



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 278 916**

⑤1 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **02726037 .1**
⑧6 Fecha de presentación : **24.05.2002**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1390403**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

⑤4 Título: **Péptidos obtenidos de proteínas de cadena neural y su uso médico.**

③0 Prioridad: **25.05.2001 US 293156 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

⑦3 Titular/es: **NYMOX CORPORATION**
9900 Boulevard Cavendish, Nr. 306
Saint-Laurent, Quebec H4M 2V2, CA

⑦2 Inventor/es: **Averback, Paul, A.**

⑦4 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Péptidos obtenidos de proteínas de cadena neural y su uso médico.

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a péptidos constituidos por secuencias de aminoácidos correspondientes a parte de la secuencia de aminoácidos de proteínas de cadena neural. Estos compuestos pueden administrarse por vía intramuscular, por vía oral, por vía intravenosa, por vía intratecal, por vía intratumoral, por vía intranasal, por vía tópica, por vía transdérmica, etc., en solitario o conjugadas con un vehículo.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 Muchos tratamientos y procedimientos médicos implican la eliminación o destrucción de tejido dañino o no deseado. Los ejemplos de dichos tratamientos importantes incluyen la eliminación quirúrgica de crecimientos cancerosos, la destrucción de tumores metastáticos a través de quimioterapia, y la reducción de hiperplasia glandular (por ejemplo, de próstata). Otros ejemplos incluyen la eliminación de vello facial no deseado, la eliminación de verrugas y la
20 eliminación de tejido adiposo no deseado. Muchos de estos tratamientos son invasivos a través de cirugía complicada y peligrosa, o destruyen tejido no diana que estaría sano de otra manera a través de técnicas no invasivas.

Hay una necesidad de un agente eficaz que destruirá y: (i) facilitará sin cirugía la eliminación de; o (ii) inhibirá el crecimiento adicional de células o tejido dañinos o no deseados, pero que principalmente tendrá efectos locales y
25 toxicidad mínima o no sistémica.

El cáncer es una anomalía en el mecanismo regulador interno de una célula que da como resultado crecimiento y reproducción incontrolados de la célula. Las células normales forman tejidos, y cuando estas células pierden su capacidad de comportarse como una unidad específica, controlada y coordinada (desdiferenciación) el defecto conduce
30 a desorganización entre la población celular. Cuando esto ocurre, se forma un tumor.

Los sobrecrecimientos benignos de tejido son anomalías en las que es deseable eliminar células de un organismo. Los tumores benignos son proliferaciones celulares que no metastatizan por todo el cuerpo pero que, sin embargo, causan síntomas de enfermedad. Dichos tumores pueden ser letales si se sitúan en áreas inaccesibles en órganos tales
35 como el cerebro. Los tumores benignos existen en muchos otros órganos incluyendo pulmón, piel, pituitaria, tiroides, córtex y médula adrenal, ovario, útero, testículos, tejido conectivo, músculo, intestinos, orejas, nariz, garganta, amígdalas, boca, hígado, vesícula biliar, páncreas, próstata, corazón, y otros órganos.

La cirugía a menudo es la primera etapa en el tratamiento del cáncer. El objetivo de la cirugía varía. Algunas veces se usa para eliminar todo el tumor evidente que sea posible, o al menos para "reducir su masa" (eliminar la(s)
40 masa(s) principal(es) de tumor de modo que haya menos que necesite tratarse por otros medios). Dependiendo del tipo y situación del cáncer, la cirugía puede proporcionar también algún alivio sintomático al paciente. Por ejemplo, si el cirujano puede eliminar una porción grande de un tumor cerebral en expansión, la presión dentro del cráneo disminuirá, conduciendo a una mejora en los síntomas del paciente.

45 No todos los tumores son susceptibles a cirugía. Algunos pueden estar situados en partes del cuerpo que les hacen imposibles de eliminar totalmente. Ejemplos de estos serían en el tronco del encéfalo (una parte del cerebro que controla la respiración) o un tumor que ha crecido en y alrededor de un vaso sanguíneo principal. En estos casos, el papel de la cirugía está limitado debido al alto riesgo asociado a la eliminación del tumor.

50 En algunos casos, no se usa cirugía para eliminar la mayor parte del tumor porque simplemente no es necesario. Un ejemplo es linfoma Hodgkin, un cáncer de los ganglios linfáticos que responde muy bien a combinaciones de quimioterapia y terapia de radiación. En el linfoma Hodgkin, raramente se necesita cirugía para conseguir la curación, pero casi siempre se usa para establecer un diagnóstico.

55 La quimioterapia es otra forma común de tratamiento del cáncer. Esencialmente, implica el uso de medicamentos (administrados normalmente por la boca o por inyección) que atacan de forma específica a células que se dividen rápidamente (tales como las que se encuentran en un tumor) por todo el cuerpo. Esto hace a la quimioterapia útil para tratar cánceres que ya han desarrollado metástasis, así como tumores que tienen una gran posibilidad de extenderse
60 a través de la sangre y los sistemas linfáticos pero no son evidentes más allá del tumor primario. La quimioterapia también puede usarse para potenciar la respuesta de tumores localizados a la cirugía y a la terapia de radiación. Este es el caso, por ejemplo, de algunos cánceres de cabeza y cuello.

Desafortunadamente, otras células del cuerpo humano que normalmente se dividen de forma rápida (tales como
65 el revestimiento del estómago y el pelo) también pueden verse afectadas por la quimioterapia. Por esta razón, algunos (aunque no todos) agentes de quimioterapia inducen náusea o pérdida del pelo. Estos efectos secundarios son temporales, y los médicos tienen medicamentos que pueden proporcionar ayuda para aliviar muchos de estos efectos secundarios. Así, en general, los pacientes toleran bien los tratamientos de quimioterapia. A medida que ha aumentado

el conocimiento, los investigadores han diseñado nuevos agentes quimioterapéuticos que son no solamente mejores para matar células cancerosas, sino que también tienen menos efectos secundarios para el paciente.

La quimioterapia se administra a pacientes de diversas maneras. Algunas son píldoras que se toman a diario o una vez a la semana o en algún otro programa y algunas se administran mediante una inyección intravenosa. Para la quimioterapia inyectable, un paciente va a la consulta del médico o al hospital para recibir tratamiento. Otros agentes quimioterapéuticos requieren infusión continua en el torrente sanguíneo, 24 horas al día. Para estos tipos de quimioterapia, se realiza un procedimiento quirúrgico menor para implantar una pequeña bomba que lleva el paciente. La bomba administra después lentamente el medicamento. En muchos casos, se coloca un puerto permanente en la vena de un paciente para eliminar la necesidad de repetidas punciones con la aguja.

La terapia de radiación es otra arma usada normalmente en la lucha contra el cáncer. La radiación mata el cáncer dañando el ADN dentro de las células tumorales. La radiación se “aplica” de dos maneras posibles. La primera, y la más común, implica dirigir un rayo de radiación al paciente de manera muy precisa, centrándolo en el tumor. Para hacer esto, un paciente yace en una mesa y el rayo se mueve a su alrededor. Esto sólo requiere varios minutos, pero se realiza 5 veces por semana durante 3-6 semanas (dependiendo del tipo de tumor), para conseguir una “dosis” prescrita particular.

Otro procedimiento de radiación que se emplea a veces, llamado braquiterapia, implica tomar gránulos (“semillas”) o cables radiactivos e implantarlos en el cuerpo en el área del tumor. Los implantes pueden ser temporales o permanentes. Para los implantes permanentes, la radiación en las semillas “se deteriora” o se consume durante un periodo de días o semanas de modo que el paciente no es radiactivo. Para implantes temporales, la dosis completa de radiación se administra normalmente en aproximadamente dos días, y el paciente debe permanecer en el hospital durante ese tiempo. Para los dos tipos de braquiterapia, la radiación se suministra generalmente al propio área objetivo para obtener control local sobre un cáncer (en contraposición al tratamiento de todo el cuerpo, como en dosis de quimioterapia).

Algunos pacientes muy seleccionados pueden remitirse a trasplantes de médula ósea. Este procedimiento se realiza normalmente porque un paciente tiene un cáncer que es particularmente agresivo o porque tienen un cáncer que ha reaparecido después de tratarlo con terapia convencional. El trasplante de médula ósea es un procedimiento complicado. Hay muchos tipos, y su potencial para causar efectos secundarios y curación varía. La mayoría de los trasplantes se realizan en centros especiales, y en muchos casos su uso se considera materia de investigación.

Existen terapias adicionales, aunque la mayoría de ellas aún se están explorando en ensayos clínicos y aún no se han convertido en atención médica convencional. Los ejemplos incluyen el uso de inmunoterapia, anticuerpos monoclonales, factores anti-angiogénesis, y terapia génica.

Inmunoterapia: se han diseñado diversas técnicas para ayudar al sistema inmune del propio paciente a combatir el cáncer, bastantes de forma independiente a la radiación o la quimioterapia. A menudo, para alcanzar el objetivo, los investigadores inyectan al paciente una vacuna obtenida especialmente. La mayor parte de la investigación en esta área se ha realizado sobre el melanoma, aunque ahora se están fijando como objetivo otros cánceres.

Anticuerpos monoclonales: estos son pequeñas proteínas que se diseñan especialmente para atacar a las células cancerosas (y células no normales) tomando ventaja de las diferencias entre las células cancerosas y no cancerosas en sus membranas celulares. Antes de administrar los anticuerpos al paciente, a menudo se “marcan” (unen a) diversos compuestos citotóxicos o se hacen radiactivos, de modo que el anticuerpo se dirija preferiblemente a las células cancerosas, suministrando de este modo el agente tóxico a la célula deseada.

Factores Anti-Angiogénesis: Puesto que las células cancerosas se dividen rápidamente y el tumor crece, pueden crecer pronto por encima de lo permitido por su suministro de sangre. Para compensar esto, algunos tumores secretan un compuesto que ha demostrado ayudar a inducir el crecimiento de vasos sanguíneos en sus proximidades, asegurando de este modo un suministro continuo de nutrientes a las células cancerosas. Recientemente, se han estado investigando maneras de interrumpir este proceso deteniendo el crecimiento de vasos sanguíneos y/o evitando que más sangre alcance las células cancerosas.

Terapia Génica: el cáncer es el producto de una serie de mutaciones que finalmente conducen a la producción de una célula cancerosa y su excesiva proliferación. Los cánceres pueden tratarse introduciendo genes en las células cancerosas que actuarán para controlar o detener la proliferación del cáncer, activar los mecanismos celulares programados para destruir la célula, potenciar el reconocimiento inmune de la célula, o expresar un pro-fármaco que se convierte en un metabolito tóxico o una citoquina que inhibe el crecimiento tumoral.

Los tumores benignos y malformaciones también pueden tratarse mediante diversos procedimientos incluyendo cirugía, radioterapia, terapia de fármacos, ablación térmica o eléctrica, crioterapia, y otros. Aunque los tumores benignos no desarrollan metástasis, pueden crecer a gran tamaño y pueden ser recurrentes. La extirpación quirúrgica de tumores benignos tiene todas las dificultades y efectos secundarios de la cirugía en general y a menudo debe realizarse repetidamente para algunos tumores benignos, tales como adenomas de la pituitaria, meningiomas del cerebro, hiperplasia prostática, y otros.

Otras afecciones que implican elementos celulares no deseados donde es deseable la eliminación celular selectiva incluyen, por ejemplo, enfermedad cardíaca y apoplejías. Estas afecciones están causadas típicamente por aterosclerosis, una lesión proliferativa del tejido fibroadiposo y elementos modificados del músculo liso que deforman la pared del vaso sanguíneo, estrechan la luz, constriñen el flujo sanguíneo, predisponen a coágulos sanguíneos focales, y finalmente conducen al bloqueo e infarto. Los tratamientos para aterosclerosis incluyen injertos de bypass; injertos artificiales; angioplastia con recanalización, raspado, radiación, láser, u otra eliminación; farmacoterapia para inhibir la aterosclerosis a través de la reducción de lípidos; terapias anticoagulantes; y medidas generales de dieta, ejercicio y estilo de vida. Se necesita un procedimiento para eliminar lesiones ateroscleróticas sin el riesgo y efectos secundarios de los procedimientos quirúrgicos.

Otros ejemplos de elementos celulares no deseados donde la eliminación celular selectiva es deseable incluyen crecimientos inducidos por virus, tales como verrugas. Otro ejemplo son las masas inflamatorias hipertróficas descubiertas en afecciones inflamatorias, y cicatrices hipertróficas o queloides. Se han descubierto otros ejemplos más en contextos cosméticos tales como la eliminación de vello no deseado, por ejemplo, vello facial, o para la contracción de áreas de tejido no deseado para fines cosméticos, tales como en la dermis facial y tejidos conectivos o en la dermis y tejido conectivo de las extremidades.

Otros ejemplos más serán fácilmente evidentes para los especialistas en la técnica. En todos o en la mayoría de estos ejemplos, existe una necesidad de tratamientos que puedan eliminar o destruir los elementos celulares no deseados sin los riesgos y efectos secundarios de las terapias convencionales. También existe una necesidad de eliminar los elementos celulares no deseados con más precisión.

Las proteínas de cadena neural (NTP) son una familia de proteínas cerebrales recientemente caracterizadas. Un miembro de esta familia, AD7C-NTP, es una fosfoproteína asociada a la membrana ~41 kD con funciones asociadas con brotes neuróticos (de la Monte y col., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997); de la Monte y col., *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999); de la Monte SM y Wands JR, *Journal of Alzheimer's Disease*, 3: 345-353 (2001)). El gen que codifica AD7C-NTP y la secuencia de proteína predicha para AD7C-NTP se ha identificado y descrito (de la Monte y col., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997)). Además de la especie de ~41 kD, se han identificado otras especies de proteínas de cadena neural (~26 kD, ~21 kD, ~17 kD, y ~15kD) y se han asociado con tumores neuroectodérmicos, astrocitomas, y glioblastomas y con lesión debida a hipoxia, isquemia, o infarto cerebral (Xu y col., *Cancer Research*, 53: 3823-38-29 (1993); de la Monte y col., *J Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10): 1038-50 (1996), de la Monte y col., *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2): 26-35 (1996); de la Monte y col., *J. Neurol. Sci.*, 135(2): 118-25 (1996); de la Monte y col., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997); y de la Monte y col., *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999)).

Se han descrito y reivindicado especies de proteínas de cadena neural en las Patentes de Estados Unidos N° 5.948.634; 5.948.888; y 5.830.670, todas para "Neural Thread Protein Gene Expression and Detection of Alzheimer's Disease" y en la Patente de Estados Unidos N° 6.071.705 para "Method of Detecting Neurological Disease or Dysfunction". Como se describe en estos documentos, NTP se regula positivamente y se produce durante la muerte celular. De este modo, se describe que las células nerviosas muertas y moribundas sobreproducen NTP, y por consiguiente, su presencia indica la muerte de células nerviosas y la aparición de enfermedad de Alzheimer (AD).

Se han identificado otras especies de proteínas de cadena neural como otros productos del gen AD7C-NTP (por ejemplo, una proteína de 112 aminoácidos descrita en la base de datos NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso XP_032307 PID g 15928971) o como similares a proteínas de cadena neural (por ejemplo, una proteína de 106 aminoácidos descrita en la base de datos NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAH14951 PID g 15928971, otra proteína de 106 aminoácidos descrita en la base de datos NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso XP_039102 PID g 18599339 y una proteína de 61 aminoácidos descrita en la base de datos NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAH02534 PID g 12803421).

La proteína de cadena neural se asocia con AD y la NTP está regulada positivamente junto con la muerte celular en AD. El ARNm de AD7C-NTP está regulado positivamente en cerebro con AD en comparación con los controles; los niveles de proteína AD7C-NTP en el cerebro y en el CSF (fluido cerebroespinal) son mayores en AD que en los controles; y se descubre inmunorreactividad a AD7C-NTP en placas seniles, en nudos neurofibrilares (NFT), en neuronas en degeneración, hebras de neuropilo, y brotes neuróticos distróficos en cerebros con AD y síndrome de Down (Ozturk y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 419-423 (1989); de la Monte y col., *J. Clin. Invest.*, 86(3): 1004-13 (1990); de la Monte y col., *J. Neurol. Sci.*, 113(2): 152-64 (1992); de la Monte y col., *Ann. Neurol.*, 32(6): 733-42 (1992); de la Monte y col., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10): 1038-50 (1996), de la Monte y col., *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2): 26-35 (1996); de la Monte y col., *J. Neurol. Sci.*, 135(2): 118-25 (1996); de la Monte y col., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997); y de la Monte y col., *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999)). NTP se sitúa en el interior de las células, en procesos finos en el neuropilo, o es extracelular en cerebros con AD o Síndrome de Down, de la Monte y col., *Ann. Neurol.*, 32(6): 733-42 (1992).

Se han descubierto niveles elevados de proteína AD7C-NTP en el CSF y la orina de pacientes de AD (de la Monte y Wands, *Front Biosci* 7: 989-96 (2002); de la Monte y Wands *Journal of Alzheimer's Disease*, 3: 345-353 (2001); Munzar y col., *Alzheimer's Reports* 4: 61-65 (2001); Kahle y col., *Neurology* 54: 1498-1504 (2000) y Averbach *Neurology* 55:1068 (2000); Munzar y col., *Alzheimer's Reports* 3: 155-159 (2000); de la Monte y col., *Alzheimer's Reports* 2: 327-332 (1999); Ghanbari y col., *J Clin Lab Anal* 12: 285-288 (1998); Ghanbari y col., *J Clin Lab Anal* 12: 223-226 (1998); Ghanbari y col., *journal of Contemporary Neurology* 1998; 4A: 2-6 (1998); y de la Monte y col., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997)).

La sobreexpresión de NTP se ha asociado también al proceso de muerte celular en la enfermedad de Alzheimer (de la Monte y Wands, *J. Neuropathol. And Exp. Neuro.*, 60: 195-207 (2001); de la Monte y Wands, *Cell Mol Life Sci* 58: 844-49 (2001)). AD7C-NTP también se ha identificado en tejido de cerebro con Síndrome de Down (Wands y col., Publicación de Patente Internacional N° WO 90/06993; de la Monte y col., *J. Neurol. Sci.*, 135(2): 118-25 (1996); de la Monte y col., *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999)). Algunas pruebas sugieren que la sobreexpresión de NTP también puede estar asociada con el glaucoma de tensión normal (Golubnitschaja-Labudova y col, *Curr Eye Res* 21: 867-76 (2000)).

El documento WO 00/63230 describe un polipéptido de 47 miembros que comprende la SEC ID N° 35 de la presente invención que puede ser útil para un amplio intervalo de enfermedades (cáncer, enfermedades neurológicas, etc.). El documento WO 00/58495 describe un polipéptido de 47 miembros que comprende las SEC ID N° 11 y 12 de la presente invención que puede ser útil para un amplio intervalo de enfermedades (cáncer, enfermedades neurológicas, etc.). Sijts, A.J.A.M. y col (J. immun., vol. 152, 1994, 106-116) describe el péptido SSWDYITV que puede ser útil en estrategias de vacunación con péptidos contra tumores. El documento WO 99/19347 describe el péptido ISGPCPK para el tratamiento del cáncer.

NTP ha demostrado ser un agente eficaz para causar la muerte celular *in vitro* en células de glioma y neuroblastoma e *in vivo* en tejido muscular, tejido conectivo subcutáneo, y dermis normal de roedor y en diversos tumores de origen humano y no humano diferentes, incluyendo carcinoma mamario, carcinoma de piel y papiloma, carcinoma de colon, glioma del cerebro, y otros en modelos de roedor.

Sumario de la invención

Aún existe una necesidad en la técnica de nuevos tratamientos menos tóxicos para tratar elementos celulares no deseados. Esta invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que los péptidos que contienen secuencias de aminoácidos correspondientes a parte de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de cadena neural también son dichos agentes.

La presente invención también se refiere al uso de dichos péptidos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección seleccionada entre el grupo constituido por: un tumor benigno o maligno; una hiperplasia, hipertrofia, o sobrecrecimiento; un tejido alterado por un virus, bacteria, o parásito; una malformación de un tejido; hipertrofia amigdalal; hiperplasia prostática; una modificación cosmética del tejido; una enfermedad vascular; hemorroides; venas varicosas; aterosclerosis o arteriosclerosis; una enfermedad inflamatoria; enfermedad autoinmune; enfermedad metabólica; enfermedad hereditaria/genética; enfermedad traumática; enfermedad de deficiencia nutricional; enfermedad infecciosa; enfermedad amiloide; enfermedad de fibrosis; malformación congénita; enfermedad de deficiencia enzimática; enfermedad de radiación; enfermedad endocrina; y enfermedad degenerativa. Dicho uso comprende administrar a un mamífero en necesidad una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido constituido por secuencias de aminoácidos correspondientes a parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína de cadena neural (NTP).

Dicho péptido ("péptido NTP") puede administrarse en solitario o conjugado con un vehículo. El péptido NTP puede administrarse por vía intramuscular, por vía oral, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intracerebral (por vía intraparenquimatosa), por vía intracerebroventricular, por vía intratumoral, por vía intralesional, por vía intradérmica, por vía intratecal, por vía intranasal, por vía intraocular, por vía intraarterial, por vía tópica, por vía transdérmica, mediante un aerosol, infusión, inyección en embolada, dispositivo de implante, sistema de liberación sostenida etc., en solitario o conjugado con un vehículo.

Además, el péptido NTP puede usarse junto con otras terapias para tratar tumores benignos y malignos y otros crecimientos celulares no deseados o dañinos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra la secuencia de aminoácidos y secuencia de ácidos nucleicos completa del gen AD7C-NTP y la proteína AD7C-NTP producto de ese gen (Secuencias 120 y 121 de las Patentes de Estados Unidos N° 5.830.670, 5.948.634, y 5.948.888; de la Monte y col., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997); NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAC08737; PID g 3002527) [SEC ID N° 1].

Figura 2: muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína de cadena neural de 122 aminoácidos (Secuencia 40 de las Patentes de Estados Unidos N° 5.830.670, 5.948.634, y 5.948.888; NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAE25447 PID g 10048540) [SEC ID N° 2].

Figura 3: muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína de cadena neural de 112 aminoácidos (NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso XP_032307 PID g 15928971) [SEC ID N° 3].

Figura 4: muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína similar a la proteína de cadena neural de 106 aminoácidos (NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAH14951 PID g 15928971) [SEC ID N° 4].

Figura 5: muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína similar a la proteína de cadena neural de 106 aminoácidos (NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso XP_039102 PID g 18599339) [SEC ID N° 5].

Figura 6: muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína de cadena neural de 98 aminoácidos (Secuencia 30 de las Patentes de Estados Unidos N° 5.830.670, 5.948.634, y 5.948.888; NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAE25445 PID g 10048538) [SEC ID N° 6].

Figura 7: muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína de cadena neural de 75 aminoácidos (Secuencia 48 de las Patentes de Estados Unidos N° 5.830.670, 5.948.634, y 5.948.888; NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAE25448 PID g 10048541) [SEC ID N° 7].

Figura 8: muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína de cadena neural de 68 aminoácidos (Secuencia 36 de las Patentes de Estados Unidos N° 5.830.670, 5.948.634, y 5.948.888; NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAE25446 PID g 10048539) [SEC ID N° 8].

Figura 9: muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína similar a la proteína de cadena neural de 61 aminoácidos (NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAH02534 PID g 12803421) [SEC ID N° 9].

Descripción detallada de la invención

La expresión “AD7C-NTP” se refiere a la proteína de ~41 kD y el gen y las secuencias de ácidos nucleicos que lo codifican descritas en de la Monte y col., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997), en las Secuencias 120 y 121 de las Patentes de Estados Unidos N° 5.830.670, 5.948.634, y 5.948.888 y en GenBank N° AF010144, cuyas secuencias de ácido nucleico y aminoácidos se ilustran en la Figura 1. La expresión “AD7C-NTP” también incluye fragmentos, variantes, derivados, homólogos y miméticos de AD7C-NTP biológicamente activos.

La expresión “NTP” o “proteína de cadena neural” se refiere a proteínas de cadena neural (incluyendo la proteína de cadena pancreática) y las secuencias de aminoácidos que codifican estas proteínas, e incluye (aunque sin limitación) las siguientes proteínas y las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos para estas proteínas:

(a) AD7C-NTP

(b) las especies de proteína de cadena neural de ~42, ~26, ~21, ~17, ~14, y ~8 kD como se ha descrito en las Patentes de Estados Unidos N° 5.948.634, 5.948.888, 5.830.670, y 6.071.705 y en de la Monte y col., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10): 1038-50 (1996), de la Monte y col., *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2): 26-35 (1996); de la Monte y col., *J. Neurol. Sci.*, 135(2): 118-25 (1996); de la Monte y col., *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997); y de la Monte y col., *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999);

(c) proteínas reconocidas específicamente por el anticuerpo monoclonal N° 2 en depósito en la American Type Culture Collection, Manassas, Va., con el número de entrada HB-12546 o anticuerpo monoclonal N° 5 en depósito en la American Type Culture Collection, Manassas, Va., con el número de entrada HB-12545;

(d) proteínas codificadas por el gen AD7C-NTP.

(e) la proteína de cadena neural de 122 aminoácidos descrita en la Secuencia 40 de las Patentes de Estados Unidos N° 5.830.670, 5.948.634, y 5.948.888; y mostrada en NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAE25447 PID g 10048540, cuyas secuencias de aminoácidos se ilustran en la Figura 2;

(f) la proteína de cadena neural de 112 aminoácidos mostrada en NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso XP_032307 PID g 14725132, cuya secuencia de aminoácidos se ilustra en la Figura 3;

(g) una proteína similar a la proteína de cadena neural de 106 aminoácidos mostrada en NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAH14951 PID g 15928971, cuya secuencia de aminoácidos se ilustra en la Figura 4;

(h) una proteína similar a la proteína de cadena neural de 106 aminoácidos mostrada en NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso XP_039102 PID g 18599339, cuya secuencia de aminoácidos se ilustra en la Figura 5;

(i) la proteína de cadena neural de 98 aminoácidos descrita en la Secuencia 30 de las Patentes de Estados Unidos N° 5.830.670, 5.948.634, y 5.948.888 y mostrada en NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAE25445 PID g 10048538, cuya secuencia de aminoácidos se ilustra en la Figura 6;

(j) la proteína de cadena neural de 75 aminoácidos descrita en la Secuencia 48 de las Patentes de Estados Unidos N° 5.830.670, 5.948.634, y 5.948.888 y mostrada en NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAE25448 PID g 10048541, cuya secuencia de aminoácidos se ilustra en la Figura 7;

(k) la proteína de cadena neural de 68 aminoácidos descrita en la Secuencia 36 de las Patentes de Estados Unidos N° 5.830.670, 5.948.634, y 5.948.888 y mostrada en NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAE25446 PID g 10048539, cuya secuencia de aminoácidos se ilustra en la Figura 8;

ES 2 278 916 T3

(l) la proteína similar a la proteína de cadena neural de 61 aminoácidos mostrada en NCBI Entrez-Protein, N° de Acceso AAH02534 PID g 12803421, cuya secuencia de aminoácidos se ilustra en la Figura 9;

(m) proteína de cadena pancreática;

(n) la proteína de cadena pancreática neural (nPTP) descrita en la Patente de Estados Unidos N° 6.071.705; y

(o) proteínas reconocidas por los anticuerpos producidos por un hibridoma del grupo constituido por HB 9934, HB 9935, y HB 9936 depositados en la American Type Culture Collection.

Los aminoácidos y restos de aminoácidos descritos en este documento pueden mencionarse de acuerdo con el código aceptado de una o tres letras que se muestra a continuación.

TABLA 1

Aminoácido	Símbolo de Una Letra	Símbolo de Tres Letras
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

ES 2 278 916 T3

La expresión “péptido NTP” se refiere a los siguientes péptidos obtenidos de la secuencia de aminoácidos de AD7C-NTP, como se describe mediante las secuencias de aminoácidos que se muestran a continuación:

Péptido NTP N° 1 [SEC ID N° 10], AD7C-NTP p1-15

MEFSLLLPRLECNGA

Met-Glu-Phe-Ser-Leu-Leu-Leu-Pro-Arg-Leu-Glu-Cys-Asn-Gly-Ala

Péptido NTP N° 2 [SEC ID N° 11], AD7C-NTP p14-28

GAISAHRLRLPGSS

Gly-Ala-Ile-Ser-Ala-His-Arg-Asn-Leu-Arg-Leu-Pro-Gly-Ser-Ser

Péptido NTP N° 3 [SEC ID N° 12], AD7C-NTP p29-45

DSPASASPVAAGITGMCT

Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-Val-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Met-Cys-Thr

Péptido NTP N° 4 [SEC ID N° 13], AD7C-NTP p43-58

MCTHARLILYFLVEM

Met-Cys-Thr-His-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Leu-Val-Glu-Met

Péptido NTP N° 5 [SEC ID N° 14], AD7C-NTP p52-62

YFFLVEMEFLH

Tyr-Phe-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Glu-Phe-Leu-His

Péptido NTP N° 6 [SEC ID N° 15], AD7C-NTP p63-73

VGQAGLELPTS

Val-Gly-Gln-Ala-Gly-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-Ser

Péptido NTP N° 7 [SEC ID N° 16], AD7C-NTP p74-90

DDPSVSASQSARYRTGH

Asp-Asp-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Arg-Tyr-Arg-Thr-Gly-His

Péptido NTP N° 8 [SEC ID N° 17], AD7C-NTP p88-101

TGHHARLCLANFCG

Thr-Gly-His-His-Ala-Arg-Leu-Cys-Leu-Ala-Asn-Phe-Cys-Gly

Péptido NTP N° 9 [SEC ID N° 18], AD7C-NTP p97-113

ANFCGRNRVSLMCPSWS

Ala-Asn-Phe-Cys-Gly-Arg-Asn-Arg-Val-Ser-Leu-Met-Cys-Pro-Ser-Trp-Ser

ES 2 278 916 T3

Péptido NTP N° 10 [SEC ID N° 19], AD7C-NTP p114-132

PELKQSTCLSLPKCWDYRR

5 Pro-Glu-Leu-Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido NTP N° 11 [SEC ID N° 20], AD7C-NTP p116-132

10 LKQSTCLSLPKCWDYRR

Leu-Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

15 Péptido NTP N° 12 [SEC ID N° 21], AD7C-NTP p119-132

STCLSLPKCWDYRR

20 Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido NTP N° 13 [SEC ID N° 22], AD7C-NTP p122-132

25 LSLPKCWDYRR

Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido NTP N° 14 [SEC ID N° 23], AD7C-NTP p126-138

30 KCWDYRRAAVPGL

Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu

35 Péptido NTP N° 15 [SEC ID N° 24], AD7C-NTP p126-144

KCWDYRRAAVPGLFILFLL

40 Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu

Péptido NTP N° 16 [SEC ID N° 25], AD7C-NTP p126-149

45 KCWDYRRAAVPGLFILFLLRHRC

Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro

50 Péptido NTP N° 17 [SEC ID N° 26], AD7C-NTP p126-163

KCWDYRRAAVPGLFILFLLRHRCPTLTQDEVQWCDHSS

55 Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser

Péptido NTP N° 18 [SEC ID N° 27], AD7C-NTP p128-132, p241-245

60 WDYRR

Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

65

ES 2 278 916 T3

Péptido NTP N° 19 [SEC ID N° 28], AD7C-NTP p139-151

FILFLLRHRCPTL

5 Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu

Péptido NTP N° 20 [SEC ID N° 29], AD7C-NTP p139-163

10 FILFLLRHRCPTLTQDEVQWCDHSS

Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser

15 Péptido NTP N° 21 [SEC ID N° 30], AD7C-NTP p146-174

HRCPTLTQDEVQWCDHSSLQPSTPEIKHP

20 His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser-Leu-Gln-Pro-Ser-Thr-Pro-Glu-Ile-Lys-His-Pro

Péptido NTP N° 22 [SEC ID N° 31], AD7C-NTP p175-188

25 PASASQVAGTKDMH

Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Lys-Asp-Met-His

30 Péptido NTP N° 23 [SEC ID N° 32], AD7C-NTP p186-203

DMHHYTWLIFIFITNPLR

35 Asp-Met-His-His-Tyr-Thr-Trp-Leu-Ile-Phe-Ile-Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu-Arg

Péptido NTP N° 24 [SEC ID N° 33], AD7C-NTP p189-207

40 HYTWLIFIFIFNPLRQSLN

His-Tyr-Thr-Trp-Leu-Ile-Phe-Ile-Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu-Arg-Gln-Ser-Leu-Asn

Péptido NTP N° 25 [SEC ID N° 34], AD7C-NTP p208-252

45 SVTQAGVQWRNLGSLQPLPPGFKLFSCPSLLSSWDYRRPPRLANF

50 Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Arg-Asn-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe

Péptido NTP N° 26 [SEC ID N° 35], AD7C-NTP p227-245

55 PGFKLFSCPSLLSSWDYRR

Pro-Gly-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido NTP N° 27 [SEC ID N° 36], AD7C-NTP p229-252

60 FKLFSCPSLLSSWDYRRPPRLANF

Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe

65

ES 2 278 916 T3

Péptido NTP N° 28 [SEC ID N° 37], AD7C-NTP p232-245

FSCPSLLSSWDYRR

5 Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido NTP N° 29 [SEC ID N° 38], AD7C-NTP p236-245

10 SLLSSWDYRR

Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

15 Péptido NTP N° 30 [SEC ID N° 39], AD7C-NTP p239-243, p339-343

SSWDY

20 Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr

Péptido NTP N° 31 [SEC ID N° 40], AD7C-NTP p239-245

25 SSWDYRR

Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

Péptido NTP N° 32 [SEC ID N° 41], AD7C-NTP p239-263

30 SSWDYRRPPRLANFFVFLVEMGFTM

Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Phe-Val-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Gly-Phe-Thr-Met

35 Péptido NTP N° 33 [SEC ID N° 42], AD7C-NTP p253-263

FVFLVEMGFTM

40 Phe-Val-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Gly-Phe-Thr-Met

Péptido NTP N° 34 [SEC ID N° 43], AD7C-NTP p259-281

45 MGFTMFARLILISGPCDLPASAS

Met-Gly-Phe-Thr-Met-Phe-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Ile-Ser-Gly-Pro-Cys-Asp-Leu-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser

50 Péptido NTP N° 35 [SEC ID N° 44], AD7C-NTP p270-274

ISGPC

55 Ile-Ser-Gly-Pro-Cys

Péptido NTP N° 36 [SEC ID N° 45], AD7C-NTP p275-291

60 DLPASASQSAGITGVSH

Asp-Leu-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His

Péptido NTP N° 37 [SEC ID N° 46], AD7C-NTP p288-304

65 GVSHHARLIFNFCLEFEM

Gly-Val-Ser-His-His-Arg-Leu-Ile-Phe-Asn-Phe-Cys-Leu-Phe-Glu-Met

ES 2 278 916 T3

Péptido NTP N° 38 [SEC ID N° 47], AD7C-NTP p298-307

NFCLFEMESH

5 Asn-Phe-Cys-Leu-Phe-Glu-Met-Glu-Ser-His

Péptido NTP N° 39 [SEC ID N° 48], AD7C-NTP p308-353

10 SVTQAGVQWP NLGSLQPLPPGLKRF SCLSLPSSWDYGH LPPHPANF

Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Pro-Asn-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Ala-Asn-Phe

15 Péptido NTP N° 40 [SEC ID N° 49], AD7C-NTP p326-344

PPGLKRF SCLSLPSSWDYG

20 Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly

Péptido NTP N° 41 [SEC ID N° 50], AD7C-NTP p332-345

25 FSCLSLPSSWDYGH

Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His

30 Péptido NTP N° 42 [SEC ID N° 51], AD7C-NTP p335-343

LSLPSSWDY

35 Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly

Péptido NTP N° 43 [SEC ID N° 52], AD7C-NTP p339-375

40 SSWDYGH LPPHPANFCIFIRGGVSPYLSGWSQTPDLR

Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Ala-Asn-Phe-Cys-Ile-Phe-Ile-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Pro-Tyr-Leu-Ser-Gly-Trp-Ser-Gln-Thr-Pro-Asp-Leu-Arg

45 abarcados por esta invención pueden prepararse usando procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica, tales como tecnología de ADN recombinante, síntesis de proteínas y aislamiento de péptidos NTP de origen natural.

Un péptido NTP puede prepararse usando procedimientos bien conocidos de tecnología de ADN recombinante tales como los que se muestran en Sambrook y *col.*, (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. [1994]).

55 Puede obtenerse un gen o ADNc que codifica un péptido NTP por ejemplo explorando una biblioteca génica o de ADNc, o mediante amplificación por PCR. Las sondas o cebadores útiles para explorar la biblioteca pueden generarse en base a la información de secuencias para otros genes conocidos o fragmentos génicos de la misma o una familia de genes relacionada, tales como, por ejemplo, motivos conservados descubiertos en otras proteínas NTP. Además, donde se ha identificado un gen que codifica un péptido NTP de otras especies, todo o una porción de este gen puede usarse como sonda para identificar genes homólogos de otras especies. Las sondas o cebadores pueden usarse para explorar bibliotecas de ADNc de diversas fuentes de tejido que se cree expresan un gen NTP. Típicamente, para explorar se emplearán condiciones de alta rigurosidad, para minimizar la cantidad de falsos positivos obtenidos a partir de la exploración.

65 Otro medio para preparar un gen que codifica un péptido NTP es emplear síntesis química usando procedimientos bien conocidos por el especialista en la técnica, tales como los descritos por Engels y *col.* (*Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28: 716-734 [1989]). Estos procedimientos incluyen, entre otros, los procedimientos de fosfotriéster, fosforamidita, y H-fosfonato para síntesis de ácidos nucleicos. Un procedimiento preferido para dicha síntesis es síntesis apoyada por polímeros usando química de fosforamidita convencional. Típicamente, el ADN que dosifica un péptido NTP será de varios cientos de nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos mayores de 100 nucleótidos pueden sintetizarse en forma de varios fragmentos usando estos procedimientos. Los fragmentos pueden unirse todos juntos después para

formar el péptido NTP de longitud completa. Normalmente, el fragmento de ADN que codifica el extremo amino de la proteína tendrá un ATG, que codifica un resto de metionina. Esta metionina puede estar o no presente en la forma madura del péptido NTP, dependiendo de si la proteína producida en la célula huésped está diseñada para que la secrete esa célula.

5

El gen, ADNc, o fragmento del mismo que codifica el péptido NTP puede insertarse en un vector de expresión o amplificación apropiado usando técnicas de ligamiento. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped de modo que pueda producirse la amplificación del gen y/o la expresión del gen). El gen, ADNc, o fragmento del mismo
10 que codifica el péptido NTP puede amplificarse/expresarse en células huésped procariotas, de levadura, de insectos (sistemas de baculovirus) y/o eucariotas. La selección de la célula huésped dependerá en parte de si el péptido NTP se glicosilará y/o fosforilará. En este caso, son preferible células huésped de levadura, insecto, o mamífero.

15

Típicamente, los vectores usados en cualquiera de las células huésped, contendrán al menos una secuencia de flanco 5' (denominada también "promotora") y otros elementos reguladores así como un(os) potenciador(es), un elemento de origen de la replicación, un elemento de terminación de la transcripción, una secuencia intrón completa que contiene un sitio de empalme de donante y aceptor, una secuencia péptido señal, un elemento de sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región poliengarce para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar, y un elemento marcador seleccionable. Cada uno de estos elementos se describe a continuación.
20 Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia "marca", es decir, una molécula oligonucleotídica situada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante de la proteína NTP; la molécula oligonucleotídica codifica poliHis (tal como hexaHis), u otra "marca" tal como FLAG, HA (hemaglutinina del virus de la gripe) o myc para el que existen anticuerpos disponibles en el mercado. Esta marca típicamente se fusiona al polipéptido después de la expresión del polipéptido, y puede servir como medio para purificación por afinidad del péptido NTP de la célula huésped.
25 La purificación por afinidad puede realizarse, por ejemplo, mediante cromatografía en columna usando anticuerpos contra la marca como matriz de afinidad. Opcionalmente, la marca puede retirarse posteriormente de la proteína NTP o péptido NTP purificado por diversos medios tales como usando ciertas peptidasas.

30

La región bisagra y Fc de inmunoglobulina humana puede fusionarse al extremo N o Extremo C del péptido NTP por un especialista en la técnica. La proteína de fusión a Fc subsiguiente podría purificarse mediante el uso de una columna de afinidad a Proteína A. Se sabe que Fc muestra una larga semi-vida farmacocinética *in vivo* y se ha descubierto que las proteínas fusionadas a Fc muestran una semi-vida sustancialmente mayor que sus contrapartidas no fusionadas. Además, la fusión a la región Fc permite la dimerización/multimerización de la molécula lo que puede ser útil para la bioactividad de algunas moléculas.

35

La secuencia de flanco 5' puede ser homóloga, (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heteróloga (es decir, de una especie diferente a la especie o cepa de la célula huésped), híbrida (es decir, una combinación de secuencias de flanco 5' de más de una fuente), sintética, o puede ser la secuencia de flanco 5' del gen de la proteína o péptido NTP nativo. Así, la fuente de la secuencia de flanco 5' puede ser un organismo unicelular
40 procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia de flanco 5' sea funcional en, y pueda activarse por, la maquinaria de la célula huésped.

45

Las secuencias de flanco 5' útiles en los vectores pueden obtenerse mediante cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias de flanco 5' útiles en este documento diferentes de la secuencia de flanco del gen NTP se habrán identificado previamente mediante el mapeado y/o digestión por endonucleasa de restricción y pueden aislarse por tanto a partir de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia de nucleótidos completa de la secuencia de flanco 5'. En este documento, la secuencia de flanco 5' puede sintetizarse usando los procedimientos descritos anteriormente para síntesis o clonación de ácidos nucleicos.

50

Donde se conoce toda o sólo una porción de la secuencia de flanco 5', esta puede obtenerse usando PCR y/o explorando una biblioteca génica con oligonucleótidos y/o fragmentos de secuencias de flanco 5' adecuados de la misma o de otra especie.

55

Donde no se conoce la secuencia de flanco 5', puede aislarse un fragmento de ADN que contenga una secuencia de flanco 5' a partir de una pieza más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede realizarse mediante digestión con endonucleasas de restricción usando una o más enzimas seleccionadas cuidadosamente para aislar el fragmento de ADN apropiado. Después de la digestión, el fragmento deseado puede aislarse mediante purificación en gel de agarosa, columna Qiagen® u otros procedimientos conocidos por el especialista en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para conseguir este fin será fácilmente evidente para el especialista en la técnica.

60

El elemento de origen de la replicación es típicamente una parte de vectores de expresión procariotas adquiridos en el mercado, y ayuda en la amplificación del vector en una célula huésped. La amplificación del vector hasta un cierto número de copias puede, en algunos casos, ser importante para la expresión óptima del péptido NTP. Si el vector de elección no contiene un sitio de origen de replicación, puede sintetizarse químicamente uno en base a una secuencia conocida, y puede ligarse en el vector. El elemento de terminación de la transcripción se sitúa típicamente en posición 3' con respecto al extremo de la secuencia codificante del péptido NTP y sirve para interrumpir la transcripción de

65

la proteína o péptido NTP. Normalmente, el elemento de terminación de la transcripción en células procariotas en un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia de poli T. Aunque el elemento se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se adquiere en el mercado como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente usando procedimientos de síntesis de ácidos nucleicos tales como los descritos anteriormente.

Un elemento de gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y crecimiento de una célula huésped cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores seleccionables típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo ampicilina, tetraciclina, o kanamicina a células huésped procariotas, (b) complementan deficiencias auxótrofas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos. Los marcadores seleccionables preferidos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina, y el gen de resistencia a tetraciclina.

El elemento de unión a ribosomas, llamado comúnmente la secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o la secuencia Kozak (eucariotas), es normalmente necesaria para el inicio de la traducción del ARNm. El elemento se sitúa típicamente en situación 3' con respecto al promotor y 5' con respecto a la secuencia codificante de la proteína NTP o péptido NTP a sintetizar. La secuencia Shine-Dalgarno es variada pero típicamente es una polipurina (es decir, tiene un alto contenido de A-G). Se ha identificado muchas secuencias Shine-Dalgarno, cada una de las cuales puede sintetizarse fácilmente usando procedimientos que se han mostrado anteriormente, y usarse en un vector procariota.

En los casos donde es deseable que el péptido se secrete desde la célula huésped, puede usarse una secuencia señal para dirigir la proteína NTP fuera de la célula huésped donde se sintetiza, y la parte carboxilo terminal de la proteína puede delecionarse para prevenir el anclaje a la membrana. Típicamente, la secuencia señal se sitúa en la región codificante del gen o ADNc de NTP, o directamente en el extremo 5' de la región codificante de NTP. Se han identificado muchas secuencias señal, y cualquiera de ellas que sean funcionales en la célula huésped seleccionada pueden usarse junto con el gen o ADNc de NTP. Por lo tanto, la secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga con respecto al gen o ADNc de NTP, y puede ser homóloga o heteróloga con respecto al gen o ADNc de NTP. Además, la secuencia señal puede sintetizarse químicamente usando procedimientos que se han mostrado anteriormente. En la mayoría de los casos, la secreción del polipéptido a partir de la célula huésped mediante la presencia de un péptido señal dará como resultado la eliminación de la metionina amino terminal del polipéptido.

En muchos casos, la transcripción del gen o ADNc de NTP puede aumentar mediante la presencia de uno o más intrones en el vector, esto es particularmente cierto cuando el péptido NTP se produce en células huésped eucariotas, especialmente células huésped de mamífero. Los intrones usados pueden ser de origen natural dentro el gen NTP, especialmente donde el gen usado es una secuencia génica de longitud completa o un fragmento de la misma. Donde el intrón no es de origen natural dentro del gen (como para la mayoría de ADNc), el(los) intrón(es) puede(n) obtenerse de otra fuente. La posición del intrón con respecto a la secuencia de flaqueo y el gen NTP es relativamente importante, puesto que el intrón debe transcribirse para ser eficaz. Así, donde el gen de NTP insertado en el vector de expresión en una molécula de ADNc, la posición preferida de los intrones es 3' con respecto al sitio de inicio de la transcripción, y 5' con respecto a la secuencia de terminación de la transcripción poliA. Preferiblemente para el ADNc de NTP, el intrón o intrones se situarán a un lado o al otro (es decir, 5' ó 3') del ADNc de modo que no interrumpen su secuencia codificante. Puede usarse cualquier intrón de cualquier fuente, incluyendo cualquier organismo vírico, procariota y eucariota (vegetal o animal) para poner en práctica esta invención, siempre que sea compatible con la(s) célula(s) huésped en la que se inserta. En este documento también se incluyen intrones sintéticos. Opcionalmente, puede usarse más de un intrón en el vector.

Donde uno o más de los elementos que se han mostrado anteriormente no están ya presentes en el vector a usar, pueden obtenerse individualmente y ligarse al vector. Los procedimientos usados para obtener cada uno de los elementos los conoce bien el especialista en la técnica y son comparables a los procedimientos que se han mostrado anteriormente (es decir, síntesis del ADN, exploración de bibliotecas, y similares).

Los vectores finales usados para poner en práctica esta invención pueden construirse a partir de vectores de inicio tales como un vector disponible en el mercado. Dichos vectores pueden o no contener algunos de los elementos a incluir en el vector completo. Si ninguno de los elementos deseados está presente en el vector de inicio, cada elemento puede ligarse en el vector individualmente cortando el vector con la(s) endonucleasa(s) de restricción apropiada(s) de modo que los extremos del elemento a ligar en, y los extremos del vector sean compatibles para el ligamiento. En algunos casos, puede ser necesario "hacer romos" los extremos que se ligarán juntos para obtener un ligamiento satisfactorio. El enromado se realiza rellenando primero los "extremos pegajosos" con ADN polimerasa Klenow o ADN polimerasa T4 en presencia de los cuatro nucleótidos. Este procedimiento se conoce bien en la técnica y se describe por ejemplo en Sambrook y *col.*, *supra*. Como alternativa, dos o más de los elementos a insertar en el vector pueden ligarse juntos primero (si no están situados adyacentes entre sí) y ligarse después en el vector.

Un procedimiento deferente para construir el vector para realizar todos los ligamientos de los diversos elementos simultáneamente en una mezcla de reacción. En este documento, se generarán muchos vectores sin sentido o no funcionales debido al ligamiento o inserción inapropiada de los elementos, sin embargo el vector funcional puede identificarse y seleccionarse mediante digestión con endonucleasas de restricción.

Los vectores preferidos para poner en práctica esta invención son aquellos que son compatibles con células huésped bacterianas, de insecto y de mamífero. Dichos vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3, y pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), pET15b (Novagen, Madison, Wis.), PGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N. J.), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL (BlueBacII; Invitrogen), y pFastBacDual (Gibco/BRL, Gand Island, N.Y.).

Después de que se ha construido el vector y se ha insertado una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido NTP en el sitio apropiado del vector, el vector completo puede insertarse en una célula huésped adecuada para amplificación y/o expresión del polipéptido. La células huésped pueden ser células huésped procariotas (tales como *E. coli*) o células huésped eucariotas (tales como una célula de levadura, una célula de insecto, o una célula de vertebrado). La célula huésped, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, puede sintetizar péptido NTP que puede recogerse posteriormente del medio de cultivo (si la célula huésped lo secreta al medio) o directamente de la célula huésped que lo produce (si no se secreta).

Después de la recogida, el péptido NTP puede purificarse usando procedimientos tales como cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad, y similares. La selección de la célula huésped para la producción de péptido NTP dependerá en parte de si el péptido NTP se va a glicosilar o fosforilar (en cuyo caso se prefieren células huésped eucariotas), y la manera en que la célula huésped es capaz de “plegar” la proteína en su estructura terciaria nativa. (por ejemplo, orientación apropiada de los puentes disulfuro, etc.) de modo que se prepare proteína biológicamente activa mediante la proteína o péptido NTP que tiene actividad biológica, el péptido NTP puede “plegarse” después de la síntesis usando las condiciones químicas apropiadas como se describe a continuación. Las células o líneas celulares adecuadas pueden ser células de mamífero, tales como células de Ovario de hámster chino (CHO), células embrionarios de riñón humano (HEK) 293 ó 293T. La selección de células huésped de mamífero y procedimientos adecuados para transformación, cultivo, amplificación, exploración y producción y purificación del producto se conocen en la técnica. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas, son las líneas celulares de mono COS-1 y COS-7, y la línea celular CV-1. Otras células huésped de mamífero ejemplares incluyen líneas celulares de primates y líneas celulares de roedores, incluyendo líneas celulares transformadas. Las células diploides normales, cepas celulares obtenidas del cultivo *in vitro* de tejido primario, así como explantes primarios, también son adecuados. Las células candidatas pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección de acción dominante. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen aunque sin limitación, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 obtenidas de ratones Swiss, Balb-c o NIH, o líneas celulares BHK o Hak de hámster.

Igualmente útiles como células huésped adecuadas para la presente invención son las células bacterianas. Por ejemplo, las diversas cepas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, DH5.alfa, DH10, y MC1061) se conocen bien como células huésped en el campo de la biotecnología. También pueden emplearse en este procedimiento diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, otros *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, y similares. También están disponibles muchas cepas de levaduras conocidas por los especialistas en la técnica como células huésped para la expresión de los polipéptidos de la presente invención.

Además, donde se desee, pueden usarse sistemas de células de insectos. Dichos sistemas se describen por ejemplo en Kitts y col. (*Biotechniques*, 14:810-817 [1993]), Lucklow (Curr. Opin. Biotechnol., 4:564-572 [1993]) y Lucklow y col. (*J. Virol.*, 67: 4566-4579 [1993]). Las células de insecto preferidas son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.).

La inserción (también denominada “transformación” o “transfección”) del vector en la célula huésped seleccionada puede conseguirse usando procedimientos tales como el procedimiento de cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, el de DEAE-dextrano. El procedimiento seleccionado será en parte una función del tipo de célula huésped a usar. Estos procedimientos y otros procedimientos adecuados los conoce bien el especialista en la técnica, y se muestran, por ejemplo, en Sambrook y col., *supra*.

Las células huésped que contienen el vector, (es decir, transformadas o transfectadas) pueden cultivarse usando medios convencionales bien conocidos por el especialista en la técnica. Los medios normalmente contendrán todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células. Son medios adecuados para cultivar células de *E. coli* por ejemplo, Caldo Luria (LB) y/o Caldo Terrific (TB). Son medios adecuados para cultivar células eucariotas RPMI 1640, MEM, DMEM, todos los cuales pueden suplementarse con suero y/o factores de crecimiento según lo requiera la línea celular particular que se cultive. Un medio adecuado para cultivos de células de insecto es el medio Grace suplementado con yeastolato, hidrolizado de lactoalbúmina, y/o suero fetal de ternero según sea necesario. Típicamente, un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de las células transformadas se añade solamente como suplemento para los medios. El compuesto a usar lo dictará el elemento marcador seleccionable presente en el plásmido con el que se transformó la célula huésped. Por ejemplo, donde el elemento marcador seleccionable es la resistencia a kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina.

La cantidad de péptido NTP producido en la célula huésped puede evaluarse usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen, sin limitación, análisis de transferencia de Western, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturante, separación por HPLC, espectroscopía de masas, inmunoprecipitación, y/o ensayos de actividad tales como ensayos de desplazamiento en gel de unión a ADN.

Si el péptido NTP se ha diseñado para ser secretado por las células huésped, la mayoría del péptido NTP puede encontrarse en el medio de cultivo celular. Las proteínas preparadas de esta manera típicamente no poseerán una metionina amino terminal, puesto que se retira durante la secreción de la célula. Si el péptido NTP no es secretado por las células huésped, sin embargo, estará presente en el citoplasma y/o el núcleo (para células huésped eucariotas) o en el citosol (para células huésped bacterianas gram negativas) y puede tener una metionina amino terminal.

Para péptido NTP situado en el citoplasma y/o núcleo, las células huésped se alteran primero mecánicamente o con detergente para liberar los contenidos intra-celulares en una solución tamponada. El péptido NTP puede aislarse después a partir de esta solución.

La purificación del péptido NTP de la solución puede realizarse usando diversas técnicas. Si la proteína se ha sintetizado de modo que contenga una marga tal como hexaHistidina (proteína NTP/hexaHis) u otro péptido pequeño tal como FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) o péptido de unión a calmodulina (Stratagene, La Jolla, CA) en su extremo carboxilo o amino, puede purificarse esencialmente en un procedimiento de una etapa pasando la solución a través de una columna de afinidad donde la matriz de la columna tiene alta afinidad por la marca o directamente por la proteína (es decir, un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente al péptido NTP). Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad a níquel, cinc y cobalto; por tanto, puede usarse cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados que emplea una resina de afinidad basada en níquel (como se usa en el sistema QIAexpress de Qiagen o el sistema Xpress de Invitrogen) o una resina de afinidad basada en cobalto (como se usa en el sistema Talon de BD Biosciences-CLON-TECH), para la purificación de proteína NTO/poliHis (véase por ejemplo, Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular biology*, Sección 10.11.8, John Wiley & Sons, New York [1993]).

Donde el péptido NTP se prepara sin una marca unida, y no están disponibles anticuerpos, pueden usarse otros procedimientos para purificación bien conocidos. Dichos procedimientos incluyen, sin limitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión molecular, HPLC, electroforesis en gel nativo en combinación con elución en gel, enfoque isoelectrico preparativo (máquina/técnica "Isoprime", Hoefer Scientific). En algunos casos, dos o más de estas técnicas pueden combinarse para conseguir una pureza aumentada.

Si se ha anticipado que el péptido NTP se encontrará principalmente intracelularmente, el material intracelular (incluyendo cuerpos de inclusión de bacterias gram negativas) puede extraerse de la célula huésped usando cualquier técnica convencional conocida por el especialista en la técnica. Por ejemplo, las células huésped pueden lisarse para liberar los contenidos del periplasma/citoplasma mediante French press, homogenización, y/o sonicación seguida de centrifugado. Si el péptido NTP ha formado cuerpos de inclusión en el citosol, los cuerpos de inclusión a menudo pueden unirse a las membranas celulares interna y/o externa y por tanto se encontrarán principalmente en el material sedimentado después del centrifugado. El material sedimentado puede tratarse después a pH extremos o con un agente caotrópico tal como un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea, o derivados de urea en presencia de un agente reductor tal como ditioeritrol a pH alcalino o tris carboxietilfosfina a pH ácido para liberar, separar por rotura, y solubilizar los cuerpos de inclusión. El péptido NTP en su forma ahora soluble puede analizarse después usando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o similares.

Si se desea aislar el péptido NTP, el aislamiento puede realizarse usando procedimientos convencionales tales como los que se muestran a continuación y en Marston y col. (*Meth. Enz.*, 182: 264-275 [1990]). En algunos casos, el péptido NTP puede no ser biológicamente activo después del aislamiento. Pueden usarse diversos procedimientos para "replegar" o convertir el polipéptido en su estructura terciaria y generar uniones disulfuro, para restaurar la actividad biológica. Dichos procedimientos incluyen exponer el polipéptido solubilizado a un pH por encima de 7 y en presencia de una concentración particular de un caotrope. La selección del caotrope es muy similar a las elecciones usadas para inducir la solubilización de los cuerpos de inclusión pero normalmente a una concentración más baja, y no es necesario el mismo caotrope que el usado para la solubilización. En la mayoría de los casos, la solución de replegamiento/oxidación contendrá también un agente reductor o el agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial redox particular que permita que se produzca el desplazamiento de disulfuros en la formación del puente o los puentes de cisteína de la proteína. Algunos de los pares redox usados comúnmente incluyen cisteína/cistamina, glutatión (GSH)/ditiobis GSH, cloruro cúprico, ditiotretol (DTT)/ditiano DTT, 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-b(ME). En muchos casos es necesario un codisolvente para aumentar la eficacia del replegamiento y los reactivos usados más comúnmente para este fin incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, y arginina.

Si no se forman cuerpos de inclusión del péptido NTP a un grado significativo en la célula huésped, el péptido NTP se encontrará principalmente en el sobrenadante después del centrifugado del homogenado celular, y el péptido NTP puede aislarse del sobrenadante usando procedimientos tales como los que se muestran a continuación.

En las situaciones en las que es preferible aislar parcial o completamente el péptido NTP, la purificación puede realizarse usando procedimientos convencionales bien conocidos por el especialista en la técnica. Dichos procedimientos incluyen, sin limitación, separación mediante electroforesis seguida de electroelución, diversos tipos de cromatografía (de inmunofinidad, de exclusión molecular, y/o de intercambio iónico), y/o cromatografía de líquidos de alta presión. En algunos casos, puede ser preferible usar más de uno de estos procedimientos para la purificación completa.

Además de preparar y purificar el péptido NTP usando técnicas de ADN recombinante, los péptidos NTP pueden prepararse mediante procedimientos de síntesis química (tales como síntesis de péptidos en fase sólida) usando técnicas conocidas en la técnica tales como las mostradas por Merrifield y col., (*J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149 [1963]), Houghten y col., (*Proc Natl Acad. Sci. USA*, 82: 5132 [1985]), y Stewart y Young (*Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. [1984]). Dichos polipéptidos pueden sintetizarse con o sin una metionina en el extremo amino. Los péptidos NTP sintetizados químicamente pueden oxidarse usando procedimientos que se muestran en estas referencias para formar puentes disulfuro. Se espera que los péptidos NTP tengan actividad biológica comparable a los péptidos NTP producidos de forma recombinante o purificados a partir de fuentes naturales, y de este modo pueden usarse de forma intercambiable con un péptido NTP recombinante o natural.

Los péptidos NTP pueden prepararse usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales conocidas por el especialista en la técnica. Estas técnicas incluyen procedimientos de acoplamiento químico (cf. Wunsch, E: "Methoden der organischen Chemie", volumen 15, Banda 1+2, *Synthese von Peptiden*, thime Verlag, Stuttgart (1974) y Barrany, G.; Marrifield, R. B.: "The Peptides", eds. E. Gross, J. Meienhofer, Volume 2, Chapter 1, págs. 1-284, Academic Press (1980)), procedimientos de acoplamiento enzimático (cf. Widmer, F. Johansen, J. T., *Calsberg Res. Commun.*, Vol. 44, págs. 37-46 (1979), y Kullmann, W.: "Enzymatic Peptide Synthesis", CRC Press Inc. Boca Raton, Fla. (1987), y Widmer, F. Johansen, J. T. en "Synthetic Peptides in Biology and Medicines", eds. Alitalo, K., Partanen, P., Väterli, A., págs. 79-86, Elsevier, Amsterdam (1985)), o una combinación de procedimientos químicos y enzimáticos si esta es ventajosa para el diseño y la economía del procedimiento. Usando las directrices y enseñanzas que se proporcionan en este documento, los especialistas en la técnica son capaces de modificar la secuencia peptídica del péptido NTP para fabricar un homólogo que tenga la misma o similar actividad biológica (bioactividad) que el péptido NTP original o nativo.

La presente invención también se refiere al uso de péptidos NTP para tratar afecciones que requieran la eliminación de células tales como tumores benignos y malignos, hiperplasia glandular (por ejemplo, de próstata), vello facial no deseado, verrugas, y tejido adiposo no deseado. Dicho uso comprende administrar a un mamífero en necesidad una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido NTP.

La afección puede ser, por ejemplo, tumores de pulmón, de mama, de estómago, de páncreas, de próstata, de vejiga, óseos, de ovarios, de piel, de riñón, del seno, de colon, de intestino, de estómago, del recto, de esófago, sanguíneos, de cerebro y sus cubiertas, de médula espinal y sus cubiertas, de músculo, de tejido conectivo, adrenales, de paratiroides, de tiroides, de útero, de testículos, de la pituitaria, de los órganos reproductores, de hígado, de vesícula biliar, oculares, del oído, de nariz, de garganta, de amígdalas, de boca, de los ganglios linfáticos y del sistema linfático, y de otros órganos.

Como se usa en este documento, la expresión "tumor maligno" pretende abarcar todas las formas de carcinomas, sarcomas y melanomas humanos que se producen de forma mal diferenciada, moderadamente diferenciada, y bien diferenciada.

Esta invención satisface una necesidad en la técnica de tratamientos que puedan eliminar tumores malignos con menor riesgo y menos efectos secundarios no deseables de la cirugía. La eliminación de tumores benignos en áreas quirúrgicamente arriesgadas tales como en localizaciones profundas en el cuerpo (por ejemplo, cerebro, corazón, pulmones, y otros) es particularmente necesaria.

El uso de péptidos NTP para tratar afecciones donde deben eliminarse células puede usarse junto con procedimientos convencionales para tratar dichas afecciones, tales como extirpación quirúrgica, quimioterapia, y radiación. Los péptidos NTP pueden administrarse antes, durante, o después de estos tratamientos convencionales.

La afección a tratar puede ser también hiperplasia, hipertrofia, o sobrecrecimiento de un tejido seleccionado entre el grupo constituido por pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovarios, piel, riñón, seno, colon, intestino, estómago, recto, esófago, sangre, cerebro y sus cubiertas, médula espinal y sus cubiertas, músculo, tejido conectivo, adrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículos, pituitaria, órganos reproductores, hígado, vesícula biliar, ocular, del oído, de nariz, de garganta, amígdalas, bucal, de los ganglios linfáticos y del sistema linfático.

Otra afección más que puede tratarse mediante los péptidos NTP de la invención es un tejido alterado por un virus, bacteria, o parásito seleccionado entre el grupo constituido por pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovarios, piel, riñón, seno, colon, intestino, estómago, recto, esófago, sangre, cerebro y sus cubiertas, médula espinal y sus cubiertas, músculo, tejido conectivo, adrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículos, pituitaria, órganos reproductores, hígado, vesícula biliar, ocular, del oído, de nariz, de garganta, amígdalas, bucal, de los ganglios linfáticos y del sistema linfático.

La afección a tratar puede ser también una malformación de un tejido seleccionado entre el grupo constituido por pulmón, mama, estómago, páncreas, próstata, vejiga, hueso, ovarios, piel, riñón, seno, colon, intestino, estómago, recto, esófago, sangre, cerebro y sus cubiertas, médula espinal y sus cubiertas, músculo, tejido conectivo, adrenal, paratiroides, tiroides, útero, testículos, pituitaria, órganos reproductores, hígado, vesícula biliar, ocular, del oído, de nariz, de garganta, amígdalas, bucal, de los ganglios linfáticos y del sistema linfático.

En particular, la afección a tratar puede ser hipertrofia amigdal, hiperplasia prostática o hemorroides. La afección a tratar puede ser una enfermedad vascular, tal como aterosclerosis o arteriosclerosis, una enfermedad vascular, tal como venas varicosas. La afección a tratar puede ser también una modificación cosmética de un tejido, tal como piel, ojo, oído, nariz, garganta, boca, músculo, tejido conectivo, pelo, o tejido mamario.

Las composiciones terapéuticas de péptidos NTP están dentro del alcance de la presente invención. Dichas composiciones pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido NTP mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El material vehículo puede ser agua para inyección, preferiblemente con otros materiales comunes en soluciones para administración a mamíferos. Típicamente, un péptido NTP para uso terapéutico se administrará en forma de una composición que comprende péptido NTP purificado junto con uno o más vehículos, excipientes, o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos ejemplares apropiados. Preferiblemente, el producto se formula en forma de un liofilizado usando excipientes apropiados (por ejemplo, sacarosa). Pueden incluirse otros vehículos, diluyentes, y excipientes convencionales como se desee. Las composiciones comprenden tampones conocidos por los especialistas en la técnica con un intervalo apropiado de valores de pH, incluyendo tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo.

Los péptidos NTP pueden emplearse en solitario, juntos o junto con otras composiciones farmacéuticas, tales como citoquinas, factores de crecimiento, antibióticos, agentes inductores de apoptosis, agentes anti-inflamatorios, y/o agentes quimioterapéuticos según sea apropiado para la indicación que se trata.

Esta invención también abarca composiciones terapéuticas de péptidos NTP que emplean dendrímeros, fulerenos, y otras moléculas, polímeros y macromoléculas sintéticas donde el péptido NTP se encierra en la molécula, polímero o macromolécula, por sí mismo o junto con otras especies de molécula tales como un marcador específico de tumores. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.714.166, *Bioactive and/or Targeted Dendrimer Conjugates*, proporciona un procedimiento para preparar y usar, entre otros, conjugados de polímeros dendríticos de al menos un dendrímero con un director o directores dirigido(s) y al menos un agente bioactivo conjugado a el(los).

Esta invención también abarca composiciones terapéuticas de péptidos NTP y vehículos de suministro de fármacos tales como emulsiones de lípidos, polímeros de micelas, microesferas poliméricas, polímeros electroactivos, hidrogeles y liposomas.

Las formas de dosificación sólida para administración oral incluyen aunque sin limitación, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En dichas formas de dosificación sólida, el compuesto activo se mezcla con al menos uno de los siguientes: (a) uno o más excipientes (o vehículos) inertes, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico; (b) cargas o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico; (c) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga; (d) humectantes, tales como glicerol; (e) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos, y carbonato sódico; (f) retardantes de solución, tales como parafina; (g) acelerantes de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (h) agentes humectantes, tales como alcohol acetílico y monoestearato de glicerol; (i) adsorbentes, tales como caolín y bentonita; y (j) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, o mezclas de los mismos. Para las cápsulas, comprimidos, y píldoras, las formas de dosificación pueden comprender también agentes tamponantes.

Las formas de dosificación líquida para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquida pueden comprender diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes, y emulsionantes. Los emulsionantes ejemplares son alcohol, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino, y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles, ésteres de ácidos grasos de sorbitano, o mezclas de estas sustancias, y similares.

Además de dichos diluyentes inertes, la composición puede incluir también adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, y agentes perfumantes.

Los niveles reales de dosificación de ingredientes activos en las composiciones de la invención puede modificarse para obtener una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido NTP que es eficaz para obtener una respuesta terapéutica deseada para una composición y procedimiento de administración particulares. El nivel de dosificación seleccionado depende por lo tanto del efecto terapéutico deseado, la vía de administración, la duración deseada del tratamiento, el tamaño del individuo o animal tratado, y otros factores.

Con mamíferos, incluyendo seres humanos, las cantidades eficaces pueden administrarse en base al área de superficie corporal. La interrelación de dosificaciones para animales de diversos tamaños y especies, y seres humanos (en base a mg/m^2 de superficie corporal) la describen E. J. Freireich y col., *Cancer Chemother. Rep.*, 50(4): 219 (1966). El área de superficie corporal puede determinarse aproximadamente a partir de la estatura y peso de un individuo (véase por ejemplo, Scientific Tables, Geigy, Pharmaceuticals, Ardsley, N.Y. págs. 537-538 (1970)). Usando las técnicas conocidas por los especialistas en la técnica, y usando las directrices y enseñanzas que se proporcionan en este

documento, los especialistas en la técnica serán capaces de determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de péptido NTP para uso en la presente invención.

La dosis diaria total del péptido NTP administrado a un huésped puede estar en una única dosis o en dosis divididas. Las composiciones de dosificación unitaria pueden comprender dichas cantidades de dichos submúltiplos de las mismas que puedan usarse para preparar la dosis diaria. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para un paciente en particular dependerá de diversos factores incluyendo el peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, periodo y vía de administración, potencia del fármaco administrado, velocidades de absorción y excreción, combinación con otros fármacos y la gravedad de la enfermedad particular tratada.

La composición del péptido NTP de acuerdo con la invención puede administrarse por vía intramuscular, por vía oral, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intracerebral (por vía intraparenquimatosa), por vía intracerebroventricular, por vía intratumoral, por vía intralesional, por vía intradérmica, por vía intratecal, por vía intranasal, por vía intraocular, por vía intraarterial, por vía tópica, por vía transdérmica, mediante un aerosol, infusión, inyección en embolada, dispositivo de implante, sistema de liberación sostenida etc.

El péptido NTP de la invención también puede administrarse mediante una vía transdérmica o transcutánea. Un ejemplo de dicha realización es el uso de un parche. En particular, puede prepararse un parche con una fina suspensión de péptido NTP en, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), o una mezcla de DMSO con aceite de semilla de algodón y ponerse en contacto con la piel de los mamíferos portadores del tumor, lejos del sitio de localización del tumor dentro de una bolsa de piel. Otros medios o mezclas de los mismos con otros disolventes o soportes sólidos podrían funcionar igualmente. El parche puede contener el compuesto del péptido NTP en forma de una solución o suspensión. El parche puede aplicarse después a la piel del paciente, por ejemplo, insertándolo en una bolsa de piel del paciente, formada plegando y manteniendo junta la piel por medio de puntos de sutura o grapas, u otros dispositivos de mantenimiento. Esta bolsa debe emplearse de tal manera que se asegure el contacto continuo con la piel sin la interferencia del mamífero. Además de usar una bolsa de piel, puede usarse cualquier dispositivo que asegure la colocación firme del parche en contacto con la piel. Por ejemplo, podría usarse un vendaje adhesivo para mantener el parche en su lugar sobre la piel.

El péptido NTP puede administrarse en una formulación o preparación de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos con la forma adecuada, por ejemplo películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (documentos U. S. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma L-glutamato de etilo (Sidman y col., *Biopolymers*, 22: 547-556 [1983]), poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer y col., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 [1981] y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 [1982]), acetato de etilvinilo (Langer y col., *supra*) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida pueden incluir también liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, Eppstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 [1985]; EP 36.676; EP 88.046; y EP 143.949).

Otra vía de administración para un péptido NTP de la invención es mediante infusión directa o indirecta del péptido NTP en el tumor o en otro tejido a tratar. Un ejemplo de dicha realización es la inyección directa del péptido NTP en el tumor o en otro tejido a tratar. El tratamiento puede estar constituido por una única inyección, múltiples inyecciones en una ocasión o una serie de inyecciones durante un periodo de horas, días o meses con la regresión o destrucción del tumor u otro tejido a tratar controlada por medio de biopsia, formación de imágenes u otros procedimientos de control del crecimiento tisular. La inyección en el tumor o en otro tejido a tratar puede ser mediante un dispositivo insertado en un orificio tal como la nariz, la boca, el oído, la vagina, el recto, o la uretra o a través de una incisión para alcanzar el tumor o tejido *in vivo* y puede realizarse junto con un sistema de formación de imágenes u óptico tal como una sonda de ultrasonidos o de fibra óptica para identificar el sitio apropiado para la inyección o inyecciones. Otro ejemplo de dicha realización es el uso de un dispositivo que pueda proporcionar una infusión constante del péptido NTP al tejido en el tiempo.

Otra vía de administración para un péptido NTP de la invención es junto con un procedimiento quirúrgico o procedimiento similar empleado para extirpar, retirar o matar o destruir de otra manera físicamente un tumor u otro tejido o elementos celulares que se necesite eliminar o destruir, en el que un péptido NTP de la invención se administra a el área o las áreas intermedias que rodean el área o las áreas donde se eliminó el tumor o el otro tejido para destruir o impedir el crecimiento de cualquier célula tumoral u otros elementos celulares no eliminados o destruidos por el procedimiento.

Otra vía de administración para un péptido NTP de la invención es mediante el implante de un dispositivo dentro del tumor o de otro tejido a tratar. Un ejemplo de dicho dispositivo es el implante de una oblea que contenga el péptido NTP en el tumor o en otro tejido a tratar. La oblea libera una dosis terapéutica del péptido NTP en el tejido en el tiempo. Como alternativa o adicionalmente, la composición puede administrarse por vía local mediante el implante en el área afectada de una membrana, esponja, u otro material apropiado que ha absorbido al péptido NTP. Donde se usa un dispositivo de implante, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro del péptido NTP puede ser directamente a través del dispositivo mediante embolada, o mediante administración continua, o mediante un catéter usando infusión continua.

ES 2 278 916 T3

Ejemplo 1

El fin de este ejemplo era determinar el efecto del péptido NTP N° 43 sobre el tejido en los sitios de inyección.

5 Se inyectó a ocho ratas normales en la piel y por vía subcutánea, cada una en cuatro focos diferentes, y en el músculo esquelético de las extremidades, cada una en dos focos diferentes, con péptido NTP N° 43 en solución salina en cantidades de 100 a 400 µl a concentraciones de 0,1-1 mg/ml suministrado desde jeringas de plástico a través de agujas del calibre 26 de acero inoxidable.

10 Se observaron los animales durante 24 horas y se sacrificaron sin dolor a las 24 horas. Los 48 focos individuales de infiltración se extirparon, se fijaron en formalina al 10%, se sumergieron en parafina, y se tiñeron y examinaron mediante procedimientos histopatológicos convencionales.

15 Se inyectó a grupos similares de ratas de control con (1) albúmina de suero bovino al 0,1% en solución salina, (2) suero humano normal, (3) solución salina fisiológica, (4) proteínas bacterianas no infecciosas, y (5) péptidos de control, y se purificaron y después se examinaron y sacrificaron como anteriormente, con los puntos de inyección extirpados tratados como anteriormente.

Resultados

20 La inyección del péptido NTP N° 43 produjo abundante necrosis aguda del tejido en los sitios de inyección. La necrosis era evidente en el tejido muscular, el tejido conectivo subcutáneo, y la dermis en los sitios donde se inyectó el péptido NTP N° 43. A las 24 horas, las células aparecían pálidas, encogidas, y necróticas, y había infiltración con células inflamatorias. La necrosis tenía correlación con las áreas de inyección y no parecía extenderse mucho más allá del sitio de inyección.

30 Aparte de las áreas de inflamación moderada, los controles no mostraron pruebas de necrosis o pérdida de células. Al contrario que las inyecciones de péptido NTP N° 43 donde campos enteros de capas de fibras musculares eran necróticas, los controles mostraron cambios musculares mínimos o ausentes. Las inyecciones de control tuvieron inflamación aguda moderada a mínima en los sitios de inyección y microhemorragias focales desde las agujas.

Ejemplo 2

El fin de este ejemplo era determinar el efecto del péptido NTP N° 17 sobre el tejido en los sitios de inyección.

35 Se inyectó a ocho ratas normales en la piel y por vía subcutánea, cada una en cuatro focos diferentes, y en el músculo esquelético de las extremidades, cada una en dos focos diferentes, con péptido NTP N° 17 en solución salina en cantidades de 100 a 400 µl a concentraciones de 0,1-1 mg/ml suministrado desde jeringas de plástico a través de agujas del calibre 26 de acero inoxidable.

40 Se observaron los animales durante 24 horas y se sacrificaron sin dolor a las 24 horas. Los 48 focos individuales de infiltración se extirparon, se fijaron en formalina al 10%, se sumergieron en parafina, y se tiñeron y examinaron mediante procedimientos histopatológicos convencionales.

45 Los controles fueron iguales a los del Ejemplo 1.

Resultados

50 La inyección del péptido NTP N° 17 produjo abundante necrosis aguda del tejido en los sitios de inyección. La necrosis era evidente en el tejido muscular, el tejido conectivo subcutáneo, y la dermis en los sitios donde se inyectó el péptido NTP N° 17. A las 24 horas, las células aparecían pálidas, encogidas, y necróticas, y había infiltración con células inflamatorias. La necrosis tenía correlación con las áreas de inyección y no parecía extenderse mucho más allá del sitio de inyección.

55 Aparte de las áreas de inflamación moderada, los controles no mostraron pruebas de necrosis o pérdida de células. Al contrario que las inyecciones de péptido NTP N° 17 donde campos enteros de capas de fibras musculares eran necróticas, los controles mostraron cambios musculares mínimos o ausentes. Las inyecciones de control tuvieron inflamación aguda moderada a mínima en los sitios de inyección y microhemorragias focales desde las agujas.

Ejemplo 3

El fin de este ejemplo era determinar el efecto del péptido NTP N° 20 sobre el tejido en los sitios de inyección.

65 Se inyectó a ocho ratas normales en la piel y por vía subcutánea, cada una en cuatro focos diferentes, y en el músculo esquelético de las extremidades, cada una en dos focos diferentes, con péptido NTP N° 20 en solución salina en cantidades de 100 a 400 µl a concentraciones de 0,1-1 mg/ml suministrado desde jeringas de plástico a través de agujas del calibre 26 de acero inoxidable.

ES 2 278 916 T3

Se observaron los animales durante 24 horas y se sacrificaron sin dolor a las 24 horas. Los 48 focos individuales de infiltración se extirparon, se fijaron en formalina al 10%, se sumergieron en parafina, y se tiñeron y examinaron mediante procedimientos histopatológicos convencionales.

5 Los controles fueron iguales a los del Ejemplo 1.

Resultados

10 La inyección del péptido NTP N° 20 produjo abundante necrosis aguda del tejido en los sitios de inyección. La muerte celular estaba presente en el tejido muscular, el tejido conectivo subcutáneo, y la dermis en los sitios donde se inyectó el péptido NTP N° 20. A las 24 horas, las células en esas áreas aparecían pálidas, encogidas, y necróticas, y había infiltración con células inflamatorias. La muerte celular y la necrosis estaban en las áreas de inyección y no parecía extenderse mucho más allá del sitio de inyección.

15 Aparte de las áreas de inflamación moderada, los controles no mostraron pruebas de necrosis o pérdida de células. Al contrario que las inyecciones de péptido NTP N° 20 donde campos enteros de capas de fibras musculares eran necróticas, los controles mostraron cambios musculares mínimos o ausentes. Las inyecciones de control tuvieron inflamación aguda moderada a mínima en los sitios de inyección y microhemorragias focales ocasionales desde las agujas.

20 Ejemplo 4

El fin de este ejemplo era determinar el efecto del péptido NTP N° 19 sobre el tejido en los sitios de inyección.

25 Se inyectó a ocho ratas normales en la piel y por vía subcutánea, cada una en cuatro focos diferentes, y en el músculo esquelético de las extremidades, cada una en dos focos diferentes, con péptido NTP N° 19 en solución salina en cantidades de 100 a 400 µl a concentraciones de 0,1-1 mg/ml suministrado desde jeringas de plástico a través de agujas del calibre 26 de acero inoxidable.

30 Se observaron los animales durante 24 horas y se sacrificaron sin dolor a las 24 horas. Los 48 focos individuales de infiltración se extirparon, se fijaron en formalina al 10%, se sumergieron en parafina, y se tiñeron y examinaron mediante procedimientos histopatológicos convencionales.

35 Los controles fueron iguales a los del Ejemplo 1.

Resultados

40 Como en los ejemplos anteriores, la inyección del péptido NTP N° 19 produjo muerte celular y necrosis del tejido en los sitios de inyección. Los controles mostraron cambios mínimos o ausentes constituidos por inflamación aguda en los sitios de inyección y microhemorragias focales desde las agujas.

Ejemplo 5

45 El fin de este ejemplo era determinar el efecto del péptido NTP N° 16 sobre el tejido en los sitios de inyección.

Se inyectó a ocho ratas normales en la piel y por vía subcutánea, cada una en cuatro focos diferentes, y en el músculo esquelético de las extremidades, cada una en dos focos diferentes, con péptido NTP N° 16 en solución salina en cantidades de 100 a 400 µl a concentraciones de 0,1-1 mg/ml suministrado desde jeringas de plástico a través de agujas del calibre 26 de acero inoxidable.

50 Se observaron los animales durante 24 horas y se sacrificaron sin dolor a las 24 horas. Los 48 focos individuales de infiltración se extirparon, se fijaron en formalina al 10%, se sumergieron en parafina, y se tiñeron y examinaron mediante procedimientos histopatológicos convencionales.

55 Los controles fueron iguales a los del Ejemplo 1.

Resultados

60 Como en los ejemplos anteriores, la inyección del péptido NTP N° 16 produjo muerte celular y necrosis del tejido en los sitios de inyección. Los controles mostraron cambios mínimos o ausentes constituidos por inflamación aguda en los sitios de inyección y microhemorragias focales desde las agujas.

Ejemplo 6

65 El fin de este ejemplo era determinar el efecto del péptido NTP N° 15 sobre el tejido en los sitios de inyección.

Se inyectó a ocho ratas normales en la piel y por vía subcutánea, cada una en cuatro focos diferentes, y en el músculo esquelético de las extremidades, cada una en dos focos diferentes, con péptido NTP N° 15 en solución salina

ES 2 278 916 T3

en cantidades de 100 a 400 ml a concentraciones de 0,1-1 mg/ml suministrado desde jeringas de plástico a través de agujas del calibre 26 de acero inoxidable.

Se observaron los animales durante 24 horas y se sacrificaron sin dolor a las 24 horas. Los 48 focos individuales de infiltración se extirparon, se fijaron en formalina al 10%, se sumergieron en parafina, y se tiñeron y examinaron mediante procedimientos histopatológicos convencionales.

Los controles fueron iguales a los del Ejemplo 1.

Resultados

Como en los ejemplos anteriores, la inyección del péptido NTP N° 15 produjo muerte celular y necrosis del tejido en los sitios de inyección. Los controles mostraron cambios mínimos o ausentes constituidos por inflamación aguda en los sitios de inyección y microhemorragias focales desde las agujas.

Ejemplo 7

El fin de este ejemplo era determinar el efecto del péptido NTP N° 14 sobre el tejido en los sitios de inyección.

Se inyectó a ocho ratas normales en la piel y por vía subcutánea, cada una en cuatro focos diferentes, y en el músculo esquelético de las extremidades, cada una en dos focos diferentes, con péptido NTP N° 14 en solución salina en cantidades de 100 a 400 ml a concentraciones de 0,1-1 mg/ml suministrado desde jeringas de plástico a través de agujas del calibre 26 de acero inoxidable.

Se observaron los animales durante 24 horas y se sacrificaron sin dolor a las 24 horas. Los 48 focos individuales de infiltración se extirparon, se fijaron en formalina al 10%, se sumergieron en parafina, y se tiñeron y examinaron mediante procedimientos histopatológicos convencionales.

Los controles fueron iguales a los del Ejemplo 1.

Resultados

Como en los ejemplos anteriores, la inyección del péptido NTP N° 15 produjo muerte celular y necrosis del tejido en los sitios de inyección. Los controles mostraron cambios mínimos o ausentes constituidos por inflamación aguda en los sitios de inyección y microhemorragias focales desde las agujas.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido NTP constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID N° 10, la SEC ID N° 11, la SEC ID N° 12, la SEC ID N° 13, la SEC ID N° 14, la SEC ID N° 15, la SEC ID N° 16, la SEC ID N° 17, la SEC ID N° 18, la SEC ID N° 19, la SEC ID N° 20, la SEC ID N° 21, la SEC ID N° 22, la SEC ID N° 23, la SEC ID N° 24, la SEC ID N° 25, la SEC ID N° 26, la SEC ID N° 27, la SEC ID N° 28, la SEC ID N° 29, la SEC ID N° 30, la SEC ID N° 31, la SEC ID N° 32, la SEC ID N° 33, la SEC ID N° 34, la SEC ID N° 35, la SEC ID N° 36, la SEC ID N° 37, la SEC ID N° 38, la SEC ID N° 39, la SEC ID N° 40, la SEC ID N° 41, la SEC ID N° 42, la SEC ID N° 43, la SEC ID N° 44, la SEC ID N° 45, la SEC ID N° 46, la SEC ID N° 47, la SEC ID N° 48, la SEC ID N° 49, la SEC ID N° 50, la SEC ID N° 51 y la SEC ID N° 52.

2. Un péptido NTP de acuerdo con la reivindicación 1 para uso como medicamento.

3. Uso de un péptido NTP de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección seleccionada entre el grupo constituido por: un tumor benigno o maligno; una hiperplasia, hipertrofia, o sobrecrecimiento; un tejido alterado por un virus, bacteria, o parásito; una malformación de un tejido; hipertrofia amigdal; hiperplasia prostática; una modificación cosmética del tejido; una enfermedad vascular; hemorroides; venas varicosas; aterosclerosis o arteriosclerosis; una enfermedad inflamatoria; enfermedad autoinmune; enfermedad metabólica; enfermedad hereditaria/genética; enfermedad traumática; enfermedad de deficiencia nutricional; enfermedad infecciosa; enfermedad amiloide; enfermedad de fibrosis; malformación congénita; enfermedad de deficiencia enzimática; enfermedad de radiación; enfermedad endocrina; y enfermedad degenerativa.

4. Una composición que comprende un péptido NTP de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo del mismo.

Figura 1

AD7C-NTP [SEC ID N° . 1]

```

1 1 ttttttttttttgag ATG GAG TTT TCG CTC TTG TTG CCC AGG CTG GAG TGC AAT GGC GCA ATC 62
1 M E F S L L L L P R L E C N G A I 16

63 TCA GCT CAC CGC AAC CTC CGC CTC CCG GGT TCA AGC GAT TCT CCT GCC TCA GCC TCC CCA 122
17 S A H R N L R L P G S S D S P A S A S P 36

123 GTA GCT GGG ATT ACA GGC ATG TGC ACC CAC GCT CGG CTA ATT TTG TAT TTT TTT TTA GTA 182
37 V A G I T G N C T H A R L I L Y P F L V 56

183 GAG ATG GAG TTT CTC CAT GTT GGT CAG GCT GGT CTC GAA CTC CCG ACC TCA GAT GAT CCC 242
57 E N E F L H V G Q A G L E L P T S D D P 76

243 TCC GTC TCG GCC TCC CAA AGT GCT AGA TAC AGG ACT GGC CAC CAT GCC CGG CTC TGC CTG 302
77 S V S A S Q S A R Y R T G H H A R L C L 96

303 GCT AAT TTT TGT GGT AGA AAC AGG GTT TCA CTG ATG TGC CCA AGC TGG TCT CCT GAG CTC 362
97 A N F C G R N R V S L M C P S W S P E L 116

363 AAG CAG TCC ACC TGC CTC AGC CTC CCA AAG TGC TGG GAT TAC AGG CGT GCA GCC GTG CCT 422
117 K Q S T C L S L P K C W D Y R R A A V P 136

423 GGC CTT TTT ATT TTA TTT TTT TTA AGA CAC AGG TGT CCC ACT CTT ACC CAG GAT GAA GTG 482
137 G L P I L P P L R H R C P T L T Q D E V 156

483 CAG TGG TGT GAT CAC AGC TCA CTG CAG CCT TCA ACT CCT GAG ATC AAG CAT CCT CCT GCC 542
157 Q W C D H S S L Q P S T P E I K H P P A 176

543 TCA GCC TCC CAA GTA GCT GGG ACC AAA GAC ATG CAC CAC TAC ACC TGG CTA ATT TTT ATT 602
177 S A S Q V A G T K D M H H Y T W L I F I 196

603 TTT ATT TTT AAT TTT TTG AGA CAG AGT CTC AAC TCT CTC ACC CAG GCT GGA GTG CAG TGG 662
197 F I F N P L R Q S L N S V T Q A G V Q W 216

663 CGC AAT CTT GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG TTC AAG TTA TTC TCC TGC CCC AGC 722
217 R N L G S L Q P L P P G F K L P S C P S 236

723 CTC CTG AGT AGC TGG GAC TAC AGG CGC CCA CCA CGC CTA GCT AAT TTT TTT GTA TTT TTA 782
237 L L S S W D Y R R P P R L A N P F V F L 256

783 GTA GAG ATG GGG TTC ACC ATG TTC GCC AGG TTG ATC TTG ATC TCT GGA CCT TGT GAT CTG 842
257 V E M G F T H F A R L I L I S G P C D L 276

843 CCT GCC TCG GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA GGC GTG AGC CAC CAC GCC CGG CTT ATT 902
277 P A S A S Q S A G I T G V S H H A R L I 296

903 TTT AAT TTT TGT TTG TTT GAA ATG GAA TCT CAC TCT GTT ACC CAG GCT GGA GTG CAA TGG 962
297 F N F C L F E M E S H S V T Q A G V Q W 316

963 CCA AAT CTC GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG CTC AAG CGA TTC TCC TGT CTC AGC 1022
317 P N L G S L Q P L P P G L K R P S C L S 336

1023 CTC CCA AGC AGC TGG GAT TAC GGG CAC CTG CCA CCA CAC CCC GCT AAT TTT TGT ATT TTC 1082
337 L P S S W D Y G H L P P H P A N F C I F 356

1083 ATT AGA GGC GGG GTT TCA CCA TAT TTG TCA GGC TGG TCT CAA ACT CCT GAC CTC AGG tgac 1143
357 I R G G V S P Y L S G W S Q T P D L R 375

1144 ccacctgcctcagccttccaaagtgctgggattacaggcgctgagccacctcaccagccggctaatattagataaaaaaat 1223

1224 atgtagcaaatggggggtcttgcctatgttgccaggctgggtctcaaaacttctggttcatgcaatccttccaaatgagcca 1303

1304 caacacccagccagtcacattttttaaacagttacatctttatttttagtatactagaaagtaatacaataaacatgtcaa 1383

1384 acctgcaaaattcagtagtaacagagttctctttataactttttaaacaaagcttttagagca 1442

```


Figura 2

NTP[122] [SEC ID N° 2]

```

1   Met-Met-Val-Cys-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-Lys-
    M  M  V  C  W  N  R  F  G  K

11  Trp-Val-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Ile-Phe-Asn-
    W  V  Y  F  I  S  A  I  F  N

21  Phe-Gly-Pro-Arg-Tyr-Leu-Tyr-His-Gly-Val-
    F  G  P  R  Y  L  Y  H  G  V

31  Pro-Phe-Tyr-Phe-Leu-Ile-Leu-Val-Arg-Ile-
    P  F  Y  F  L  I  L  V  R  I

41  Ile-Ser-Phe-Leu-Ile-Gly-Asp-Met-Glu-Asp-
    I  S  F  L  I  G  D  M  E  D

51  Val-Leu-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Leu-Lys-Arg-
    V  L  L  N  C  T  L  L  K  R

61  Ser-Ser-Arg-Phe-Arg-Phe-Trp-Gly-Ala-Leu-
    S  S  R  F  R  F  W  G  A  L

71  Val-Cys-Ser-Met-Asp-Ser-Cys-Arg-Phe-Ser
    V  C  S  M  D  S  C  R  F  S

81  Arg-Val-Ala-Val-Thr-Tyr-Arg-Phe-Ile-Thr-
    R  V  A  V  T  Y  R  F  I  T

91  Leu-Leu-Asn-Ile-Pro-Ser-Pro-Ala-Val-Trp-
    L  L  N  I  P  S  P  A  V  W

101 Met-Ala-Arg-Asn-Thr-Ile-Asp-Gln-Gln-Val-
    M  A  R  N  T  I  D  Q  Q  V

111 Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-
    L  S  R  I  K  L  E  I  K  R

121 Cys-Leu
    C  L

```

Figura 3

NTP[112] [SEC ID N° 3]

```

1   Met-Ala-Gln-Ser-Arg-Leu-Thr-Ala-The-Ser-
    M  A  Q  S  R  L  T  A  T  S

11  Ala-Ser-Arg-Val-Gln-Ala-Ile-Leu-Leu-Ser-
    A  S  R  V  Q  A  I  L  L  S

21  Gln-Pro-Pro-Lys-Gln-Leu-Gly-Leu-Arg-Ala-
    Q  P  P  K  Q  L  G  L  R  A

31  Pro-Ala-Asn-Thr-Pro-Leu-Ile-Phe-Val-Phe-
    P  A  N  T  P  L  I  F  V  F

41  Ser-Leu-Glu-Ala-Gly-Phe-His-His-Ile-Cys-
    S  L  E  A  G  F  H  H  I  C

51  Gln-Ala-Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Thr-Ser-Gly-
    Q  A  G  L  K  L  L  T  S  G

61  Asp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ala-Phe-Gln-Ser-Ala-
    D  P  P  A  S  A  F  Q  S  A

71  Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His-Leu-Thr-Gln-
    G  I  T  G  V  S  H  L  T  Q

81  Pro-Ala-Asn-Leu-Asp-Lys-Lys-Ile-Cys-Ser-
    P  A  N  L  D  K  K  I  C  S

91  Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Tyr-Val-Ala-Gln-Ala-
    N  G  G  S  C  Y  V  A  Q  A

101 Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Ala-Ser-Cys-Asn-Pro-
    G  L  K  L  L  A  S  C  N  P

111 Ser-Lys
    S  K

```

Figura 4

NTP[106] [SEC ID N° 4]

```

1   Met-Trp-Thr-Leu-Lys-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-
    M   W   T   L   K   S   S   L   V   L

11  Leu-Leu-Cys-Leu-Thr-Cys-Ser-Tyr-Ala-Phe-
    L   L   C   L   T   C   S   Y   A   F

21  Met-Phe-Ser-Ser-Leu-Arg-Gln-Lys-Thr-Ser-
    M   P   S   S   L   R   Q   K   T   S

31  Glu-Pro-Gln-Gly-Lys-Val-Pro-Cys-Gly-Glu-
    E   P   Q   G   K   V   P   C   G   E

41  His-Phe-Arg-Ile-Arg-Gln-Asn-Leu-Pro-Glu-
    H   F   R   I   R   Q   N   L   P   E

51  His-Thr-Gln-Gly-Trp-Leu-Gly-Ser-Lys-Trp-
    H   T   Q   G   W   L   G   S   K   W

61  Leu-Trp-Leu-Leu-Phe-Ala-Val-Val-Pro-Phe-
    L   W   L   L   F   A   V   V   P   F

71  Val-Ile-Leu-Lys-Cys-Gln-Arg-Asp-Ser-Glu-
    V   I   L   K   C   Q   R   D   S   E

81  Lys-Asn-Lys-Val-Arg-Met-Ala-Pro-Phe-Phe-
    K   N   K   V   R   M   A   P   F   F

91  Leu-His-His-Ile-Asp-Ser-Ile-Ser-Gly-Val-
    L   H   H   I   D   S   I   S   G   V

101 Ser-Gly-Lys-Arg-Met-Phe
    S   G   K   R   M   F

```

Figura 5

NTP [106] [SEC ID N° 5]

```

1   Met-Phe-Phe-Val-Leu-Tyr-Arg-Phe-Cys-Phe-
    M   F   F   V   L   Y   R   F   C   F

11  Cys-Phe-Phe-Glu-Thr-Glu-Ser-His-Ser-Leu-
    C   F   F   E   T   E   S   H   S   L

21  Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Cys-Glu-Leu-
    T   Q   A   G   V   Q   W   C   E   L

31  Gly-Ser-Pro-Gln-Pro-Leu-Pro-Ser-Gly-Phe-
    G   S   P   Q   P   L   P   S   G   F

41  Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Leu-Ser-
    K   R   F   S   C   L   S   L   L   S

51  Ser-Trp-Asp-Tyr-Ser-His-Glu-Pro-Pro-His-
    S   W   D   Y   S   H   E   P   P   H

61  Pro-Val-Ile-Cys-Ser-Phe-Leu-Met-Glu-Lys-
    P   V   I   C   S   F   L   M   E   K

71  Cys-Leu-Ile-Leu-Tyr-Lys-Pro-Asn-Gly-Asp-
    C   L   I   L   Y   K   P   N   G   D

81  Thr-Ile-Gly-Pro-Ile-Leu-Val-Gln-Gln-Gly-
    T   I   G   P   I   L   V   Q   Q   G

91  Lys-Arg-Gln-Lys-Leu-Tyr-Ile-Ser-Ala-Asp-
    K   R   Q   K   L   Y   I   S   A   D

100 Leu-Val-His-Leu-Ile-Ala
    L   V   H   L   I   A

```

Figura 6

NTP[98] [SEC ID N° . 6]

```

1   Glu-Ala-Tyr-Tyr-Thr-Met-Leu-His-Leu-Pro-
    E  A  Y  Y  T  M  L  H  L  P

11  Thr-Thr-Asn-Arg-Pro-Lys-Ile-Ala-His-Cys
    T  T  N  R  P  K  I  A  H  C

21  Ile-Leu-Phe-Asn-Gln-Pro-His-Ser-Pro-Arg-
    I  L  F  N  Q  P  H  S  P  R

31  Ser-Asn-Ser-His-Ser-His-Pro-Asn-Pro-Leu-
    S  N  S  H  S  H  P  N  P  L

41  Lys-Leu-His-Arg-Arg-Ser-His-Ser-His-Asn-
    K  L  H  R  R  S  H  S  H  N

51  Arg-Pro-Arg-Ala-Tyr-Ile-Leu-Ile-Thr-Ile-
    R  P  R  A  Y  I  L  I  T  I

61  Leu-Pro-Ser-Lys-Leu-Lys-Leu-Arg-Thr-His-
    L  P  S  K  L  K  L  R  T  H

71  Ser-Gln-Ser-His-His-Asn-Pro-Leu-Ser-Arg-
    S  Q  S  H  H  N  P  L  S  R

81  Thr-Ser-Asn-Ser-Thr-Pro-Thr-Asn-Ser-Phe-
    T  S  N  S  T  P  T  N  S  F

91  Leu-Met-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Arg
    L  M  T  S  S  K  P  R

```

Figura 7

NTP[75] [SEC ID Nº 7]

```

1   Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-
    S  S  S  L  G  L  P  K  C  W

11  Asp-Tyr-Arg-His-Glu-Leu-Leu-Ser-Leu-Ala-
    D  Y  R  H  E  L  L  S  L  A

21  Leu-Met-Ile-Asn-Phe-Arg-Val-Met-Ala-Cys
    L  M  I  N  F  R  V  M  A  C

31  Thr-Phe-Lys-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Arg-Gln-
    T  F  K  Q  H  I  E  L  R  Q

41  Lys-Ile-Ser-Ile-Val-Pro-Arg-Lys-Leu-Cys-
    K  I  S  I  V  P  R  K  L  C

51  Cys-Met-Gly-Pro-Val-Cys-Pro-Val-Lys-Ile-
    C  M  G  P  V  C  P  V  K  I

61  Ala-Leu-Leu-Thr-Ile-Asn-Gly-His-Cys-Thr-
    A  L  L  T  I  N  G  H  C  T

71  Trp-Leu-Pro-Ala-Ser
    W  L  P  A  S

```

Figura 8

NTP[68] [SEC ID N° 8]

```

1   Met-Phe-Val-Phe-Cys-Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-
    M   F   V   F   C   L   I   L   N   R

11  Glu-Lys-Ile-Lys-Gly-Gly-Asn-Ser-Ser-Phe-
    E   K   I   K   G   G   N   S   S   F

21  Phe-Leu-Leu-Ser-Phe-Phe-Phe-Ser-Phe-Gln-
    F   L   L   S   F   F   F   S   F   Q

31  Asn-Cys-Cys-Gln-Cys-Phe-Gln-Cys-Arg-Thr-
    N   C   C   Q   C   F   Q   C   R   T

41  Thr-Glu-Gly-Tyr-Ala-Val-Glu-Cys-Phe-Tyr-
    T   E   G   Y   A   V   E   C   F   Y

51  Cys-Leu-Val-Asp-Lys-Ala-Ala-Phe-Glu-Cys-
    C   L   V   D   K   A   A   F   E   C

61  Trp-Trp-Phe-Tyr-Ser-Phe-Asp-Thr
    W   W   F   Y   S   F   D   T

```

Figura 9

NTP[61] [SEC ID N° 9]

```

1   Met-Glu-Pro-His-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Gly-
    M   E   P   H   T   V   A   Q   A   G

11  Val-Pro-Gln-His-Asp-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-
    V   P   Q   H   D   L   G   S   L   Q

21  Ser-Leu-Leu-Pro-Arg-Phe-Lys-Arg-Phe-Ser-
    S   L   L   P   R   F   K   R   F   S

31  Cys-Leu-Ile-Leu-Pro-Lys-Ile-Trp-Asp-Tyr-
    C   L   I   L   P   K   I   W   D   Y

41  Arg-Asn-Met-Asn-Thr-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-
    R   N   M   N   T   A   L   I   K   R

51  Asn-Arg-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-
    N   R   Y   T   P   E   T   G   R   K

61  Ser
    S
    
```


ES 2 278 916 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NYMOX CORPORATION
AVERBACK, Paul A.

<120> PÉPTIDOS EFICACES EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES Y OTRAS AFECCIONES QUE REQUIEREN LA ELIMINACIÓN O DESTRUCCIÓN DE CÉLULAS

<130> 10107-30

<140> PCT/CA02/00759

<141> 24-05-2002

<150> US 60/293.156

<151> 25-05-2001

<160> 53

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 375

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

Met Glu Phe Ser Leu Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys Asn Gly Ala Ile
 1          5          10          15

Ser Ala His Arg Asn Leu Arg Leu Pro Gly Ser Ser Asp Ser Pro Ala
          20          25          30

Ser Ala Ser Pro Val Ala Gly Ile Thr Gly Met Cys Thr His Ala Arg
          35          40          45

Leu Ile Leu Tyr Phe Phe Leu Val Glu Met Glu Phe Leu His Val Gly
          50          55          60

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

Ser Gln Ser Ala Arg Tyr Arg Thr Gly His His Ala Arg Leu Cys Leu
          85          90          95

Ala Asn Phe Cys Gly Arg Asn Arg Val Ser Leu Met Cys Pro Ser Trp
          100          105          110

Ser Pro Glu Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu Pro Lys Cys Trp
          115          120          125

Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile Leu Phe Phe Leu
          130          135          140

Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val Gln Trp Cys Asp
          145          150          155          160

His Ser Ser Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Ile Lys His Pro Pro Ala

```

ES 2 278 916 T3

	165	170	175
5	Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His His Tyr Thr Trp 180 185 190		
	Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln Ser Leu Asn Ser 195 200 205		
10	Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro 210 215 220		
	Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser 225 230 235 240		
15	Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe Phe Val Phe Leu 245 250 255		
	Val Glu Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile Leu Ile Ser Gly 260 265 270		
20	Pro Cys Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly 275 280 285		
	Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys Leu Phe Glu Met 290 295 300		
25	Glu Ser His Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Pro Asn Leu Gly 305 310 315 320		
30	Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser 325 330 335		
	Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro His Pro Ala Asn 340 345 350		
35	Phe Cys Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr Leu Ser Gly Trp 355 360 365		
40	Ser Gln Thr Pro Asp Leu Arg 370 375		

<210> 2

45 <211> 122

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 2

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

65

ES 2 278 916 T3

	50	55	60
5	Arg Phe Trp Gly Ala Leu Val Cys Ser Met Asp Ser Cys Arg Phe Ser 65 70 75 80		
	Arg Val Ala Val Thr Tyr Arg Phe Ile Thr Leu Leu Asn Ile Pro Ser 85 90 95		
10	Pro Ala Val Trp Met Ala Arg Asn Thr Ile Asp Gln Gln Val Leu Ser 100 105 110		
	Arg Ile Lys Leu Glu Ile Lys Arg Cys Leu 115 120		

15
 <210> 3
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25	Met Ala Gln Ser Arg Leu Thr Ala Thr Ser Ala Ser Arg Val Gln Ala 1 5 10 15
30	Ile Leu Leu Ser Gln Pro Pro Lys Gln Leu Gly Leu Arg Ala Pro Ala 20 25 30
	Asn Thr Pro Leu Ile Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Gly Phe His His 35 40 45
35	Ile Cys Gln Ala Gly Leu Lys Leu Leu Thr Ser Gly Asp Pro Pro Ala 50 55 60
40	Ser Ala Phe Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly Val Ser His Leu Thr Gln 65 70 75 80
	Pro Ala Asn Leu Asp Lys Lys Ile Cys Ser Asn Gly Gly Ser Cys Tyr 85 90 95
45	Val Ala Gln Ala Gly Leu Lys Leu Leu Ala Ser Cys Asn Pro Ser Lys 100 105 110

50
 <210> 4
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 278 916 T3

<400> 4

5 Met Trp Thr Leu Lys Ser Ser Leu Val Leu Leu Cys Leu Thr Cys
1 5 10 15
Ser Tyr Ala Phe Met Phe Ser Ser Leu Arg Gln Lys Thr Ser Glu Pro
20 25 30
10 Gln Gly Lys Val Pro Cys Gly Glu His Phe Arg Ile Arg Gln Asn Leu
35 40 45
Pro Glu His Thr Gln Gly Trp Leu Gly Ser Lys Trp Leu Trp Leu Leu
50 55 60
15 Phe Ala Val Val Pro Phe Val Ile Leu Lys Cys Gln Arg Asp Ser Glu
65 70 75 80
20 Lys Asn Lys Val Arg Met Ala Pro Phe Phe Leu His His Ile Asp Ser
85 90 95
Ile Ser Gly Val Ser Gly Lys Arg Met Phe
100 105

25
<210> 5
<211> 106
<212> PRT
30 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

35 Met Phe Phe Val Leu Tyr Arg Phe Cys Phe Cys Phe Phe Glu Thr Glu
1 5 10 15
Ser His Ser Leu Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Cys Glu Leu Gly Ser
20 25 30
40 Pro Gln Pro Leu Pro Ser Gly Phe Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser Leu
35 40 45
Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Ser His Glu Pro Pro His Pro Val Ile Cys
50 55 60
45 Ser Phe Leu Met Glu Lys Cys Leu Ile Leu Tyr Lys Pro Asn Gly Asp
65 70 75 80
50 Thr Ile Gly Pro Ile Leu Val Gln Gln Gly Lys Arg Gln Lys Leu Tyr
85 90 95
Ile Ser Ala Asp Leu Val His Leu Ile Ala
100 105
55

<210> 6
<211> 98
60 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 278 916 T3

<400> 6

5 Glu Ala Tyr Tyr Thr Met Leu His Leu Pro Thr Thr Asn Arg Pro Lys
 1 5 10 15

 Ile Ala His Cys Ile Leu Phe Asn Gln Pro His Ser Pro Arg Ser Asn
 20 25 30

10 Ser His Ser His Pro Asn Pro Leu Lys Leu His Arg Arg Ser His Ser
 35 40 45

 His Asn Arg Pro Arg Ala Tyr Ile Leu Ile Thr Ile Leu Pro Ser Lys
 50 55 60

15 Leu Lys Leu Arg Thr His Ser Gln Ser His His Asn Pro Leu Ser Arg
 65 70 75 80

20 Thr Ser Asn Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Leu Met Thr Ser Ser Lys
 85 90 95

Pro Arg

25 <210> 7
 <211> 75
 <212> PRT
30 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

35 Ser Ser Ser Leu Gly Leu Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg His Glu Leu
 1 5 10 15

 Leu Ser Leu Ala Leu Met Ile Asn Phe Arg Val Met Ala Cys Thr Phe
 20 25 30

40 Lys Gln His Ile Glu Leu Arg Gln Lys Ile Ser Ile Val Pro Arg Lys
 35 40 45

45 Leu Cys Cys Met Gly Pro Val Cys Pro Val Lys Ile Ala Leu Leu Thr
 50 55 60

 Ile Asn Gly His Cys Thr Trp Leu Pro Ala Ser
 65 70 75

50 <210> 8
 <211> 68
55 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 278 916 T3

<400> 8

```

5      Met Phe Val Phe Cys Leu Ile Leu Asn Arg Glu Lys Ile Lys Gly Gly
      1           5           10           15

      Asn Ser Ser Phe Phe Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ser Phe Gln Asn Cys
           20           25           30

10     Cys Gln Cys Phe Gln Cys Arg Thr Thr Glu Gly Tyr Ala Val Glu Cys
           35           40           45

      Phe Tyr Cys Leu Val Asp Lys Ala Ala Phe Glu Cys Trp Trp Phe Tyr
           50           55           60

15     Ser Phe Asp Thr
      65

```

20 <210> 9

<211> 61

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

```

30     Met Glu Pro His Thr Val Ala Gln Ala Gly Val Pro Gln His Asp Leu
      1           5           10           15

      Gly Ser Leu Gln Ser Leu Leu Pro Arg Phe Lys Arg Phe Ser Cys Leu
           20           25           30

35     Ile Leu Pro Lys Ile Trp Asp Tyr Arg Asn Met Asn Thr Ala Leu Ile
           35           40           45

      Lys Arg Asn Arg Tyr Thr Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser
           50           55           60

```

<210> 10

45 <211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 10

```

      Met Glu Phe Ser Leu Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys Asn Gly Ala
      1           5           10           15

```

55 <210> 11

<211> 15

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

```

65     Gly Ala Ile Ser Ala His Arg Asn Leu Arg Leu Pro Gly Ser Ser
      1           5           10           15

```

ES 2 278 916 T3

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

[illegible]

Thr

<210> 13

15 $\langle 210 \rangle$ 13
 $\langle 211 \rangle$ 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20
 <400> 13

Met Cys Thr His Ala Arg Leu Ile Leu Tyr Phe Phe Leu Val Glu Met
1 5 10 15

25

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

35 Tyr Phe Phe Leu Val Glu Met Glu Phe Leu His
1 5 10

<210> 15

<211> 11

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

45 Val Gly Gln Ala Gly Leu Glu Leu Pro Thr Ser
1 5 10

<210> 16

50 $\langle 211 \rangle$ 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 16

Asp Asp Pro Ser Val Ser Ala Ser Gln Ser Ala Arg Tyr Arg Thr Gly
1 5 10 15

60 **His**

<210> 17

<211> 14

65 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 278 916 T3

<400> 17

Thr Gly His His Ala Arg Leu Cys Leu Ala Asn Phe Cys Gly
1 5 10

5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

Ala Asn Phe Cys Gly Arg Asn Arg Val Ser Leu Met Cys Pro Ser Trp
1 5 10 15

Ser

20 <210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 19

Pro Glu Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu Pro Lys Cys Trp Asp
1 5 10 15

Tyr Arg Arg

<210> 20

35 <211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 20

Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg
1 5 10 15

45 Arg

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

Ser Thr Cys Leu Ser Leu Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg
1 5 10

55

<210> 22

<211> 11

60 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 278 916 T3

<400> 22

Leu Ser Leu Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg
1 5 10

5

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu
1 5 10

15

<210> 24

<211> 19

20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile Leu
1 5 10 15

25

30

Phe Phe Leu

<210> 25

35

<211> 24

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 25

Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile Leu
1 5 10 15

45

Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro
20

<210> 26

50

<211> 38

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile Leu
1 5 10 15

60

Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val Gln
20 25 30

Trp Cys Asp His Ser Ser
35

65

<210> 27

<211> 5

ES 2 278 916 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 27

Trp Asp Tyr Arg Arg
1 5

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 28

Phe Ile Leu Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu
1 5 10

20

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

Phe Ile Leu Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp
1 5 10 15

Glu Val Gln Trp Cys Asp His Ser Ser
20 25

35

 $\langle 210 \rangle$ 30

<211> 29

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

 $\langle 400 \rangle$ 30

His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val Gln Trp Cys Asp His
1 5 10 15

Ser Ser Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Ile Lys His Pro
20 25

50

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

Pro Ala Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His
1 5 10

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 278 916 T3

<400> 32

Asp Met His His Tyr Thr Trp Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe
1 5 10 15

5

Leu Arg

<210> 33

10 <211> 19

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 33

His Tyr Thr Trp Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln
1 5 10 15

20

Ser Leu Asn

<210> 34

<211> 45

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

30

Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly Ser Leu Gln
1 5 10 15

35

Pro Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser
20 25 30

Ser Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe
35 40 45

40 <210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 35

Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser Trp Asp
1 5 10 15

50

Tyr Arg Arg

<210> 36

55 <211> 24

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60 <400> 36

Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg
1 5 10 15

65

Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe
20

ES 2 278 916 T3

```

<210> 37
<211> 14
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 37
      Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg
      1          5          10

<210> 38
<211> 10
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
      Ser Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg
      1          5          10

<210> 39
25 <211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
      Ser Ser Trp Asp Tyr
      1          5

35 <210> 40
<211> 7
<212> PRT
40 <213> Homo sapiens

<400> 40
      Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg
      1          5

45 <210> 41
<211> 25
<212> PRT
50 <213> Homo sapiens

<400> 41
      Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe Phe Val
      1          5          10          15

      Phe Leu Val Glu Met Gly Phe Thr Met
      20          25

60 <210> 42
<211> 11
<212> PRT
65 <213> Homo sapiens

```

ES 2 278 916 T3

<400> 42

Phe Val Phe Leu Val Glu Met Gly Phe Thr Met
1 5 10

5

<210> 43

<211> 23

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 43

15 Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile Leu Ile Ser Gly Pro Cys
1 5 10 15

Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser
20

20 <210> 44

<211> 5

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 44

Ile Ser Gly Pro Cys
1 5

30

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 45

40 Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly Val Ser
1 5 10 15

His

45 <210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

<400> 46

Gly Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys Leu Phe Glu
1 5 10 15

55

Met

<210> 47

<211> 10

60 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

65 Asn Phe Cys Leu Phe Glu Met Glu Ser His
1 5 10

ES 2 278 916 T3

<210> 48
 <211> 46
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 48
 10 Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Pro Asn Leu Gly Ser Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser
 20 25 30
 15 Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro His Pro Ala Asn Phe
 35 40 45
 <210> 49
 20 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 49
 Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp
 1 5 10 15
 30 Asp Tyr Gly
 <210> 50
 35 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 50
 Phe Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His
 1 5 10
 45 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 51
 Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr
 1 5
 55 <210> 52
 <211> 37
 <212> PRT
 60 <213> *Homo sapiens*
 65

ES 2 278 916 T3

<400> 52

	Ser	Ser	Trp	Asp	Tyr	Gly	His	Leu	Pro	Pro	His	Pro	Ala	Asn	Phe	Cys
	1				5				10					15		
5	Ile	Phe	Ile	Arg	Gly	Gly	Val	Ser	Pro	Tyr	Leu	Ser	Gly	Trp	Ser	Gln
				20					25					30		
10	Thr	Pro	Asp	Leu	Arg											
			35													

<210> 53

<211> 1442

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 278 916 T3

<400> 53

	tttttttttt tgag atg gag ttt tcg ctc ttg ttg ccc agg ctg gag tgc	50
5	Met Glu Phe Ser Leu Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys 1 5 10	
10	aat ggc gca atc tca gct cac cgc aac ctc cgc ctc ccg ggt tca agc Asn Gly Ala Ile Ser Ala His Arg Asn Leu Arg Leu Pro Gly Ser Ser 15 20 25	98
15	gat tct cct gcc tca gcc tcc cca gta gct ggg att aca ggc atg tgc Asp Ser Pro Ala Ser Ala Ser Pro Val Ala Gly Ile Thr Gly Met Cys 30 35 40	146
20	acc cac gct cgg cta att ttg tat ttt ttt tta gta gag atg gag ttt Thr His Ala Arg Leu Ile Leu Tyr Phe Phe Leu Val Glu Met Glu Phe 45 50 55 60	194
25	ctc cat gtt ggt cag gct ggt ctc gaa ctc ccg acc tca gat gat ccc Leu His Val Gly Gln Ala Gly Leu Glu Leu Pro Thr Ser Asp Asp Pro 65 70 75	242
30	tcc gtc tcg gcc tcc caa agt gct aga tac agg act ggc cac cat gcc Ser Val Ser Ala Ser Gln Ser Ala Arg Tyr Arg Thr Gly His His Ala 80 85 90	290
35	cgg ctc tgc ctg gct aat ttt tgt ggt aga aac agg gtt tca ctg atg Arg Leu Cys Leu Ala Asn Phe Cys Gly Arg Asn Arg Val Ser Leu Met 95 100 105	338
40	tgc cca agc tgg tct cct gag ctc aag cag tcc acc tgc ctc agc ctc Cys Pro Ser Trp Ser Pro Glu Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu 110 115 120	386
45	cca aag tgc tgg gat tac agg cgt gca gcc gtg cct ggc ctt ttt att Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile 125 130 135 140	434
50	tta ttt ttt tta aga cac agg tgt ccc act ctt acc cag gat gaa gtg Leu Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val 145 150 155	482
55	cag tgg tgt gat cac agc tca ctg cag cct tca act cct gag atc aag Gln Trp Cys Asp His Ser Ser Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Ile Lys 160 165 170	530
60	cat cct cct gcc tca gcc tcc caa gta gct ggg acc aaa gac atg cac His Pro Pro Ala Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His 175 180 185	578
65	cac tac acc tgg cta att ttt att ttt att ttt aat ttt ttg aga cag His Tyr Thr Trp Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln 190 195 200	626
	agt ctc aac tct gtc acc cag gct gga gtg cag tgg cgc aat ctt ggc Ser Leu Asn Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly 205 210 215 220	674
	tca ctg caa cct ctg cct ccc ggg ttc aag tta ttc tcc tgc ccc agc Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser 225 230 235	722

ES 2 278 916 T3

5 ctc ctg agt agc tgg gac tac agg cgc cca cca cgc cta gct aat ttt 770
 Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe
 240 245 250

10 ttt gta ttt tta gta gag atg ggg ttc acc atg ttc gcc agg ttg atc 818
 Phe Val Phe Leu Val Glu Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile
 255 260 265

15 ttg atc tct gga cct tgt gat ctg cct gcc tcg gcc tcc caa agt gct 866
 Leu Ile Ser Gly Pro Cys Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala
 270 275 280

20 ggg att aca ggc gtg agc cac cac gcc cgg ctt att ttt aat ttt tgt 914
 Gly Ile Thr Gly Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys
 285 290 295 300

25 ttg ttt gaa atg gaa tct cac tct gtt acc cag gct gga gtg caa tgg 962
 Leu Phe Glu Met Glu Ser His Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp
 305 310 315

30 cca aat ctc ggc tca ctg caa cct ctg cct ccc ggg ctc aag cga ttc 1010
 Pro Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe
 320 325 330

35 tcc tgt ctc agc ctc cca agc agc tgg gat tac ggg cac ctg cca cca 1058
 Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro
 335 340 345

40 cac ccc gct aat ttt tgt att ttc att aga ggc ggg gtt tca cca tat 1106
 His Pro Ala Asn Phe Cys Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr
 350 355 360

45 ttg tca ggc tgg tct caa act cct gac ctc agg tgacccacct gcctcagcct 1159
 Leu Ser Gly Trp Ser Gln Thr Pro Asp Leu Arg
 365 370 375

50 tccaaagtgc tgggattaca gggtgagcc acctcaccca gccggctaatt ttagataaaa 1219

55 aaatatgtag caatgggggg tcttgctatg ttgcccaggc tgggtctcaaa cttctggcctt 1279

60 catgcaatcc ttccaaatga gccacaacac ccagccagtc acattttttta aacagttaca 1339

65 tctttattttt agtatactag aaagtaatac aataaacatg tcaaacctgc aaattcagta 1399

gtaacagagt tcttttataa ctttttaaca aagcttttaga gca 1442