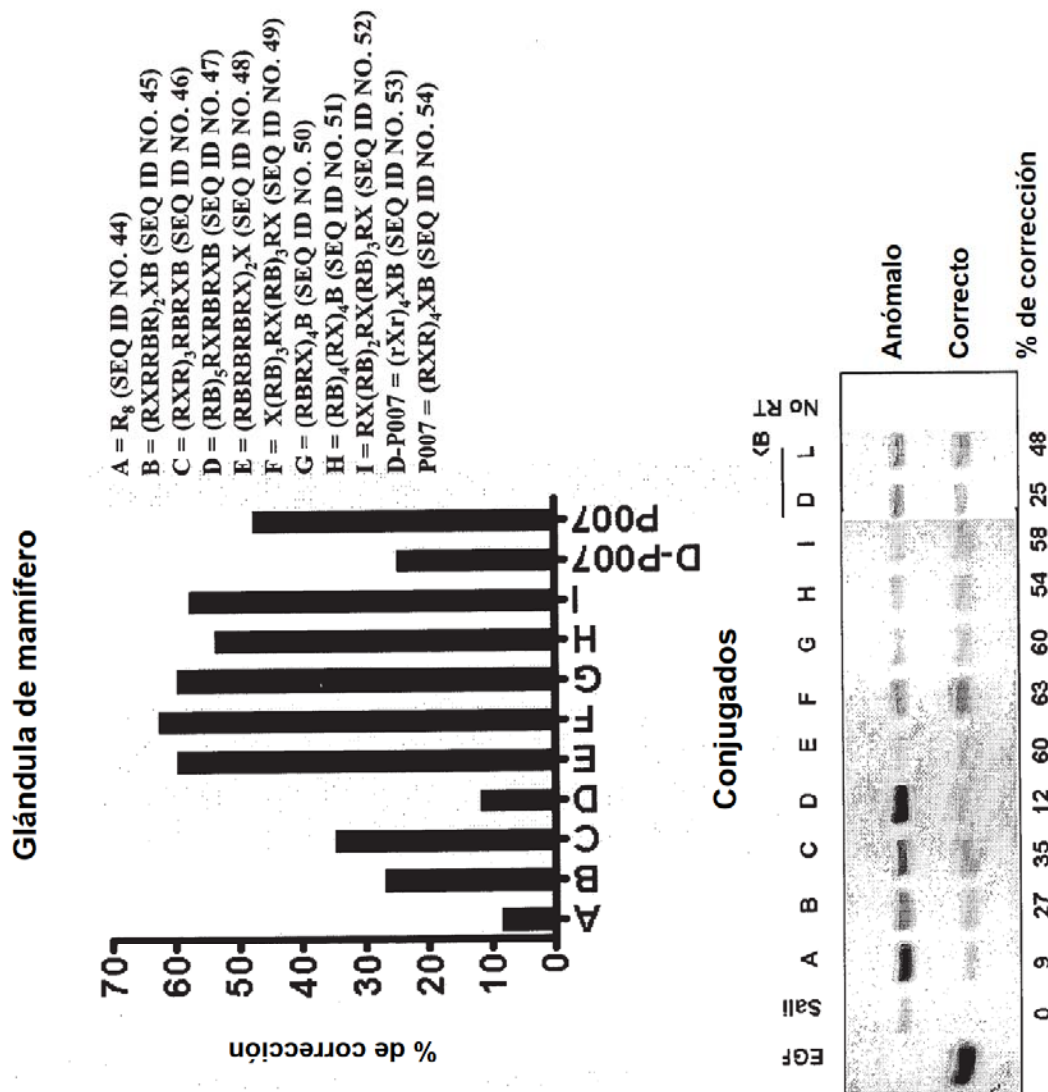


Fig. 14A

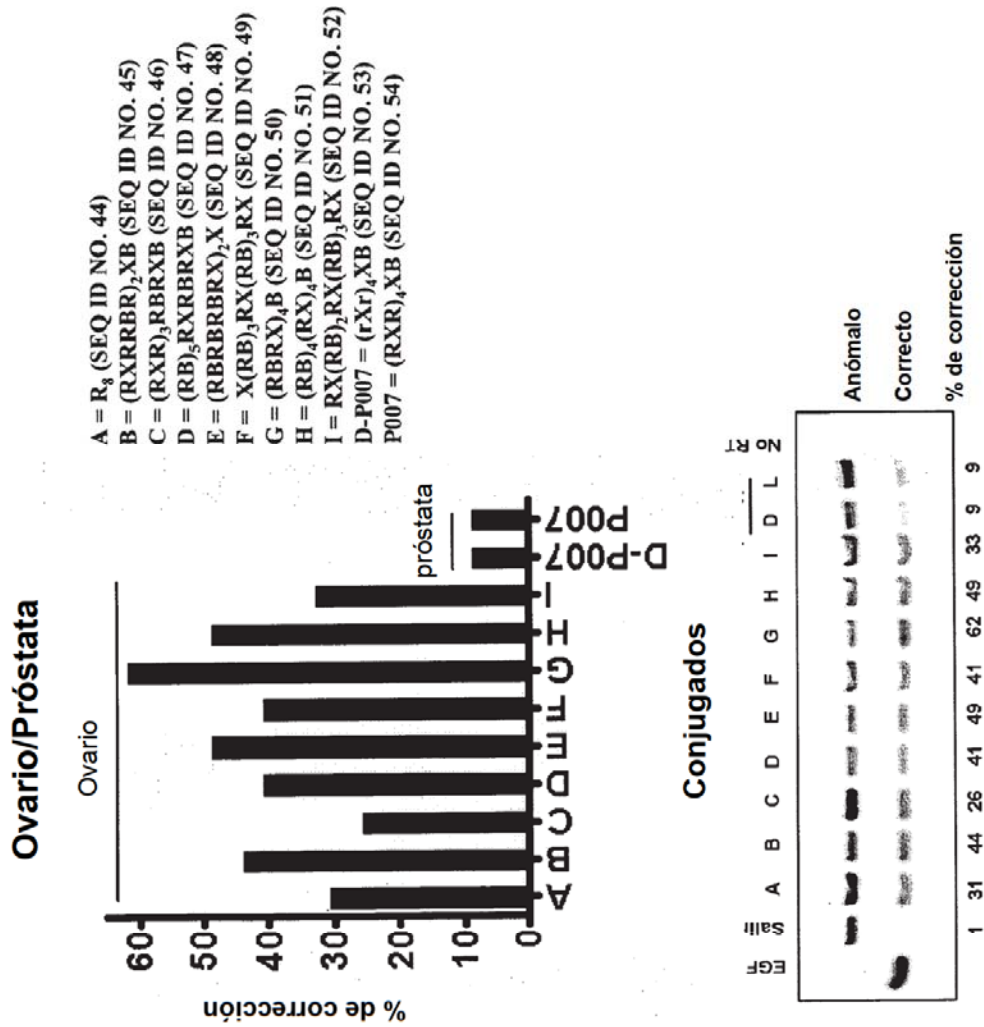


Fig. 14B

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