



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 299 536**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02001271 .2**

(86) Fecha de presentación : **08.07.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1234876**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.08.2002**

(54) Título: **Inhibición del crecimiento de células de leucemia mielógena crónica mediante oligodesoxi-nucleótidos antisentido liposomales dirigidos a Crkl.**

(30) Prioridad: **08.07.1996 US 679437**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

(73) Titular/es:
**Board of Regents, The University of Texas System
201 West 7th Street
Austin, Texas 78701, US**

(72) Inventor/es: **Arlinghaus, Ralph B.;
Tari, Ana M. y
Lopez-Berestein, Gabriel**

(74) Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

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

Inhibición del crecimiento de células de leucemia mielógena crónica mediante oligodesoxi-nucleótidos antisentido liposomales dirigidos a Crkl.

Antecedentes de la invención

A. Sector de la invención

La presente invención se refiere al campo de la terapia para el cáncer, específicamente, el tratamiento de la leucemia mielógena crónica. Más particularmente, estos tratamientos implican la utilización de oligonucleótidos antisentido y formulaciones liposomales de los mismos.

B. Técnica relacionada

La leucemia mielógena crónica (LMC) es un cáncer hematológico en el que tiene lugar la proliferación incontrolada de granulocitos. Se caracteriza frecuentemente por la translocación recíproca de los cromosomas 9 y 22, que resitúa el protooncogen Ableson (*abl*) en el extremo 3' de la región de fractura ("breakpoint cluster region") (*bcr*). Esto produce un gen *bcr-abl* quimérico que codifica una proteína de fusión p210 *bcr-abl*, que es tumorigénica y es necesaria para el crecimiento de células de LMC (Szczylik y otros, 1991; Skorski y otros, 1994; Tari y otros, 1994; McGahon y otros, 1994; Bedi y otros, 1994).

La proteína *bcr-abl* se puede autofosforilar en el aminoácido de tirosina 177 hallado en el primer exón de *bcr*. Cuando se fosforila, el dominio de *bcr* de la proteína *bcr-abl* se une al dominio SH2 de la proteína adaptadora, proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2). A través del dominio SH3, Grb2 se une al factor de intercambio GDP/GTP Hijo de Sevenless 1 humano (hSosl) dando lugar a la activación de la proteína ras. La proteína *bcr-abl* también puede transfosforilar el aminoácido de tirosina 177 hallado en la proteína de *bcr* normal. Se cree que cuando en la proteína de *bcr* normal se transforma la tirosina fosforilada en el aminoácido 177, también se formará complejo con Grb2. Cuando se expresa la proteína *bcr-abl*, en las proteínas p46 y p52 Shc (Puil y otros, 1994) también se transforma la tirosina fosforilada. También se ha observado que estas proteínas Shc forman complejos estables con Grb2. Por lo tanto, Grb2 parece jugar un papel muy importante en la tumorigenicidad mediada por la proteína *bcr-abl* (Puil y otros, 1994; Pendergast y otros, 1993).

Se ha observado también que otra proteína adaptadora, tipo Crk (Crkl), se une a *bcr-abl*. A diferencia de Grb2, Crkl se une a *bcr-abl* mediante el dominio *abl*. A través del dominio de SH3, Crkl también se puede unir a hSosl, que de nuevo conduce a la activación de la proteína Ras (Hoeve y otros, 1994a y 1994b). De este modo, a través de las proteínas adaptadoras Grb2 y Crkl, la proteína *bcr-abl* queda unida a la activación *ras*, que se sabe que conduce a la tumorigénesis. Cuando se inhibe la expresión de la proteína *ras*, también se inhibe la proliferación de células de LMC. Por lo tanto, uno de los mecanismos principales en los que la proteína *bcr-abl* induce a la proliferación de LMC es mediante la activación de la proteína *ras* (Skorski y otros, 1994; 1995). Los oligonucleótidos antisentido liposomales dirigidos a *bcr-abl* pueden reducir la proliferación de células de LMC. Después de la inhibición máxima (75% de inhibición del crecimiento y un 90% de inhibición de proteína), las células de LMC aún se pueden recuperar y crecer si los oligonucleótidos antisentido liposomales se extraen del medio de cultivo. Esto es probablemente causado por la inhibición incompleta de la síntesis de proteínas de *bcr-abl* (Tari y otros, 1994). De este modo, a pesar de la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la proliferación de células de LMC, existe la necesidad de composiciones y tratamientos más efectivos contra esta forma de cáncer.

Características de la invención

La presente invención está diseñada para superar las deficiencias de la técnica anterior dando a conocer composiciones mejoradas y métodos para el tratamiento de LMC. En particular, la presente invención utiliza oligonucleótidos antisentido nuevos para dirigir ácidos nucleicos específicos en las células de pacientes de LMC.

Por lo tanto, en una realización de la invención se da a conocer un compuesto que comprende un polinucleótido que hibridiza a un polinucleótido que codifica Grb2. En otra realización se dispone un compuesto que comprende una formulación liposomal de un polinucleótido que hibridiza a un polinucleótido que codifica Crkl, en el que el liposoma es preparado a partir de fosfolípidos neutros. Estos polinucleótidos pueden ser oligonucleótidos con una longitud de 8-50 bases. El liposoma puede estar compuesto ventajosamente del lípido dioleoilfosfatidilcolina. En otra realización de la invención, el polinucleótido hibridiza para el lugar de iniciación de traducción de mRNA de Grb2. En otra realización, el polinucleótido hibridiza para el lugar de inicio de traducción de mRNA de Crkl. En una realización específica de la invención el polinucleótido es un oligonucleótido que tiene la secuencia ATATTTGGCGATGGCTTC. En una realización específica, el polinucleótido es un oligonucleótido que tiene la secuencia GTCGAACCGGCGGAGGA.

En otra realización de la invención se prevé un compuesto formado por un polinucleótido que hibridiza un polinucleótido que codifica Grb2. En otra realización adicional, se prevé un compuesto que comprende una formulación liposómica de un polinucleótido que hibridiza para un polinucleótido que codifica Crkl. El compuesto puede comprender además un polinucleótido que hibridiza un polinucleótido que codifica *bcr-abl*, en el que el liposoma es preparado a partir de fosfolípidos neutros.

En otra realización de la invención, se da a conocer un compuesto que comprende un constructo de expresión que codifica un primer polinucleótido que hibridiza un polinucleótido que codifica Grb2, en el que dicho primer polinucleótido se encuentra bajo el control de un promotor que es activo en células eucarióticas. De manera similar, en otra realización, se da a conocer un compuesto que comprende una formulación liposomal de un constructo de expresión que codifica un primer polinucleótido que hibridiza un polinucleótido que codifica Crkl, en el que dicho primer polinucleótido se encuentra bajo el control de un promotor que es activo en células eucarióticas, en el que el liposoma es preparado a partir de fosfolípidos neutros.

En otra realización adicional de la invención, se da a conocer un método para inhibir la proliferación de una célula cancerosa que comprende el establecer contacto con dicha célula cancerosa con un compuesto que comprende como mínimo un polinucleótido que hibridiza un ácido nucleico Grb2. De manera similar, en otra realización, se da a conocer un método para la inhibición de la proliferación de una célula cancerosa, comprendiendo dicha célula cancerosa un compuesto que comprende como mínimo una formulación liposomal de un polinucleótido que hibridiza un ácido nucleico Crkl. En esta realización, los polinucleótidos pueden ser oligonucleótidos que tienen una longitud de 8-50 bases. El método puede comprender además el contacto de la célula cancerosa con un compuesto que comprende un polinucleótido que hibridiza un ácido nucleico *bcr-abl*. El compuesto puede comprender ambos: (i) un polinucleótido que hibridiza un ácido nucleico Grb2 o (ii) un polinucleótido que hibridiza un ácido nucleico Crkl.

El método anterior se puede aplicar de forma ventajosa a una célula cancerígena que es una célula de leucemia o, más específicamente, una célula de leucemia mielogenosa crónica. La composición puede comprender un liposoma en el que el polinucleótido está encapsulado. En una realización específica, el contacto tiene lugar en un paciente. El paciente puede ser un humano. La composición se puede administrar de forma ventajosa a un paciente humano en un volumen de 0,50-10,0 ml por dosis o en una cantidad de 5-30 mg de polinucleótido por m². En un régimen particular, la composición se administra tres veces por semana durante ocho semanas.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, a la vez que indican las realizaciones preferentes de la presente invención, se proporcionan sólo a modo de ilustración.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte del presente documento y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La presente invención se puede entender mejor mediante la referencia a uno o más de estos dibujos combinados con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en la presente invención:

Figura 1: *Efectos de oligonucleótidos antisentido liposomales específicos para Grb2 en el crecimiento de células leucémicas.* Se incubaron células BV173, K562 y HL60 con concentraciones crecientes de oligonucleótidos antisentido liposomales específicos para Grb2. Después de tres días de incubación, se realizó un ensayo alamarBlue para determinar los efectos inhibidores de crecimiento de estos oligonucleótidos en las células leucémicas. La viabilidad se expresó como el porcentaje de células no tratadas, que se determinó mediante (absorbancia de células tratadas / absorbancia de células no tratadas) x 100.

Figura 2: *Efectos de oligonucleótidos antisentido liposomales específicos para Crkl en el crecimiento de células leucémicas.* Se incubaron células BV173, K562 y HL60 con concentraciones crecientes de oligonucleótidos antisentido liposomales específicos para Crkl. Después de tres días de incubación, se realizó un ensayo alamarBlue para determinar los efectos inhibidores de crecimiento de estos oligonucleótidos en las células leucémicas. La viabilidad se expresó como el porcentaje de células no tratadas, que se determinó mediante (absorbancia de células tratadas / absorbancia de células no tratadas) x 100.

Figura 3: *Efectos de oligonucleótidos de control liposomales específicos en el crecimiento de células leucémicas.* Se incubaron células BV173, K562 y HL60 con concentraciones crecientes de oligonucleótidos de control liposomales. Después de tres días de incubación, se realizó un ensayo alamarBlue para determinar los efectos inhibidores de crecimiento de estos oligonucleótidos en las células leucémicas. La viabilidad se expresó como el porcentaje de células no tratadas, que se determinó mediante (absorbancia de células tratadas / absorbancia de células no tratadas) x 100.

Figura 4: *Secuencias de ADNc y proteína de GRB2.* Se ilustran las secuencias flanqueantes 5' y 3' no traducidas junto con la región codificante y la secuencia de aminoácidos. Se indican los dominios SH2 (línea gruesa) y SH3 (línea delgada).

Figura 5: *Secuencias de ADNc y proteína de CRKL.* Se ilustran las secuencias flanqueantes 5' y 3' no traducidas junto con la región codificante y la secuencia de aminoácidos. Se indican los dominios SH2, SH2', SH3 y SH4 mediante subrayado.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

A. La presente invención

La leucemia mieloide crónica, o LMC, es un trastorno clonal en el que las células madre leucémicas producen glóbulos rojos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocito-macrófagos, plaquetas, células T y células B. La translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 da lugar a un cromosoma 22 acortado, llamado cromosoma de Philadelphia (Ph⁺). A pesar de que hasta un 10% de casos de LMC se han clasificado como Ph negativo, dichos casos se consideran ahora muy raros.

Esta translocación genera un gen fusionado *bcr-abl*, el producto del cual (p210) juega un papel importante en la tumorigénesis. Esta proteína citoplasmática tiene aproximadamente 1910 residuos de aminoácidos e incluye los exones 2 y 3 de *bcr* y el exón 2 de *abl*. A pesar de los esfuerzos dirigidos en la inhibición de la síntesis de *bcr-abl* utilizando construcciones antisentido, parece que el fenotipo tumorigénico de células de Ph positivo vuelve rápidamente después de los tratamientos.

La presente invención se refiere a oligonucleótidos antisentido y polinucleótidos dirigidos a partes del gen *Crkl* y su utilización en el tratamiento del cáncer. Se cree que el producto génico *Crkl* interacciona con el producto *bcr-abl* y, por lo tanto, participan en la transformación de las células de LMC. La inhibición de la síntesis de estas moléculas reduce el crecimiento de células tumorales. En particular, se contempla que utilizando estas moléculas antisentido, solas o conjuntamente con otras moléculas antisentido, es posible tratar de forma efectiva la LMC, y posiblemente otros cánceres. Se pueden utilizar los propios oligo- o polinucleótidos, o vectores de expresión que los codifican. El método preferente de administración de estos ácidos nucleicos es a través de liposomas. La presente invención, en sus varias realizaciones, se describe con mayor detalle a continuación.

B. Polinucleótidos y oligonucleótidos

El término “antisentido” pretende referirse a moléculas de polinucleótido complementarias a una parte de un ARN de *Crkl*, o los ADNs correspondientes al mismo. Ver las figuras 4 y 5. Los polinucleótidos “complementarios” son aquéllos que son capaces aparear las bases según las reglas estándar de complementariedad de Watson-Crick. Es decir, las purinas más grandes se aparearán en las bases con las pirimidinas más pequeñas para formar combinaciones de guanina emparejada con citosina (G:C) y adenina emparejada con timina (A:T) en el caso de ADN, o adenina emparejada con uracilo (A:U) en el caso de ARN. La inclusión de bases menos comunes, tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras en secuencias de hibridación no interfieren con el emparejamiento.

El marcaje de ADN de doble cadena (ds) con polinucleótidos conduce a la formación de una triple hélice; el marcaje ARN conducirá a la formación de una doble hélice. Los polinucleótidos antisentido, cuando se introducen en una célula diana, se unen específicamente a su polinucleótido diana e interfieren con la transcripción, el procesamiento, el transporte, la traducción y/o estabilidad del ARN. Las construcciones de ARN antisentido, o ADN que codifica dichos ARNs antisentido; se pueden utilizar para inhibir la transcripción o traducción de genes o ambos en el interior de una célula huésped, *in vitro* o *in vivo*, tal como en el interior de un animal huésped, incluyendo un sujeto humano.

La concentración intracelular de catión monovalente es aproximadamente 160 mM, (10 mM Na⁺; 150 mM K⁺). La concentración intracelular de catión divalente es aproximadamente 20 mM, (18 mM Mg⁺⁺; 2 mM Ca⁺⁺). La concentración de proteína intracelular, que serviría para disminuir el volumen de hibridación y, por lo tanto, aumenta la concentración eficaz de muestras de ácidos nucleicos, es 150 mg/ml. Las construcciones se pueden analizar *in vitro* en condiciones que imitan estas condiciones *in vivo*.

Las construcciones antisentido se pueden diseñar para unirse al promotor y otras regiones de control, exones, intrones, o incluso zonas de límites entre exón-intrón de un gen. Se contempla que las construcciones antisentido más eficaces para la presente invención incluirán regiones complementarias al sitio de inicio de ARNm. Se pueden analizar fácilmente dichas construcciones simplemente mediante las construcciones *in vitro* para determinar si están afectados los niveles de la proteína diana. De forma similar, la inhibición no específica perjudicial de la síntesis de proteína también se puede medir determinando la viabilidad de la célula diana *in vitro*.

Tal como se utiliza en la presente invención, los términos “complementario” o “antisentido” significan polinucleótidos que son sustancialmente complementarios sobre su longitud completa y tienen muy pocos desajustes de bases. Por ejemplo, las secuencias de quince bases de longitud se pueden denominar como complementarias cuando tienen un nucleótido complementario en trece o catorce nucleótidos de quince. Naturalmente, las secuencias que son “completamente complementarias” serán secuencias que son totalmente complementarias a lo largo de su longitud y no tienen desajustes de bases.

También se contemplan otras secuencias con grados inferiores de homología. Por ejemplo, se podría diseñar una construcción antisentido que tiene regiones limitadas de homología elevada, pero que también contiene una región no homóloga (por ejemplo, una ribozima). Estas moléculas, a pesar de tener menos de un 50% de homología, se unirán a secuencias diana en las condiciones apropiadas.

Los polinucleótidos según la presente invención pueden codificar un gen Crkl o una parte de ese gen que es suficiente para realizar la inhibición antisentido de la expresión de proteínas. Los polinucleótidos se pueden derivar de ADN genómico, es decir, clonado directamente del genoma de un organismo particular. En otras realizaciones, sin embargo, los polinucleótidos pueden ser ADN complementarios (ADNc). ADNc es ADN preparado utilizando ARN mensajero (ARNm) como plantilla. De este modo, un ADNc no contiene ninguna secuencia codificante interrumpida y habitualmente contiene casi exclusivamente la región o regiones codificantes para la correspondiente proteína. En otras realizaciones, el polinucleótido antisentido se puede producir sintéticamente.

Puede ser ventajoso combinar partes del ADN genómico con ADNc o secuencias sintéticas para generar construcciones específicas. Por ejemplo, cuando se desea un intrón en la construcción final, se necesitará utilizar un clon genómico. El ADNc o un polinucleótido sintetizado pueden proporcionar más sitios de restricción conveniente para la parte restante de la construcción y, por lo tanto, se utilizaría para el resto de la secuencia.

El ADN y las secuencias de proteína para Grb2 y Crkl están publicadas en la literatura por Lowenstein y otros (1992) y ten Hoeve y otros (1993), respectivamente, ambas incorporadas en la presente invención como referencia. Se prevé que existen variantes naturales que tienen secuencias diferentes que las descritas en la presente invención. De este modo, la presente invención no está limitada a utilizar la secuencia de polinucleótidos proporcionada para Crkl sino que, en cambio, incluye la utilización de cualquier variante natural. Dependiendo de la secuencia particular de dichas variantes, éstas pueden proporcionar ventajas adicionales en términos de selectividad diana, es decir, evitar la inhibición antisentido no deseada de transcritos relacionados. La presente invención también abarca los mutantes sintetizados químicamente de estas secuencias.

Tal como se afirmó anteriormente, aunque las secuencias antisentido pueden ser copias genómicas o ADNc de longitud completa (ver figuras 4 y 5), o amplios fragmentos de las mismas, también pueden ser fragmentos más cortos, u "oligonucleótidos" definidos en la presente invención como polinucleótidos de 50 o menos bases. Aunque los oligómeros más cortos (8-20) son más fáciles de fabricar y aumentar la accesibilidad *in vivo*, otra gran cantidad de factores están implicados en la determinación de la especificidad del emparejamiento de bases. Por ejemplo, tanto la afinidad de unión como la especificidad de unión de un oligonucleótido a su diana complementaria aumentan con la longitud creciente. Se contempla que se utilizarán oligonucleótidos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 pares de bases. Aunque se pueden utilizar toda o parte de la secuencia del gen en el contexto de la construcción antisentido, estadísticamente, cualquier secuencia de 17 bases de largo debería aparecer sólo una vez en el genoma humano y, por lo tanto, suficiente para especificar una única secuencia diana.

En ciertas realizaciones, se puede desear utilizar construcciones antisentido que incluyen otros elementos, por ejemplo, aquéllas que incluyen pirimidinas C-5. Se ha observado que los oligonucleótidos que contienen análogos propino C-5 de uridina y citidina se unen a ARN con una afinidad elevada y son potentes inhibidores antisentido de la expresión génica (Wagner y otros, 1993).

Como una alternativa a la administración antisentido dirigida, se pueden utilizar ribozimas dirigidas. El término "ribozima" se refiere a una enzima de base ARN capaz de dirigir y dividir secuencias de bases particulares en el ADN y el ARN. Las ribozimas pueden estar directamente dirigidas a células, en forma de oligonucleótidos de ARN que incorporan secuencias de ribozimas, o introducidas en la célula como un vector de expresión que codifica el ARN ribozimal deseado. Las ribozimas se pueden utilizar y aplicar en gran parte de la misma manera que se describe para polinucleótido antisentido. Las secuencias de ribozimas también se pueden modificar en gran parte de la misma manera que se describe para polinucleótido antisentido. Por ejemplo, se podrían incorporar bases que no son de Watson-Crick, o fabricar oligonucleótidos de ARN/ADN mezclados, o modificar el esqueleto de fosfodiéster, o modificar el 2'-hidroxi en el grupo de azúcar ribosa del ARN.

Alternativamente, los oligo- y polinucleótidos antisentido según la presente invención se pueden proporcionar como ARN mediante la transcripción a partir de las construcciones de expresión que llevan ácidos nucleicos que codifican los oligo- y polinucleótidos. A lo largo de esta solicitud, el término "construcción de expresión" pretende incluir cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico que codifica un producto antisentido en el que parte o toda la secuencia de ácido nucleico es capaz de ser transcrito. Entre los vectores de expresión habituales se incluyen plásmidos bacterianos o fago, tales como cualquiera de la serie de pUC o Bluescript™ o, tal y como se describe posteriormente, vectores víricos adaptados para la utilización en células eucariotas.

En realizaciones preferentes, el ácido nucleico codifica un oligo- o polionucleótido antisentido bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. La frase "bajo control transcripcional" significa que el promotor está en la posición y la orientación correctas en relación al ácido nucleico para controlar el inicio de la ARN polimerasa.

El término promotor se utilizará en la presente invención para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que están empaquetados alrededor del sitio de inicio de la ARN polimerasa II. Muchas de las ideas de cómo se organizan los promotores derivan de los análisis de varios promotores víricos, incluyendo aquéllos para las unidades de transcripción temprana de la HSV timidina quinasa (tk) y SV40. Estos estudios, aumentado por trabajos más recientes, han mostrado que los promotores están compuestos de módulos funcionales discretos, consistiendo cada uno en

ES 2 299 536 T3

aproximadamente 7-20 pb de ADN, y conteniendo uno o más sitios de reconocimiento para las proteínas activadoras o supresoras transcripcionales.

Como mínimo, un módulo de cada promotor actúa para situar el sitio de inicio para la síntesis del ARN. El mejor ejemplo conocido de este módulo es la caja TATA, pero en algunos promotores falta una caja TATA, tal como el promotor para el gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes de SV40 tardío, un elemento discreto que solapa el propio sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de inicio.

Los elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de inicio transcripcional. Habitualmente, éstos se localizan en la región de 30-110 pb en dirección ascendente del sitio de inicio, aunque recientemente se ha observado que un conjunto de promotores contienen también elementos funcionales en dirección descendente del sitio de inicio. El espaciado entre los elementos promotores frecuentemente es flexible, de manera que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí. En el promotor tk, el espaciado entre los elementos promotores se puede incrementar hasta 50 pb antes de que la actividad empiece a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden actuar de forma cooperativa o independientemente para activar la transcripción.

El promotor particular que se utiliza para controlar la expresión de un ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor se cree que no es importante, siempre y cuando sea capaz de expresar el péptido en la célula marcada. De este modo, cuando una célula está marcada, es preferible situar el ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor de forma adyacente a y bajo el control de un promotor que es activo en la célula humana. En general, dicho promotor podría incluir un promotor humano o vírico.

En varias realizaciones, se pueden utilizar el promotor del gen inmediato temprano de citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano de SV40 y la repetición larga terminal del virus de sarcoma de Rous, para obtener una expresión de nivel elevado de varias proteínas. También se contempla la utilización de otros promotores víricos o celulares de mamíferos o bacterianos que son bien conocidos en la técnica para conseguir la expresión de péptidos según la presente invención, siempre y cuando los niveles de expresión sean suficientes para un objetivo determinado.

Mediante la utilización de un promotor con propiedades bien conocidas, se puede optimizar el nivel y patrón de expresión de un oligo- o polinucleótidos antisentido. Además, la selección de un promotor que se regula en respuesta a señales fisiológicas específicas puede permitir la expresión inducible de una proteína inhibidora. Por ejemplo, un ácido nucleico bajo el control del promotor humano PAI-1 da lugar a una expresión inducible por el factor de necrosis tumoral. Las Tablas 2 y 3 enumeran diferentes elementos/promotores que se pueden utilizar, en el contexto de la presente invención, para regular la expresión de las construcciones antisentido. Esta lista no pretende ser exhaustiva de todos los posibles elementos implicados en la inducción de la expresión, sino que simplemente son ejemplos de los mismos.

Los potenciadores se detectaron originalmente como elementos genéticos que incrementaban la transcripción a partir de un promotor localizado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Esta capacidad de actuar sobre una distancia amplia tenía un pequeño precedente en los estudios clásicos de regulación transcripcional eucariota. El trabajo posterior mostró que las regiones de ADN con actividad potenciadora se organizan como los promotores. Es decir, están compuestas de muchos elementos individuales, cada una unida a una o más proteínas transcripcionales.

La diferencia básica entre los potenciadores y los promotores es operacional. Una región potenciadora globalmente debe ser capaz de estimular la transcripción a una distancia; esta necesidad no es efectiva para una región de promotor o sus elementos constituyentes. Por otro lado, un promotor debe tener uno o más elementos que dirigen el inicio de la síntesis de ARN en un sitio particular y en una orientación particular, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Los promotores y potenciadores se solapan y son contiguos frecuentemente, pareciendo que tienen una organización modular similar.

A continuación se presenta una lista de promotores víricos, potenciadores/promotores celulares y potenciadores/promotores inducibles que se podrían utilizar combinados con el ácido nucleico que codifica un péptido inhibidor NF-IL6 en una construcción de expresión (Tabla 1 y tabla 2). Adicionalmente, cualquier combinación de promotor/potenciador (según la Base de Datos de Promotores Eucariotas EPDB) también se podría utilizar para conducir la expresión de un ácido nucleico según la presente invención. La utilización de un sistema de expresión citoplásmica T3, T7 o SP6 es otra posible realización. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplásmica de ciertos promotores bacterianos si se dispone de la polimerasa bacteriana adecuada, como parte del complejo de administración o como una construcción de expresión génica adicional.

ES 2 299 536 T3

TABLA 1

	PROMOTOR
5	Cadena pesada de inmunoglobulina
	Cadena ligera de inmunoglobulina
	Receptor de Célula T
10	DQ α y DQ β de HLA
	β -interferón
	Interleuquina-2
15	Receptor de interleuquina-2
	MHC Clase II 5
	MHC Clase II HLA-DR α
20	β -actina
	Creatina quinasa de músculo
	Prealbúmina (transtiretina)
	Elastasa
25	Metalotioneína
	Colagenasa
	Gen de albúmina
30	α -fetoproteína
	α -Globina
	β -Globina
35	c-fos
	c-HA-ras
	Insulina
	Molécula de adhesión celular neural (NCAM)
40	α 1-Antitripsina
	H2B (TH2B) histona
	Colágeno de ratón o tipo I
45	Proteínas reguladas de glucosa (GRP94 y GRP78)
	Hormona de crecimiento de rata
	Amiloide A de suero humano (SAA)
50	Troponina I (TN I)
	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
	Distrofia muscular de Duchenne
	SV40
55	Polioma
	Retrovirus
	Virus de papiloma
60	Virus de hepatitis B
	Virus de inmunodeficiencia humana
	Citomegalovirus
65	Virus de leucemia de simio gibón

TABLA 2

Elemento MT II	Inductor
MT II	Éster Forbol (TPA) Metales pesados
MMTV (virus de tumor mamario de ratón)	Glucocorticoides
β -Interferón	Poli(rl)Xpoli(rc)
Adenovirus 5 E2	Ela
c-jun	Éster Forbol (TPA), H ₂ O ₂
Colagenaza	Éster Forbol (TPA)
Estromelislina	Éster Forbol (TPA), IL-1
SV40	Éster Forbol (TPA)
Gen MX murino	Interferón, Virus de la enfermedad de Newcastle
Gen GRP78	A23187
α -2-macroglobulina	IL-6
Vimentina	Suero
MHC Clase I Gen H-2kB	Interferón
HSP70	Ela, Antígeno de SV40 Amplio T
Proliferina	Éster Forbol (TPA)
Factor de necrosis tumoral	PHA
Gen de hormona de estimulante de la tiroides α	Hormona tiroides

En ciertas realizaciones de la invención, la liberación de un ácido nucleico en una célula se puede identificar *in vitro* o *in vivo* mediante la inclusión de un marcador en la construcción de expresión. El marcador daría lugar a un cambio identificable en la célula transfectada permitiendo la fácil identificación de la expresión. Se pueden utilizar enzimas, tales como la timidina quinasa (*tk*) del virus herpes simples (eucariótica) o cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) (procariota).

También se puede incluir una señal de poliadenilación para realizar la poliadenilación correcta del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica satisfactoria de la presente invención, y se puede utilizar cualquier secuencia. Por ejemplo, se puede utilizar la señal de poliadenilación de SV40, β -globina o adenovirus. También se contempla como elemento del casete de expresión un terminador. Estos elementos pueden servir para aumentar los niveles de mensaje y minimizar la lectura a través del casete en otras secuencias.

C. Formulaciones liposomales

En la presente invención, los oligo- y polinucleótidos antisentido y vectores de expresión están atrapados en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana en bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en exceso de medio acuoso. Los componentes lipídicos experimentan una autodistribución antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contemplan complejos catiónicos de lípido-ácido nucleico, tales como complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

La liberación del polinucleótido mediada por liposomas y la expresión de ADN foráneo *in vitro* ha sido muy satisfactoria. Wong y otros (1980) demostraron la viabilidad de liberación mediada por liposomas y la expresión de ADN foráneo en células cultivadas de embriones de pollito, HeLa y hematomas. Nicolau y otros (1987) llevaron a cabo la transferencia de genes mediada por liposomas en ratas después de la inyección intravenosa.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el liposoma se puede complejar con un virus hemaglutinante (HVJ). Se ha observado que esto facilita la fusión con la membrana celular y provoca la entrada en la célula del ADN encapsulado en el liposoma (Kaneda y otros, 1989). En otras realizaciones, el liposoma se puede complejar o utilizar conjuntamente con las proteínas nucleares cromosómicas que no son histonas (HMG-1) (Kato y otros, 1991).

5 En realizaciones adicionales, el liposoma se puede complejar o utilizar conjuntamente con HVJ y HMG-1. Cuando dichos vectores de expresión se utilizan de forma satisfactoria en la transferencia y expresión de un polinucleótido *in vitro* e *in vivo*, entonces son aplicables para la presente invención. Cuando un promotor bacteriano se utiliza en la construcción de ADN, también será deseable incluir en el interior del liposoma una polimerasa bacteriana apropiada.

10 “Liposoma” es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos únicos y multilamelares formados por la generación de bicapas lipídicas cerradas. Los fosfolípidos se utilizan para preparar los liposomas según la presente invención y pueden llevar una carga positiva neta, una carga negativa neta o ser neutros. Se pueden utilizar directamente fosfatos para conferir una carga negativa en los liposomas, y se puede utilizar estearilamina para conferir

15 una carga positiva en los liposomas.

Los lípidos adecuados para su utilización en la presente invención se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, el dimiristil fosfatidilcolina (“DMPC”) se puede obtener de Sigma Chemical Co., dicetil fosfato (“DCP”) se obtiene de K & K Laboratories (Plainview, N.Y.); colesterol (“Chol”) se obtiene de Calbiochem-Behring; dimiristil fosfatidilglicerol (“DMPG”) y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). Las

20 soluciones de reserva de lípidos en cloroformo, cloroformo/metanol o t-butanol se pueden almacenar a, aproximadamente, -20°C. Preferiblemente, se utiliza cloroformo como el único disolvente ya que se evapora más fácilmente que el metanol.

25 Los fosfolípidos de fuentes naturales, tales como fosfatidilcolina de huevo o soja, ácido fosfatídico de cerebro, fosfatidilinositol de cerebro o planta, cardiolipina de corazón y fosfatidiletanolamina bacteriana o de planta, no se utilizan preferiblemente como fosfátido primario, es decir, que constituyen el 50% o más de la composición total de fosfátido, debido a la inestabilidad y falta de estancueidad de los liposomas resultantes.

30 Los liposomas utilizados según la presente invención se pueden fabricar mediante diferentes métodos. El tamaño de los liposomas varía dependiendo del método de síntesis. Un liposoma suspendido en solución acuosa está generalmente en forma de una vesícula esférica, que tiene una o más capas concéntricas de moléculas de bicapa lipídica. Cada capa consiste en un conjunto paralelo de moléculas representadas por la fórmula XY, en la que X es una parte hidrofílica e Y es una parte hidrofóbica. En una suspensión acuosa, las capas concéntricas se disponen de manera que las partes

35 hidrofílicas tienden a permanecer en contacto con una fase acuosa y las regiones hidrofílicas tienden a autoasociarse. Por ejemplo, cuando las fases acuosas están presentes en el interior y exterior del liposoma, las moléculas lipídicas formarán una bicapa, conocida como lamela, de disposición XY-YX.

Los liposomas dentro del alcance de la presente invención se pueden preparar según técnicas de laboratorio conocidas. En una realización preferente, los liposomas se preparan mediante la mezcla de lípidos liposomales, en un disolvente en un recipiente, por ejemplo, un vaso, un matraz en forma de pera. El recipiente debería tener un volumen diez veces superior al volumen de la suspensión esperada de liposomas. Utilizando un evaporador rotatorio, se elimina el disolvente, aproximadamente, a 40°C a presión negativa. El disolvente se elimina normalmente en aproximadamente de 5 minutos a 2 horas, dependiendo del volumen deseado de los liposomas. La composición se puede secar adicionalmente en un desecador de vacío. Los lípidos secados generalmente se descartan después de aproximadamente 1

45 semana debido a la tendencia a deteriorarse con el tiempo.

Los lípidos secados se pueden hidratar aproximadamente a 25-50 mM de fosfolípido en agua estéril, agua libre de pirógeno mediante agitación hasta la resuspensión de la película de lípido. A continuación, los liposomas acuosos se

50 pueden separar en alícuotas, cada una colocada en un vial, liofilizada y sellada al vacío.

Alternativamente, los liposomas se pueden preparar según otros procedimientos de laboratorio conocidos: el método de Bangham y otros (1965), el contenido del cual se incorpora en la presente invención como referencia; el método de Gregoriadis, tal como se describe en *DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE*, G. Gregoriadis ed. (1979)

55 páginas 287-341, el contenido del cual se incorpora en la presente invención como referencia; el método de Deamer y Ustet (1983), el contenido del cual se incorpora en la presente invención como referencia; y el método de evaporación de fase inversa tal como se describe por Szoka y Papahadjopoulos (1978). Los métodos mencionados anteriormente se diferencian con respecto al material acuoso atrapado y sus proporciones de espacio con respecto a lípido.

60 Los lípidos secados o liposomas liofilizados preparados según se ha descrito anteriormente se pueden reconstituir en una solución de ácido nucleico y diluir hasta una concentración adecuada con un disolvente adecuado, por ejemplo, DPBS. A continuación, la mezcla se agita vigorosamente en un mezclador vórtex. El ácido nucleico no encapsulado se elimina mediante centrifugación a 29.000 x g y se lavaron los gránulos liposomales. Los liposomas lavados se resuspenden a una concentración de fosfolípido total adecuada, por ejemplo, aproximadamente 50-200 mM. La cantidad de

65 ácido nucleico encapsulado se puede determinar según métodos estándar. Después de la determinación de la cantidad de ácido nucleico encapsulado en la preparación de liposoma, los liposomas se pueden diluir hasta la concentración apropiada y almacenar a 4°C hasta su uso.

En una realización preferente, se utiliza el lípido dioleoilfosfatidilcolina. Los oligonucleótidos resistentes a nucleasa se mezclaron con lípidos en presencia de t-butanol en exceso. La mezcla se centrifugó antes de congelarse en baño de acetona/hielo seco. La mezcla congelada se liofilizó e hidrató con una solución salina tamponada de Hepes (Hepes 1 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5) durante toda la noche y, a continuación, los liposomas se sonicaron en un sonicador tipo baño de 10 a 15 minutos. El tamaño de los oligonucleótidos liposomales variaba habitualmente entre 200-300 nm de diámetro mediante el medidor de partículas de submicras modelo 370 autodiluido (Nicom, Santa Barbara, CA).

D. Sistemas de liberación alternativos

Retrovirus. Los retrovirus son un grupo de virus de ARN de cadena única caracterizados por la capacidad en convertir su ARN en ADN de cadena doble en células infectadas mediante un proceso de transcripción inversa (Coffin, 1990). A continuación, el ADN resultante se integra de forma estable en cromosomas celulares como provirus y dirige la síntesis de proteínas víricas. La integración da lugar a la retención de las secuencias de genes víricos en la célula receptora y sus descendientes. El genoma retroviral contiene tres genes - *gag*, *pol*, y *env* - que codifican las proteínas de la cápside, enzima polimerasa, y componentes de envoltura, respectivamente. Una secuencia encontrada en dirección 5' del gen *gag*, denominada Ψ , actúa como señal para empaquetar el genoma en viriones. Dos secuencias largas repetitivas terminales (LTR) se presentan en los extremos 5' y 3' del genoma vírico. Éstos contienen secuencias de promotor y potenciador fuertes y también se requieren para la integración en el genoma de la célula huésped (Coffin, 1990).

Con el fin de construir un vector retroviral, un ácido nucleico que codifica un Grb2 o Crkl, se inserta una construcción antisentido en el genoma vírico en el lugar de ciertas secuencias víricas para producir un virus que es defectuoso en la replicación. Con el fin de producir viriones, se construye una línea de células de empaquetamiento que contiene los genes *gag*, *pol* y *env* pero sin los componentes LTR y Ψ (Mann y otros, 1983). Cuando se introduce en esta línea celular (mediante precipitación con fosfato cálcico, por ejemplo) un plásmido recombinante que contiene un ADN insertado, junto con las secuencias de LTR y Ψ retrovirales, la secuencia de Ψ permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas víricas que, a continuación, se secretan en el medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann y otros, 1983). A continuación, se recoge el medio que contiene los retrovirus recombinantes, opcionalmente concentrados, y utilizados para transferencia génica. Los vectores retrovirales son capaces de infectar una gran variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de células huésped (Paskind y otros, 1975).

Adenovirus: Los adenovirus humanos son virus de ADN de doble cadena de tumor con tamaños de genoma de aproximadamente 36 kB (Tooze, 1981). Como sistema modelo para la expresión de genes eucariotas, se han estudiado ampliamente los adenovirus y se han caracterizado bien, lo que los hace un sistema atractivo para el desarrollo de adenovirus como un sistema de transferencia de genes. Este grupo de virus es fácil de desarrollar y manipular, y muestran un amplio rango de huéspedes *in vitro* e *in vivo*. En células infectadas líticamente, los adenovirus son capaces de evitar la síntesis de proteínas huésped, dirigiendo las maquinarias celulares para sintetizar grandes cantidades de proteínas víricas, y producir cantidades abundantes de virus.

La región E1 del genoma incluye E1A y E1B que codifican proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma vírico, así como de ciertos genes celulares. La expresión de E2, incluyendo E2A y E2B, permite la síntesis de funciones víricas replicativas, por ejemplo proteína de unión a ADN, ADN polimerasa, y una proteína terminal que ceba la replicación. Los productos génicos de E3 evitan la citólisis mediante células T citotóxicas y el factor de necrosis tumoral y parece ser importante para la propagación vírica. Las funciones asociadas con las proteínas E4 incluyen la replicación de ADN, la expresión tardía del gen, y la desactivación de la célula huésped. Los productos génicos tardíos incluyen la mayoría de las proteínas cápsides del virión, y éstas se expresan sólo después de que tenga lugar la mayoría del procesamiento de un transcrito primario único a partir del promotor tardío principal. El promotor tardío principal (MLP) muestra una eficacia elevada durante la fase tardía de la infección (Stratford-Perricaudet y Perricaudet, 1991).

Como sólo una pequeña parte del genoma vírico parece necesitarse *in cis* (Tooze, 1981), los vectores derivados de adenovirus ofrecen un potencial excelente para la sustitución de grandes fragmentos de ADN cuando se utilizan conjuntamente con líneas celulares, tales como células 293. Se han desarrollado líneas celulares de riñón embrionario humano transformado con Ad5 (Graham y otros, 1977) para proporcionar las proteínas víricas esenciales *in trans*.

Entre las ventajas particulares de un sistema de adenovirus para la liberación de proteínas foráneas en una célula incluyen (i) la capacidad de sustituir piezas relativamente grandes de ADN vírico por ADN foráneo; (ii) la estabilidad estructural de adenovirus recombinantes; (iii) la seguridad de administración adenoviral a humanos; y (iv) la falta de cualquier asociación conocida de infección adenoviral con cáncer o tumores; (v) la capacidad de obtener títulos elevados del virus recombinante, y (vi) la elevada infectividad del adenovirus.

Entre las ventajas adicionales de los vectores de adenovirus se incluyen los niveles más elevados de expresión génica. Adicionalmente, la replicación de adenovirus es independiente de la replicación del gen huésped, a diferencia de las secuencias retrovirales. Dado que los adenovirus transformantes de los genes en la región E1 se pueden eliminar fácilmente y aún proporcionar vectores de expresión eficaces, el riesgo oncogénico de los vectores de adenovirus se cree que es negligible. (Grunhaus y Horwitz, 1992).

En general, los sistemas de transferencia de genes de adenovirus se basan en adenovirus diseñados recombinantes que resultan incompetentes en la replicación mediante la eliminación de una parte de su genoma, tal como E1, y aún mantiene su competencia para la infección. Las secuencias que codifican proteínas foráneas relativamente grandes se pueden expresar cuando las eliminaciones adicionales se realizan en el genoma del adenovirus. Por ejemplo, los adenovirus eliminados en las regiones E1 y E3 son capaces de transportar hasta 10 kB de ADN foráneo y se pueden desarrollar hasta títulos elevados en células 293 (Stratford-Perricaudet y Perricaudet, 1991). Sorprendentemente, se ha observado la expresión persistente de transgenes que siguen a la infección adenoviral.

Otros vectores virales como construcciones de expresión. Se pueden utilizar otros vectores virales como construcciones de expresión en la presente invención. Se pueden utilizar vectores derivados de virus, tales como virus vaccinia (ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y otros, 1988), virus adeno-asociados (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984) y virus herpes. Ofrecen varias características atractivas para varias células de mamíferos (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Balchwal y Sugden, 1986; Coupar y otros, 1988; Horwich y otros, 1990).

Con el reciente reconocimiento de virus de hepatitis B anormales, se ganó un nuevo entendimiento en la relación estructura-función de diferentes secuencias víricas. Los estudios *in vitro* mostraron que el virus podía mantener la capacidad para el empaquetamiento dependiente de un ayudante y la transcripción inversa a pesar de la eliminación de hasta un 80% de su genoma (Horwich y otros, 1990). Esto sugirió que grandes partes del genoma se podrían sustituir por material genético foráneo. El hepatotropismo y la persistencia (integración) eran propiedades particularmente atractivas para la transferencia génica dirigida al hígado. Chang y otros recientemente introdujeron el gen de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) en el genoma del virus de la hepatitis B de pato en lugar de las secuencias codificantes superficiales y presuperficiales de polimerasa. Se cotransfectó con virus de tipo salvaje en una línea celular de hematoma aviaria. Se utilizaron medios de cultivo que contenían títulos elevados del virus recombinante para infectar hepatocitos primarios de patito. La expresión génica de CAT estable se detectó durante, como mínimo, 24 horas después de la transfección (Chang y otros, 1991).

Métodos no víricos: Se contemplan también en la presente invención varios métodos no víricos para la transferencia de vectores de expresión en células cultivadas de mamífero. Entre éstos se incluyen precipitación con fosfato cálcico (Graham y VanDer Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y otros, 1990), DEAE-dextrano (Gopal, 1985), electroporación (Tur-Kaspa y otros, 1986; Potter y otros, 1984), microinyección directa (Harland y Weintraub, 1985), liposomas cargados de ADN (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y otros, 1979) y complejos de lipofectamina-ADN, sonicación celular (Fechheimer y otros, 1987), bombardeo de genes utilizando microproyectiles de alta velocidad (Yang y otros, 1990), policones (Boussif y otros, 1995) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988). Algunas de estas técnicas se pueden adaptar de forma satisfactoria para su uso *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización de la presente invención, la construcción de expresión puede consistir simplemente en un vector recombinante desnudo. La transferencia de la construcción se puede llevar a cabo mediante cualquier método mencionado anteriormente que permeabiliza física o químicamente la membrana celular. Por ejemplo, Dubensky y otros (1984) inyectaron satisfactoriamente ADN de poliomavirus en forma de precipitados de CaPO_4 en el hígado y el bazo de ratones adultos y recién nacidos demostrando la replicación vírica activa y la infección aguda. Benvenisty y Neshif (1986) también demostraron que la inyección intraperitoneal directa de plásmidos precipitados con CaPO_4 da lugar a la expresión de los genes transfectados. Se prevé que el ADN que codifica una construcción de Grb2 o Crkl también se pueda transferir de una manera similar *in vivo*.

Otra realización de la presente invención para transferir un vector de expresión de ADN desnudo en células puede implicar el bombardeo de partículas. Este método depende de la capacidad de acelerar microproyectiles recubiertos de ADN a una velocidad elevada permitiendo que penetren las membranas celulares y entren en las células sin matarlas (Klein y otros, 1987). Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Uno de dichos dispositivos depende de una descarga de voltaje elevada para generar una corriente eléctrica que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang y otros, 1990). Los microproyectiles utilizados consistían en sustancias biológicamente inertes, tales como bolas de tungsteno u oro.

Se han bombardeado *in vivo* órganos seleccionados que incluyen el hígado, la piel, el tejido muscular de ratas y ratones (Yang y otros, 1990; Zelenin y otros, 1991). Esto puede requerir la exposición quirúrgica del tejido o células, para eliminar cualquier tejido que intervenga entre la pistola y el órgano diana. El ADN que codifica una construcción de Grb2 o Crkl se puede administrar mediante este método.

E. Composiciones farmacéuticas y vías de administración

Cuando se lleve a cabo la aplicación clínica de liposomas que contienen oligo- o polinucleótidos antisentido o vectores de expresión, será necesario preparar el complejo de liposoma como una composición farmacéutica apropiada para la aplicación deseada. Generalmente, esto comprenderá preparar una composición farmacéutica que está esencialmente libre de pirógenos, así como cualquier otra impureza que podría ser perjudicial para humanos o animales. También se puede desear generalmente utilizar tampones adecuados para hacer que el complejo sea estable y permite la captación por las células diana.

Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz del vector de expresión antisentido encapsulado en un liposoma tal como se ha descrito anteriormente, dispersado adicionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. A dichas composiciones también se les hace referencia como inocula. Las frases “farmacéuticamente o farmacológicamente aceptables” se refieren a composiciones que no producen una
 5 reacción adversa, alérgica o desfavorable cuando se administra a un animal, o un humano, según sea apropiado.

Tal como se utiliza en la presente invención, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas
 10 es bien conocida en la técnica. Excepto en la medida de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su utilización en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos complementarios.

Las soluciones de las composiciones terapéuticas se pueden preparar en agua mezclada de forma adecuada con un tensoactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones
 15 contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención se administran de forma ventajosa en forma de composiciones inyectables como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en líquido antes de la inyección. Estas preparaciones también se pueden emulsionar. Una composición habitual para dicho objetivo comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la
 20 composición puede contener 10 mg, 25 mg, 50 mg o hasta, aproximadamente, 100 mg de albúmina de suero humano por mililitro de solución salina tamponada de fosfato. Entre otros portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares.

Entre los ejemplos de disolventes no acuosos están propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables, tal como etiloleato. Entre los portadores acuosos se incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales, tales como cloruro sódico, dextrosa de Ringer, etc. Entre los vehículos intravenosos se incluyen fluidos y rellenos de nutrientes. Entre los conservantes se incluyen agentes antimicrobianos,
 30 antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según parámetros bien conocidos.

Las formulaciones adicionales son adecuadas para la administración oral. Entre las formulaciones orales se incluyen dichos excipientes habituales tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico y similares. Las composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, formulaciones de liberación controlada o polvos. Cuando la vía de administración es tópica, la forma puede ser una crema, pomada, ungüento o pulverizador.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de composiciones terapéuticas según la presente invención será mediante cualquier vía habitual siempre y cuando el tejido diana esté disponible mediante esa vía. Esto incluye administración oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. La administración tópica sería particularmente ventajosa para el tratamiento de cánceres de piel para evitar la alopecia inducida por la quimioterapia u otro trastorno dérmico hidroproliferativo. Alternativamente, la administración será mediante inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Dichas composiciones se administrarían normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables que incluyen portadores fisiológicamente aceptables, tampones u otros excipientes. Para el tratamiento de enfermedades de los pulmones, la vía preferente es la administración mediante aerosol al pulmón. El volumen del aerosol está entre aproximadamente 0,01 ml y 0,5 ml. De forma similar, una vía preferente para el tratamiento de una enfermedad asociada
 45 con el colon sería vía enema. El volumen del enema está entre aproximadamente 1 ml y 100 ml.

Una cantidad eficaz de la composición terapéutica se determina en base del objetivo pretendido. El término “dosis unitaria” o “dosificación” se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para su uso en un sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición terapéutica calculada para producir las respuestas deseadas descritas anteriormente, junto con su administración, es decir, la vía apropiada y la pauta de tratamiento. La
 55 cantidad a administrar, en cuanto al número de tratamientos y las dosis unitarias, depende de la protección deseada.

Las cantidades precisas de la composición terapéutica también dependen del criterio del profesional y son características de cada individuo. Entre los factores que afectan a la dosis se incluyen el estado físico y clínico del paciente, la vía de administración, el objetivo pretendido del tratamiento (alivio de síntomas frente a la curación) y la potencia, estabilidad y toxicidad de la sustancia terapéutica particular. Para la presente solicitud, se prevé que la cantidad de composición terapéutica comprenda una dosis unitaria que variará aproximadamente en 5-30 mg de polinucleótido.

65 F. Protocolos clínicos

Habitualmente, los pacientes que son candidatos para el tratamiento son aquéllos en la fase crónica de LMC. Se diagnosticaron aproximadamente 7000 nuevos pacientes por año con LMC, y la duración media de la fase crónica de la enfermedad es de cinco años. El curso habitual del tratamiento se proporcionará en ciclos de ocho semanas, aunque

se puede utilizar una duración más larga si no se observan efectos adversos con el paciente, y se pueden proporcionar términos más cortos de tratamientos si el paciente no tolera el tratamiento tal como se esperaba. Cada ciclo consistirá de entre 20 y 35 dosis individuales equidistantes en el tiempo, aunque esto también puede variar dependiendo de la situación clínica.

G. Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis de oligonucleótidos

Los p-etoxi oligonucleótidos resistentes a nucleasa se adquirieron en Oligos Etc. (Willsonville, OR). La longitud de los oligonucleótidos varía entre 16 y 18 bases. Las secuencias de los oligonucleótidos, de 5' a 3', son tal como se indica:

1. Oligonucleótido antisentido que dirige el sitio de inicio de la traducción de Grb2: ATATTTGGCGATGGCTTC
2. Oligonucleótido antisentido que dirige el sitio de inicio de la traducción de Crkl: GTCGAACCGGCGGAGGA
3. Oligos de control: GAAGGGCTTCTGCGTC

Ejemplo 2

Formación de liposomas

El lípido, dioleoilfosfatidilcolina, se adquirió de Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster AL). Los oligonucleótidos resistentes a nucleasa se mezclaron con lípidos en presencia de un exceso de t-butanol. La mezcla se centrifugó antes de ser congelada en un baño de acetona/hielo seco. La mezcla congelada se liofilizó e hidrató con solución salina tamponada con Hepes (Hepes 1 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5) durante toda la noche y, a continuación, los liposomas se sonicaron en un sonicador tipo baño de 10 a 15 minutos. El tamaño de los oligonucleótidos liposomales variaba habitualmente entre 200-300 nm de diámetro mediante el medidor de partículas de submicras modelo 370 autodiluido (Nicom, Santa Barbara, CA).

Ejemplo 3

Inhibición por los nucleótidos de la proliferación celular (Grb2)

Las líneas celulares de LMC, BV173 y K562 se utilizaron para analizar la capacidad de los oligonucleótidos para inhibir el crecimiento celular. Estas líneas celulares se obtuvieron originalmente de pacientes de LMC en "crisis blast". Ambas líneas celulares expresan la proteína de fusión p210^{Bcr-Abl}. Las células HL60, que se obtuvieron originalmente de un paciente promielocítico humano, se utilizaron como control ya que estas células no producen *bcr-ab*, y su proliferación es independiente del mecanismo de señalización de *ras*.

Cinco mil células K562, diez mil células BV173, o diez mil células HL60 se sembraron por pocillo en una placa de 96 pocillos en 0,1 ml de medio RPMI 1640 que contenía suero de ternera fetal al 10%. Después de 2 horas de siembra, las concentraciones finales de 0-10 μ M de oligonucleótidos liposomales se añadieron a estas células. Las células se incubaron con oligonucleótidos liposomales durante 3 días. Los efectos de los oligonucleótidos liposomales en la proliferación de las células leucémicas se analizaron mediante el ensayo de alamarBlue (Alamar, Sacramento, CA).

El alamarBlue es un colorante indicador de oxidación/reducción en el que la absorbancia está relacionada con la reducción metabólica celular. Por lo tanto, es una medida del número de células y la actividad metabólica de las células. Después de la incubación con oligonucleótidos liposomales, se añadieron 50 μ l de alícuotas de células/pocillo a 130 μ l de medio. Veinte μ l de colorante alamarBlue se añadieron a cada pocillo. Después de la incubación durante 6-8 horas a 37°C, las placas se leyeron directamente en un lector de microplacas (Molecular Devices, Menlo Park, CA) a 570 y 595 nm. La diferencia en la absorbancia entre 570 y 595 nm se tomó como el valor de absorbancia global de las células leucémicas. Las viabilidades de células tratadas con oligonucleótidos liposomales se compararon con las de las células no tratadas.

Los oligonucleótidos antisentido liposomales específicos para Grb2 pueden inhibir la proliferación de células leucémicas de manera dependiente de la dosis. Cuando se utilizaron concentraciones de 5-7 μ M de oligonucleótidos antisentido liposomales específicos para Grb2 (figura 1), las viabilidades de las líneas celulares de LMC, BV173 y K562 fueron de un 10-60% de las de células no tratadas. En otras palabras, se indujo el 40-90% de la inhibición del crecimiento en células de LMC. En condiciones idénticas, no se redujeron las viabilidades celulares de células HL60. De hecho, las viabilidades de células HL60 no se redujeron hasta utilizar concentraciones de 8-10 μ M.

Ejemplo 4 comparativo

Inhibición por los nucleótidos de la proliferación celular (Crkl)

5 El ensayo se realizó tal como se describe en el ejemplo 5. Los oligonucleótidos antisentido liposomales específicos para Crkl pueden inhibir la proliferación de células leucémicas de manera dependiente de la dosis. Cuando se utilizaron concentraciones de 5-8 μ M de oligonucleótidos antisentido liposomales específicos para Crkl (figura 2), las viabilidades de las células BV173 fueron de un 10-40% de las de células no tratadas. Cuando se utilizaron concentra-
10 ciones de 8-9 μ M de oligonucleótidos antisentido liposomales, las viabilidades de las células K562 fueron de un 10-40% de las de células no tratadas. Las viabilidades de células HL60 no se redujeron hasta un 40%, excepto cuando se utilizaron concentraciones de 10 μ M de oligonucleótidos antisentido liposomales.

Ejemplo 5

15 *Inhibición por los oligonucleótidos de la proliferación celular (control)*

Los oligonucleótidos de control liposomales que no se hibridan a secuencias de Grb2 o Crkl no inhiben la proliferación de células de LMC excepto a concentraciones elevadas. Las viabilidades de las células BV173 se redujeron en un 50% cuando se utilizaron concentraciones de 8 μ M o superior de oligos de control liposomales. Las viabilidades
20 de células K562 y HL60 no se redujeron excepto a concentraciones de 10 μ M.

H. Referencias

Las siguientes referencias proporcionan ejemplos de procedimientos u otros detalles complementarios a los ex-
25 puestos en la presente invención.

Baichwal y Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes", *En: Kucherlapati R, ed. Gene transfer*. New York: Plenum Press, pág. 117-148, 1986.

30 **Bangham y otros**, *J. Mol Biol.* 13:238-52 (1965).

Bedi y otros, "Inhibition of apoptosis by Bcr-Abl in chronic myeloid leukemia." *Blood* 83:2038-2044, 1994.

Benvenisty y Neshif, "Direction introduction of genes into rats and expression of the genes", *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 83:9551-9555, 1986.
35

Boussif y otros, 1995.

Chang y otros, "Foreign gene delivery and expression in hepatocytes using a hepatitis B virus vector", *Hepatology*,
40 14:134A, 1991.

Chen y Okayama, "High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA", *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.

45 **Coffin**, "Retroviridae and their replication", *En: Virology*, Fields y otros (eds.), New York: Raven Press, pág. 1437-1500, 1990.

Coupar y otros, "A general method for the construction of recombinant vaccinia virus expressing multiple foreign genes;" *Gene*, 68:1-10, 1988.

50 **Deamer y Uster**, 1983.

Dubensky y otros, "Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice", *Proc. Nat'l Acad Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.
55

Fechheimer y otros, "Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading", *Proc. Nat'l Acad Sci USA*, 84:8463-8467, 1987.

Fraley y otros, "Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer", *Proc. Nat'l Acad Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
60

Friedmann, "Progress toward human gene therapy", *Science*, 244:1275-1281, 1989.

Ghosh y Bachhawat, "Targeting of liposomes to hepatocytes", *En: Wu G, Wu C ed., Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, New York: Marcel Dekker, pág. 87-104, 1991.
65

Gopal, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and cotransfection of suspension cell cultures", *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.

Graham y Van der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA", *Virology*, 52:456-467, 1973.

Graham y otros, "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5", *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.

Gregoriadis, *Drug Carriers In Biology And Medicine*, G. Gregoriadis ed. (1979).

Grunhaus y Horwitz, "Adenovirus as cloning vector", *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.

Harland y Weintraub, "Translation of mammalian mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA", *J Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.

Heronat y Muzyska, "Use of adenoassociated virus as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.

Horwich y otros, "Synthesis of hepadenavirus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured HuH7 cells", *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.

Kaneda y otros, "Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver", *Science*, 243:375-378, 1989.

Kato y otros, "Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver", *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.

Klein y otros, "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells", *Nature*, 327:70-73, 1987.

Lowenstein y otros, "The SH2 and SH3 domain-containing protein Grb2 links receptor tyrosine kinases to ras signalling", *Cell*, 70:431-442, 1992.

Mann y otros, "Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free detective retrovirus", *Cell*, 33:153-159, 1983.

McGahan y otros, "Bcr-Abl maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death", *Blood*, 83:1179-1187, 1994.

Nicolas y Rubenstein, "Retroviral vectors", *En: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez y Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, pág. 494-513, 1988.

Nicolau y otros, "Liposomes as carriers for *in vivo* gene transfer and expression", *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.

Nicolau y Sene, "Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells", *Biochem. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.

Paskind y otros, "Dependence of moloney murine leukemia virus production on cell growth", *Virology*, 67:242-248, 1975.

Pendergast y otros, "Bcr-Abl-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein", *Cell*, 75:175-185.

Potter y otros, "Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation", *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.

Puil y otros, "Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the ras signaling pathway", *EMBO J.*, 13(4):764-773, 1994.

Ridgeway, "Mammalian expression vectors", *En: Rodriguez RL, Denhardt DT, ed. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Stoneham: Butterworth, pág. 467-492, 1988.

Rippe y otros, "DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture", *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.

Skorski y otros, "Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells", *Blood* 86:726-736, 1995.

Skorski y otros, "Negative regulation of p120^{GAP} GTPase promoting activity by p210^{Bcr-Abl}, Implication for RAS-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth", *J. Exp. Med.*, 179:1855-1865, 1994.

Skorski y otros, "Suppression of Philadelphia leukemia cell growth in mice by Bcr-Abl antisense oligodeoxynucleotides", *Proc. Natl. Acad. Sci.: USA*, 91:4504-4508, 1994.

Stratford-Perricaudet y Perricaudet, "Gene transfer into animals: the promise of adenovirus", pág. 51-61, *En: "Human Gene Transfer"*, Eds, O. Cohen-Haguenaue and M. Boiron, Editions John Libbey Eurotext, Francia, 1991.

Szoka y Papahadjopoulos, 1978.

Szczylik y otros, "Selective inhibition of Leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligonucleotides", *Science*, 253:262-265, 1991.

Tari y otros, "Liposomal delivery of methylphosphonate oligodeoxynucleotides in chronic myelogenous leukemia", *Blood* 84:601-607, 1994.

ten Hoeve y otros, "Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia", *Blood*, 84:173 1-1736, 1994.

ten Hoeve y otros, "Cellular interactions of CRKL, an SH2-SH3 adaptor protein", *Cancer Res.*, 54:2563-2567, 1994.

ten Hoeve y otros, "Isolation and chromosomal localization of CRKL, a human CRK-like gene", *Oncogene*, 8:2469-2475, 1993.

Temin, "Retrovirus vectors for gene transfer: Efficient integration into and expression of exogenous DNA in vertebrate cell genome", *En: Gene Transfer*, Kuchetlapati (ed.). New York: Plenum Press, pág. 149-188, 1986.

Tooze, 1981.

Tur-Kaspa y otros, "Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes", *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.

Wagner y otros, *Science*, 260:1510-1513, 1993.

Wong y otros, "Appearance of [Beta]-lactamase activity in animal cells upon liposome mediated gene transfer", *Gene*, 10:87-94, 1980.

Wu y Wu, "Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells *in vitro*", *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.

Wu y Wu, "Receptor-mediated *in vitro* gene transfections by a soluble DNA carrier system", *d. Biol Chem.*, 262:4429-4432, 1987.

Yang y otros, "*in vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment", *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990.

Zelenin y otros, "High-velocity mechanical DNA transfer of the chloramphenicol acetyltransferase gene into rodent liver, kidney and mammary gland cells in organ explants and *in vivo*", *FEBS Lett.*, 280:94-96, 1991.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una formulación liposomal de un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido que codifica Crkl, en la que el liposoma se prepara a partir de fosfolípidos neutros.

2. Composición, según la reivindicación 1, en la que dicho polinucleótido es un oligonucleótido que tiene una longitud de 8-50 bases.

3. Composición, según la reivindicación 1, en la que el polinucleótido es un oligonucleótido que tiene la secuencia GTCGAACCGGCGGAGGA (SEC ID No: 6).

4. Composición, según la reivindicación 1, en la que dicho liposoma comprende el lípido dioleoilfosfatidilcolina.

5. Composición que comprende una formulación liposomal de (i) un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido que codifica Crkl y (ii) un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido de codificación *bcr-abl*, en la que el liposoma se prepara a partir de fosfolípidos neutros.

6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polinucleótido se hibrida al sitio de inicio de la traducción de un polinucleótido de codificación Crkl.

7. Composición que comprende una formulación liposomal de una construcción de expresión que codifica un primer polinucleótido que se hibrida al sitio de inicio de la traducción de un polinucleótido que codifica Crkl, en la que dicho primer polinucleótido está bajo el control de un promotor que es activo en células eucariotas, en la que el liposoma se prepara a partir de fosfolípidos neutros.

8. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en un método para inhibir la proliferación de una célula cancerígena *in vitro* que comprende poner en contacto dicha célula cancerígena con dicha composición.

9. Composición, según la reivindicación 8, en la que dicha célula cancerígena es una célula de leucemia.

10. Composición, según la reivindicación 9, en la que dicha célula cancerígena es una célula de leucemia mielógena crónica.

11. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su utilización en un método para inhibir la proliferación de una célula cancerígena que comprende poner en contacto dicha célula cancerígena con dicha composición.

12. Composición, según la reivindicación 11, en la que dicha composición se formula para entrar en contacto con un paciente.

13. Composición, según la reivindicación 12, en la que dicho paciente es un humano.

14. Composición, según la reivindicación 13, en la que dicha composición se administra a dicho humano en un volumen de 0,50-10,0 ml por dosis.

15. Composición, según la reivindicación 13, en la que dicha composición se administra a dicho humano en una cantidad de 5-30 mg de polinucleótido por m².

16. Composición, según la reivindicación 13, en la que dicha composición se administra tres veces por semana durante ocho semanas.

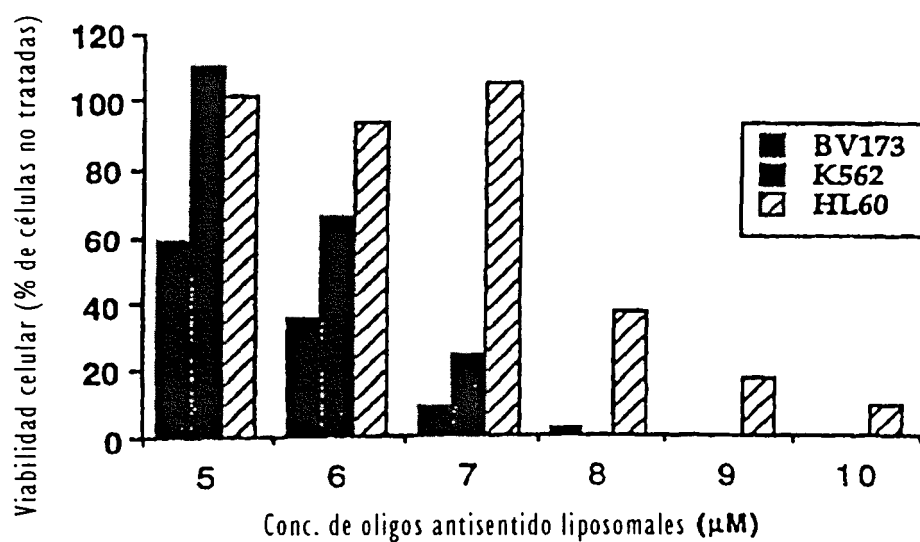


FIG. 1

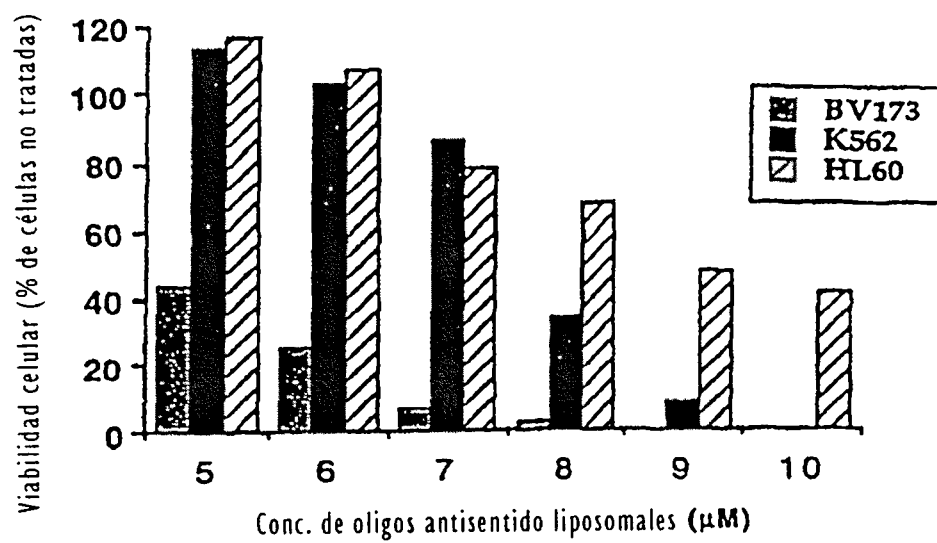


FIG. 2

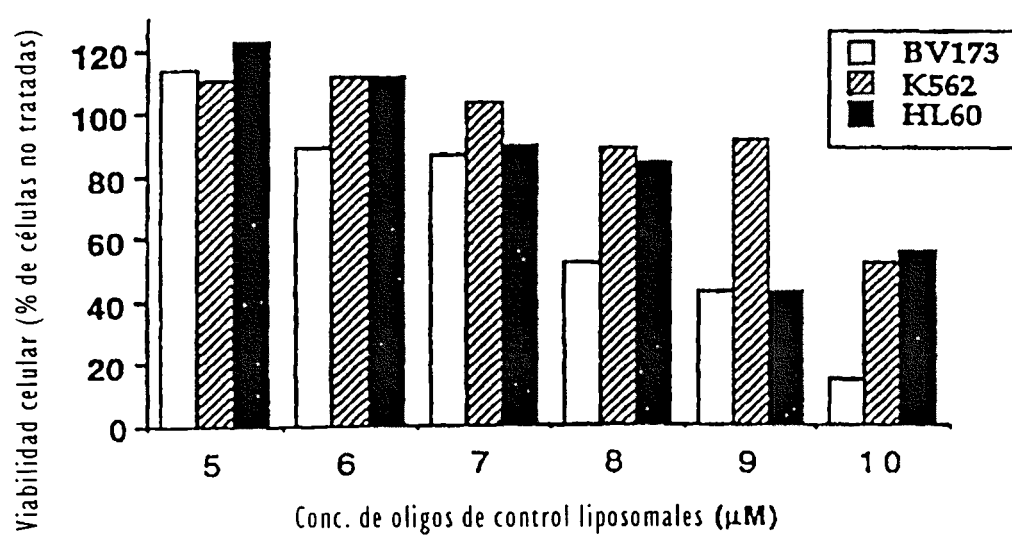


FIG. 3

GCCAGTGAATTCGGGGGCTCAGCCCTCCTCCCTCCCTCCCCCTGCTTCAGGCTGCTGAG 60
 CACTGAGCAGCGCTCAGAATGGAAGCCATCGCCAAATATGACTTCAAAGCTACTGCAGAC 120
 H E A I A K Y D F K A T A D 14
 GACGAGCTGAGCTTCAAAAGGGGGGACATCCTCAAGGTTTTGAACGAAGAATGTGATCAG 180
D E L S F K R G D I L K V L N E E C D O 34
 983 AACTGGTACAAGGCAGAGCTTAATGGAAAAGACGGCTTCATTCCCAAGAAGTACATAGAA 240
N H Y K A E L N G K D G F I P K N Y I E 54
 ATGAAACCACATCCGTGGTTTTTTGGCAAAATCCCCAGAGCCAAGGCAGAAAGAAATGCTT 300
M K P H P H F F G K I P R A K A E E M L 74
 AGCAAAACAGCGGCACGATGGGGCCTTTCTTATCCGAGAGAGTGAGAGCGCTCCTGGGGAC 360
S K Q R H D G A F L I R E S E S A P G D 94
 TTCTCCCTCTCTGTCAAGTTTGGAACGATGTGCAGCACTTCAAGGTGCTCCGAGATGGA 420
F S L S V K F G N D Y Q H F K V L R D G 114
 982 GCCGGGAAGTACTTCCTCTGGGTGGTGAAGTTCAATTCTTTGAATGAGCTGGTGGATTAT 480
A G K Y F L W V V K F N S L N E L V D Y 134
 CACAGATCTACATCTGTCTCCAGAAACCAGCAGATATTCCTGCGGGACATAGAACAGGTG 540
H P S T S V S R N O O I F L R D I E O V 154
 CCACAGCAGCCGACATACGTCCAGGCCCTCTTTGACTTTGATCCCCAGGAGGATGGAGAG 600
P Q Q P T Y V Q A L F D F D P O F D G E 174
 CTGGGCTTCCGCCGGGAGATTTTTATCCATGTGATGGATAACTCAGACCCCAACTGGTGG 660
L G F R R G D F I H V M D N S D P N W W 194
 983 AAAGGAGCTTGCCACGGGCAGACCGGCATGTTTCCCCGCAATTATGTCACCCCGTGAAC 720
K G A C H G O T G M F P R N Y V T P V N 214
 CGGAACGTCTAAGAGTCAAGAAGCAATTATTTAAAGAAAGTGA AAAATGTAAAACACATA 780
 R N V 217
 CAAAAGAATTA AACCCACAGCTGCCCTCTGACAGCAGCCTGTGAGGGACTGCAGAACACC 840
 TGGCCGGGTACCCCTGTGACCCCTCTCACTTTGGTTGGAACTTTAGGGGTGGGAGGGGGC 900
 GTTGGATTTAAAAATGCCAAACTTACCTATAAATTAAGAAGAGTTTTTATTACAAATTT 960
 TCACTGCTGCTCCTCTTTCCCTCCTTTTGTCTTTTTTTTCATCTTTTCTCTCTCTGTC 1020
 CATCAGTGCATGACGTTTAAGGCCACGTATAGTCTAGCTGACGCCAATAATAAAAAACA 1080
 AGAAACCAAAAAAAAAAAACCCGAATTCA 1109

FIG. 4

ES 2 299 536 T3

1 CGGAGGGGAGGTGGCTGCCCTTCTCCCGCTCCGCCATTTTGTTCGTGGCTATTGGGAACAAGCTGGGCAAAAGCAACCCGGAGG
 90 CGCGACGCTCCTTCGAGTTCGGTCCCTCGTGTGACGGCGGGGGTCCGTGAAGACCCGTCGAGCTCGGGCGCGCGCGGTTCAGGCGCGG
 180 AGTCACITGGAGGCAACCCCTGGGACCGGAGCAGCCCGAGAACCCTGGGGTGGCTCCGCTCGGGCTCGGGTTTGCCTGCCCGACCCCC
 270 GCGTCTGCCGTGCATTTCCCGGGCGGCTCTCTCCGTGTGGCGGCCCCGGAGCAGGCGGGCGGCGTGGAGGATGCTCGGGCCCGGAGCGG
 360 AGAGGAAAGTGTGCCCCAGCCCTCTGAGCGCTCCTCGAGGTGTGGAGAGGCCCTTCTCGGGCCCCAAAGCCGTCTGCCGGCTAAGGC
 450 GTGCAGAGCAGGCGAGGACAGCCGCGGCCCTACCGCGCAGAGTCCCGGTCCAAACCATGTCTCCGCCAGGTTCGACTCCTCGGAC
 1 M S S A R F O S S O
 540 CGTCCGCTGGTATATGGGGCCGGTGTCTCGCCAGGAGGCGCAGACCCGCTCCAGGGCCAGCGCCAGGTATGTTCCTCGTCCGCAI
 11 R S A V Y H G P V S R Q E A O T R L O G O R H G H F L V R O SH2
 630 TCTTCCACCTGCCCTGGGACTATGTGCTGTCCGTGTCCGAGAATCGCGGGTCTCCCACTACATTATCAACTCGCTGCCCAACCGCGT
 41 S S T C P G D Y V L S V S E N S R V S H Y I I N S L P H R R
 720 TTTAAGATCGGGGACCAGGAATTTGACCATTTGCCGGCCCTGCTGGAGTTTACAAGATCCACTACCTGGACACCACCACCTCATCGAG
 71 F K I G D Q E F D H L P A L L E F Y K I H Y L O T T I L I E SH2
 810 CCTGCCCCAGGTATCCAAGCCCAATGGGATCTGTCTCAGCACCACCTGCCTACAGCAGAAGATAACCTGGAATATGTACGGACT
 101 P A P R Y P S P P H G S V S A P H L P T A E D N L E Y V R T
 900 CTGTATGATTTTCTGGGAATGATGCCGAAGACCTGCCCTTTAAAAAGGGTGAGATCCTAGTGATAATAGAGAAGCCTGAAGAACAGTGG
 131 L Y D F P G N D A E D L P F K X G E I L V I I E K P E E O W SH3
 990 TGGAGTCCCGGAACAAGGATGGCGGGTGGGATGATTCCTGTCCCTTATGTGGAAGCTTGTGAGATCCTCACCACCGGAAAGCAT
 161 W S A R N K D G R V G M I P V P Y V E K L V R S S P H G K H
 1080 GGAATAGGAATCCAACAGTTATGGGATCCAGAACCTGCTCATGATACGCTCAACCTCAGACCAACTCCTCTACCTGCAGTTTCC
 191 G N R N S N S Y G I P E P A H A Y A Q P O T I I P L P A V S
 1170 GGTTCCTCGGGCAGCAATCACCCTTTGCCATCCACACAGAAAGGACCTGTCTTTGGAAAGCAATCCAGAAAAGAGTACCTGTGCT
 221 G S P G A A I T P L P S T Q H G P V F A K A I O K R V P C A SH3
 1260 TATGACAAGACTGCTTGGCATTAGAGGTTCGTGACATCGTGAAGTCAAGGATGAATATAATGGCCAGTGGGAAGGCAAGTGAAC
 251 Y D K T A L A L E V G D I V K V T R M N I N G O V E S E V H
 1350 GGGCGCAAGGGCTTTTCCCTTTACGCACGTCAAATCTTTGACCTCAAAACCCAGATGAAAAGAGTGATTCGTGTGCCCTGTTC
 281 G R K G L F P F I H V K I F D P O N P D E N E
 1440 CTGCTGCTTTGTGTCTGCTGTCTAGTCTCCTTTGAAGTGGGAAGCATTTTCTCTATAGGCAAGTCACACTGCATTCGCGAAGTC
 1530 CAGCTTTCTGCAGACTGGCAGTGGACACACATTTGGAATGCACACAGCGGCTGCCCTCCTGATGTTTGTATCATAGTCTATTGTGCAAA
 1620 GAGTAGCGATTTTAGAGTCTTTTGGATCATAAATGGAATACTGATGGAAGCACACAAGTGGAGAGAAGTTGACGTGGAAGGGTCT
 1710 TCCTTCTCATTCGTGCCCGTTTGTACATGGGACTGATTCTGTCTGTTTACCAGAGAAAGCTTGAGGCCATGGEGAGATACGCAITTT
 1800 GCTGTTCACAAAGCAGTGGCTTAGCTGCCATCTTGCCTTTCTTTGGACAACAGGAAGTGAACCTTAAGGAAGAGAGAATTC

FIG. 5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: Board of Regents, The University of Texas System

(B) CALLE: 201 W. 7th Street

(C) CIUDAD: Austin

(D) ESTADO: Tejas

(E) PAÍS: E.E.U.U.

(F) CÓDIGO POSTAL: 78701

(G) TELÉFONO: (512) 418-3000

(H) TELEFAX: (512) 474-7577

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOGENA CRÓNICA MEDIANTE OLIGODESOXI-NUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO LIPOSOMALES DIRIGIDOS A Grb2 O Crk1

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 7

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO MEDIO: disquete

(B) ORDENADOR: compatible con IBM PC

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1109 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 79..729

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO: 1:

ES 2 299 536 T3

	GCCAGTGAAT TCGGGGGCTC AGCCCTCCTC CCTCCCTTCC CCCTGCTTCA GGCTGCTGAG	60
5	CACTGAGCAG CGCTCAGA ATG GAA GCC ATC GCC AAA TAT GAC TTC AAA GCT Met Glu Ala Ile Ala Lys Tyr Asp Phe Lys Ala 1 5 10	111
10	ACT GCA GAC GAC GAG CTG AGC TTC AAA AGG GGG GAC ATC CTC AAG GTT Thr Ala Asp Asp Glu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asp Ile Leu Lys Val 15 20 25	159
15	TTG AAC GAA GAA TGT GAT CAG AAC TGG TAC AAG GCA GAG CTT AAT GGA Leu Asn Glu Glu Cys Asp Gln Asn Trp Tyr Lys Ala Glu Leu Asn Gly 30 35 40	207
20	AAA GAC GGC TTC ATT CCC AAG AAC TAC ATA GAA ATG AAA CCA CAT CCG Lys Asp Gly Phe Ile Pro Lys Asn Tyr Ile Glu Met Lys Pro His Pro 45 50 55	255
25	TGG TTT TTT GGC AAA ATC CCC AGA GCC AAG GCA GAA GAA ATG CTT AGC Trp Phe Phe Gly Lys Ile Pro Arg Ala Lys Ala Glu Glu Met Leu Ser 60 65 70 75	303
30	AAA CAG CGG CAC GAT GGG GCC TTT CTT ATC CGA GAG AGT GAG AGC GCT Lys Gln Arg His Asp Gly Ala Phe Leu Ile Arg Glu Ser Glu Ser Ala 80 85 90	351
35	CCT GGG GAC TTC TCC CTC TCT GTC AAG TTT GGA AAC GAT GTG CAG CAC Pro Gly Asp Phe Ser Leu Ser Val Lys Phe Gly Asn Asp Val Gln His 95 100 105	399
40	TTC AAG GTG CTC CGA GAT GGA GCC GGG AAG TAC TTC CTC TGG GTG GTG Phe Lys Val Leu Arg Asp Gly Ala Gly Lys Tyr Phe Leu Trp Val Val 110 115 120	447
45	AAG TTC AAT TCT TTG AAT GAG CTG GTG GAT TAT CAC AGA TCT ACA TCT Lys Phe Asn Ser Leu Asn Glu Leu Val Asp Tyr His Arg Ser Thr Ser 125 130 135	495
50	GTC TCC AGA AAC CAG CAG ATA TTC CTG CGG GAC ATA GAA CAG GTG CCA Val Ser Arg Asn Gln Gln Ile Phe Leu Arg Asp Ile Glu Gln Val Pro 140 145 150 155	543
55	CAG CAG CCG ACA TAC GTC CAG GCC CTC TTT GAC TTT GAT CCC CAG GAG Gln Gln Pro Thr Tyr Val Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asp Pro Gln Glu 160 165 170	591
60	GAT GGA GAG CTG GGC TTC CGC CGG GGA GAT TTT ATC CAT GTC ATG GAT Asp Gly Glu Leu Gly Phe Arg Arg Gly Asp Phe Ile His Val Met Asp 175 180 185	639
65	AAC TCA GAC CCC AAC TGG TGG AAA GGA GCT TGC CAC GGG CAG ACC GGC Asn Ser Asp Pro Asn Trp Trp Lys Gly Ala Cys His Gly Gln Thr Gly 190 195 200	687
	ATG TTT CCC CGC AAT TAT GTC ACC CCC CTG AAC CGG AAC GTC Met Phe Pro Arg Asn Tyr Val Thr Pro Val Asn Arg Asn Val 205 210 215	729

ES 2 299 536 T3

TAAGAGTCAA GAAGCAATTA TTTAAGAAH GTGAAAAATG TAAACACAT AAAAAAGAAT 789
 TAAACCCACA AGCTGCCTCT GACAGCAGCC TGTGAGGGAG TGCAGAACAC CTGGCCGGGT 849
 CACCCTGTGA CCTCTCACT TTGGTTGGAA CTTTAGGGGG TGGGAGGGGG CGTTGGATTT 909
 AAAAAATGCCA AAACCTACCT ATAAATTAAG AAGAGTTTTT ATTACAAATT TTCACTGCTG 969
 CTCCTCTTTC CCTCCTTTG TCTTTTTTTT CATCCTTTT TCTCTCTGT CCATCAGTGC 1029
 ATGACGTTTA AGGCCACGTA TAGTCCTAGC TGACGCCAAT AATAAAAAAC AAGAAACCAA 1089
 AAAAAAAAAA CCGAATTCA 1109

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 217 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO: 2:

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

ES 2 299 536 T3

Phe Arg Arg Gly Asp Phe Ile His Val Met Asp Asn Ser Asp Pro Asn
 180 195 190
 5 Trp Trp Lys Gly Ala Cys His Gly Gln Thr Gly Met Phe Pro Arg Asn
 195 200 205
 10 Tyr Val Thr Pro Val Asn Arg Asn Val
 210 215

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1881 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 510..1418

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO: 3:

30 CGGAGGGGGA GGTGGCTGCC GCTTCTCCCG CGTCCGCCAT TTGTGTGCTG TGGCTATTGG 60
 GAACAAGCTG GGC AAAAGCA CCCCGGAGGC GCGACGCTCC TTCGAGTTCC GTGCCTCGTG 120
 TGACGGCGGG GGTGGGTGAA GACCCGTCGA GCTGCGGGCG CGGCGCGTTC CAGGCCGGGA 180
 35 GTCACTGGAG GCACCCCTGG GACGCGGAGC AGCCCGAGAA CCCCGGGGTG GCCTCCGCTG 240
 CCGCTCGGGT TTGCCTGCCC CGACCCCCCG GCTCTGCCGT GCATTCCCGG GCGGCTCTCT 300
 40 CCGTGTGGCG GCGCCGAGC AGGCGGGCGG CGTCCGAGGA TGCTGCGGGC CCGGAGCCGA 360
 GAGGAAAGTG CTGGCCGAGC CCTCTGAGCG CTCCTCGAGG TGTGCGAGAG GCCCTTCTCTC 420
 45 GGCCCCAAAG CCGTCTGCCG GGCTAAGGCG TGCAGAGCAG GCGAGGACAG CCGCCGCCCC 480
 TACCGCCGCA GAGTCCCCCG TCCAACACC ATG TCC TCC GCC AGG TTC GAC TCC 533
 Met Ser Ser Ala Arg Phe Asp Ser
 1 5
 50 TCG GAC CGC TCC GCC TGG TAT ATG GGG CCG GTG TCT CGC CAG GAG GCG 581
 Ser Asp Arg Ser Ala Trp Tyr Met Gly Pro Val Ser Arg Gln Glu Ala
 10 15 20
 55 CAG ACC CGG CTC CAG GGC CAG CGC CAC GGT ATG TTC CTC GTC CGC GAT 629
 Gln Thr Arg Leu Gln Gly Gln Arg His Gly Met Phe Leu Val Arg Asp
 25 30 35 40
 60 TCT TCC ACC TGC CCT GGG GAC TAT GTG CTG TCG GTG TCC GAG AAC TCG 677
 Ser Ser Thr Cys Pro Gly Asp Tyr Val Leu Ser Val Ser Glu Asn Ser
 45 50 55
 65 CGG GTC TCC CAC TAC ATT ATC AAC TCG CTG CCC AAC CGC CGT TTT AAG 725
 Arg Val Ser His Tyr Ile Ile Asn Ser Leu Pro Asn Arg Arg Phe Lys
 60 65 70

ES 2 299 536 T3

5	ATC GGG GAC CAG GAA TTT GAC CAT TTG CCG GCC CTG CTG GAG TTT TAC Ile Gly Asp Gln Glu Phe Asp His Leu Pro Ala Leu Leu Glu Phe Tyr 75 80 85	773
10	AAG ATC CAC TAC CTG GAC ACC ACC ACC CTC ATC GAG CCT GCG CCC AGG Lys Ile His Tyr Leu Asp Thr Thr Thr Leu Ile Glu Pro Ala Pro Arg 90 95 100	821
15	TAT CCA AGC CCA CCA ATG GGA TCT GTC TCA GCA CCC AAC CTG CCT ACA Tyr Pro Ser Pro Pro Met Gly Ser Val Ser Ala Pro Asn Leu Pro Thr 105 110 115 120	869
20	GCA GAA GAT AAC CTG GAA TAT GTA CGG ACT CTG TAT GAT TTT CCT GGG Ala Glu Asp Asn Leu Glu Tyr Val Arg Thr Leu Tyr Asp Phe Pro Gly 125 130 135	917
25	AAT GAT GCC GAA GAC CTG CCC TTT AAA AAG GGT GAG ATC CTA GTG ATA Asn Asp Ala Glu Asp Leu Pro Phe Lys Lys Gly Glu Ile Leu Val Ile 140 145 150	965
30	ATA GAG AAG CCT GAA GAA CAG TGG TGG AGT GCC CGG AAC AAG GAT GGC Ile Glu Lys Pro Glu Glu Gln Trp Trp Ser Ala Arg Asn Lys Asp Gly 155 160 165	1013
35	CGG GTT GGG ATG ATT CCT GTC CCT TAT GTC GAA AAG CTT GTG AGA TCC Arg Val Gly Met Ile Pro Val Pro Tyr Val Glu Lys Leu Val Arg Ser 170 175 180	1061
40	TCA CCA CAC GGA AAG CAT GGA AAT AGG AAT TCC AAC AGT TAT GGG ATC Ser Pro His Gly Lys His Gly Asn Arg Asn Ser Asn Ser Tyr Gly Ile 185 190 195 200	1109
45	CCA GAA CCT GCT CAT GCA TAC GCT CAA CCT CAG ACC ACA ACT CCT CTA Pro Glu Pro Ala His Ala Tyr Ala Gln Pro Gln Thr Thr Thr Pro Leu 205 210 215	1157
50	CCT GCA GTT TCC GGT TCT CCT GGG GCA GCA ATC ACC CCT TTG CCA TCC Pro Ala Val Ser Gly Ser Pro Gly Ala Ala Ile Thr Pro Leu Pro Ser 220 225 230	1205
55	ACA CAG AAT GGA CCT GTC TTT GCG AAA GCA ATC CAG AAA AGA GTA CCC Thr Gln Asn Gly Pro Val Phe Ala Lys Ala Ile Gln Lys Arg Val Pro 235 240 245	1253
60	TGT GCT TAT GAC AAG ACT GCC TTG GCA TTA GAG GTT GGT GAC ATC GTG Cys Ala Tyr Asp Lys Thr Ala Leu Ala Leu Glu Val Gly Asp Ile Val 250 255 260	1301
65	AAA GTC ACA AGG ATG AAT ATA AAT GGC CAG TGG GAA GGC GAA GTG AAC Lys Val Thr Arg Met Asn Ile Asn Gly Gln Trp Glu Gly Glu Val Asn 265 270 275 280	1349
	GGG CGC AAA GGG CTT TTC CCC TTT ACG CAC GTC AAA ATC TTT GAC CCT Gly Arg Lys Gly Leu Phe Pro Phe Thr His Val Lys Ile Phe Asp Pro 285 290 295	1397
	CAA AAC CCA GAT GAA AAC GAG TGATTGCTGT TGCCCTGTTT CCTGCTGCTT Gln Asn Pro Asp Glu Asn Glu 300	1448

ES 2 299 536 T3

```

TGTGTCTCTG CCTGTCCTAG TCTCCTTTGA AGTGGGAAAG CATTTTCTCT CATAGGCAAG 1508
TCACACTGCA TTGCCGAAGT CCAGCTTTCT GCAGACTGGC AGTCGCACAC ACATTTGGAA 1568
TGCACACAGC GGCTGCCTCC TGATGTTTGT ATCATAGTCG TATTGTGCAA AGAGTAGCCG 1628
ATTTTAGAGT TCTTTTGGAT CATAAACTGG AAATACTGAT GGAAGCACAC AAGTGGAGAG 1688
AAGTTGACGT GGAAAGGGTC TTCCTTCTCA TTGCTGCCCG TTTGTACATG GGAAGTATTC 1748
TGTCGTGTTC ACCAGAGAAA GCTTGAGGCC ATGGCGAGAT ACTGCATGTT TGCTGTTCCA 1808
CAAAGCAGTG GCTTAGCTGC CATCTTGCTT TCTTTTGGAC AACAGGAAGT GAACCTTAAG 1868
GAAGAGAGAA TTC 1881

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 303 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 4:

```

Met Ser Ser Ala Arg Phe Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Trp Tyr Met
 1             5             10             15

Gly Pro Val Ser Arg Gln Glu Ala Gln Thr Arg Leu Gln Gly Gln Arg
          20             25             30

His Gly Met Phe Leu Val Arg Asp Ser Ser Thr Cys Pro Gly Asp Tyr
          35             40             45

Val Leu Ser Val Ser Glu Asn Ser Arg Val Ser His Tyr Ile Ile Asn
 50             55             60

Ser Leu Pro Asn Arg Arg Phe Lys Ile Gly Asp Gln Glu Phe Asp His
 65             70             75             80

Leu Pro Ala Leu Leu Glu Phe Tyr Lys Ile His Tyr Leu Asp Thr Thr
          85             90             95

Thr Leu Ile Glu Pro Ala Pro Arg Tyr Pro Ser Pro Pro Met Gly Ser
          100            105            110

Val Ser Ala Pro Asn Leu Pro Thr Ala Glu Asp Asn Leu Glu Tyr Val
          115            120            125

Arg Thr Leu Tyr Asp Phe Pro Gly Asn Asp Ala Glu Asp Leu Pro Phe
          130            135            140

```

ES 2 299 536 T3

Lys Lys Gly Glu Ile Leu Val Ile Ile Glu Lys Pro Glu Glu Gln Trp
 145 150 155 160
 Trp Ser Ala Arg Asn Lys Asp Gly Arg Val Gly Met Ile Pro Val Pro
 165 170 175
 Tyr Val Glu Lys Leu Val Arg Ser Ser Pro His Gly Lys His Gly Asn
 180 185 190
 Arg Asn Ser Asn Ser Tyr Gly Ile Pro Glu Pro Ala His Ala Tyr Ala
 195 200 205
 Gln Pro Gln Thr Thr Thr Pro Leu Pro Ala Val Ser Gly Ser Pro Gly
 210 215 220
 Ala Ala Ile Thr Pro Leu Pro Ser Thr Gln Asn Gly Pro Val Phe Ala
 225 230 235 240
 Lys Ala Ile Gln Lys Arg Val Pro Cys Ala Tyr Asp Lys Thr Ala Leu
 245 250 255
 Ala Leu Glu Val Gly Asp Ile Val Lys Val Thr Arg Met Asn Ile Asn
 260 265 270
 Gly Gln Trp Glu Gly Glu Val Asn Gly Arg Lys Gly Leu Phe Pro Phe
 275 280 285
 Thr His Val Lys Ile Phe Asp Pro Gln Asn Pro Asp Glu Asn Glu
 290 295 300

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO: 5:

ATATTGGCG ATGGCTTC

18

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO: 6:

GTCGAACCGG CGGAGGA

17

ES 2 299 536 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 16 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: única

10

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO: 7:

GAAGGGCTTC TCGGTC

16

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65