



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 705**

51 Int. Cl.:  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 31/70** (2006.01)  
**C07H 21/02** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96914430 .2**  
86 Fecha de presentación : **24.05.1996**  
87 Número de publicación de la solicitud: **0841068**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.1998**

54 Título: **Inhibidor del crecimiento de células leucémicas que contienen un derivado oligonucleotídico antisentido frente al gen del tumor de Wilms (WT1).**

30 Prioridad: **01.06.1995 JP 7-156672**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73 Titular/es: **Tadamitsu Kishimoto**  
**3-5-31, Nakano-cho**  
**Tondabayashi-shi, Osaka 584, JP**  
**Haruo Sugiyama**

72 Inventor/es: **Sugiyama, Haruo;**  
**Yamagami, Tamotsu y**  
**Inoue, Kazushi**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 268 705 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Inhibidor del crecimiento de células leucémicas que contiene un derivado oligonucleotídico antisentido frente al gen del tumor de Wilms (WT1).

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un inhibidor del crecimiento para células de leucemia, que comprende un derivado nucleotídico antisentido.

**Técnica anterior**

El tumor de Wilms es un tumor de riñón pediátrico que ocurre como resultado de la desactivación de ambos alelos del gen del tumor de Wilms (WT1) ubicado en el cromosoma 11p13 (Call, K.M., *et al.*, Cell 60: 509, 1990). Una secuencia de WT1 en dirección 5', no codificante (C.E. Campbell, *et al.*, Oncogene 9: 583-595, 1994) y una región codificante que incluye el intrón (D.A. Haber, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9618-9622, 1991) han sido dadas a conocer previamente, y es de suponer que estén implicadas en el crecimiento y la diferenciación del tumor y demás (D.A. Haber, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9618-9622, 1991).

Pritchard-Jones *et al* en Human Molecular Genetics, Vol 3, 1994, p.1633-1637 sugieren que el gen WT1 está implicado en la regulación de la diferenciación hematopoyética y en la leucemogénesis. Rothenpieler en The Journal of The American Society of Nephrology, vol 5, 1994, página 635 describe oligonucleótidos antisentido dirigidos contra WT1. Phelan *et al* en Cell Growth & Differentiation, vol 5, Junio 1994, páginas 667-686 indican que el mRNA de WT1 es regulado a la baja en células K562 durante cierta inducción estudiada de diferenciación eritroide y megacariocítica, indicando que esta regulación a la baja no es un fenómeno generalizado de inhibición del crecimiento. Sugieren experimentos antisentido y sentido para estudiar el papel de la proteína WT1 en la diferenciación de células K562.

**Descripción de la invención**

La presente invención proporciona un inhibidor del crecimiento para células de leucemia que comprende un oligonucleótido antisentido que se dirigen contra el gen del tumor de Wilms (WT1), según se define en las reivindicaciones anejas.

**Breve descripción de los dibujos**

Fig. 1 es una gráfica que indica los efectos inhibidores del oligonucleótido sobre el crecimiento de la línea celular de leucemia K562.

Fig. 2 es una gráfica que indica la relación entre las concentraciones de oligonucleótidos SE3 y AS3 y el crecimiento de la línea celular de leucemia K562.

Fig. 3 es una gráfica que indica la relación entre las concentraciones de oligonucleótidos SE4 y AS4 y el crecimiento de la línea celular de leucemia K562.

Fig. 4 es una gráfica que indica los efectos en función del tiempo de los oligonucleótidos SE3 y AS3 sobre el crecimiento de la línea celular de leucemia K562.

Fig. 5 es una gráfica que indica los efectos de diversos oligonucleótidos sobre el crecimiento de la línea celular de leucemia K562.

Fig. 6 es una gráfica que indica los efectos inhibidores de diversos oligonucleótidos sobre el crecimiento de la línea celular de leucemia HEL positiva para la expresión de WT1.

Fig. 7 es una gráfica que indica los efectos inhibidores de diversos oligonucleótidos sobre el crecimiento de la línea celular de leucemia THP-1 positiva para la expresión de WT1.

Fig. 8 es una gráfica que indica los efectos inhibidores de diversos oligonucleótidos sobre el crecimiento de la línea celular de linfoma maligno U937 negativa para la expresión de WT1.

Fig. 9 es una gráfica que indica los efectos de los oligonucleótidos SE3 y AS3 sobre la formación de colonias de células de leucemia a partir de células mononucleares de médula ósea obtenidas a partir de pacientes leucémicos.

Fig. 10 es una gráfica que indica los efectos de los oligonucleótidos SE3 y AS3 sobre la formación de colonias de macrófagos granulocíticos a partir de células mononucleares de médula ósea obtenidas a partir de voluntarios sanos.

Fig. 11, el panel A es una fotografía de los resultados de la electroforesis que indica una disminución en el nivel de la proteína WT1 en células en el caso de añadir diversos oligonucleótidos antisentido que se dirigen contra WT1 a un cultivo de células K562; el panel B indica una disminución en el nivel de proteína WT1 en las células en el caso de

añadir oligonucleótidos antisentido que se dirigen contra WT1 a células de leucemia recién obtenidas de un paciente con AML.

### Descripción detallada de la invención

5

La presente invención proporciona un inhibidor del crecimiento de células de leucemia, que comprende un oligonucleótido antisentido que se dirigen contra WT1. Los oligonucleótidos antisentido usados en la presente invención son oligonucleótidos antisentido que se dirige contra WT1, ejemplos de los cuales incluyen uno dirigido contra el sitio caperuza de inicio de la transcripción de WT1, uno dirigido contra la región de inicio de la traducción, uno dirigido contra un exón o un dirigido contra un intrón.

10

Por ejemplo, una secuencia nucleotídica de una cadena de DNA sentido de la región que contiene el sitio caperuza de inicio de la transcripción de WT1 se representa por SEQ ID N°: 9. Además, una secuencia nucleotídica de una cadena de DNA sentido de los exones 1 a 10 de la región codificante de WT1 se representa por la SEQ ID NO: 10 a 15 19. La presente invención hace uso de un oligonucleótido antisentido que se dirige contra tal secuencia nucleotídica de la cadena de ADN sentido de WT1. Este oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido antisentido que comprende 9 a 30 nucleótidos de cadena de DNA o RNA antisentido para WT1.

Ejemplos de oligonucleótidos antisentido que se dirigen contra el sitio caperuza de inicio de la transcripción incluyen los que tienen las siguientes secuencias de nucleótidos: 5'-AGGGTCGAATGCGGTGGG-3' (SEQ ID N°: 2) y 5'-TCAAATAAGAGGGGCCGG-3' (SEQ ID N°: 4). Además, ejemplos de oligonucleótidos antisentido que se dirigen contra la región de inicio de la traducción incluyen oligonucleótidos antisentido que se dirigen contra el codón ATG de iniciación de la traducción y su región en 5' y/o en 3' tal como la secuencia nucleotídica siguiente: 5'-GTCGGAGCC CATTGCTG-3' (SEQ ID N°: 6).

20

Además, hay diez exones contenidos en la región codificante de WT1 y los ejemplos de los oligonucleótidos antisentido incluyen los que se dirigen contra las secuencias contenidas en cualquiera de estos exones, los que se dirigen contra las secuencias que se extienden a lo largo de dos exones consecutivos cualesquiera después de la maduración por corte y empalme, o los que se dirigen a las secuencias que se extienden a lo largo de un intrón y un exón consecutivos, y los que se extienden a secuencias de todos los intrones y las regiones no codificantes en 3' y 5'. Un ejemplo de un oligonucleótido antisentido de la presente invención es el que se dirige al 6° exón, uno de cuyos ejemplos es el que se dirige a la siguiente secuencia de nucleótidos: 5'-CGTTGTGTGGTTATCGCT-3' (SEQ ID NO: 8).

25

30

Además, se incluyen aquellos oligonucleótidos similares a ribozimas con la función de escindir la cadena de DNA o la cadena de RNA para WT1.

35

La estructura del oligonucleótido antisentido usado en la presente invención es la indicada en la fórmula química 1, donde X puede ser independientemente un oxígeno (O), un azufre (S), un grupo alquilo inferior, amina primaria o amina secundaria. Y puede ser independientemente oxígeno (O) o azufre (S). Z es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo. B se elige entre adenina, guanina, timina o citosina cuando Z es un átomo de hidrógeno, o se elige entre adenina, guanina, uracilo o citosina cuando Z es un grupo hidroxilo, y principalmente es un oligonucleótido complementario al DNA o mRNA codificante de WT1. R es, independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo dimetoxitritilo o un grupo alquilo inferior. N es un número entero de 7-28.

45

(Fórmula pasa a página siguiente)

50

55

60

65

5

10

15

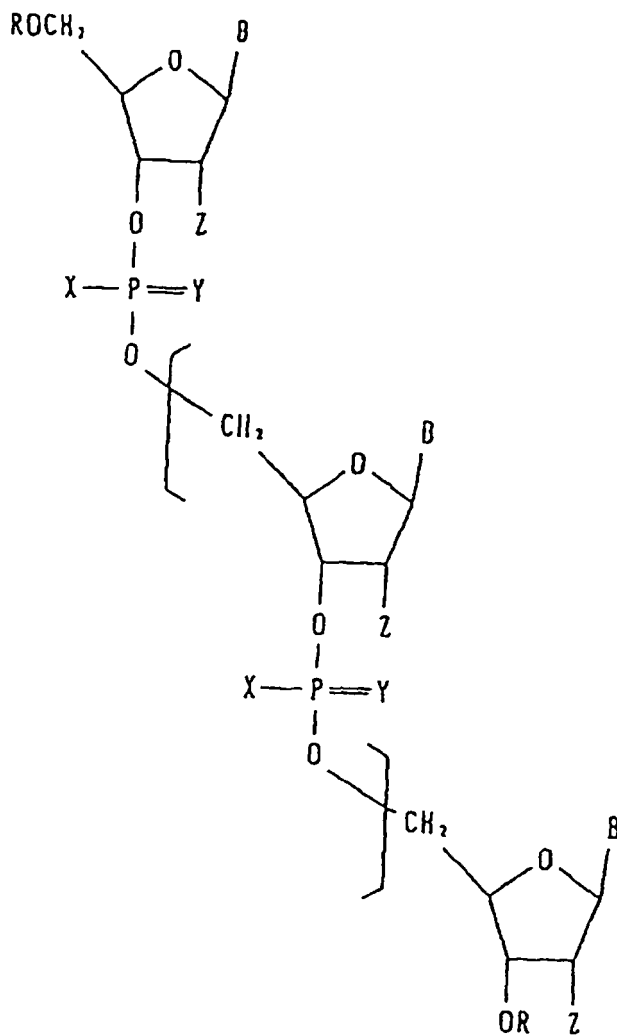
20

25

30

35

40



Fórmula química 1

45

50

55

60

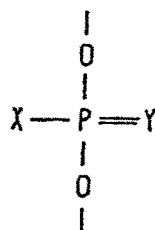
65

Ejemplos preferibles de oligonucleótidos antisentido incluyen no sólo los oligonucleótidos antisentido no modificados, sino también los oligonucleótidos antisentido modificados. Ejemplos de estas formas modificadas incluyen formas alquil inferior fosfonato, como la forma metilfosfonato o la forma etilfosfonato mencionada anteriormente, y otras formas fosforotioato o fosforoamidato (véase la fórmula química 2).

(Fórmula pasa a página siguiente)

5

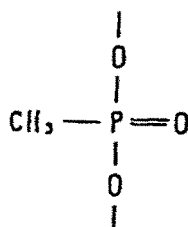
**Ejemplo de**



10

15

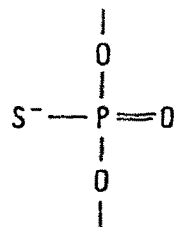
**Metilfosfonato**



20

25

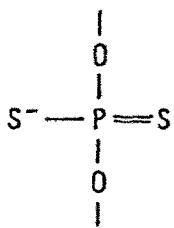
**Fosforotioato**



30

35

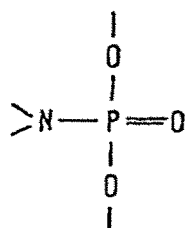
**Fosforoditioato**



40

45

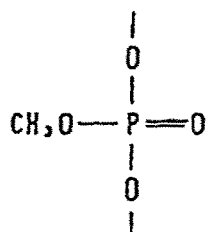
**Fosforoamidato**



50

55

**Triéster fosfato**



60

Fórmula química 2

Estos oligonucleótidos antisentido se pueden obtener de acuerdo con los siguientes métodos convencionales.

65

Los oligonucleótidos antisentido en que X e Y en la fórmula química 1 son O y Z es un átomo de hidrógeno o grupo hidroxilo son sintetizados fácilmente por un sintetizador de DNA disponible en el mercado (por ejemplo, el fabricado por Applied Biosystems).

## ES 2 268 705 T3

El oligodesoxirribonucleótido antisentido en el que Z es un átomo de hidrógeno se puede obtener por un método tal como síntesis en fase sólida usando fosforoamidito o síntesis en fase sólida usando hidrógeno fosfonato.

Véase, por ejemplo, T. Atkinson y M. Smith en *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M.J. Gait, IRL Press, 35-81 (1984); M.H. Caruthers, *Science*, 230, 281 (1985); A. Kume, M. Fujii, M. Sekine and M. Hata, *J. Org. Chem.*, 49, 2139 (1984); B.C. Froehler y M. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, 27, 469 (1986); P.J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stromberg y C. Henrichson, *ibid.*, 27, 4051 (1986); B.S. Sproat y M.J. Gait en *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M.J. Gait, IRL Press, 83-115 (1984); S.L. Beaucage y M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859-1862 (1981); M.D. Matteucci y M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 21, 719-722 (1980); y, M.D. Matteucci y M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191 (1981).

Las formas modificadas con triéster fosfato, en las que X es un grupo alcoxi inferior, se pueden obtener por métodos ordinarios, tales como tratamiento de un oligonucleótido obtenido por síntesis química con una solución de cloruro de tosilo en DMF, metanol y 2,6-lutidina (Moody H.M., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 17, 4769-4782 (1989)).

Las formas modificadas con alquilfosfonato, en que X es un grupo alquilo, se pueden obtener por métodos convencionales, utilizando, por ejemplo, fosfoamidito (M.A. Dorman, *et al.*, *Tetrahedron*, 40, 95-102 (1984); y, K.L. Agarwal y F. Riftina, *Nucleic Acids Res.*, 6, 3009-3024 (1979)).

Las formas modificadas con fosfortioato en las que Z es S se pueden obtener por métodos convencionales como la síntesis en fase sólida (C.A. Stein, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 16, 3209-3221 (1988)) o la síntesis en fase sólida utilizando disulfuro de tetraetilolam (H. Vu y B.L. Hirschbein, *Tetrahedron Letters*, 32, 3005-3008 (1991)).

Las formas modificadas con fosforoditioato en las que X e Y son ambos S se pueden obtener, por ejemplo, por síntesis en fase sólida convirtiendo el bis-amidito en tioamidito y dejando actuar el azufre sobre el tioamidito (W.K.D. Brill, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 2321-2322 (1989)).

Las formas modificadas con fosforoamidato en que X es una amina primaria o amina secundaria se pueden obtener, por ejemplo, por síntesis en fase sólida, tratando el hidrógeno fosfonato con una amina primaria o secundaria (B. Froehler, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 16, 4831-4839 (1988)), u oxidando el amidito con hidróperóxido de terc-butilo (H. Ozaki, *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 30, 5899-5902 (1989)).

Aunque la síntesis del oligorribonucleótido antisentido en el que Z es un grupo hidroxilo es extremadamente difícil en comparación con la síntesis del oligodesoxirribonucleótido antisentido ya que debe protegerse el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa (azúcar), puede sintetizarse eligiendo adecuadamente el grupo protector y el método de fosforilación (véase, *Basic Microbiology Course*, Vol. 8, *Genetic Engineering*, E. Ohtsuka, K. Miura, ed. T. Ando y K. Sakaguchi, Oct. 10, 1987, Kyoritsu Publishing Co., Ltd.).

La purificación y la confirmación de la pureza se pueden llevar a cabo por cromatografía de líquidos de alta eficacia y electroforesis en gel de poliacrilamida. La confirmación del peso molecular se puede realizar por espectrometría de masas con ionización por electropulverización, o por espectrometría de masas con bombardeo de átomos rápidos.

El oligonucleótido antisentido de la presente invención actúa en cualquier estadio desde DNA genómico hasta mRNA maduro, y se cree que la supresión de su expresión inhibe el crecimiento de las células de leucemia. Así, cabe suponer que los oligonucleótidos antisentido de la presente invención serán eficaces en el tratamiento de la leucemia.

Más aún, como se describe más adelante, se cree que los oligonucleótidos antisentido de la presente invención inhiben específicamente células de leucemia sin inhibir el crecimiento de células de médula ósea sanas. Así, también se pueden aplicar al "transplante autólogo de médula ósea" y al "transplante autólogo de células pluripotenciales de sangre periférica" en los que, por ejemplo, después de separar primero las células de médula ósea o las células pluripotenciales de sangre periférica del cuerpo y tratarlas *in vitro* con los oligonucleótidos antisentido de la presente invención para inhibir el crecimiento de células de leucemia, sólo las células de médula ósea sanas o las células pluripotenciales de sangre periférica sanas se devuelven al cuerpo.

Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención también se pueden utilizar en forma de una preparación externa tal como un linimento o una cataplasma por mezcla con una base inactiva adecuada.

Además, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención también se pueden utilizar en forma de comprimidos, polvos, gránulos, cápsulas, cápsulas de liposomas, preparados inyectables, líquidos o gotas nasales por adición de un vehículo, agente isotónico, coadyuvante de solubilidad, estabilizante, conservante o analgésico, etc, lo que sea necesario, o se pueden producir como preparados liofilizados. Estas formulaciones se pueden preparar de acuerdo con métodos rutinarios.

Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención se pueden aplicar directamente a la zona afectada de los pacientes, o de manera que puedan llegar a la zona afectada como resultado de la administración intravascular, etc. Además, los materiales de inclusión antisentido también se pueden utilizar para mejorar la duración y la penetración en la membrana. Ejemplos de estos incluyen los liposomas, poli-L-lisina, lípidos, colesterol, lipofectina, y sus derivados.

## ES 2 268 705 T3

La dosis del oligonucleótido antisentido de la presente invención es tal que se puede utilizar una cantidad preferible preparando adecuadamente una dosis de acuerdo con el estado, la edad, el sexo y el peso corporal del paciente. Adicionalmente, el método de administración se puede elegir adecuadamente a partir de varios métodos de administración, incluida la administración oral, la administración intramuscular, la administración intraperitoneal, la administración intradérmica, la administración subcutánea, la administración intravenosa, la administración intraarterial y la administración rectal, de acuerdo con el estado del paciente, las formas farmacéuticas, etc.

A continuación se proporciona una explicación detallada de la presente invención a través de Ejemplos.

### 10 Ejemplos

#### Ejemplo de síntesis 1

Los oligodesoxirribonucleótidos utilizados más abajo (SEQ ID NOS: 1 a 8) fueron sintetizados utilizando un sintetizador automático (Applied Biosystems), purificados por cromatografía de líquidos de alta eficacia, precipitados tres veces con etanol y suspendidos en tampón fosfato. Los oligonucleótidos sintetizados fueron los enumerados a continuación.

SEQ ID NO: 1: Secuencia sentido del sitio caperuza de inicio de la transcripción (SE1)

SEQ ID NO: 2: Secuencia antisentido del sitio caperuza de inicio de la transcripción (AS1)

SEQ ID NO: 3: Secuencia sentido de la región caperuza de inicio de la transcripción (SE2)

SEQ ID NO: 4: Secuencia antisentido de la región caperuza de inicio de la transcripción (AS2)

SEQ ID NO: 5: Secuencia sentido de la región de inicio de la traducción (SE3)

SEQ ID NO: 6: Secuencia antisentido de la región de inicio de la traducción (AS3)

SEQ ID NO: 7: Secuencia sentido del exón 6 (SE4)

SEQ ID NO: 8: Secuencia antisentido del exón 6 (AS4).

#### 35 Ejemplo 1

Se inocularon  $5 \times 10^4$  células/ml de la línea celular de leucemia K562 positiva para la expresión de WT1 en medio RPMI 1640 que no incluía suero vacuno fetal (FCS), contenido en los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano en la cantidad de  $100 \mu\text{l}$ /pocillo. Cada oligonucleótido fue añadido a una serie de tres pocillos hasta una concentración final de  $200 \mu\text{g}$ /pocillo. Después de incubar durante 2 horas, se añadió FCS a cada pocillo a una concentración final de 10%. Después se añadieron los oligonucleótidos al cultivo en una cantidad igual a la mitad de la cantidad mencionada anteriormente cada 24 horas.

Después de cultivar durante 96 horas, se contó el número de células viables utilizando el método de eliminación de pigmento. Se añadió un volumen igual de PBS que no contenía nucleótido, como cultivo control, y se tomó como 100% el número de células de este cultivo control.

Los resultados se indican en la Fig. 1. Como es evidente a partir de esta figura, todos los oligonucleótidos antisentido inhibían poderosamente el crecimiento celular comparando con los correspondientes oligonucleótidos sentido.

#### 50 Ejemplo 2

Se realizó el mismo experimento descrito en el Ejemplo 1, pero se añadieron los oligonucleótidos SE3 y AS3 a diversas concentraciones. Como es evidente a partir de la Fig. 2, aunque el oligonucleótido sentido (SE3) virtualmente no inhibía el crecimiento celular, el oligonucleótido antisentido (AS3) inhibió el crecimiento celular de manera dependiente de la dosis.

#### Ejemplo 3

Se realizó el mismo experimento descrito en el Ejemplo 1, pero se añadieron los oligonucleótidos SE4 y AS4 a diversas concentraciones. Como es evidente a partir de la Fig. 3, aunque el oligonucleótido sentido (SE4) virtualmente no inhibía el crecimiento celular, el oligonucleótido antisentido (AS4) inhibió el crecimiento celular de manera dependiente de la dosis.

#### 65 Ejemplo 4

Se realizó el mismo experimento descrito en el Ejemplo 1. Sin embargo, las células se cultivaron en una placa de 24 pocillos de fondo plano a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/ml y en la cantidad de  $1 \text{ ml}$ /pocillo. Se añadieron

## ES 2 268 705 T3

los oligonucleótidos SE3 y AS3 y se contó diariamente el número de células viables durante 2 a 5 días. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Como es evidente a partir de esta figura, aunque se observó crecimiento celular similar al del control en el caso de añadir oligonucleótido sentido, en el caso de añadir oligonucleótido antisentido, el crecimiento celular se inhibía.

### 5 Ejemplo 5

Se realizó el mismo experimento descrito en el Ejemplo 1. Sin embargo, SE3, AS3, un oligonucleótido antisentido 5'-AGAGAAGAAGGGAACCCC-3' (SEQ ID NO: 20) (MPO-AS) dirigido contra el gen de mieloperoxidasa (MPO), y un oligonucleótido antisentido 5'-GCGTGCCGAGCCTGGGAA-3' (SEQ ID NO: 21) (FV-AS) contra el factor V de coagulación (FV) de la sangre se utilizaron como oligonucleótidos. Como es evidente de la Fig. 5, el crecimiento celular sólo se inhibió en el caso de utilizar AS3.

### 15 Ejemplo 6

Se realizó el mismo experimento descrito en el Ejemplo 1, pero se usaron las líneas celulares HEL y THP-1 positivas en expresión de WT1, así como la línea celular U937 negativa en expresión de WT-1, como células experimentales. Como oligonucleótidos se utilizaron los ocho mismos tipos de oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 1. En el caso de usar la línea celular HEL (Fig. 6) o THP-1 (Fig. 7) positiva en expresión de WT1, el crecimiento celular se inhibía por el oligonucleótido antisentido. En cambio, en el caso de usar la línea celular U937 negativa en expresión de WT-1 (Fig. 8), el crecimiento celular no se inhibía ni siquiera cuando se añadía el oligonucleótido antisentido.

### Ejemplo 7

25 Células de médula ósea de pacientes con leucemia y de voluntarios sanos se trataron con heparina y se suspendieron en medio RPMI 1640 para obtener células mononucleares de médula ósea por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Se añadió una proteína (100  $\mu$ l/pocillo) de las células mononucleares mencionadas anteriormente a una densidad celular de  $1,5 \times 10^6$  células/ml a una placa de 96 pocillos de fondo plano que contenía  $\alpha$ -MEM que contenía GM-CSF (100 ng/ml) y IL-3 (100 unidades/ml). El tratamiento con oligonucleótidos (SE3 y AS3) se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Después de 96 horas, las células se recogieron y cultivaron en placas en medio de metilcelulosa [1,2% de metilcelulosa  $\alpha$ -MEM, 20% de FCS, GM-CSF (100 ng/ml), G-CSF (100 ng/ml), IL-3 (100 unidades/ml) y SCF (10 ng/ml)]. El cultivo se realizó en tres series. El día 14 se contó el número de colonias (CFU-L) y de colonias de macrófagos granulocíticos (CFU-GM).

La Fig. 9 indica la morfología de las colonias leucémicas en muestras de cuatro pacientes con leucemia (dos con leucemia mieloide aguda (AML) y dos con leucemia mieloide crónica (CML)). Se puede ver que la formación de colonias era inhibida por el oligonucleótido antisentido. La Fig. 10 indica la apariencia de las colonias de macrófagos granulocíticos en muestras de voluntarios sanos. La formación de colonias no es inhibida por ninguno de los oligonucleótidos antisentido.

### Ejemplo 8

45 Se añadió oligonucleótido al azar, oligonucleótido AS1, oligonucleótido AS2 u oligonucleótido AS3 a una concentración de 200  $\mu$ g/ml a células K562 (A) o células de leucemia recién extraídas de un paciente con AML (B) a una densidad celular de  $5 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 24 pocillos, seguido de la adición de los oligonucleótidos a una concentración de 100  $\mu$ g/ml cada 24 horas. Las células se recogieron 4 días después del tratamiento inicial con oligonucleótido, se lavaron con PBS y se lisaron con tampón de muestra Laemli.

50 Cada lisado celular de  $2 \times 10^4$  células se calentó a ebullición durante 5 minutos, y después se aplicó a cada calle de un gel de poliacrilamida con 5% de dodecilsulfato de sodio. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a un filtro de difluoruro de polivinilideno Immobilon (Millipore Corp. MA, EE.UU). Después este filtro se hibridó usando un anticuerpo policlonal anti-WT1 a un polipéptido sintético (posiciones de aminoácidos 177 a 192: Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln (SEQ ID NO: 22)). Esto fue seguido de tratamiento con anticuerpo anti-inmunoglobulina unida a peroxidasa de rábano picante (Amersham, Little Chalfont, U.K.). Después de lavarlo, el filtro se sumergió en reactivo de detección (Amersham, Little Chalfont, U.K.) durante 1 hora seguida de tratamiento autorradiográfico durante 1 a 5 minutos.

60 Después de lavar dos veces con TBST (tampón Tris conteniendo 0,05% de Tween 20), el filtro se hibridó con anticuerpo monoclonal anti-actina (Oncogene Science Inc., NY, USA) seguido de autorradiografía de la manera descrita más arriba.

La densidad de las bandas correspondientes a proteína WT1 y actina se midió con un densitómetro CS-9000 (Shimizu, Kyoto) y seguidamente se calculó la relación WT1/actina.

65 Los resultados se muestran en la Fig. 11 A y B. En estas figuras, la calle 1 muestra los resultados en el caso de añadir oligonucleótido al azar, la calle 2 en el caso de añadir oligonucleótido AS3, la calle 3 en el caso de añadir

oligonucleótido AS1, y la calle 4 en el caso de añadir oligonucleótido AS2. En estas figuras, A indica los resultados en el caso de usar células K562, mientras que B los muestra en el caso de utilizar células de leucemia recientes de un paciente con AML.

5 Como es evidente a partir de la Fig. 11A, en el caso de añadir oligonucleótido WT1 a medio que contiene células K562, el nivel de proteína WT1 disminuía significativamente. Por otro lado, el control en forma de nucleótido al azar no afectó al nivel de proteína WT1. Además, como es evidente a partir de la Fig. 11B, en el caso de añadir oligonucleótido WT1 a medio que contiene células leucémicas recién aisladas de un paciente con AML, el nivel de proteína WT1 disminuía significativamente. Estos resultados mostraban claramente que el oligonucleótido antisentido  
10 WT1 inhibe específicamente el crecimiento de células de leucemia disminuyendo el nivel de proteína WT1.

#### **Aplicabilidad industrial**

15 Como se ha expuesto anteriormente, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención son eficaces inhibiendo el crecimiento de células leucémicas y, por lo tanto, cabe esperar que sean útiles como nuevo tratamiento para la leucemia.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 268 705 T3

## REIVINDICACIONES

5 1. Un inhibidor del crecimiento para células de leucemia que contiene un oligonucleótido antisentido frente al gen del tumor de Wilms (WT1), en donde el oligonucleótido tiene 9-30 nucleótidos de longitud y comprende al menos nueve nucleótidos continuos de una de las siguientes secuencias de nucleótidos

10 5'-AGGGTCGAATGCGGTGGG-3'

(SEQ ID N°: 2);

5'-TCAAATAAGAGGGGCCGG-3'

(SEQ ID NO: 4),

5'-GTCGGAGCCCATTGCTG-3'

(SEQ ID N°: 6); o

5'-CGTTGTGTGGTTATCGCT-3'

(SEQ ID NO: 8).

15 2. Un inhibidor del crecimiento de células de leucemia según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido consiste en la siguiente secuencia de nucleótidos

20 5'-AGGGTCGAATGCGGTGGG-3'

(SEQ ID N°: 2) o

5'-TCAAATAAGAGGGGCCGG-3'

(SEQ ID NO: 4).

25 3. Un inhibidor del crecimiento de células de leucemia según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido consiste en la siguiente secuencia de nucleótidos

5'-GTCGGAGCCCATTGCTG-3'

(SEQ ID N°: 6).

30 4. Un inhibidor del crecimiento de células de leucemia según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido consiste en la siguiente secuencia de nucleótidos

5'-CGTTGTGTGGTTATCGCT-3'

(SEQ ID NO: 8).

35

40

45

50

55

60

65

Fig.1

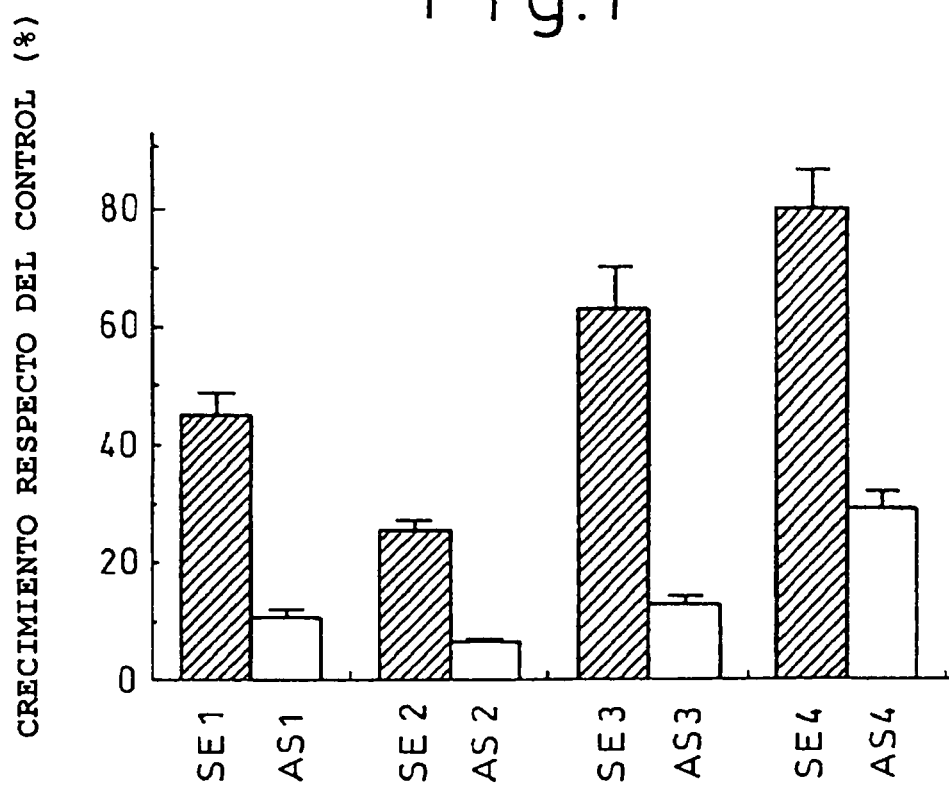


Fig.2

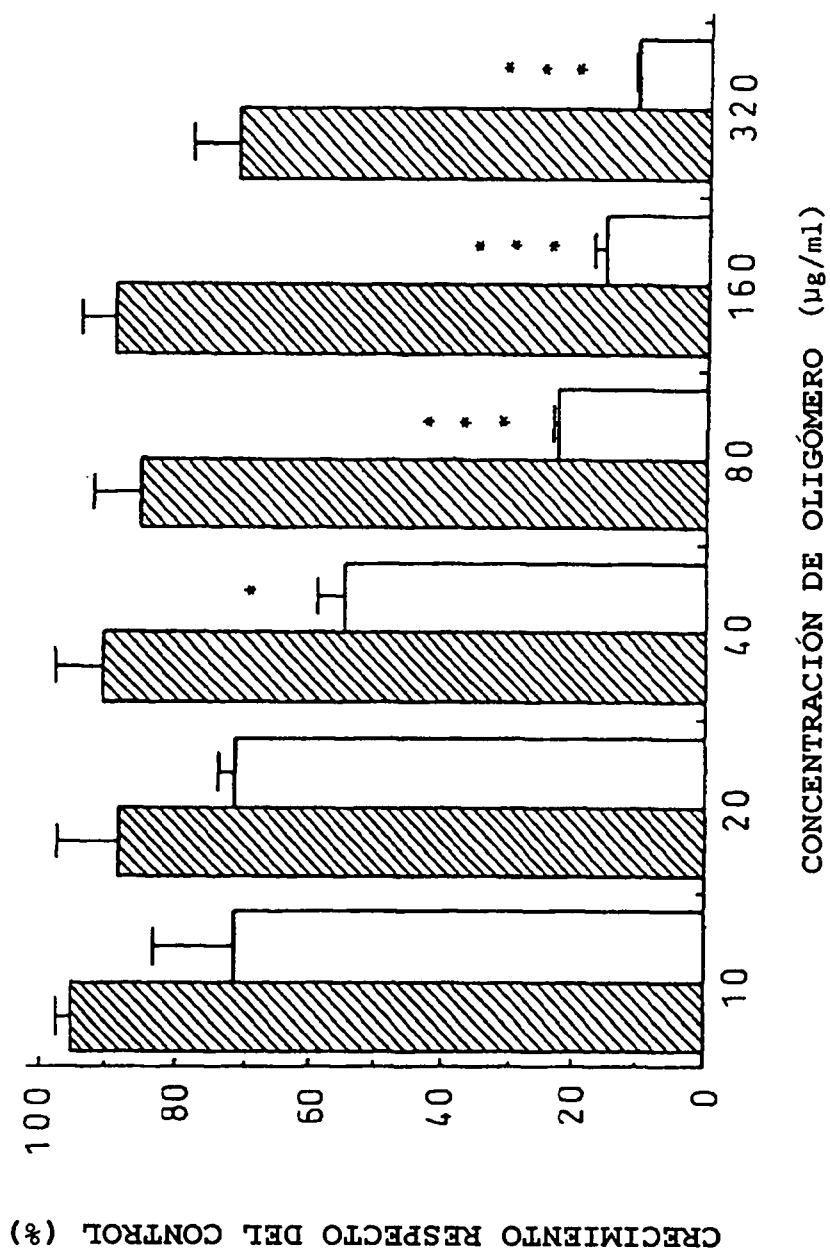


Fig.3

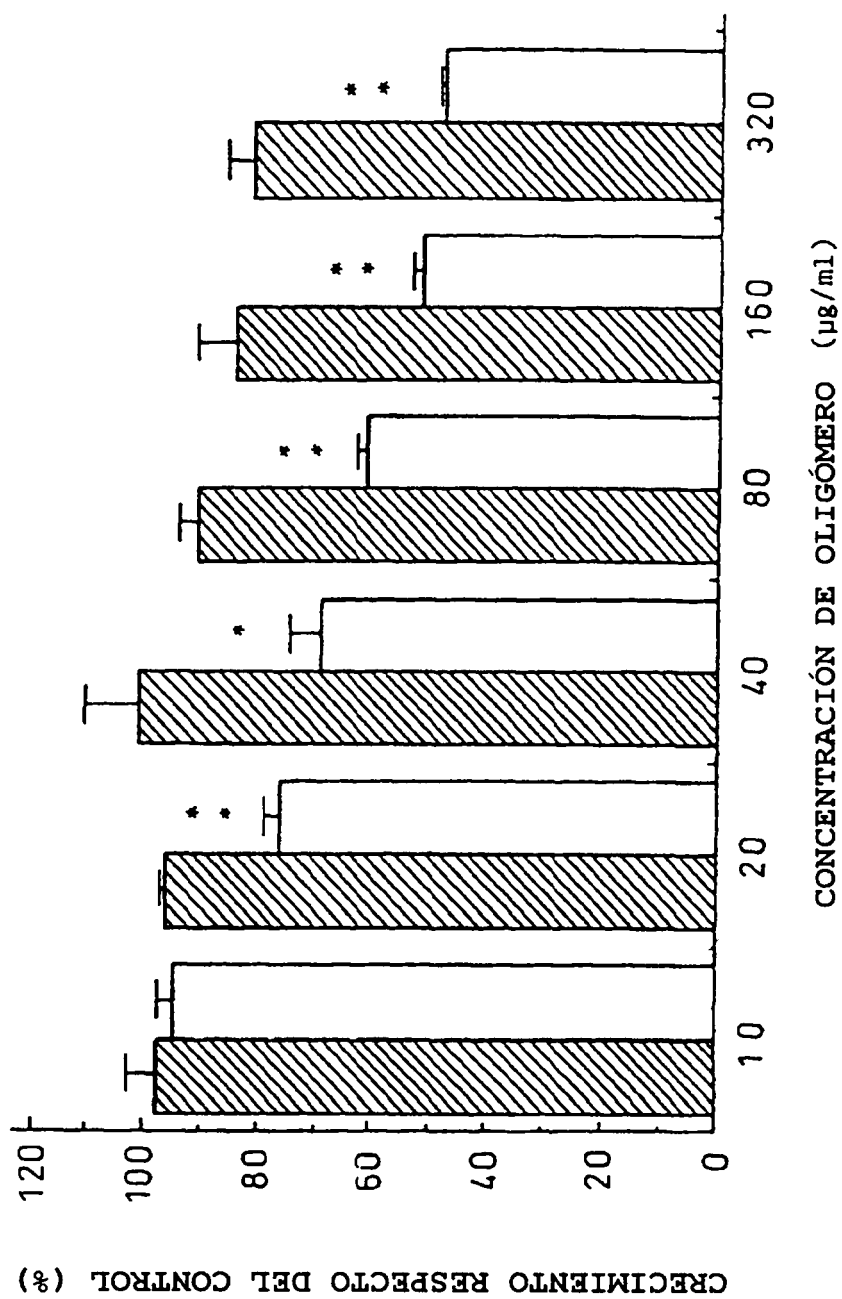


Fig.4

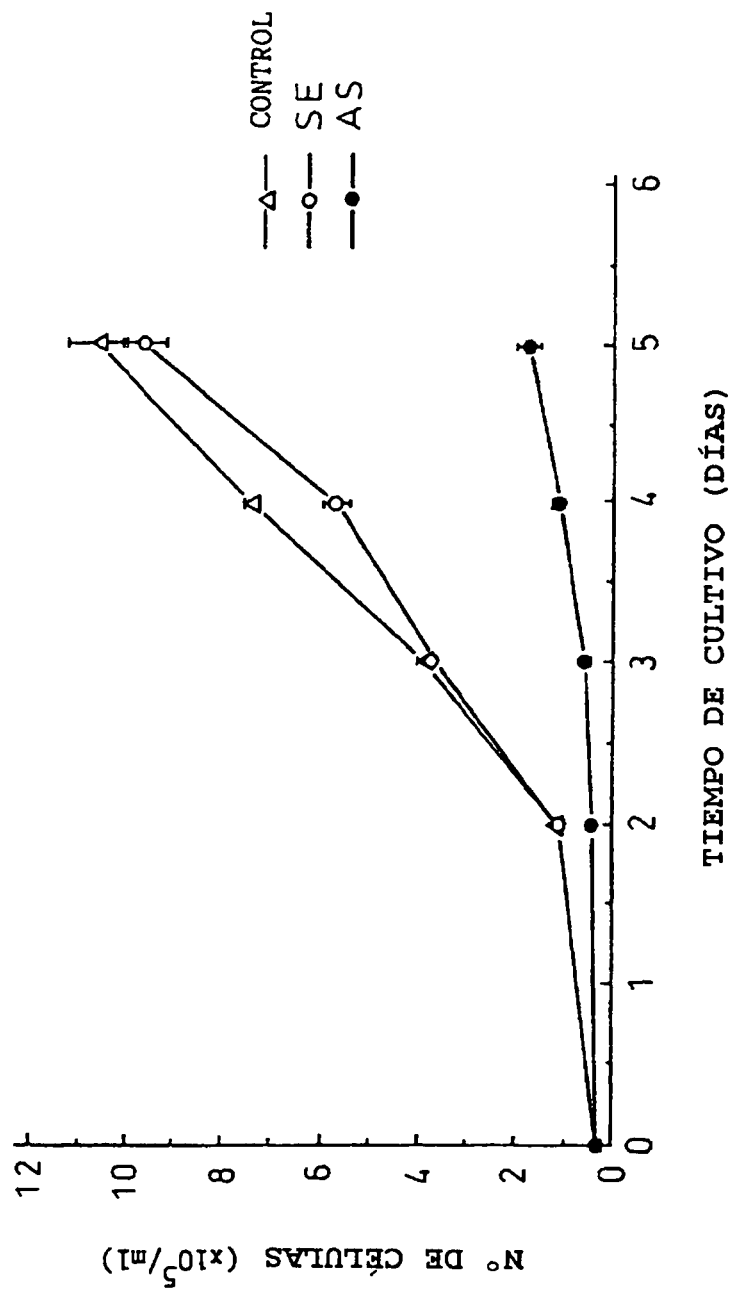


Fig.5

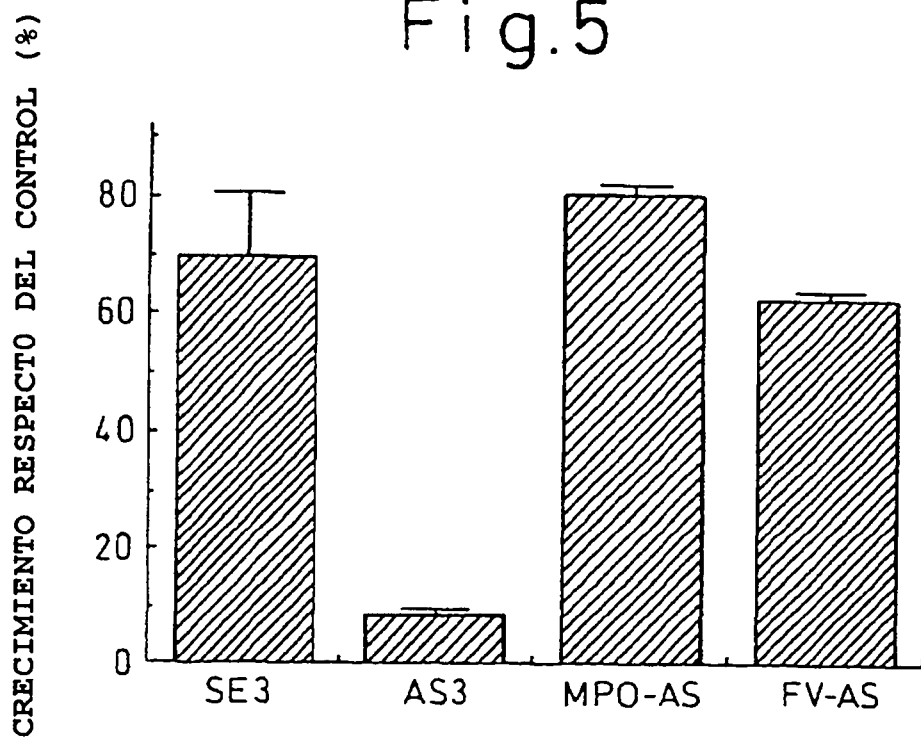


Fig.6

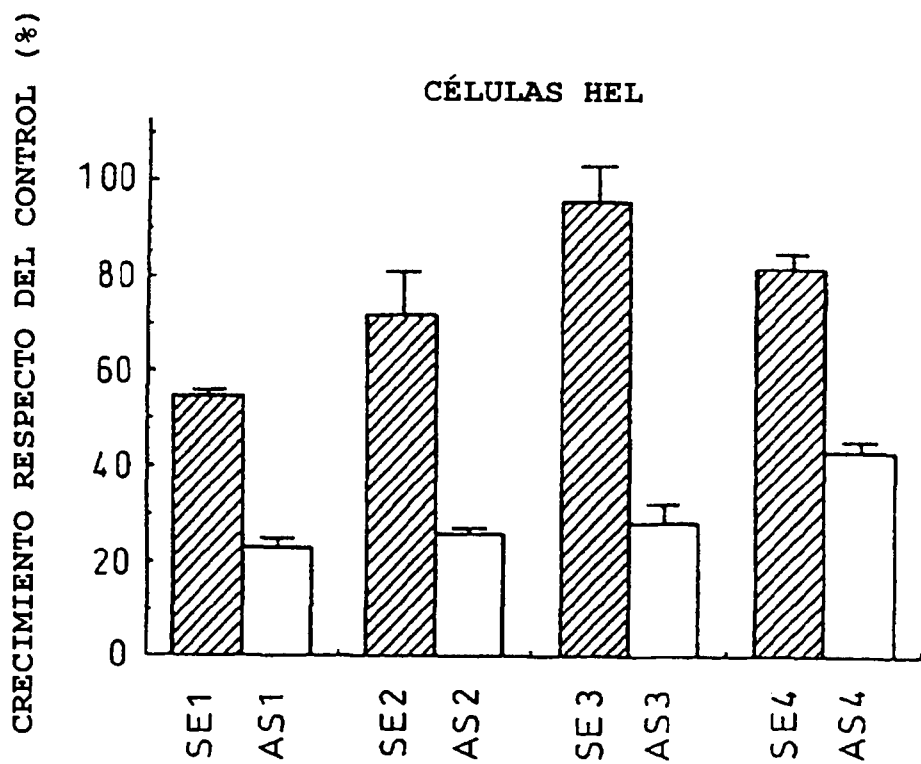


Fig.7

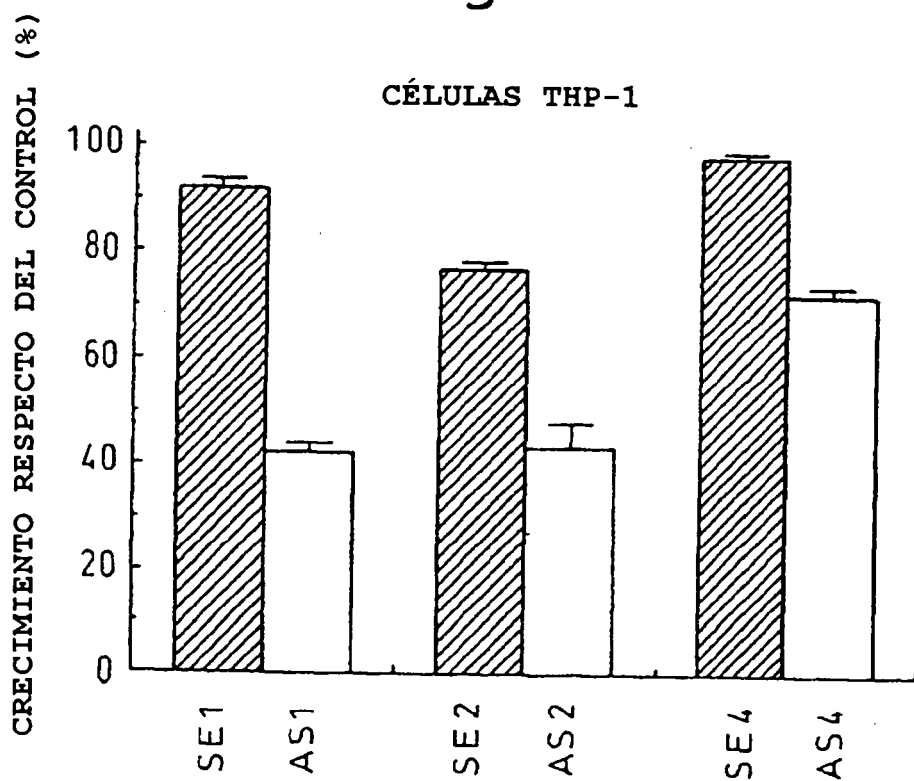
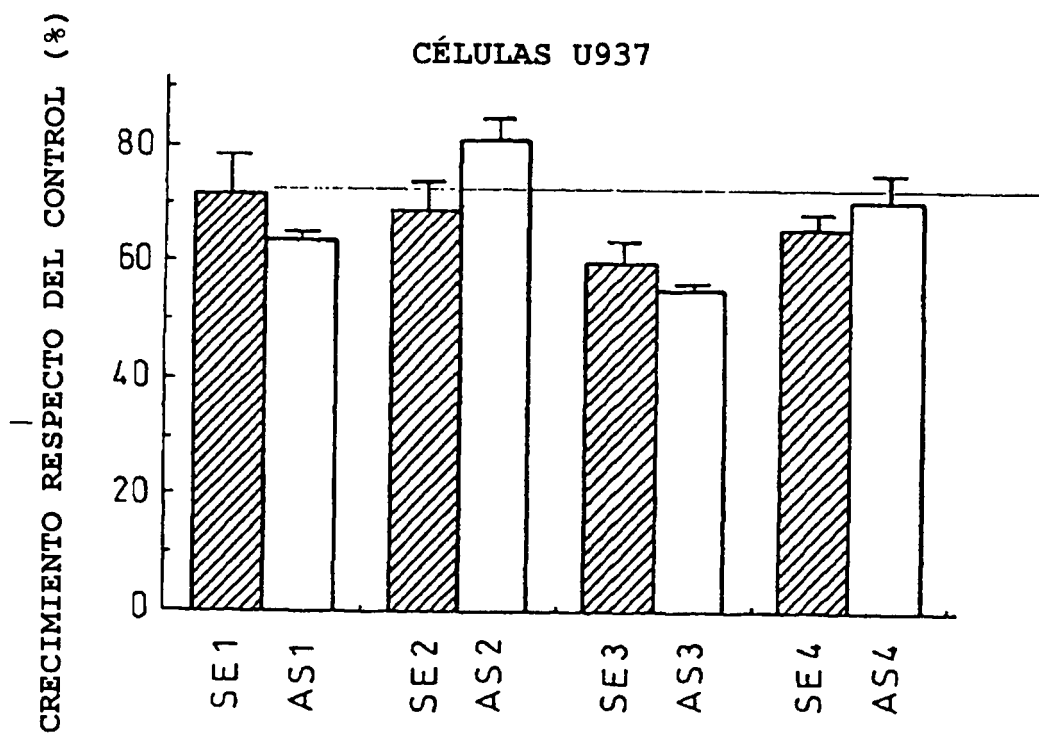
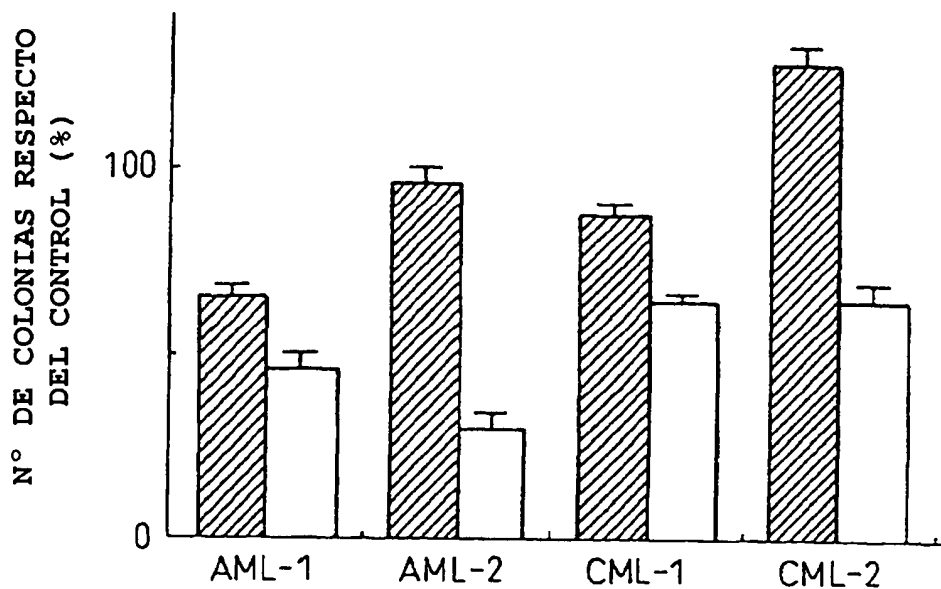


Fig.8



# Fig.9

CFU-L



# Fig.10

CFU-GM

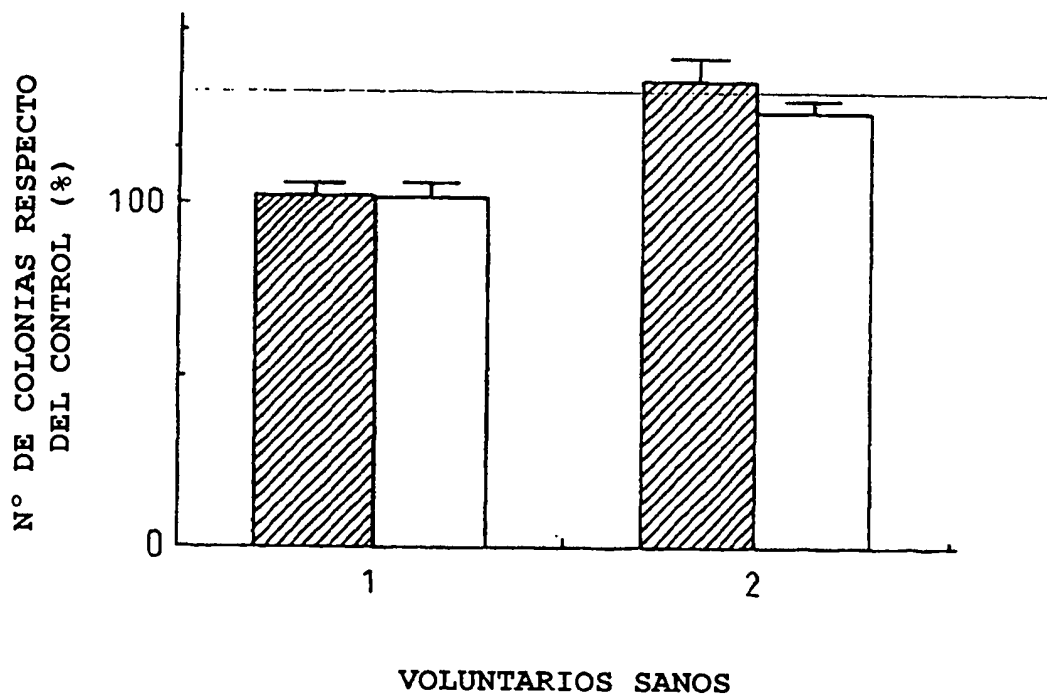
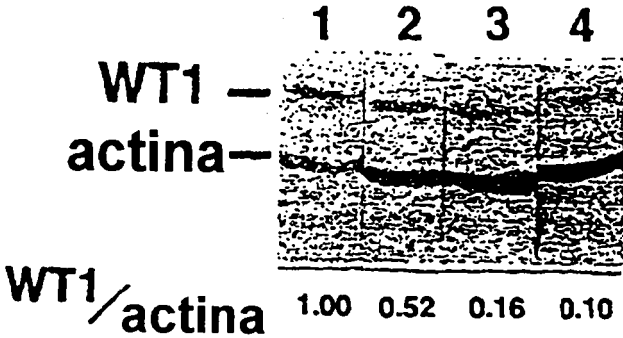


Fig.11

**A**



**B**



## ES 2 268 705 T3

### LISTA DE SECUENCIAS

#### SEQ ID N°: 1

5 Longitud de la secuencia: 18  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
Tipo de cadena: Monocatenaria  
Tipo de molécula: DNA sintético  
10 Secuencia:

CCCACCGCAT TCGACCCT

#### 15 SEQ ID N°: 2

Longitud de la secuencia: 18  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
de cadena: Monocatenaria  
20 de molécula: DNA sintético  
Secuencia:

AGGGTCGAAT GCGGTGGG

#### 25 SEQ ID N°: 3

Longitud de la secuencia: 18  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
30 Tipo de cadena: Monocatenaria  
Tipo de molécula: DNA sintético  
Secuencia:

35 CCGGCCCTC TTATTTGA

#### SEQ ID N°: 4

40 Longitud de la secuencia: 18  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
Tipo de cadena: Monocatenaria  
Tipo de molécula: DNA sintético  
Secuencia:

45 TCAAATAAGA GGGCCGG

#### SEQ ID N°: 5

50 Longitud de la secuencia: 18  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
Tipo de cadena: Monocatenaria  
de molécula: DNA sintético  
55 Secuencia:

CAGCAAATGG GCTCCGAC

60

65

## ES 2 268 705 T3

### SEQ ID N°: 6

Longitud de la secuencia: 18  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
5 Tipo de cadena: Monocatenaria  
Tipo de molécula: DNA sintético  
Secuencia:

10 GTCGGAGCCC ATTTGCTG

### SEQ ID N°: 7

Longitud de la secuencia: 18  
15 de secuencia: Ácido nucleico  
Tipo de cadena: Monocatenaria  
de molécula: DNA sintético  
Secuencia:

20 AGCGATAACC ACACAACG

### SEQ ID N°: 8

25 Longitud de la secuencia: 18  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
Tipo de cadena: Monocatenaria  
30 Tipo de molécula: DNA sintético  
Secuencia:

CGTTGTGTGG TTATCGCT

### SEQ ID N°: 9

35 Longitud de la secuencia: 1272  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
40 Tipo de cadena: Monocatenaria  
Tipo de molécula: DNA sintético  
Secuencia:

45 TGGTATCCTC GACCAGGGCC ACAGGCAGTG CTCGGCGGAG TGGCTCCAGG AGTTACCCGC 60  
TCCCTGCCGG GCTTCGTATC CAAACCCTCC CCTTCACCCC TCCTCCCAA ACTGGGGGCC 120  
AGGATGCTCC GGCCGGAATA TACGCAGGCT TTGGGCGTTT GCCAAGGGTT TTCTCCCTC 180  
50 CTAAACTAGC CGCTGTTTT CCGGCTTAAC CGTAGAAGAA TTAGATATTC CTCACTGGAA 240  
AGGGAACTA AGTGCTGCTG ACTCCAATTT TAGGTAGGCG GCAACCGCCT TCCGCCTGGC 300  
GCAAACCTCA CCAAGTAAAC AACTACTAGC CGATCGAAAT ACGCCCGGCT TATAACTGGT 360  
60 GCAACTCCCG GCCACCCAAC TGAGGGACGT TCGCTTTCAG TCCCGACCTC TGAACCCAC 420  
AAAGGGCCAC CTCTTTCCCC AGTGACCCCA AGATCATGGC CACTCCCCTA CCGACAGTT 480  
CTAGAGCAAG AGCCAGACTC AAGGGTGCAA AGCAAGGTA TACGCTTCTT TGAAGCTTGA 540  
CTGAGTTCTT TCTGCCTTT CCTGAAGTTC CCGCCCTCTT GGAGCCTACC TGCCCTCCC 600  
TCCAACCAC TCTTTTAGAT TAACAACCCC ATCTCTACTC CCACCGCATT CGACCTGCC 660

65

## ES 2 268 705 T3

	CGGACTCACT GCTACTGAAC GGACTCTCCA GTGAGACGAG GCTCCCACAC TGGCGAAGGC	720
	AAGAAGGGGA GGTGGGGGA GGGTTGTGCC ACACCGGCCA GCTGAGAGCG CGTGTGGGT	780
	TGAAGAGGAG GGTGTCTCCG AGAGGGACGC TCCCTCGGAC CCGCCCTCAC CCCAGCTGCG	840
5	AGGGCGCCCC CAAGGAGCAG CGCGCGCTGC CTGGCCGGGC TTGGGCTGCT GAGTGAATGG	900
	AGCGGCCGAG CCTCCTGGCT CCTCCTCTC CCCGGCCGC CGGCCCTCT TATTTGAGCT	960
	TTGGGAAGCT GAGGCAGCC AGGCAGCTGG GGTAAAGAGT TCAAGGCAGC GCCCACACCC	1020
10	GGGGGCTCTC CGCAACCGA CGGCCTGTGC CTCGCCACT TCCGCCCTC CCTCCACCT	1080
	ACTCATTAC CCACCCACCC ACCCAGAGCC GGGACGGCAG CCCAGGGCC CGGGCCCGC	1140
	CGTCTCCTCG CCGGATCCT GGACTTCCTC TTGCTGCAGG ACCCGCTTC CACGTGTGTC	1200
15	CCGGAGCCGG CGTTCAGCA CACGCTCCGC TCCGGCCTG GGTGCCTACA GCAGCCAGAG	1260
	CAGCAGGAG TC	1272

### SEQ ID N°: 10

20 Longitud de la secuencia: 457  
 Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
 de cadena: Monocatenaria  
 de molécula: DNA sintético  
 25 Característica de la secuencia: Porción de exón 1 del gen WT1  
 Secuencia:

	TCTGAGCCTC AGCAAATGGG CTCCGACGTG CGGGACCTGA ACGCGCTGCT GCCCGCCGTC	60
	CCCTCCCTGG GTGGCGCGG CGGCTGTGCC CTGCCTGTGA GCGGCGCGGC GCAGTGGGCG	120
	CCGGTGTGTT ACTTTGCGCC CCCGGGCGCT TCGGCTTACG GGTGTTGGG CGGCCCGCG	180
	CGCCACCGG CTCCGCGCC ACCCCGCGG CCGCCGCTC ACTCCTTCAT CAAACAGGAG	240
35	CCGAGCTGGG GCGGCGCGA GCGCACGAG GAGCAGTGC TGAGCGCCTT CACTGTCCAC	300
	TTTTCCGGCC AGTTCACTGG CACAGCCGGA GCCTGTGCT ACGGGCCCTT CGGTCTCTCT	360
	CGCCCAGCC AGGCGTCATC CGGCCAGGC AGGATGTTT CTAACGCGCC CTACCTGCCC	420
40	AGCTGCCTCG AGAGCCAGCC CGCTATTGCG AATCAGG	457

### SEQ ID N°: 11

45 Longitud de la secuencia: 123  
 Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
 Tipo de cadena: Monocatenaria  
 Tipo de molécula: DNA sintético  
 de la secuencia: Exón 2 del gen WT1  
 50 Secuencia:

	GTTACAGCAC GGTACCTTC GACGGGACGC CCAGCTACGG TCACAGCCC TGCACCATG	60
55	CGGCGCAGTT CCCCAACCAC TCATTCAAGC ATGAGGATCC CATGGGCCAG CAGGGCTGCG	120
	TGG	123

### 60 SEQ ID N°: 12

Longitud de la secuencia: 103  
 Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
 Tipo de cadena: Monocatenaria  
 65 Tipo de molécula: DNA sintético  
 Característica de la secuencia: Exón 3 del gen WT1  
 Secuencia:

## ES 2 268 705 T3

**GTGAGCAGCA GTACTCGGTG CCGCCCCGG TCTATGGCTG CCACACCCCG ACCGACAGCT 60**  
**GCACCGGCAG CCAGGCTTTG CTGCTGAGGA CGCCCTACAG CAG 103**

5 SEQ ID N°: 13

Longitud de la secuencia: 78  
 Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
 Tipo de cadena: Monocatenaria  
 10 de molécula: DNA sintético  
 de la secuencia: Exón 4 del gen WT1  
 Secuencia:

15 **TGACAATTA TACCAAATGA CATCCAGCT TGAATGCATG ACCTGGAATC AGATGAACTT 60**  
**AGGAGCCACC TTAAAGGG 78**

20 SEQ ID N°: 14

Longitud de la secuencia: 51  
 Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
 Tipo de cadena: Monocatenaria  
 25 Tipo de molécula: DNA sintético  
 Característica de la secuencia: Exón 5 del gen WT1  
 Secuencia:

30 **AGTTGCTGCT GGGAGCTCCA GCTCAGTGAA ATGGACAGAA GGGCAGAGCA A 51**

SEQ ID N°: 15

35 Longitud de la secuencia: 97  
 Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
 Tipo de cadena: Monocatenaria  
 Tipo de molécula: DNA sintético  
 40 Característica de la secuencia: Exón 6 del gen WT1  
 Secuencia:

45 **CCACAGCACA GGGTACGAGA GCGATAACCA CACAACGCC ATCCTCTGCG GAGCCCAATA 60**  
**CAGAATACAC ACGCACGGTG TCTTCAGAGG CATTACG 97**

SEQ ID N°: 16

50 Longitud de la secuencia: 151  
 Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
 Tipo de cadena: Monocatenaria  
 de molécula: DNA sintético  
 55 de la secuencia: Exón 7 del gen WT1  
 Secuencia:

60 **GATGTGCGAC GTGTGCCTGG AGTAGCCCCG ACTCTTGAC GGTCGGCATC TGAGACCAGT 60**  
**GAGAAACGCC CCTTCATGTG TGCTTACCCA GGCTGCAATA AGAGATATTT TAAGCTGTCC 120**  
**CACTTACAGA TGCACAGCAG GAAGCACACT G 151**

## ES 2 268 705 T3

### SEQ ID N°: 17

Longitud de la secuencia: 90  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
5 Tipo de cadena: Monocatenaria  
de molécula: DNA sintético  
Característica de la secuencia: Exón 8 del gen WT1  
Secuencia:

10

**GTGAGAAACC ATACCAGTGT GACTTCAAGG ACTGTGAACG AAGGTTTTCT CGTTCAGACC 60**  
**AGCTCAAAAG ACACCAAAGG AGACATACAG 90**

15

### SEQ ID N°: 18

Longitud de la secuencia: 93  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
20 Tipo de cadena: Monocatenaria  
Tipo de molécula: DNA sintético  
Característica de la secuencia: Exón 9 del gen WT1  
Secuencia:

25

**GTGTGAAACC ATTCCAGTGT AAAACTTGTC AGCGAAAGTT CTCCCGGTCC GACCACCTGA 60**  
**AGACCCACAC CAGGACTCAT ACAGGTAAAA CAA 93**

30

### SEQ ID N°: 19

Longitud de la secuencia: 158  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
35 Tipo de cadena: Monocatenaria  
de molécula: DNA sintético  
de la secuencia: Porción de exón 10 del gen WT1  
Secuencia:

40

**GTGAAAAGCC CTTCAGCTGT CGGTGGCCAA GTGTGCAGAA AAAGTTTGCC CGGTCAGATG 60**  
**AATTAGTCCG CCATCACAAC ATGCATCAGA GAAACATGAC CAAACTCCAG CTGGCGCTTT 120**  
**GAGGGTCTC CCTCGGGGAC CGTTCAGTGT CCCAGGCA 158**

45

### SEQ ID N°: 20

Longitud de la secuencia: 18  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
50 Tipo de cadena: Monocatenaria  
Tipo de molécula: DNA sintético  
Secuencia:

55

**AGAGAAGAAG GGAACCCC**

### 60 SEQ ID N°: 21

Longitud de la secuencia: 18  
Tipo de secuencia: Ácido nucleico  
Tipo de cadena: Monocatenaria  
65 Tipo de molécula: DNA sintético  
Secuencia:

65

# ES 2 268 705 T3

GCGTGGGCAG CCTGGGAA

SEQ ID Nº: 22

5 Longitud de la secuencia: 16  
Tipo de secuencia: Aminoácido  
Tipo de molécula: Péptido sintético  
Secuencia:

10 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Gln Gln Gln  
1 5 10 15

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 268 705 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: KISHIMOTO, TADAMITSU
  - (B) DOMICILIO: 3-5-31, NAKANO-CHO
  - 10 (C) CIUDAD: TONDABAYASHI-SHI
  - (D) ESTADO: OSAKA
  - (E) PAÍS: JAPÓN
  - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 562/JP
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS LEUCÉMICAS QUE CONTIENE DERIVADO OLIGONUCLEOTÍDICO ANTISENTIDO CONTRA EL GEN DEL TUMOR DE WILMS (WT1)
- 20 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 22
- (iv) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco blando
  - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
  - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versión 1.30 (EPO)
- (v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL: NÚMERO DE SOLICITUD: EP 96914430.2
- 30

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 35 (A) LONGITUD: 18 pares de bases
  - (B) TIPO: Ácido nucleico
  - (C) TIPO DE CADENA: simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"
- 45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 1:
- CCCACCGCAT TCGACCCT

18

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 2:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
  - (B) TIPO: Ácido nucleico
  - 55 (C) TIPO DE CADENA: simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 2:
- 65 AGGGTCGAAT GCGGTGGG

18

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 3:

## ES 2 268 705 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 3:

CCGGCCCCTC TTATTTGA

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 4:

TCAAATAAGA GGGGCCGG

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 5:

CAGCAAATGG GCTCCGAC

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 6:

GTCGGAGCCC ATTTGCTG

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 7:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
  - (B) TIPO: Ácido nucleico
  - 10 (C) TIPO DE CADENA: simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 15 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 7:

AGCGATAACC ACACAACG

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 8:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
  - (B) TIPO: Ácido nucleico
  - (C) TIPO DE CADENA: simple
  - 30 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 8:

CGTTGTGTGG TTATCGCT

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 9:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1272 pares de bases
  - (B) TIPO: Ácido nucleico
  - 45 (C) TIPO DE CADENA: simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 50 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 9:

55

60

65

## ES 2 268 705 T3

	TGGTATCCTC GACCAGGGCC ACAGGCAGTG CTCGGCGGAG TGGCTCCAGG AGTTACCCGC	60
	TCCCTGCCGG GCTTCGTATC CAAACCCTCC CCTTCACCCC TCCTCCCCAA ACTGGGCGCC	120
5	AGGATGCTCC GGCCGGAATA TACGCAGGCT TTGGGCGTTT GCCAAGGGTT TTCTTCCCTC	180
	CTAAACTAGC CGCTGTTTTT CCGGCTTAAC CGTAGAAGAA TTAGATATTC CTCACTGGAA	240
10	AGGGAAACTA AGTGCTGCTG ACTCCAATTT TAGGTAGGCG GCAACCGCCT TCCGCCTGGC	300
	GCAAACCTCA CCAAGTAAAC AACTACTAGC CGATCGAAAT ACGCCCGGCT TATAACTGGT	360
15	GCAACTCCCG GCCACCCAAC TGAGGGACGT TCGCTTTCAG TCCCGACCTC TGGAAACCCAC	420
	AAAGGGCCAC CTCTTTCCCC AGTGACCCCA AGATCATGGC CACTCCCCTA CCCGACAGTT	480
20	CTAGAGCAAG AGCCAGACTC AAGGGTGCAA AGCAAGGGTA TACGCTTCTT TGAAGCTTGA	540
	CTGAGTTCTT TCTGCGCTTT CCTGAAGTTC CCGCCCTCTT GGAGCCTACC TGCCCTCCC	600
25	TCCAAACCAC TCTTTTAGAT TAACAACCCC ATCTCTACTC CCACCGCATT CGACCTGCC	660
	CGGACTCACT GCTACTGAAC GGACTCTCCA GTGAGACGAG GCTCCCACAC TGGCGAAGGC	720
30	AAGAAGGGGA GGTGGGGGA GGGTTGTGCC ACACCGGCCA GCTGAGAGCG CGTGTGGGT	780
	TGAAGAGGAG GGTGTCTCCG AGAGGGACGC TCCCTCGGAC CCGCCCTCAC CCCAGCTGCG	840
35	AGGGCGCCCC CAAGGAGCAG CGCGGCTGC CTGGCCGGGC TTGGGCTGCT GAGTGAATGG	900
	AGCGGCCGAG CCTCCTGGCT CCTCCTCTC CCCGCGCCGC CGGCCCTCT TATTGAGCT	960
40	TTGGGAAGCT GAGGGCAGCC AGGCAGCTGG GGTAAGGAGT TCAAGGCAGC GCCCACACCC	1020
	GGGGGCTCTC CGCAACCGGA CCGCCTGTGG CTCCCCACT TCCGCGCTC CCTCCCACCT	1080
45	ACTCATTAC CCACCCACCC ACCCAGAGCC GGGACGGCAG CCCAGGCGCC CGGGCCCCGC	1140
	CGTCTCCTCG CCGCGATCCT GGACTTCCTC TTGCTGCAGG ACCCGGCTC CACGTGTGTC	1200
50	CCGGAGCCGG CGTCTCAGCA CACGCTCCGC TCCGGGCTG GGTGCCTACA GCAGCCAGAG	1260
	CAGCAGGGAG TC	1272

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 10:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 457 pares de bases
  - (B) TIPO: Ácido nucleico
  - (C) TIPO DE CADENA: simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 10:

65

## ES 2 268 705 T3

	<b>TCTGAGCCTC AGCAAATGGG CTCCGACGTG CGGGACCTGA ACGCGCTGCT GCCCGCCGTC</b>	<b>60</b>
	<b>CCCTCCCTGG GTGGCGGGCG CGGCTGTGCC CTGCCTGTGA GCGGCGCGGC GCAGTGGGCG</b>	<b>120</b>
5	<b>CCGGTGCTGG ACTTTGCGCC CCCGGGCGCT TCGGCTTACG GGTGTTGGG CGGCCCCGCG</b>	<b>180</b>
	<b>CCGCCACCGG CTCCGCCGCC ACCCCGCGCC CCGCCGCCTC ACTCCTTCAT CAAACAGGAG</b>	<b>240</b>
10	<b>CCGAGCTGGG GCGGCGCGGA GCCGCACGAG GAGCAGTGCC TGAGCGCCTT CACTGTCCAC</b>	<b>300</b>
	<b>TTTTCCGGCC AGTTCACTGG CACAGCCGGA GCCTGTGCT ACGGGCCCTT CGGTCTCCT</b>	<b>360</b>
15	<b>CCGCCAGCC AGGCGTCATC CGGCCAGGCC AGGATGTTTC CTAACCGCC CTACCTGCC</b>	<b>420</b>
	<b>AGCTGCCTCG AGAGCCAGCC CGCTATTCGC AATCAGG</b>	<b>457</b>

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 11:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 123 pares de bases
  - (B) TIPO: Ácido nucleico
  - 25 (C) TIPO DE CADENA: simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 30 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 11:

	<b>GTTACAGCAC GGTCACCTTC GACGGGACGC CCAGCTACGG TCACACGCCC TCGCACCATG</b>	<b>60</b>
	<b>CGGCGCAGTT CCCCAACCAC TCATTCAAGC ATGAGGATCC CATGGGCCAG CAGGGCTCGC</b>	<b>120</b>
40	<b>TGG</b>	<b>123</b>

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 12:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 103 pares de bases
  - (B) TIPO: Ácido nucleico
  - (C) TIPO DE CADENA: simple
  - 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 12:

	<b>GTGAGCAGCA GTACTCGGTG CCGCCCCGG TCTATGGCTG CCACACCCCC ACCGACAGCT</b>	<b>60</b>
60	<b>GCACCGGCAG CCAGGCTTTG CTGCTGAGGA CGCCCTACAG CAG</b>	<b>103</b>

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 13:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 78 pares de bases

## ES 2 268 705 T3

- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
  - (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"

10

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 13:

**TGACAATTTA TACCAAATGA CATCCAGCT TGAATGCATG ACCTGGAATC AGATGAACTT 60**

**AGGAGCCACC TTAAGGG 78**

15

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 14:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 51 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
  - (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"

30

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 14:

**AGTTGCTGCT GGGAGCTCCA GCTCAGTGAA ATGGACAGAA GGGCAGAGCA A 51**

35

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 15:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

- (A) LONGITUD: 97 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
  - (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 15:

50

**CCACAGCACA GGGTACGAGA GCGATAACCA CACAACGCC ATCCTCTGCG GAGCCCAATA 60**

**CAGAATACAC ACGCACGGTG TCTTCAGAGG CATTGAG 97**

55

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 16:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60

- (A) LONGITUD: 151 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

65

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
  - (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"



## ES 2 268 705 T3

GTGAAAAGCC CTTTCAGCTGT CGGTGGCCAA GTTGTGAGAA AAAGTTTGCC CGGTCAGATG 60  
AATTAGTCCG CCATCACAAC ATGCATCAGA GAAACATGAC CAAACTCCAG CTGGCGCTTT 120  
5 GAGGGGTCTC CCTCGGGGAC CGTTCAGTGT CCCAGGCA 158

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 20:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 20:

AGAGAAGAAG GGAACCCC

18

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 21:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "SINTÉTICO"

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 21:

GCGTGGGCAG CCTGGGAA

18

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 22:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 16 Aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 22:

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
1 5 10 15