



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

No se encuentra
imagen

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04 129329

54. TITULO

Secuencias de control del gen de corina
humano.

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

E12N C07H 21/02

71. SOLICITANTE

Schering Aktiengesellschaft

DOMICILIO

Berlin, Alemania

74. APODERADO

Gustavo Hellmann Bestepro

22. BOGOTA, D.C.,

28 de diciembre de 2004

utx
⑤

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT**

Dirección: **Müllerstrasse 178**
D-13342 Berlin, Alemania

Nacionalidad o Domicilio: **Berlin, Alemania**
Lugar de Constitución: **Alemania**

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO**

Dirección **Cra. 11ª No. 94-76 - Of. 308**

Teléfono: **6161948**

Fax: **6163976**

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☒

Cual _____

Número **2.878.023** TP **5903**

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **PAN Junliang**

Dirección **1220 Brewster Drive, El Cerrito**

Nacionalidad o Domicilio: **CA 94530 Estados Unidos**

⑤ **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. **PCT/US03/16741**

Fecha **Mayo 28 de 2003**

Publicación Internacional No. **WO 03/102135 A2**

Fecha **Diciembre 11 de 2003**

⑥

Título (54) **SECUENCIAS DE CONTROL DEL GEN DE CORINA HUMANO.**

⑦

Clasificación Internacional (51) **C12N 1/00 , C07H 21/62**

⑧

PRIORIDAD:

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos

(32) Fecha

Mayo 31, 2002

(31) Número de Solicitud

60/384,108

⑨

Comprobante de pago No. **24-99,599**

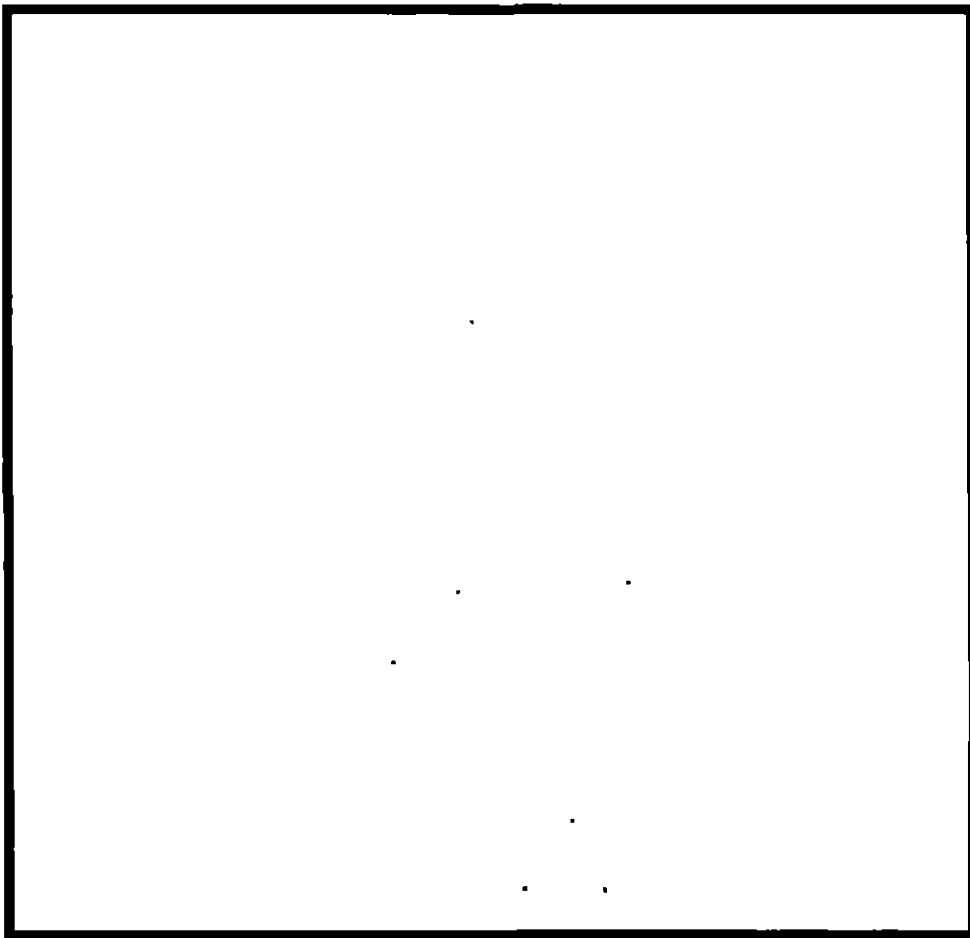
Fecha **Diciembre 27, 2004**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario , ver reverso de esta página.

ANEXOS

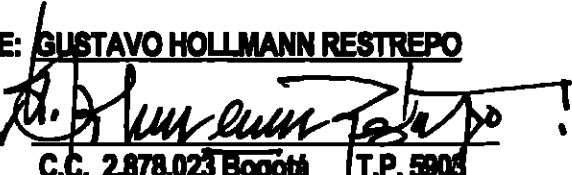
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros Reporte de Búsqueda Internacional.

(11) FIGURA CARACTERISTICA



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO

FIRMA: 

C.C. 2.878.023 Bogotá

T.P. 5905

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

Continuación nombre, dirección y domicilio de inventores:

<u>Nombre</u>	<u>Dirección</u>	<u>Domicilio</u>
WU Qingyu /	1153 Camino Vallecito,	Lafayette, CA 94549-2844 Estados Unidos

Otros anexos que se acompañan a la solicitud.

Copia formulario PCT/RO/101 correspondiente a la presentación de la solicitud internacional.

Copia formulario PCT/IB/304 correspondiente a la notificación relativa al envío o transmisión del documento de prioridad.

Copia formulario PCT/IB/301 correspondiente a la notificación o recibo de la copia de archivo.

Tabla de secuencias.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radiacion : 04129329 00000000 Folios: 194
Fecha (AMB): 2004-12-28 17:26:55
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 99,599
FECHA : DICIEMBRE 27 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
PRIETO GUTIERREZ Y CARRIZO	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	33239372	27/12/2004	4,434,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. REMITIDO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

Ref.: 56636

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

Berlín, 23 de Agosto de 1999

No. 05/99

El suscrito **ENCARGADO DE LAS FUNCIONES CONSULARES DEL CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN BERLÍN**, República Federal de Alemania

CERTIFICA:

1. Que el señor **GETTERDT**, quien autoriza el documento anterior, ejercía legalmente en la fecha allí indicada, las funciones del Presidente Encargado del Tribunal Regional de Berlín, y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

2. Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía **SCHERING AG** domiciliada en Berlín, República Federal de Alemania, existe legalmente, y que actualmente ejerce su objeto social de acuerdo con las leyes del respectivo país.

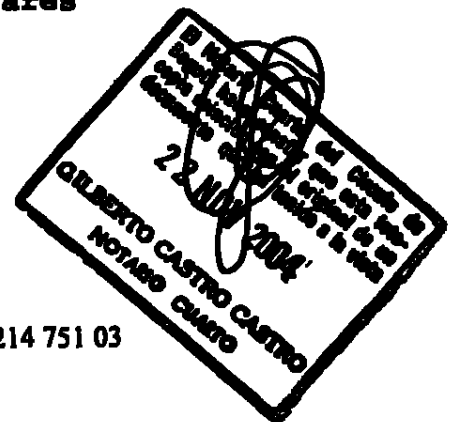
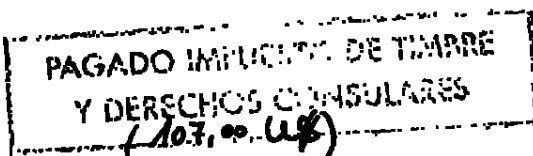
3. Que los señores **UWE HARTMANN** y **WALTER KLOSE** quienes firmaron el poder que precede, están autorizados para representarla en este acto y otorgar el certificado.

El Encargado de las Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.




GERMAN NEIRA

Encargado de las Funciones
Consulares



Tauentzienstr. 15, 10789 Berlin
TEL 030-214 751 63 - 030-214 751 64 - FAX 030-214 751 03

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

322052
German Neiva
RECEBIDO DESPACHO
DE RELACIONES EXTERIORES

23 DE AGOSTO
RECEBIDA DEL TEXTO

1999 OCT 14 12:47
RECEBIDA DEL TEXTO
SANTIAGO DE LOS CABALLEROS

RECEBIDA DEL TEXTO
SANTIAGO DE LOS CABALLEROS
22 OCT 2004
RECEBIDA DEL TEXTO
SANTIAGO DE LOS CABALLEROS

6

PARA PATENTES, MARCAS Y LICENCIAS FARMACEUTICAS
FOR PATENTS, TRADE MARKS AND PHARMACEUTICAL LICENSES

The undersigned

acting on behalf of and representing

Company's
Name
domiciled in

Company's
Domicile
hereby appoint/s

Leave blank
domiciled in Bogotá, Republic of Colombia.

as our true and legal attorneys with the necessary powers: 1) to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining letter patents, industrial designs and models, trademark registrations, registration of commercial names as well as their assignments, extensions, renewals and changes of name; 2) to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3) Intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public office or authority in any judicial, administrative or police action, such as: actions dealing with commercial names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and exploitations of licenses; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages; claims or remarks on patent applications, industrial designs and models; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measures or appeals related to industrial property matters.

To this effect, I (we) hereby authorize him (them) to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes and take all measures he (they) may deem convenient to protect my (our) interests, with all other necessary "legal" faculties, and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any actions, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extrajudicial attorneys.

Signed in

On this day of

19

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
ppa.

Signature(s)
Firma(s)

To(usotro/s)

Dr. Uwe Hartmann y Dr. Walter Klose

obrando a nombre y representación de

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

con domicilio en

Müllerstr. 178

D-13353 Berlin / Germany

nombre(s) a

GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO y/o

LUIS PATIÑO LEYVA

domiciliado(s) en Bogotá, República de Colombia, en

Cra. 11A No. 94-76 - Of. 308

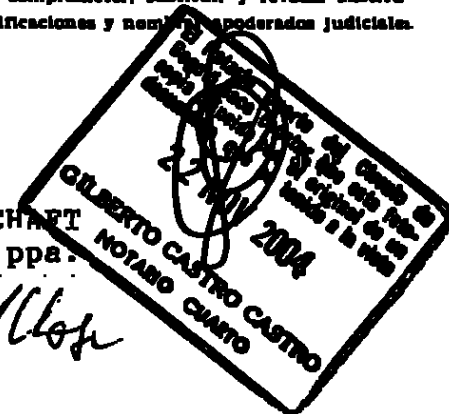
apoderados verdaderos y legales con poder especial amplio y suficiente: 1) Para rambar de las oficinas y autoridades colombianas, administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, de dibujos y modelos industriales, registro de marcas, depósito de nombres comerciales y anexos, así como sus traspaños, prórrogas, renovaciones y cambios de nombre; 2) elevar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clases; 3) intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre comercial, oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a solicitudes de patentes, modelos y dibujos industriales; en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicando y tomar todas las medidas que meyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las demás facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi /nuestro beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi(nuestro) nombre lo actuado, así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y demás apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en

si de



CONSULAR CERTIFICATION

COMPANIES

The undersigned Consul certifies: that the preceding signature(s) reading

is (are) authentic; that the signer(s) at present fills (fill) the position of

Corporation
Company's

of

that he (they) is (are) empowered to grant this power; and that said company exists and is organized in

in accordance with the laws of

All the foregoing facts are known to the Consul due to his having examined the respective documents to which he, the Consul, attests.

Signed in

On this day of

CERTIFICACION CONSULAR

SOCIEDADES

El infrascrito Cónsul certifica: que la(s) firma(s) que antecede(n) y dice(n)

es(son) auténtica(s); que el(los) signatario(s) desempeña(n) actualmente el(los) cargo(s) de

de

que tiene(n) facultad para otorgar este poder; y que dicha compañía existe y está organizada en

conforme a las leyes de

Todos los hechos anteriores le constan, por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Firmado en

En de de 19



Die vorstehenden, heute vor mir gefertigten Unterschriften der mir persönlich bekannten Prokuristen,

1. Dr. Uwe Hartmann,
2. Dr. Walter Klose,

- beide geschäftsansässig in 13353 Berlin,
Müllerstraße 178 -,

beglaubige ich hiermit.

Zugleich bescheinige ich aufgrund des mir vorliegenden beglaubigten Handelsregistrauszuges zum Aktenzeichen 93 HRB 283 des Amtsgerichts Berlin-Charlottenburg vom 17. Juni 1999, daß die vorgenannten Herren als Prokuristen gemeinsam zur Vertretung der Schering Aktiengesellschaft, Berlin, berechtigt sind.

Ich habe den Beteiligten das Mitwirkungsverbot des § 3 Abs. 1 Nr. 7 BeurkG erläutert. Meine Frage, ob eine meine Mitwirkung an der Amtshandlung ausschließende Vorbefassung vorliege, wurde von den Beteiligten verneint.

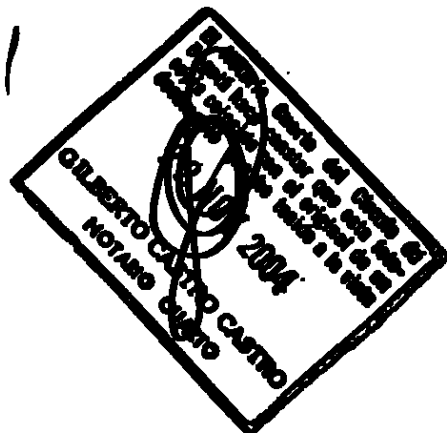
Berlin, den 11. August 1999
Urkundenrolle-Nr. 656/1999

Diack
Notarin

Kostenrechnung
§§ 141, 154 KostO
Geschäftswert: 20.000,00 DM
Beglaubigungsgebühr
Wegegebühr
Gebühr für Vertretungsbescheinigung
16 % Mehrwertsteuer

§ 45 I	25,00 DM
§ 58	25,00 DM
§ 150	25,00 DM
	<u>12,00 DM</u>
	<u>87,00 DM</u>

Diack
Notarin



Die Echtheit vorstehender Unterschrift der Notarin

Elisabeth Quack

in Berlin und die Echtheit des beigedrückten Dienstsiegels werden hiermit bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, daß die Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.

Berlin, den 17. August 1999

Der Präsident des Landgerichts
Im Auftrage

Getferdt
(Getferdt)
Richterin am Landgericht

9101 E-F. 2233/99

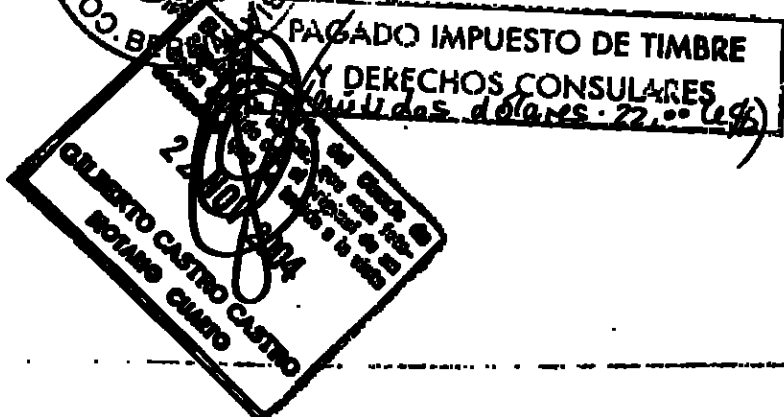
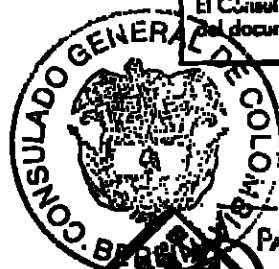
Gebühr: 25,00 DM
gezahlt

Berlin, den 17. August 1999

Justiz...

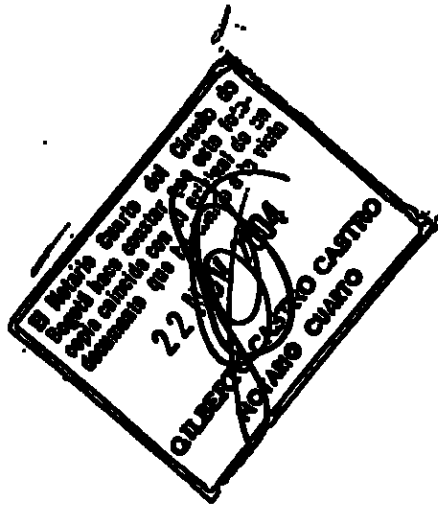
CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
Berlin, 23 Agosto 1999 No. 357/99
El suscrito Cónsul General de Colombia CERTIFICA:
Que B. Getferdt que autoriza el
presente documento ejerce legalmente en la fecha allí expresada
las funciones Encargada del Presidente
del Tribunal Regional de Berlín
y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos
son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.
El Cónsul no asume responsabilidad alguna por el contenido
del documento.

[Signature]
AUT. ADMINISTRATIVA



RELACIONES
EXTERIORES

322057
Coman Alora
CUIA FIRMA AFILIADA EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
1969 OCT 14 P/2: 17
JEFE DE LEGALIZACIONES
STAFF DE BONTAN N

Traducción oficial del alemán de la notarización (Registro Notarial No. 656/1999) y de la legalización de firmas correspondientes al poder de la compañía SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT domiciliada D-13353 Berlín, República Federal de Alemania.

Por medio de este documento autentico oficialmente las firmas que aparecen anteriormente, ejecutadas en presencia mía el día de hoy por los Apoderados

1. Dr. Uwe Hartmann,

2. Dr. Walter Klose,

ambos con domicilio de negocios en Müllerstrasse 178, 13353 Berlín, y conocidos personalmente por la suscrita Notaria.

Al mismo tiempo, con base en el extracto autenticado del Registro Comercial HRB 283 Acta 93 del Juzgado Municipal de Berlín- Charlottenburg fechado el 17 de Junio de 1999, certifico que los mencionados Señores en su calidad de Apoderados están autorizados para representar conjuntamente a la compañía Schering Aktiengesellschaft domiciliada en Berlín.

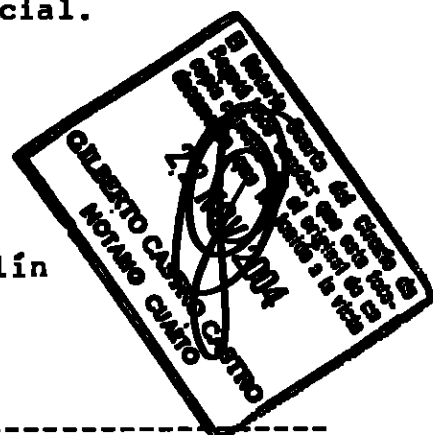
Yo les expliqué a los involucrados las prohibición de co-participación descrita en el Artículo 3 Inciso 1 Numeral 7 de la Ley de Certificaciones Notariales. Ellos contestaron negativamente mi pregunta acerca de si existía una prohibición que excluyera mi co-participación en este acto oficial.

Berlín, Agosto 11 de 1999

Registro Notarial No. 656/1999

Elisabeth Quack, Notaria en Berlín

(Firma y Sello Oficial)



------(continúa en la 2ª página)-----

Nota de gastos:

Artículos 141, 154 Disposición de Impuestos

Valor del negocio: 20.000,-- DM

Derechos por autenticación Artículo 45I	25,00 DM
Derechos por concepto de porte Artículo 58	25,00 DM
Derechos por Cert. de Representación Art. 150	25,00 DM
16% Impuesto sobre el Valor Agregado	12,00 DM
Total:	87,00 DM

Elisabeth Quack, Notaria (firma)

Se confirma la autenticidad de la firma que aparece anteriormente, la cual pertenece a la Notaria Elisabeth Quack en Berlín, y también la autenticidad del sello oficial que aparece al lado de dicha firma. Al mismo tiempo, se certifica que la persona mencionada se encontraba legalmente autorizada para la ejecución de ese acto oficial.

✓ Berlín, 17 de Agosto de 1999

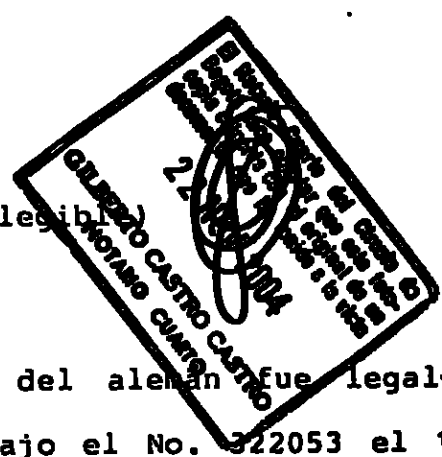
Getferdt, Representante del Presidente Tribunal Regional
(Firma y Sello Oficial)

910 E-F. 2233/99

Impuesto: 25,00 DM pagado

Berlín, 17 de Agosto de 1999

La inspectora de Impuestos (firma ilegible)



El documento traducido del alemán fue legalizado bajo el No. 322052 y bajo el No. 322053 el 14 de Octubre de 1999 en la Oficina de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores.

Adolf Watzke
ADOLF WATZKE
Traductor Oficial
Reg. 8439

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

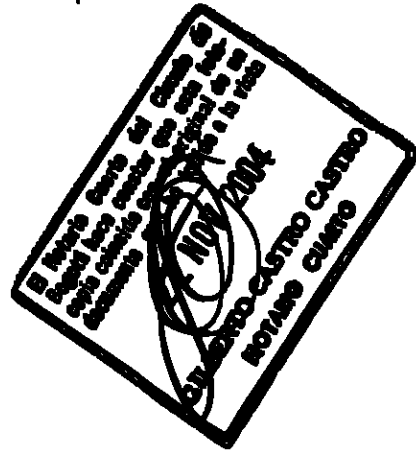
323271

ADOLF WATZKE
UNA FIGURA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1999 OCT 20 11:08

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTIAFF DE BOGOTÁ



DOCUMENTO DE CESIÓN ASSIGNMENT DOCUMENT

Los suscritos,
(We, the undersigned)

1) JUNLIANG PAN
con domicilio en El Cerrito, California, Estados Unidos de América
(domiciled in)

2) QINGYU WU
con domicilio en Lafayette, California, Estados Unidos de América

declaramos que somos los inventores de la invención que lleva el título
(declare that we are the inventors of the invention titled)

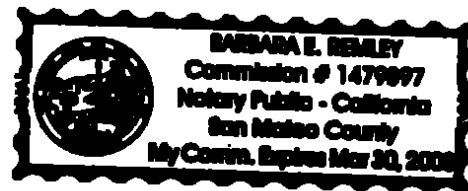
CONTROL SEQUENCES OF THE HUMAN CORIN GENE

y que hemos cedido el derecho sobre esta invención en Colombia, junto con los privilegios
(and that we have assigned our rights over this invention in Colombia, together with its
privileges)

y anexidades a favor de
(and attachments, to)

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
Berlin, Alemania

1) *Jun Pan* 12/03/04
2) *Qingyu Wu* 11/24/04



*See attached
Acknowledgement* *BER*

12

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

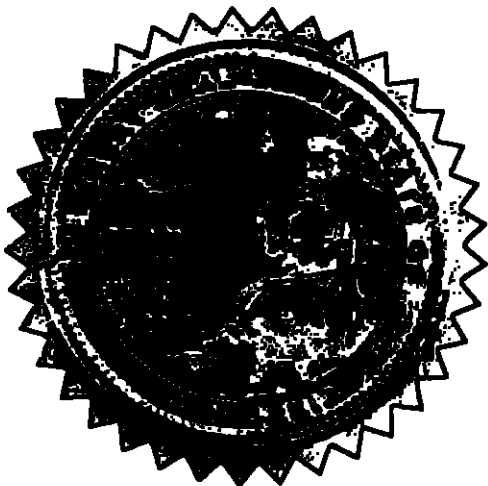
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
This public document
2. *has been signed by BARBARA E. REMLEY*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of BARBARA E. REMLEY, Notary Public,*
State of California

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 8th day of December 2004*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 219325*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*



Kevin Shelley
KEVIN SHELLEY
Secretary of State

BY *[Signature]*

ALIF RNIA ALL-PURPOSE A KN WLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

ss.

On December 3, 2004, before me,

Barbara E. Remley, Notary Public

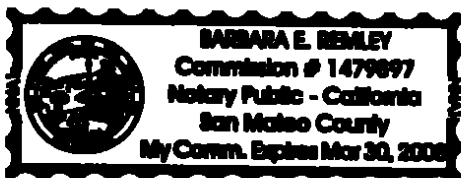
personally appeared

Junhang Pan

Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me

☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence



to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Barbara E. Remley

Place Notary Seal Above

Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Patent Application

Document Date: December 3, 2004

Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: Qingyu Wu

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: Junhang Pan

☒ Individual

☐ Corporate Officer — Title(s):

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

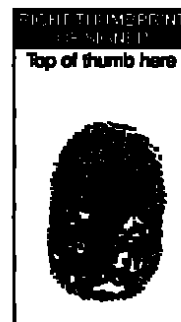
☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other:

Signer Is Representing: Self



State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by MARY ANN J. FLORES*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of MARY ANN J. FLORES, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 8th day of December 2004*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 219324*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature



Kevin Shelley
KEVIN SHELLEY
Secretary of State

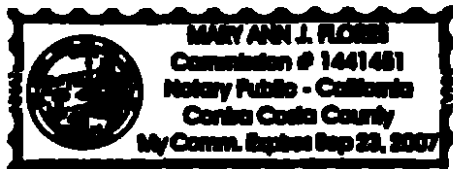
BY *[Signature]*



State of California
County of Contra Costa

On November 22, 2014 before me, Mary Ann J. Flores, Notary
Date Name and Title of Office (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Qingyu Wu
Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me -- OR -- ☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Mary Ann J. Flores
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Columbia Assignment (52357)

Document Date: _____ Number of Pages: 1

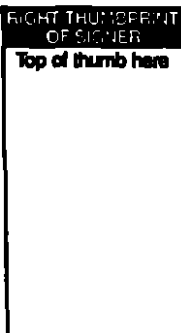
Signer(s) Other Than Named Above: Jinliang Pan

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
- ☐ Corporate Officer
- Title(s): _____
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney-in-Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other: _____

Signer Is Representing:



Signer's Name: _____

- ☐ Individual
- ☐ Corporate Officer
- Title(s): _____
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney-in-Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other: _____

Signer Is Representing:



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 December 2003 (11.12.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/102135 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12N
- (21) International Application Number: PCT/US03/16741
- (22) International Filing Date: 28 May 2003 (28.05.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/384,108 31 May 2002 (31.05.2002) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Mullerstrasse 178, D-13342 Berlin (DE).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): PAN, Junliang [US/US]; 1220 Brewster Drive, El Cerrito, CA 94530 (US). WU, Qingyu [CN/US]; 1153 Camino Vallecito, Lafayette, CA 94549-2844 (US).
- (74) Agent: WASHTIEN, Wendy, L.; Berlex Biosciences, 2600 Hilltop Drive, P.O. Box 4099, Richmond, CA 94804 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/102135 A2

(54) Title: CONTROL SEQUENCES OF THE HUMAN CORIN GENE

(57) Abstract: This invention provides a novel expression control region isolated from mammalian corin genes. This control region preferentially activates transcription in cardiac cells. Methods and compositions are provided to employ this control region for identification of agents capable of modulating corin expression and for treatment of cardiac diseases.

CONTROL SEQUENCES OF THE HUMAN CORIN GENE

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application Serial No. 60/384,108, filed May 31, 2002, which is incorporated herein in full by reference.

FIELD OF THE INVENTION

This invention provides a novel expression control region isolated from mammalian corin genes. This control region preferentially activates transcription in cardiac cells. Methods and compositions are provided to employ this control region for identification of agents capable of modulating corin expression and for treatment of cardiac diseases.

BACKGROUND

Corin, a cardiac transmembrane serine protease, plays an important role in the conversion of pro-atrial natriuretic peptides (pro-ANP) to ANP (Yan, W. et al. (2000) *PNAS*, 97: 8525-8529; Wu et al. (2002) *J.Biol. Chem.* 277:16900-16905). ANP is a cardiac hormone that reduces high blood pressure by promoting salt excretion, increasing urinary output, decreasing blood volume, and relaxing vessel tension in a receptor dependent manner. ANP has been implicated in major cardiovascular diseases such as hypertension and cardiac failure (Burnett, J.C. et al. (1986) *Science*, 231:1145-1147). In knockout mice, deficiency in either ANP or its receptor causes spontaneous hypertension (John, S.W. et al. (1995) *Science* 267:679-681; John, S.W. et al. (1996) *Am. J. Physiol.* 271, R109-R114; Lopez et al. (1995) *Nature* 378:65-68). It is recognized that the activation step of converting pro-ANP to ANP is critical in the regulation of the cardiac hormone.

Corin has a predicted structure of a type II transmembrane protein containing two frizzled-like cysteine rich motifs, eight LDL receptor repeats, a macrophage scavenger receptor-like domain, and a trypsin-like protease domain in the extracellular region (Yan et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:14926-14935). The overall topology of corin is similar to that of other type II transmembrane serine proteases including hepsin, enterokinase, MT-SP1/matriptase, human airway trypsin-like protease, TMPRSS2, TMPRSS3/TADG-12, TMPRSS4, MSPL, and Stubble-stubloid. The similar topologies as well as distinct modular structures suggest that these proteins comprise a gene family evolved by duplication and rearrangement of ancestral exons.

The human gene spans > 200 kb and contains 22 exons. The intron/exon boundaries are well conserved among species with most exons encoding structural domains. Cloning of both mouse and human cDNA encoding the corin protein has been previously reported (Yan et al. *ibid*). Northern analysis showed that corin mRNA is highly expressed in the human heart. By fluorescence in situ hybridization analysis, the human corin gene was mapped to the short arm of chromosome 4 (4p12-13) where a congenital heart disease locus, total anomalous pulmonary venous return had been previously localized.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is related to the isolation, cloning and identification of the expression control regions of the mammalian corin gene, including the promoter and other regulatory elements, and the use of this cardiac-specific expression control region to identify novel agents that modulate corin gene expression and to treat heart disease.

Toward these ends, it is an object of the present invention to provide an isolated polynucleotide comprising a corin expression control region, wherein the control region modulates transcription of any heterologous polynucleotide to which it is operably linked, including, but not limited to, the human corin gene.

The corin expression control region directs cardiac-specific transcription of the heterologous polynucleotides to which it is operably linked, comprises one or more transcription regulation elements, selected from the group consisting of GATA, Tbx-5, NKX2.5, Krüppel-like transcription factor, or NF-AT binding sites, and is capable of binding transcription proteins, e.g. GATA-4.

It is a further object of the invention to provide polynucleotides comprising a human corin expression control region. A preferred polynucleotide of the invention is located at nucleotides -4037 to -15 (SEQ ID NO: 6), more preferred at nucleotides -1297 to -15 (SEQ ID NO: 5), and still more preferred at nucleotides -405 to -15 (SEQ ID NO: 4), where the numbering is relative to the translation initiation site (ATG) of the human corin gene or its complementary strand as shown in Figure 8 (SEQ ID NO: 2).

In accordance with this aspect of the invention there are also provided fragments and variants of these polynucleotides.

It is another object of the invention to provide vectors comprising the corin expression control region, or fragments or variants thereof. In further embodiments, the vector also comprises a heterologous polynucleotide, e.g. corin, operably linked to the corin expression control region. In accordance with this aspect of the invention, there are also provided host cells transfected with such vectors, and methods of expressing products encoded by such heterologous polynucleotides.

It is another object of the invention to provide pharmaceutical compositions comprising a vector containing the corin expression control region operably linked to a heterologous polynucleotide or a host cell transfected with such a vector, in a pharmaceutically acceptable carrier.

It is another object of the invention to provide a method of identifying an agent which can modulate the expression of a human corin gene in a cell, wherein the method comprises:

- (a) producing a recombinant vector in which an isolated polynucleotide comprising a mammalian corin expression control region is operably linked to a reporter gene;
- (b) transfecting the cell with the recombinant vector;
- (c) treating the cell with the agent;
- (d) measuring the level of transcription of the reporter sequence in the treated cell; and
- (e) comparing the level of expression of the reporter sequence in the presence of the

agent to the level of expression in a transfected control cell which has not been treated with the agent.

In a preferred embodiment, cardiac myocyte cells are used.

It is another object of the invention to provide a method for modulating the cardiac-specific expression of a gene in a human subject, the method comprising:

(a) producing a recombinant vector in which an isolated polynucleotide comprising a mammalian corin expression control region is operably linked to a heterologous polynucleotide; and

(b) administering the vector in a therapeutically effective amount to the subject.

A preferred embodiment of this aspect of the invention is a vector in which the heterologous polynucleotide encodes corin. Also preferred are embodiments in which the corin expression control region is selected from the polynucleotides having the sequences of SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6.

It is another object of the invention to provide a method for treating congestive heart failure, hypertension or myocardial infarction in a human subject, the method comprising administering a therapeutically effective amount of an isolated polynucleotide comprising a corin expression control region, operably linked to a gene selected from the group consisting of corin, atrial natriuretic peptide (ANP), B-type natriuretic peptide, phosphonolamban, angiotensin converting enzyme (ACE), or dominant negative forms of these genes, to the subject. Alternatively, the corin expression control region may be operably linked to a polynucleotide which encodes an antisense RNA molecule.

In a preferred embodiment of this aspect of the invention the gene selected is corin.

It is another aspect of the invention to provide a method of treating a human subject with heart failure, the method comprising:

(a) producing a recombinant vector in which an isolated polynucleotide comprising a mammalian corin expression control region, is operably linked to a polynucleotide encoding a polypeptide selected from the group consisting of ANP, B-type natriuretic peptide, phosphonolamban, ACE, or dominant negative forms of these genes; and

(b) administering the recombinant vector, in a pharmaceutically acceptable carrier, to the subject.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. Organization of the mammalian corin genes. Organization of the (A) human and (B) mouse corin genes is shown. Two BAC clones were sequenced by a shot-gun strategy and the sizes of their assembled insert sequences are indicated. Vertical bars indicate exons. A plasmid clone used for subcloning from BAC 28540 in the human gene is indicated by restriction enzyme sites (H, *Hind III*; E, *EcoRI*). The insert of the subclone was sequenced by a primer extension method using automated

sequencing. At the bottom are depicted the positions of the BAC clones, Contigs, and a plasmid clone that span the corin gene.

Figure 2. Intron-exon boundary positions relative to the protein domain of corin. Exons 1 through 22 (upper panel) of the corin gene are aligned with their corresponding protein domains. TM, transmembrane domain; Frizzled, the frizzled-like cysteine rich domain; LDLR, LDL receptor repeats; SRCR, scavenger receptor cysteine-rich domain; H, D, and S, the His, Asp, and Ser residues of the catalytic triad of the protease domain.

Figure 3. Alignment of the 5'-flanking regions of the human (SEQ ID NO: 1) and mouse (SEQ ID NO: 3) corin genes. The 5'-flanking region, exon 1 and part of Intron 1 are aligned between the human and murine genes. The numbering is relative to the translation initiator ATG (bold-type and italics). The numbers indicated are different between human and mouse, because of the divergence in the first exons. An arrowhead indicates the junction between the first exon and Intron of the human corin gene, and the donor splice sequence of human Intron 1 is underlined. The putative regulatory sequences are indicated and bold-typed (Tbx5 site for binding to Tbx5, a T-box containing transcription factor; NF-AT, a binding site for nuclear factor of activated T cells; GATA, a binding element for GATA proteins; GT box for binding to the Krüppel-like factors; TATA box for binding to basal transcription factor TFIID; and NKE, a binding motif for Nkx2.5). The NKE sequence, which overlaps with the proximal GATA sequence, is underlined.

Figure 4. Functional analysis of corin gene promoter activity in cultured cardiomyocytes. Reporter constructs containing serially truncated segments of the 5'-flanking region of human and murine corin genes linked to the luciferase gene are diagramed (Panel A). The locations of putative regulatory elements are indicated. These constructs were co-transfected into mouse HL-5 cells with pRL-SV40, a *Renilla* luciferase-expressing plasmid driven by the SV40 viral promoter. The luciferase activity expressed by each construct was normalized to the activity of *Renilla* luciferase expressed by pRL-SV40 for each transfection. Each transfection experiment was performed in triplicate for each construct. The data represent the means $\pm$ S.D. of three independent experiments (Panel B).

Figure 5. Cardiac-specific expression of the 5'-flanking sequences from the human and murine corin genes. Cardiomyocytes HL5 cells and epitheloid HeLa cells were transfected with the indicated constructs, each along with the control construct pRL-SV40. Luciferase and *Renilla* activities are expressed as light units per 20 μ L-aliquot of the cell extracts from the transfected cells. Each transfection experiment was performed in triplicate. The data represent the means $\pm$ S.D. of three independent experiments.

Figure 6. Binding of nuclear proteins to the regulatory sequence encompassing the proximal GATA element.

A: Sequences of the upper strand oligonucleotides used as probes and competitors. The GATA motifs in each sequence (SEQ ID NOS: 11 and 13, for human and mouse, respectively) are in bold, and the mutated nucleotides (SEQ ID NOS: 12 and 14, for human and mouse, respectively) are in italics. The human and murine proximal GATA elements are from the indicated regions of the corin 5'-flanking sequences. The consensus GATA probe (SEQ ID NO: 15) containing two GATA motifs is derived from human T-cell receptor specific enhancer region.

B: The labeled consensus GATA probe (SEQ ID NO: 15) or its mutant probe (SEQ ID NO: 16) was incubated with nuclear extracts from HL-5 cells in the presence or absence of a 100-fold excess of the indicated unlabeled oligonucleotides. The arrow indicates a GATA-sequence dependent DNA-protein complex.

C: The labeled consensus GATA probe was incubated with nuclear extracts from HL-5 cells in the presence of antibodies against GATA proteins. The arrow indicates a DNA-protein complex whose formation was blocked by an antibody against GATA-4, but not by antibodies against GATA-1, -3, and -6.

D: The labeled human corin GATA element was incubated with nuclear extracts from HL-5 in the presence or absence of an antibody against GATA-4. The arrow indicates the DNA-protein complex whose formation was completely blocked in the presence of the anti-GATA-4 antibody.

Figure 7. Mutational analysis of the proximal conserved GATA elements. The same mutations (GATA to CTTA) that abolish the binding of GATA-4 protein in EMSA were introduced into the luciferase reporter constructs driven by the 5'-flanking regions from -642 to -77 in mouse or from -405 to -15 in human. The mutant and wild type constructs were transfected into HL-5 cells, each along with the control construct pRL-SV40. The luciferase activity expressed by each construct was normalized into the *Renilla* luciferase activity expressed by pRL-SV40 for each transfection. The promoter activity of each mutant construct was expressed as a percentage of the corresponding wild-type construct. Each transfection experiment was performed in triplicate. The data represent the means $\pm$ S.D. of three independent experiments.

Figure 8. Nucleotide sequence (SEQ ID NO: 2) of the 5'-flanking region of the human corin gene. The 4165-base pair sequence contains the 5'-flanking region, the first exon, and the beginning of intron 1 (in lower case). All numbering is relative to the translational start site (ATG, in boldface and underlined). The putative regulatory elements are indicated in boldface. The abbreviations for the putative regulatory elements are described in the legend of Figure 3.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is related to the isolation, cloning and identification of the expression control region of the cardiac-specific corin gene, including the promoter and other regulatory elements.

5 The isolated corin expression control region, and fragments and variants thereof, have utility in constructing *in vitro* and *in vivo* experimental models for studying the modulation of corin gene expression and for identifying novel modulators of corin gene expression. The expression control region can also be used in gene therapy targeted to cardiac disease states, e.g. heart failure.

10 Definitions

As used in the specification, examples and appended claims, unless specified to the contrary, the following terms have the meaning indicated.

15 "Nucleic acid" or "polynucleotide" refers to deoxyribonucleotides or ribonucleotides and polymers thereof in either single- or double-stranded form. The term encompasses nucleic acids containing known nucleotide analogs or modified backbone residues or linkages, which are synthetic, naturally occurring, and non-naturally occurring, which have similar binding properties as the reference nucleic acid, and which are metabolized in a manner similar to the reference nucleotides. Examples of such analogs include, without limitation, phosphorothioates, phosphoramidates, methyl phosphonates, chiral-methyl phosphonates, 2-O-methyl ribonucleotides, peptide-nucleic acids (PNAs).

20 Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (e.g., degenerate codon substitutions) and complementary sequences, as well as the sequence explicitly indicated. Specifically, degenerate codon substitutions may be achieved by generating sequences in which the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or deoxyinosine residues (Batzer *et al.* (1991) *Nucl. Acids*
25 *Res.* 19:5081; Ohtsuka *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2805-08; Rossoini *et al.* (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98). The term nucleic acid is used interchangeably with gene, cDNA, mRNA, oligonucleotide, and polynucleotide.

A particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses "splice variants." Similarly, a particular protein encoded by a nucleic acid implicitly encompasses any protein encoded by a splice
30 variant of that nucleic acid. "Splice variants," as the name suggests, are products of alternative splicing of a gene. After transcription, an initial nucleic acid transcript may be spliced such that different (alternate) nucleic acid splice products encode different polypeptides. Mechanisms for the production of splice variants vary, but include alternate splicing of exons. Alternate polypeptides derived from the same nucleic acid by read-through transcription are also encompassed by this definition. Any products
35 of a splicing reaction, including recombinant forms of the splice products, are included in this definition.

"Corin gene" refers to a gene encoding a contiguous amino acid sequence sharing about at least 60% (preferably 75%, 78%, 90%, and more preferably about 95%) identity with the human corin

gene amino acid sequence as disclosed in Yan et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 14928-14935).

"Corin expression control region" or "expression control region" refers to a polynucleotide located within the upstream (5') genomic sequence of the coding region of the naturally-occurring mammalian corin genes. In the human corin gene, the corin expression control region begins at
5 nucleotide -4165 and ends at nucleotide -15 relative to the translation initiation site (ATG) of the corin gene or its complementary strand as shown in Figure 8. The corin expression control region is capable of activating transcription of the corin gene in cardiac tissue (myocytes). The corin expression control region polynucleotides may range from 100 to 5000 nucleotides in length; particular embodiments of the functional human corin expression control region are 4023, 1283, or 391 nucleotides (SEQ ID NOS: 6,
10 5, and 4, respectively) in length. Corin expression control region polynucleotides are generally at least 70% homologous to these sequences. In some embodiments, corin expression control region polynucleotides are at least 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, or 100% homologous to these sequences. The term "control region" does not include the initiation or termination codons and other sequences already described in Yan et al. *Ibid.* The corin expression control region contains binding
15 sites for a variety of transcriptional regulatory proteins, e.g. GATA-4, which can be linked in a way that is substantially the same as in nature or in an artificial way. The corin expression control region activates transcription of the corin gene or of other heterologous polynucleotides which are operably linked to it, particularly in a cardiac-specific manner.

"Cardiac-specific expression" means that a polynucleotide is transcribed at a greater rate in
20 cardiac-derived cells than in non-cardiac cells. Thus, a corin expression control region will generally activate transcription of a linked polynucleotide at least 2-fold more efficiently in cardiac myocytes than in non-cardiac cells, where expression in each case is normalized to the transcription of another polynucleotide linked to the SV40 promoter/enhancer or other constitutive promoter.

"Variant(s)" of polynucleotides, as used herein, are polynucleotides that differ from the
25 polynucleotide sequence of a reference polynucleotide. Generally, differences are limited so that the polynucleotide sequences of the reference and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. The differences are such that the function of the polynucleotide is not altered, and if the polynucleotide normally encodes a polypeptide, the resultant polypeptide is either unchanged in amino acid sequence or, while possessing differences in amino acid sequence, is still functionally
30 identical.

"Fragment(s)", as used herein, refer to a polynucleotide having a polynucleotide sequence that entirely is the same as part, but not all, of the polynucleotide sequence of the aforementioned corin expression control region and variants thereof. Such fragments maintain the ability of the corin expression control region to direct cardiac-specific transcription of heterologous polynucleotides to
35 which they are operably linked.

"Transcription initiation elements" refer to sequences in a promoter that specify the start site of RNA polymerase II. Transcription initiation elements may include TATA boxes, which direct initiation of

transcription 25-35 bases downstream, or initiator elements, which are sequences located near the transcription start site itself. Eukaryotic promoters generally comprise transcription initiation elements and either promoter-proximal elements, distant enhancer elements, or both.

"Recombinant" when used with reference, e.g., to a cell, or nucleic acid, protein, or vector,

Indicates that the cell, nucleic acid, protein or vector, has been modified by the introduction of a heterologous nucleic acid or protein or the alteration of a native nucleic acid or protein, or that the cell is derived from a cell so modified. Thus, for example, recombinant cells express genes that are not found within the native (non-recombinant) form of the cell or express native genes that are otherwise abnormally expressed, under expressed or not expressed at all.

"Enhancer" refers to a DNA regulatory region that enhances transcription. An enhancer is usually, but not always, located outside the proximal promoter region and may be located several kilobases or more from the transcription start site, even 3' to the coding sequence or within the introns of the gene. Promoters and enhancers may alone or in combination confer tissue specific expression.

"Silencer" refers to a control region of DNA which when present in the natural context of the *corin* gene causes a suppression of the transcription from that promoter either from its own actions as a discrete DNA segment or through the actions of trans-acting factors binding to said elements and effecting a negative control on the expression of the gene. This element may play a role in the restricted cell type expression pattern seen for the *corin* gene. For example expression may be permissive in cardiomyocytes where the silencer may be inactive, but restricted in other cell types in which the silencer is active. This element may or may not work in isolation or in a heterologous promoter construct.

"Isolated" when referring, e.g., to a polynucleotide means that the material is removed from its original environment (e.g., the natural environment if it is naturally occurring), and isolated or separated from at least one other component with which it is naturally associated. For example, a naturally-occurring polynucleotide present in its natural living host is not isolated, but the same polynucleotide, separated from all of the coexisting materials in the natural system, is isolated. Such polynucleotides could be part of a composition, and still be isolated in that such composition is not part of its natural environment.

"Percent identity" or percent identical when referring to a sequence, means that a sequence is compared to a claimed element or described sequence after alignment of the sequence to be compared with the described or claimed sequence. The comparison of sequences and determination of percent identity and similarity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. A preferred non-limiting example of such a mathematical algorithm is described in Karlin et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Such an algorithm is incorporated into the NBLAST and XBLAST programs (version 2.0) as described in Altschul et al. (1997) *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402.

"High stringency" as used herein means, for example, incubating a blot overnight (e.g., at least 12 hours) with a long polynucleotide probe in hybridization solution containing, e.g., 5X SSC, 0.5%

SDS, 100 :g/ml denatured salmon sperm DNA and 50% formamide, at 42 °C. Blots can be washed at high stringency conditions that allow, e.g., for less than 5% bp mismatch (e.g., wash twice in 0.1X SSC and 0.1% SDS for 30 min at 65 °C), thereby selecting sequences having e.g., 95% or greater sequence identity.

5 A polynucleotide is "expressed" when a DNA copy of the polynucleotide is transcribed into RNA.

A polynucleotide is "operably linked" to a corin expression control region when conjunction of the polynucleotide and the corin expression control region in a single molecule results in transcription of the polynucleotide, most preferably in cardiac-specific transcription. (In myocytes).

"Heterologous polynucleotide" refers to polynucleotides, other than a corin expression control
10 region, which are operably linked to a corin expression control region and preferentially expressed in cardiac-specific cells. The linked polynucleotide encodes a therapeutically useful molecule, e.g. a polypeptide, an antisense RNA. The terms "isolated," "purified," or "biologically pure" refer to material that is substantially or essentially free from components that normally accompany it as found in its native state. Purity and homogeneity are typically determined using analytical chemistry techniques
15 such as polyacrylamide gel electrophoresis or high performance liquid chromatography. A protein that is the predominant species present in a preparation is substantially purified. In particular, an isolated nucleic acid is separated from open reading frames that flank the gene and encode other proteins. The term "purified" denotes that a nucleic acid or protein gives rise to essentially one band in an electrophoretic gel. Particularly, it means that the nucleic acid or protein is at least 85% pure, more
20 preferably at least 95% pure, and most preferably at least 99% pure.

The terms "polypeptide," "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical mimetic of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers and non-naturally occurring amino acid polymer.

25 The term "amino acid" refers to naturally occurring and synthetic amino acids, as well as amino acid analogs and amino acid mimetics that function in a manner similar to the naturally occurring amino acids. Naturally occurring amino acids are those encoded by the genetic code, as well as those amino acids that are later modified, e.g., hydroxyproline, γ -carboxyglutamate, and O-phosphoserine. Amino acid analogs refers to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid, i.e., a carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R
30 group, e.g., homoserine, norleucine, methionine sulfoxide, methionine methyl sulfonium. Such analogs have modified R groups (e.g., norleucine) or modified peptide backbones, but retain the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid. Amino acid mimetics refers to chemical compounds that have a structure that is different from the general chemical structure of an amino acid,
35 but that function in a manner similar to a naturally occurring amino acid.

Amino acids may be referred to herein by either their commonly known three letter symbols or by the one-letter symbols recommended by the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

Nucleotides, likewise, may be referred to by their commonly accepted single-letter codes.

"Conservatively modified variants" applies to both amino acid and nucleic acid sequences. With respect to particular nucleic acid sequences, conservatively modified variants refers to those nucleic acids which encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the nucleic acid does not encode an amino acid sequence, to essentially identical sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode any given protein. For instance, the codons GCA, GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are "silent variations," which are one species of conservatively modified variations. Every nucleic acid sequence herein that encodes a polypeptide also describes every possible silent variation of the nucleic acid. One of skill will recognize that each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine, and TGG, which is ordinarily the only codon for tryptophan) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, each silent variation of a nucleic acid that encodes a polypeptide is implicit in each described sequence.

As to amino acid sequences, one of skill will recognize that individual substitutions, deletions or additions to a nucleic acid, peptide, polypeptide, or protein sequence that alters, adds or deletes a single amino acid or a small percentage of amino acids in the encoded sequence is a "conservatively modified variant" where the alteration results in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well known in the art. Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies homologs, and alleles of the invention.

The following eight groups each contain amino acids that are conservative substitutions for one another:

- 1) Alanine (A), Glycine (G);
- 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E);
- 3) Asparagine (N), Glutamine (Q);
- 4) Arginine (R), Lysine (K);
- 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V);
- 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W);
- 7) Serine (S), Threonine (T); and
- 8) Cysteine (C), Methionine (M)

See, e.g., Creighton, *Proteins* (1984).

An "expression vector" refers to a nucleic acid construct, generated recombinantly or synthetically, with a series of specified nucleic acid elements that permit transcription of a particular nucleic acid in a host cell. The expression vector can be part of a plasmid, virus, or nucleic acid

fragment. Typically, the expression vector includes a nucleic acid to be transcribed operably linked to an expression control region, e.g. the corin expression control region.

"Pharmaceutically acceptable excipient" refers to an acceptable carrier, and any pharmaceutically acceptable auxiliary substance as required to be compatible with physiological conditions, which are non-toxic and do not adversely effect the biological activity of the pharmaceutical composition suspended or included within it. Suitable excipients would be compounds such as mannitol, succinate, glycine, or serum albumin.

"Therapeutically effective amount" refers to that amount of a compound of the invention, which, when administered to a subject in need thereof, is sufficient to effect treatment, as defined below, for patients suffering from, or likely to develop, cardiac diseases. The amount of a compound which constitutes a "therapeutically effective amount" will vary depending on the compound, but can be determined routinely by one of ordinary skill in the art having regard to his own knowledge and to this disclosure.

"Treating" or "treatment" as used herein covers the treatment of cardiac disease, and includes:

- (a) preventing cardiac disease from occurring in a human, particularly when such human is predisposed to having these conditions;
- (b) inhibiting cardiac disease, i.e. arresting its development; or
- (c) relieving cardiac disease, i.e. causing regressing of the conditions.

Detailed Description of the Invention

The present invention is related to the cloning and identification of the expression control region of a mammalian corin gene (e.g. mouse, human), including the promoter and other regulatory elements and the use of this expression control region to identify agents that modulate corin gene expression and in the treatment of heart disease. In particular, the invention relates to polynucleotides which comprise a novel human corin expression control region and the ability of this control region to direct cardiac-specific expression of heterologous polynucleotides operably linked to it.

Isolation and characterization of corin expression control region polynucleotides

This invention relies on routine techniques in the field of recombinant genetics. Basic texts disclosing the general methods of use in this invention include Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); Krieger, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); and Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, New York, NY, 1994).

Organization of the mammalian corin gene

Figure 1 depicts the organization of the human and murine corin genes and the locations of (bacterial artificial chromosome) BAC clones, contigs, and a plasmid clone containing the corin genes and their 5'-flanking regions. Both human and murine corin genes span at least 200 Kb and consist of 22 exons and 21 introns.

The corin cDNA sequence predicts a protein composed of a number of discrete domains. The boundaries between protein domains corresponds almost exactly to the exon/intron boundaries of the genomic structure, as illustrated schematically in Figure 2. The cytoplasmic tail at the N-terminus is encoded by exon 1 and half of exon 2, followed by the transmembrane domain that is encoded by the other half of exon 2. The region between the transmembrane and the first Frizzled domain is encoded by exon 3. Each of the frizzled domains is encoded by two exons, each of the eight LDLRs by a single exon, and the scavenger receptor cysteine-rich domain by three exons. The protease domain at the C-terminus is encoded by exons 19 through 22, with the exon 19 coding for the sequence that includes the proteolytic activation site and the catalytic histidine residue. The exons 20 and 22 code for the sequences that include the other two catalytic residues aspartic acid and serine, respectively.

Cloning of the corin expression control region

To clone the human and murine corin genes and their 5'-flanking regions, specific oligonucleotides corresponding to the published corin cDNA sequences of these genes (Yan et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:14926-14935) were synthesized. These oligonucleotide primers were tested for amplifying specific products in PCR-based reactions using human or murine genomic DNA. The pairs of primers that successfully amplified specific PCR products were then used in a PCR-based screen to identify BAC clones containing the human or murine corin gene and/or their corresponding 5'-flanking regions. The identified positive BAC clones were either directly sequenced by a shotgun strategy or subcloned into pUC118 (PanVera/Takara, Madison, WI) for sequencing. The assembly of the shotgun sequences was done using the Staden package (Bonfield et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:4992-4999).

Four BAC clones, two each containing the human and murine corin genes, were obtained by PCR-based screening. Three BAC clones were sequenced by a shotgun strategy, and these sequences, in combination with available trace file information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/Traces/trace.cgi>, <http://trace.ensembl.org>), were used to assemble a contiguous sequences of 340 kb containing the human corin gene, and to determine sequences for 5 contigs for the murine corin gene. For the murine corin gene, the order of the 5 contigs was confirmed by the existence of several mated reading pairs in respective neighboring contigs. The distance of those allowed us to determine the gap size to be less than 500 bp, because the insert size of the public shotgun libraries was well defined. The structures of the human and murine corin genes were then analyzed. However, the 340-kb human genomic sequence did not contain the 5'-flanking

-13-

region. An additional 4165 bp Hind III-EcoR I fragment was isolated from BAC 26540, which included the first 3919 bp of the 5'-flanking region, all of exon 1 and part of intron 1 (submitted to the GenBank™/EBI data Bank with the accession number AF521006).

The corin expression control region polynucleotides described herein were all derived from the 4165 bp Hind III-EcoR I fragment (see Figure 8, SEQ ID NO: 2) isolated from BAC26540. These expression control region polynucleotides were obtained by a PCR-based method, or restriction enzyme digestion, or a combination of both. The 4023 bp corin expression control region polynucleotide (SEQ ID NO: 6) was amplified from the 4165 bp Hind III-EcoR I fragment or human genomic DNA using the primers F1 (5'-AAGCTTCATGAGGGCAGGAG-3') (SEQ ID NO: 7) and R1 (5'-GAGCTCGCTTATTCTTCTGTCCACTT-3') (SEQ ID NO: 8). Similarly, the 1283 bp corin expression control region polynucleotide (SEQ ID NO: 5) was amplified using the primers F2 (5'-AAGCTTATAAAAATAATAGCTTCTTC-3') (SEQ ID NO: 9) and R1 and the 391 bp corin expression control region polynucleotide (SEQ ID NO: 4) was amplified using the primers F3 (5'-AAGCTTAGTAAGTCTTTTGCTCCCAA-3') (SEQ ID NO: 10) and R1.

Any mammalian tissue such as leukocytes, from which DNA may be easily extracted is a suitable source of genomic DNA for the isolation of mammalian corin expression control region polynucleotides.

Functional corin expression control region polynucleotides

The corin expression control region polynucleotides described above are assayed for cardiac-specific transcriptional activity by operably linking a given expression control region polynucleotide to a reporter gene, transfecting the construct into cardiac myocytes, and assaying for the ability of the particular expression control region polynucleotide sequence to direct cardiac-specific transcription of the reporter gene. Reporter genes typically encode proteins with an easily assayed enzymatic activity that is naturally absent from the host cell. Typical reporter proteins for eukaryotic promoters include chloramphenicol acetyltransferase (CAT), firefly or *Renilla* luciferase, beta-galactosidase, beta-glucuronidase, alkaline phosphatase, and green fluorescent protein (GFP). A preferred reporter gene is firefly luciferase.

One system for assessing corin expression control region activity is transient or stable transfection into cultured cell lines. Assay vectors bearing corin expression control region polynucleotides operably linked to reporter genes can be transfected into any mammalian cell line for assays of promoter activity; for methods of cell culture, transfection, and reporter gene assay see Ausubel *et al.* (2000), *supra*; *Transfection Guide*, Promega Corporation, Madison, WI (1998). Corin expression control region polynucleotides may be assayed for cardiac-specific transcription activity by transfecting the assay vectors in parallel into cardiac-derived cell lines and non-cardiac derived cell lines. Typically, a control vector comprising a second reporter gene driven by a known promoter, e.g., *Renilla* luciferase driven by the SV40 early promoter/enhancer (pRL-SV40, Promega, Madison, WI) is

co-transfected along with the assay vector to control for variations in transfection efficiency or reporter gene translation among the various cell lines.

Alternatively, corin expression control region polynucleotides driven transcription may also be detected by directly measuring the amount of RNA transcribed from the reporter gene. In these
5 embodiments, the reporter gene may be any transcribable nucleic acid of known sequence that is not otherwise expressed by the host cell. RNA expressed from corin expression control region polynucleotide constructs may be analyzed by techniques known in the art, e.g., reverse transcription and amplification of mRNA, isolation of total RNA or poly A⁺ RNA, northern blotting, dot blotting, *in situ* hybridization, RNase protection, primer extension, high density polynucleotide array technology and the
10 like.

The ability of a corin expression control region polynucleotide sequence to activate transcription is typically assessed relative to a control construct. In one embodiment, the ability of a corin expression control region polynucleotide to activate transcription is assessed by comparing the expression of a
15 reporter gene linked to a corin expression control region polynucleotide with the expression of the identical reporter gene not linked to such a sequence. Thus, in a preferred embodiment, the expression of luciferase is compared between pRL-SV40 and pRL-SV40 in which the corin expression control region polynucleotide sequences have been inserted 5' of the luciferase gene (see Example 2, Figure 4). In other embodiments, the activity of a corin expression control region polynucleotide may be compared with that of a known promoter. Thus, the activity of a reporter gene driven by a corin
20 expression control region polynucleotide is compared to the activity of a reporter gene driven by a characterized promoter (e.g., the SV40 promoter/enhancer in pGL3-Control, Promega, Madison, WI).

The cardiac-specificity of transcription directed by the corin expression control region is assessed by comparing the transcription of a reporter gene in cardiac-derived and non-cardiac derived cells. Suitable cardiac-derived cell lines for assessing cardiac-specific transcription are AT-1 (Claycomb
25 et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2979-2984), HL-1 (Lanson et al. (1992) *Circulation* 85:1835-1841), and HL-5 (Wu et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:16900-16905). A preferred cell line is the HL-5 cell line. Any readily transfectable mammalian cell line may be used to assay corin expression control region activity in non-cardiac cells (e.g., HeLa cells, ATCC No. CCL2). In Example 3 (Fig. 5), the cardiac-specific activity of both human (hCp405LUC) and mouse (mCp642LUC) corin expression
30 control region polynucleotides is demonstrated by comparing firefly luciferase expression from vectors with and without these expression control region fragments in HL-5 and HeLa cell lines. For each assay, corin expression control region activity is normalized to co-transfected SV40 promoter activity (*i.e.*, pGL3-Control) to control for variability between the cell lines.

Once cardiac-specific transcriptional activity has been demonstrated in a corin expression
35 control region polynucleotide, deletions, mutations, rearrangements, and other sequence modifications may be constructed and assayed for cardiac-specific transcription in the assays of the invention. Such derivatives of corin expression control region polynucleotides are useful to generate more compact

promoters, to decrease background expression in non-cardiac cells, to eliminate repressive sequences, or to identify novel cardiac-specific transcriptional regulatory proteins. The human and rodent corin expression control region sequences may be compared to identify conserved transcription regulatory elements, including those that confer cardiac-specific expression.

Corin expression control region sub-fragments and derivatives may be constructed by conventional recombinant DNA methods known in the art. One such method is to generate a series of deletion derivatives within the corin expression control region sequence (Example 2). By comparing the transcriptional activity of a deletion series, the elements that contribute to or detract from cardiac-specific transcription may be localized. Based on such analyses, improved derivatives of corin expression control region polynucleotides may be designed. For example, corin expression control region elements may be combined with cardiac-specific or ubiquitous regulatory elements from heterologous promoters to increase the cardiac specificity or activity of a corin expression control region polynucleotide.

Vectors and host cells

The present invention also relates to vectors which include polynucleotides of the present invention, host cells which are genetically engineered with vectors of the invention and the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques. Such techniques are described in Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 and Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

Host cells can be genetically engineered to incorporate polynucleotides which contain the corin expression control region of the present invention as well as polynucleotides which contain the corin expression control region operably linked to genes which encode corin or other polypeptides, so as to permit expression of the product encoded by the linked polynucleotide, e.g. corin. Polynucleotides may be introduced into host cells using well known techniques of infection, transduction, transfection, transvection and transformation. The polynucleotides may be introduced alone or with other polynucleotides. Such other polynucleotides may be introduced independently, co-introduced or introduced joined to the polynucleotides of the invention.

Thus, for instance, polynucleotides of the invention may be transfected into host cells with another, separate, polynucleotide encoding a selectable marker, using standard techniques for co-transfection and selection in, for instance, mammalian cells. In this case, the polynucleotides generally will be stably incorporated into the host cell genome.

Alternatively, the polynucleotides may be joined to a vector containing a selectable marker for propagation in a host. The vector construct may be introduced into host cells by the aforementioned techniques. Generally, a plasmid vector is introduced as DNA in a precipitate, such as a calcium phosphate precipitate, or in a complex with a charged lipid. Electroporation also may be used to

Introduce polynucleotides into a host. If the vector is a virus, it may be packaged *in vitro* or introduced into a packaging cell and the packaged virus may be transduced into cells. A wide variety of techniques suitable for making polynucleotides and for introducing polynucleotides into cells in accordance with this aspect of the invention are well known and routine to those of skill in the art. Such techniques are reviewed at length in Sambrook et al. cited above, which is illustrative of the many laboratory manuals that detail these techniques. In accordance with this aspect of the invention, the vector may be, for example, a plasmid vector, a single or double-stranded phage vector, a single or double-stranded RNA or DNA viral vector. Such vectors may be introduced into cells as polynucleotides, preferably DNA, by well known techniques for introducing DNA and RNA into cells. The vectors, in the case of phage and viral vectors, also may be and preferably are introduced into cells as packaged or encapsidated virus by well known techniques for infection and transduction. Viral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case viral propagation generally will occur only in complementing host cells.

Preferred among vectors, in certain respects, are those for expression of polynucleotides and polypeptides of the present invention. Generally, such vectors comprise cis-acting control regions effective for expression in a host operatively linked to the polynucleotide to be expressed. Appropriate trans-acting factors either are supplied by the host, supplied by a complementing vector or supplied by the vector itself upon introduction into the host.

The corin expression control region polynucleotides of the invention may be inserted into the vector by any of a variety of well-known and routine techniques. In general, a DNA sequence for expression is joined to an expression vector by cleaving the DNA sequence and the expression vector with one or more restriction endonucleases and then joining the restriction fragments together using T4 DNA ligase. Procedures for restriction and ligation that can be used to this end are well known and routine to those of skill. Suitable procedures in this regard, and for constructing expression vectors using alternative techniques, which also are well known and routine to those of skill, are set forth in great detail in Sambrook et al. cited elsewhere herein.

Uses of the corin expression control region

The corin expression control region polynucleotides of the present invention are useful for specifically expressing therapeutic molecules in cardiac-derived cells. Cardiac-specific expression of therapeutic molecules may be used, for example, to treat congestive heart failure, hypertension, and cardiac hypertrophy. Accordingly, vectors comprising therapeutic polynucleotides operably linked to the corin expression control region polynucleotides of the present invention can be constructed and administered to patients to treat cardiac diseases and to develop new and improved therapeutics.

Any therapeutic polynucleotide may be operably linked to a corin expression control region polynucleotide, including but not limited to, a polynucleotide encoding corin. Typically, a corin expression control region polynucleotide is included in an expression cassette and inserted 5' of the

therapeutic polynucleotide to be expressed. Corin expression control region polynucleotides may be positioned immediately proximal to the therapeutic polynucleotide, although corin expression control region polynucleotide enhancer elements may be positioned anywhere within several kilobases of the therapeutic polynucleotide, including at the 3' end of the therapeutic polynucleotide and within introns.

5 The ability of a corin expression control region polynucleotide to confer cardiac-specific transcription from a given position may be verified by positioning the corin expression control region polynucleotide in the appropriate configuration relative to a reporter gene, and assaying for cardiac-specific reporter gene activity as described herein.

10 The corin expression control region polynucleotide may be linked directly to the polynucleotide encoding a therapeutic molecule without additional sequences. In embodiments where the corin expression control region polynucleotide does not include the corin transcription initiation elements, additional elements such as a TATA box and transcription initiation sites should be provided. These may either be the transcription initiation elements native to the therapeutic gene, or derived from a heterologous eukaryotic or viral promoter. Additionally, the level of therapeutic gene expression may be
15 increased by including enhancer and polyadenylation sequences from the therapeutic gene or from heterologous genes, so long as the cardiac-specificity of expression (as measured in the assays of the invention) is maintained.

Vectors for transfecting cardiac-derived cells *in vitro* and *in vivo*, methods of ensuring sustained expression in cardiac-derived cells *in vivo*, methods of operably linking therapeutic polynucleotides to
20 cardiac-specific promoters, and methods of targeting vectors to cardiac cells *in vitro* or *in vivo*, administration routes, and dosages for treatment of cardiac disease with therapeutic vectors may be found in Tang et al. (2002) *Methods* 28:259-266; Phillips et al. (2002) *Hypertension* 39:851-855; Prentice et al. (1997) *Cardiovas. Res.* 35:567-574; Beggah AT et al. (2002) *PNAS* 99:7160-7165; Monte et al. (2003) *J. Physiol.* 546:49-61.

25 Accordingly, corin expression control region polynucleotides of the present invention can be used for cardiac-specific expression of a variety of therapeutic polynucleotides. Therapeutic polynucleotides expressed by corin expression control region polynucleotides are either active themselves (e.g., antisense and catalytic polynucleotides) or encode a protein which would have a therapeutic benefit.

30 Expression of antisense and catalytic ribonucleotides. One type of therapeutic polynucleotide that may be expressed by the corin expression control region polynucleotides is antisense RNA or iRNA (Fire, A. (1999) *Trends. Genet.* 15:358-363; Sharp, P. (2001) *Genes Dev.* 15:485-490). In such embodiments, the corin expression control region polynucleotide is operably linked to a polynucleotide
35 which, when transcribed by cellular RNA polymerases, is capable of binding to target mRNA. The derivation of an antisense sequence, based upon a cDNA sequence encoding a target protein is described in, for example, Stein & Cohen (1988) *Cancer Res.* 48:2659-68 and van der Krol et al. (1988)

BioTechniques 6:958-76. The target protein will generally be a protein whose presence is thought to contribute to, or increase the chances of, cardiac disease, e.g. angiotension converting enzyme, angiotensin II receptor or NF-ATC (Stein et al. (1998) *Amer. Heart J.* 135:914-923; Levin et al. (1998) *New Eng. J. Med.* 339:321-328; Keating and Goa (2003) *Drugs* 63:47-70). Thus, cardiac-specific expression of the antisense molecule can preferentially reduce expression of these proteins in at-risk individuals. Successful use of cardiac-specific antisense expression has been described (Beggah AT et al. (2002) *PNAS* 99:7160-7165). Such an approach has proved successful in treating cardiac fibrosis and heart failure using cardiac-specific expression (Lee et al. (1996) *Anticancer Res.* 16:1805-11).

In addition to antisense polynucleotides, ribozymes can be designed to inhibit expression of target molecules. A ribozyme is an RNA molecule that catalytically cleaves other RNA molecules. Accordingly, corin expression control region polynucleotides of the present invention may be used to express ribozymes specifically in cardiac-derived cells by linking a polynucleotide encoding a ribozyme to a corin expression control region polynucleotide. Different kinds of ribozymes have been described, including group I ribozymes, hammerhead ribozymes, hairpin ribozymes, RNase P, and axhead ribozymes (see, e.g., Castanotto et al. (1994) *Adv. In Pharmacology* 25: 289-317 for a general review of the properties of different ribozymes). The general features of hairpin ribozymes are described, e.g., in Hampel et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:299-304; Hampel et al., European Patent Publication No. 0 360 257 (1990); U.S. Patent No. 5,254,678. Methods of preparing ribozymes are well known to those of skill in the art (see, e.g., Wong-Staal et al., WO 94/26877; Ojwang et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6340-44; Yamada et al. (1994) *Hum. Gene Ther.* 1:39-45; Leavitt et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:699-703; Leavitt et al. (1994) *Hum. Gene Ther.* 5: 1115-20; and Yamada et al. (1994) *Virology* 205:121-26).

Expression of therapeutic proteins: A wide variety of therapeutic proteins may be used to treat cardiac diseases. Accordingly, a corin expression control region polynucleotide of the present invention may be used to express polynucleotides encoding therapeutic proteins specifically in cardiac cells. Therapeutic proteins may be of prokaryotic, eukaryotic, viral, or synthetic origin. Where the therapeutic protein is not of mammalian origin, the coding sequence of the protein may be modified for maximal mammalian expression according to methods known in the art (e.g., mammalian codon usage and consensus translation initiation sites).

Therapeutic proteins may be operably linked to the corin expression control region polynucleotides to permit cardiac-specific expression and be successfully employed to treat cardiac diseases of any etiology, including (but not limited to) ischemic heart disease, hypertensive heart disease, valvular heart disease, myocarditis, Chagas cardiomyopathy and idiopathic cardiomyopathy. Such therapeutic proteins include, but are not limited to, proteins such as corin, which converts pro-atrial natriuretic peptide (pro-ANP) to ANP, ANP, which lowers blood volume and pressure by promoting

sodium secretion and vasodilation, and B-type natriuretic peptide, (Stein et al. (1998) *Amer. Heart J.* 135:914-923; Levin et al. (1998) *New Eng. J. Med.* 339:321-328; Keating and Goa (2003) *Drugs* 63:47-70), as well as negative dominant forms of such genes, i.e. corin (Wu et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:16900-16905).

5

Identification of modulators of corin expression

The corin expression control region polynucleotides of the present invention can be used to identify novel modulators which are useful in the control of cardiac-related disease in mammals, especially in humans, examples being cardiovascular hypertension, congestive heart failure, or
10 cardiomyopathy. Such modulators are useful in treating a host with abnormal levels of corin gene expression. The corin gene modulators may also be used to treat diseases and conditions affected by the level of corin gene expression, such as, but not limited to, mechanic stretch, blood volume, salt excretion, urinary output, and vasomotor tone. The modulators are also useful in mimicking human diseases or conditions in animals relating to the level of expression of selected polypeptides.

15 Specifically, agents that bind to and modulate such expression can be identified by their ability to cause a change in the transcriptional level of a reporter gene, e.g. luciferase, which has been operably linked to a corin expression control region polynucleotide, as previously described. (See Example 2).

Agents that are assayed in the above method can be randomly selected or rationally selected
20 or designed. As used herein, an agent is said to be randomly selected when the agent is chosen randomly without considering any the specific sequences. An example of randomly selected agents is the use of a chemical library or a growth broth of an organism or plant extract (Bunin, et al. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:10997-10998 and referenced combined therein).

As used herein, an agent is said to be rationally selected or designed when the agent is chosen
25 on a nonrandom basis that takes into account the sequence of the target site and/or its conformation in connection with the agent's action.

Gene Therapy

The present invention provides corin expression control region polynucleotides which can be
30 transfected into cells for therapeutic purposes *in vitro* and *in vivo*. These nucleic acids can be inserted into any of a number of well-known vectors for the transfection of target cells and organisms as described below. The nucleic acids are transfected into cells, *ex vivo* or *in vivo*, through the interaction of the vector and the target cell. Typically, the operable linkage of a corin expression control region polynucleotide and a second, therapeutically useful, polynucleotide elicits cardiac-specific expression of
35 the second polynucleotide. The compositions are administered to a patient in an amount sufficient to elicit a therapeutic response in the patient. An amount adequate to accomplish this is defined as "therapeutically effective dose or amount."

Such gene therapy procedures have been used to correct acquired and inherited genetic defects, cancers, and viral infection in a number of contexts. The ability to express therapeutically useful artificial genes in humans facilitates the prevention and/or cure of many important human diseases, including many diseases that are not amenable to treatment by other therapies (for a review of gene therapy procedures, see Anderson (1992) *Science* 256:808-13; Nabel & Feigner, *TIBTECH* (1993), Vol. 11, pp. 211-17; Mitani & Caskey, *TIBTECH* (1993), Vol. 11, pp. 182-86; Mulligan, *Science* (1993), Vol. 260, pp. 926-32; Dillon, *TIBTECH* (1993), Vol. 11, pp. 187-75; Miller, *Nature* (1992), Vol. 357, pp. 455-60; Van Brunt, *Biotechnology* (1998), Vol. 6, pp. 1149-54; Vigne, *Restorative Neurol. Neurosci.* (1995), Vol. 8, pp. 35-36; Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* (1995), Vol. 51, pp. 31-44; Haddada et al., in *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Doerfler & Böhm eds., 1995); and Yu et al., *Gene Therapy* (1994), Vol. 1, pp. 13-26).

Delivery of the gene or genetic material into the cell is the first step in gene therapy-based disease treatment. A large number of delivery methods are well known to those of skill in the art. Preferably, the nucleic acids are administered for *in vivo* or *ex vivo* gene therapy uses. Non-viral vector delivery systems include DNA plasmids, naked nucleic acid, and nucleic acid complexed with a delivery vehicle such as a liposome. Viral vector delivery systems include DNA and RNA viruses, which have either episomal or integrated genomes after delivery to the cell.

Methods of non-viral delivery of nucleic acids include lipofection, microinjection, biolistics, virosomes, liposomes, immunoliposomes, polycation or lipid:nucleic acid conjugates, naked DNA, artificial virions, and agent-enhanced uptake of DNA. Lipofection is described in, e.g., U.S. Patent Nos. 5,049,386, 4,946,787; and 4,897,355, and lipofection reagents are sold commercially (e.g., Transfectam™ and Lipofectin™). Cationic and neutral lipids that are suitable for efficient receptor-recognition lipofection of polynucleotides include those of Feigner, WO 91/17424 and WO 91/16024. Delivery can be to cells (*ex vivo* administration) or target tissues (*in vivo* administration).

The preparation of lipid:nucleic acid complexes, including targeted liposomes such as immunolipid complexes, is well known to one of skill in the art (see, e.g., Crystal, *Science* (1995), Vol. 270, pp. 404-10; Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* (1995), Vol. 2, pp. 291-97; Behr et al., *Bioconjugate Chem.* (1994), Vol. 5, pp. 382-89; Remy et al., *Bioconjugate Chem.* (1994), Vol. 5, pp. 647-54; Gao et al., *Gene Therapy* (1995), Vol. 2, pp. 710-22; Ahmad et al., *Cancer Res.* (1992), Vol. 52, pp. 4817-20; U.S. Patent Nos. 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028, and 4,946,787).

The use of RNA or DNA viral based systems for the delivery of nucleic acids take advantage of highly evolved processes for targeting a virus to specific cells in the body and trafficking the viral payload to the nucleus. Viral vectors can be administered directly to patients (*in vivo*) or they can be used to treat cells *in vitro* and the modified cells are administered to patients (*ex vivo*). Conventional viral based systems for the delivery of nucleic acids could include retroviral, lentivirus, adenoviral, adeno-associated and herpes simplex virus vectors for gene transfer. Viral vectors are currently the

most efficient and versatile method of gene transfer in target cells and tissues. Integration in the host genome is possible with the retrovirus, lentivirus, and adeno-associated virus gene transfer methods, often resulting in long term expression of the inserted transgene. Additionally, high transduction efficiencies have been observed in many different cell types and target tissues. In particular, at least six viral vector approaches are currently available for gene transfer in clinical trials, with retroviral vectors by far the most frequently used system. All of these viral vectors utilize approaches that involve complementation of defective vectors by genes inserted into helper cell lines to generate the transducing agent.

The tropism of a retrovirus can be altered by incorporating foreign envelope proteins, expanding the potential target population of target cells. Lentiviral vectors are retroviral vectors that are able to transduce or infect non-dividing cells and typically produce high viral titers. Selection of a retroviral gene transfer system would therefore depend on the target tissue. Retroviral vectors are comprised of cis-acting long terminal repeats with packaging capacity for up to 6-10 kbp of foreign sequence. The minimum cis-acting LTRs are sufficient for replication and packaging of the vectors, which are then used to integrate the therapeutic gene into the target cell to provide permanent transgene expression. Widely used retroviral vectors include those based upon murine leukemia virus (MuLV), gibbon ape leukemia virus (GaLV), simian immunodeficiency virus (SIV), human immunodeficiency virus (HIV), and combinations thereof (see, e.g., Buchsner et al., *J. Virol.* (1992), Vol. 66, pp. 2731-38; Japhann et al., *J. Virol.* (1992), Vol. 66, pp. 1635-40; Sommerfelt et al., *Virology* (1990), Vol. 176, pp. 58-59; Wilson et al., *J. Virol.* (1989), Vol. 63, pp. 2374-78; Miller et al., *J. Virol.* (1991), Vol. 65, pp. 2220-24; PCT/US94/05700).

pLASN and MFG-S are examples are retroviral vectors that have been used in clinical trials (Dunbar et al., *Blood* (1995), Vol. 85, pp. 3048-57; Kohn et al., *Nat. Med.* (1995), Vol. 1, pp. 1017-23; Malech et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997), Vol. 94, pp. 12133-38). PA317/pLASN was the first therapeutic vector used in a gene therapy trial (Blaese et al., *Science* (1995), Vol. 270, pp. 475-80). Transduction efficiencies of 50% or greater have been observed for MFG-S packaged vectors (Ellem et al., *Immunol. Immunother.* (1997), Vol. 44, pp. 10-20; Dranoff et al., *Hum. Gene Ther.* (1997), Vol. 1, pp. 111-23).

In applications where transient expression of the nucleic acid is preferred, adenoviral based systems are typically used. Adenoviral based vectors are capable of very high transduction efficiency in many cell types and do not require cell division. With such vectors, high titer and levels of expression have been obtained. This vector can be produced in large quantities in a relatively simple system. Adeno-associated virus ("AAV") vectors are also used to transduce cells with target nucleic acids, e.g., in the *in vitro* production of nucleic acids and peptides, and for *in vivo* and *ex vivo* gene therapy procedures (see, e.g., West et al., *Virology* (1987), Vol. 160, pp. 38-47; U.S. Patent No. 4,797,368; WO 93/24641; Kotin, *Hum. Gene Ther.* (1994), Vol. 5, pp. 793-801; Muzyczka, *J. Clin. Invest.* (1994), Vol. 94, pp. 1351). Construction of recombinant AAV vectors are described in a number of publications,

including U.S. Patent No. 5,173,414; Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* (1985), Vol. 5, pp. 3251-80; Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* (1984), Vol. 4, pp. 2072-81; Hermonat & Muzyczka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984), Vol. 81, pp. 6486-70; and Samulski *et al.*, *J. Virol.* (1989), Vol. 63, pp. 3822-28.

Recombinant adeno-associated virus vectors (rAAV) are a promising alternative gene delivery system based on the defective and nonpathogenic parvovirus adeno-associated type 2 virus. All vectors are derived from a plasmid that retains only the AAV 145 bp inverted terminal repeats flanking the transgene expression cassette. Efficient gene transfer and stable transgene delivery due to integration into the genomes of the transduced cell are key features for this vector system (Wagner *et al.*, *Lancet* (1998), Vol. 351, pp. 1702-03; Kearns *et al.*, *Gene Ther.* (1998), Vol. 9, pp. 748-55).

Replication-deficient recombinant adenoviral vectors (Ad) are predominantly used in transient expression gene therapy, because they can be produced at high titer and they readily infect a number of different cell types. Most adenovirus vectors are engineered such that a transgene replaces the Ad E1a, E1b, and E3 genes; subsequently the replication defective vector is propagated in human 293 cells that supply deleted gene function *in trans*. Ad vectors can transduce multiple types of tissues *in vivo*, including nondividing, differentiated cells such as those found in the liver, kidney and muscle system tissues. Conventional Ad vectors have a large carrying capacity. An example of the use of an Ad vector in a clinical trial involved polynucleotide therapy for antitumor immunization with intramuscular injection (Sterman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* (1998), Vol. 9, pp. 1083-92). Additional examples of the use of adenovirus vectors for gene transfer in clinical trials include Rosenecker *et al.*, *Infection* (1998), Vol. 24, pp. 5-10; Welsh *et al.*, *Hum. Gene Ther.* (1995), Vol. 2, pp. 205-18; Alvarez *et al.*, *Hum. Gene Ther.* (1997), Vol. 5, pp. 597-613; Topf *et al.*, *Gene Ther.* (1998), Vol. 5, pp. 507-13; Sterman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* (1998), Vol. 9, pp. 1083-89.

In many gene therapy applications, it is desirable that the gene therapy vector be delivered with a high degree of specificity to a particular tissue type. A viral vector is typically modified to have specificity for a given cell type by expressing a ligand as a fusion protein with a viral coat protein on the outer surface of the virus. The ligand is chosen to have affinity for a receptor known to be present on the cell type of interest. For example, Han *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995), Vol. 92, pp. 9747-51, reported that Moloney murine leukemia virus can be modified to express human heregulin fused to gp70, and the recombinant virus infects certain human breast cancer cells expressing human epidermal growth factor receptor. This principle can be extended to other pairs of viruses expressing a ligand fusion protein and target cell expressing a receptor. For example, filamentous phage can be engineered to display antibody fragments (*e.g.*, Fab or Fv) having specific binding affinity for virtually any chosen cellular receptor. Although the above description applies primarily to viral vectors, the same principles can be applied to nonviral vectors. Such vectors can be engineered to contain specific uptake sequences thought to favor uptake by specific target cells.

Pharmaceutical Compositions and Administration

The present invention also relates to pharmaceutical compositions which may comprise the corin expression control region, or a vector comprising the expression control region, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier. In one embodiment of the present invention, the

5 pharmaceutically acceptable carrier is pharmaceutically inert.

Gene therapy vectors can be delivered *in vivo* by administration to an individual patient, typically by systemic administration (e.g., intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subdermal, or intracranial infusion) or topical application, as described below. Alternatively, vectors can be delivered to cells *ex vivo*, such as cells explanted from an individual patient (e.g., lymphocytes, bone marrow aspirates,

10 tissue biopsy) or universal donor hematopoietic stem cells, followed by reimplantation of the cells into a patient, usually after selection for cells which have incorporated the vector.

Ex vivo cell transfection for diagnostics, research, or for gene therapy (e.g., via re-infusion of the transfected cells into the host organism) is well known to those of skill in the art. In a preferred embodiment, cells are isolated from the subject organism, transfected with a nucleic acid (gene or

15 cDNA), and re-infused back into the subject organism (e.g., patient). Various cell types suitable for *ex vivo* transfection are well known to those of skill in the art (see, e.g., Freshney *et al.*, *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3rd ed., 1994)) and the references cited therein for a discussion of how to isolate and culture cells from patients).

Vectors (e.g., retroviruses, adenoviruses, liposomes, etc.) containing therapeutic nucleic acids

20 can be also administered directly to the organism for transduction of cells *in vivo*. Alternatively, naked DNA can be administered. Administration is by any of the routes normally used for introducing a molecule into ultimate contact with blood or tissue cells. Suitable methods of administering such nucleic acids are available and well known to those of skill in the art, and, although more than one route can be used to administer a particular composition, a particular route can often provide a more immediate and

25 more effective reaction than another route.

Pharmaceutically acceptable carriers are determined in part by the particular composition being administered (e.g., nucleic acid, protein, modulatory compounds or transduced cell), as well as by the particular method used to administer the composition. Accordingly, there are a wide variety of suitable formulations of pharmaceutical compositions of the present invention (see, e.g., *Remington's*

30 *Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., 1989). Administration can be in any convenient manner, e.g., by injection, oral administration, inhalation, or transdermal application.

Formulations suitable for oral administration can consist of: (a) liquid solutions, such as an effective amount of the packaged nucleic acid suspended in diluents, such as water, saline or PEG 400; (b) capsules, sachets or tablets, each containing a predetermined amount of the active ingredient, as

35 liquids, solids, granules or gelatin; (c) suspensions in an appropriate liquid; and (d) suitable emulsions. Tablet forms can include one or more of lactose, sucrose, mannitol, sorbitol, calcium phosphates, corn starch, potato starch, microcrystalline cellulose, gelatin, colloidal silicon dioxide, talc, magnesium

stearate, stearic acid, and other excipients, colorants, fillers, binders, diluents, buffering agents, moistening agents, preservatives, flavoring agents, dyes, disintegrating agents, and pharmaceutically compatible carriers. Lozenge forms can comprise the active ingredient in a flavor, e.g., sucrose, as well as pastilles comprising the active ingredient in an inert base, such as gelatin and glycerin or sucrose and acacia emulsions, gels, and the like containing, in addition to the active ingredient, carriers known in the art.

The compound of choice, alone or in combination with other suitable components, can be made into aerosol formulations (i.e., they can be "nebulized") to be administered via inhalation. Aerosol formulations can be placed into pressurized acceptable propellants, such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen, and the like.

Formulations suitable for parenteral administration, such as, for example, by intraarticular (in the joints), intravenous, intramuscular, intradermal, intraperitoneal, and subcutaneous routes, include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain antioxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives. In the practice of this invention, compositions can be administered, for example, by intravenous infusion, orally, topically, intraperitoneally, intravesically or intrathecally. Parenteral administration and intravenous administration are the preferred methods of administration. The formulations of compositions can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampules and vials.

Injection solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described. Cells transduced by nucleic acids for *ex vivo* therapy can also be administered intravenously or parenterally as described above.

The dose administered to a patient, in the context of the present invention should be sufficient to effect a beneficial therapeutic response in the patient over time. The dose will be determined by the efficacy of the particular vector employed and the condition of the patient, as well as the body weight or surface area of the patient to be treated. The size of the dose also will be determined by the existence, nature, and extent of any adverse side-effects that accompany the administration of a particular vector, or transduced cell type in a particular patient.

In determining the effective amount of the vector to be administered, the physician evaluates circulating plasma levels of the vector, vector toxicities, progression of the disease, and the production of anti-vector antibodies. In general, the dose equivalent of a naked nucleic acid from a vector is from about 1 μ g to 100 μ g for a typical 70 kilogram patient, and doses of vectors which include a retroviral particle are calculated to yield an equivalent amount of therapeutic nucleic acid.

For administration, compounds and transduced cells of the present invention can be administered at a rate determined by the LD-50 of the inhibitor, vector, or transduced cell type, and the side-effects of the inhibitor, vector or cell type at various concentrations, as applied to the mass and

overall health of the patient. Administration can be accomplished via single or divided doses.

Kits

The present invention further relates to pharmaceutical packs and kits comprising one or more
5 containers filled with one or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the
invention. Associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental
agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, reflecting
approval by the agency of the manufacture, use or sale of the product for human administration.

Transgenic Mice

The corin expression control region polynucleotides of the present invention may also be used
to produce a transgenic mammal, preferably a mouse. Such a transgenic organism is useful, for
example, for identifying and/or characterizing agents that modulate expression and/or activity of such a
polynucleotide. Transgenic animals are also useful as models for cardiac disease states.

15 The invention disclosed herein also relates to a non-human transgenic animal comprising within its
genome one or more copies of the polynucleotides of the invention. The transgenic animals of the
invention may contain within their genome multiple copies of the polynucleotides.

In a preferred embodiment, the transgenic animal comprises within its genome an expression
control region of the human corin gene. A variety of non-human transgenic organisms are
20 encompassed by the invention, including e.g., drosophila, C.elegans, zebrafish and yeast. The
transgenic animal of the invention is preferably a mammal, e.g., a cow, goat, sheep, rabbit, non-human
primate, or rat, most preferably a mouse.

Methods of producing transgenic animals are well within the skill of those in the art, and
include, e.g., homologous recombination, mutagenesis (e.g., ENU, Rathkolb et al.(2000) *Exp. Physiol.*,
25 85:635-644), and the tetracycline-regulated gene expression system (e.g., U.S. Pat. No. 6,242,667),
and will not be described in detail herein. (See e.g., Wu et al, *Methods in Gene Biotechnology*, CRC
1997, pp.339-366; Jacenko, O., Strategies in Generating Transgenic Animals, in *Recombinant Gene
Expression Protocols*, Vol. 62 of *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 1997, pp 399-424]

The present invention also relates to a non-human knockout animal whose genome contains
30 an expression control region of the human corin gene which is operationally linked to a reporter
sequence and wherein said control region is effective to initiate, terminate, or regulate the transcription
of the reporter sequence.

Functional disruption of the reporter sequence operatively linked with the control sequence can
be accomplished in any effective way, including, e.g., introduction of a stop codon into any part of the
35 coding sequence such that the resulting polypeptide is biologically inactive (e.g., because it lacks a
catalytic domain, a ligand binding domain, etc.), introduction of a mutation into a promoter or other
regulatory sequence that is effective to turn it off, or reduce transcription of the reporter sequence of an

exogenous sequence into the reporter sequence which inactivates it. Examples of transgenic animals having functionally disrupted genes are well known, e.g., as described in U.S. Pat. Nos. 6,239,326, 6,225,525, 6,207,878.

5

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding descriptions, utilize the present invention to its fullest extent. All examples were carried out using standard techniques, which are well known in the art, except where otherwise described in detail. Routine molecular biology techniques of the following examples can be carried out as described in standard laboratory manuals, such as Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

10

The following preferred specific embodiments are, therefore, to be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure in any way whatsoever. The entire disclosure of all applications, patents, and publications cited above are hereby incorporated by reference.

15

Example 1: Isolation and characterization of the human and mouse *corin* genes
including the 5'-flanking regions

20

To clone the human and murine *corin* genes and their 5'-flanking regions, specific oligonucleotides corresponding to the 5'- and 3'-ends of *corin* cDNA sequences were synthesized. These oligonucleotide primers were tested for amplifying specific products in PCR-based reactions using human or murine genomic DNA. PCR reactions were performed using PCR Reagent System (Life Technologies Inc.) with 30 cycles of amplification (1-min denaturation at 94°C, 1-min annealing at 50°C, and 1-min extension at 72°C) and a final 7-min extension at 72°C. The pairs of primers that successfully amplified specific PCR products were then used in a PCR-based screen to identify BAC clones containing the human or murine *corin* gene and/or their expression control regions. DNA isolation from BAC clones was carried out according to the manufacturer's instruction (Incyte Genomics, Palo Alto, CA). The identified positive bacterial artificial chromosomes (BAC) clones were further confirmed by Southern analysis using ³²P-labeled human and murine *corin* cDNA probes. The BAC clones were either directly sequenced by a shotgun strategy or subcloned into pUC118 (PanVera/Takara, Madison, WI) for sequencing. The assembly of the shotgun sequences was performed using the Staden software package (MRC Laboratory of Molecular Biology, Bonfield et al. (1995) *Nucleic Acid Res.* 23:4992-4999).

30

35

Four BAC clones, two each containing the human and murine *corin* genes, were obtained by PCR-based screening. Three BAC clones were sequenced by a shotgun strategy using dye terminator

chemistry. Combination of the shotgun data with the publicly available trace file information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Traces/trace.cgi>, <http://trace.ensembl.org>), contiguous sequences of 340 kb containing the human corin gene, and 5 contigs for the murine corin gene were assembled. The order of 5 contigs was confirmed by the existence of several mated reading pairs in respective neighboring contigs. The distance of those allowed us to determine the gap size to be less than 500 bp, because the insert size of the public shotgun libraries was well defined. The structures of the human and murine corin genes were then analyzed. The 340-kb human genomic sequence, however, did not contain the 5'-flanking region. An additional 4165 bp *Hind* III-*Eco*R I fragment was isolated from BAC 26540, which included the first 3919 bp of the 5'-flanking region, all of exon 1 and part of Intron 1 (submitted to the GenBank™/EBI data Bank with the accession number AF521006).

The corin expression control region polynucleotides (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 and SEQ ID NO: 6) were all derived from the 4165 bp *Hind* III-*Eco*R I fragment (Figure 8; SEQ ID NO: 2) isolated from BAC26540, using a PCR-based method, or restriction enzyme digestion, or a combination of both. For example, the 4023 bp corin expression control region polynucleotide (SEQ ID NO: 6) described herein was amplified from the 4165 bp *Hind* III-*Eco*R I fragment or human genomic DNA using the primers F1 (5'-AAGCTTCATGAGGGCAGGAG-3') (SEQ ID NO: 7) and R1 (5'-GAGCTCGCTTATTCTTCTGTCCACTT-3') (SEQ ID NO: 8). The 1283 bp corin expression control region polynucleotide (SEQ ID NO: 5) described herein was amplified from the 4165 bp *Hind* III-*Eco*R I fragment or human genomic DNA using the primers F2 (5'-AAGCTTATAAAAATAATAGCTTCTTC-3') (SEQ ID NO: 9) and R1. The 391 bp corin expression control region polynucleotide (SEQ ID NO: 4) described herein was amplified from the 4165 bp *Hind* III-*Eco*R I fragment or human genomic DNA using the primers F3 (5'-AAGCTTAGTAACTCTTTTGCTCCCAA-3') (SEQ ID NO: 10) and R1. Any mammalian tissue such as leukocytes from which DNA may be easily extracted is a suitable source of genomic DNA for the isolation of mammalian corin polynucleotides.

Example 2: Promoter Activity of the 5'-flanking regions

The promoter activity of the 5'-flanking regions of the corin genes was examined by preparing reporter constructs in which serially truncated fragments of the 5'-flanking sequences of human or murine corin genes were linked to a promoterless luciferase gene (see Figure 4A). The human corin promoter reporter constructs, hCp1297LUC (1283 bp corin expression control region (SEQ ID NO:) linked to the firefly luciferase gene) and hCp405LUC (391 bp corin expression control region (SEQ ID NO:) linked to the firefly luciferase gene), were generated in two steps: first, PCR-based cloning of the 5'-flanking region of human corin gene from -1297 or -405 to -15 (relative to the translation initiation codon ATG) using primers that bear restriction sites of *Sac* I and *Hind* III,

respectively; and, second, insertion of the respective PCR products into the *Sac* I and *Hind* III sites of the pGL3-basic vector (Promega, Madison, WI).

Similarly, the murine corin promoter constructs, mCp1183LUC, mCp809LUC and mCp648LUC, were also made by the PCR-based cloning approach described above. Plasmids for these constructs were prepared using an EndoFree Plasmid Max kit (Qiagen, Valencia, CA). Transfection of HL-5 cells (Claycomb et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 95:2979-2984) was carried out using a lipofectin-based method according to the manufacturer's instruction (Life Technologies). Briefly, 10 ug DNA of each of the corin reporter constructs plus 0.1 ug of pRL-SV40 (Promega, Madison, WI) was mixed with 20 ug of lipofectin in 1 ml of OPTI-MEM I reduced-serum medium. The mixture was incubated for 30 min at room temperature, and was then added to ~ 70% confluent HL-5 cultured in one well of 6-well plates. After incubation for 6 h, the medium was replaced with fresh Ex-Cell 320 culture medium; and 30 h later, the transfected cells were harvested and assayed for *firefly* and *Renilla* luciferase activities. A dual luciferase activity assay was performed according to the manufacturer's instruction (Promega). Briefly, cell extracts were prepared by lysing the transfected cells with 250 ul of freshly diluted passive lysis buffer (Promega). The lysates were frozen and thawed once before centrifugation at 13,000 rpm for 5 min to pellet the cell debris. The supernatants were transferred to a fresh tube, and a 20-ul aliquot of the supernatants was assayed by a Dual-Luciferase Reporter Assay system. The luminescence of the samples was monitored by a Microplate Luminometer LB96 V (EG&G Berthold), which measured light production (relative light units) for a duration of 10 s. Each of the cell extracts was assayed in triplicate. Each transfection experiment for each construct was performed in triplicate. *Firefly* luciferase activity was normalized to the activity of *Renilla* luciferase.

As shown in Figure 4B, human corin reporter constructs hCP1297LUC and hCP405LUC promoted luciferase activities that were significantly higher than background in pGL3-basic transfected cells. Similarly, murine receptor constructs mCp1183LUC, mCp809LUC, and mCp648LUC promoted significant luciferase activities comparable to those of the human constructs. These data suggest that the *cis* sequence responsible for most of the promoter activity is located between nucleotides -405 to -15 or nucleotides -646 to -77 in the human and murine corin genes, respectively.

Example 3: Demonstration of Cardiac-specific Expression

To determine whether the constructs mediate cardiac-specific expression, HeLa cells (ATCC No. CCL2), which do not express corin mRNA and protein were transfected with the constructs described above. In contrast to their high activities in HL-5 cells, constructs hCp405LUC and mCp648LUC had only minimal promoter activity in HeLa cells (Fig. 5). As a control, simultaneously transfected pRL-SV40 promoted higher levels of *Renilla* luciferase activity in HeLa than in HL-5 cells, indicating that HeLa cells were as readily transfected as HL-5 cells in these experiments. These results

indicate that the 5'-flanking sequences from -405 to -15 of the human or -646 to -77 of the murine corin genes contain elements that are sufficient for specific expression in cultured cardiomyocytes.

5

Example 4: Proximal GATA elements that bind to GATA-4 are required for optimal function of the corin promoters.

The 5'-flanking regions from nucleotides -405 to -15 in human or from nucleotides -646 to -77
10 in mouse were sufficient to promote high levels of gene expression in cultured cardiomyocytes but not in HeLa cells. This suggests that these regions contain regulatory elements responsible for the cardiomyocyte-specific expression. Inspection of these regions revealed a conserved GATA consensus sequence (designated as the proximal GATA sequences).

To determine whether the proximal GATA sequences indeed bind to GATA proteins, we
15 prepared nuclear extracts from exponentially growing HL-5 cells as described (Schreiber E. et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:6419) and performed a competition electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using a well-characterized consensus GATA oligonucleotide probe (Redondo, J.M. et al. (1990) *Science* 247(4947), 1225-9) and probes encompassing each of the proximal GATA sequences (Figure 6A). The double-stranded oligonucleotide probes containing two consensus GATA sequences or
20 mutated GATA sequences (GATA to CTTA) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. The probes (see Figure 6A) encompassing human or murine corin GATA (SEQ ID NOS: 11 and 13, respectively), or mutated human and murine corin GATA (GATA to CTTA) (SEQ ID NOS: 12 and 14, respectively), sequences were synthesized and HPLC-purified. The oligonucleotide probes were 5'-end-labeled with T4 polynucleotide kinase (Life Technologies) using [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol,
25 Amersham Pharmacia Biotech). Gel mobility shift assays were performed as described previously (Pan, J. & McEver R.P. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:22600-22608). As expected, the labeled consensus GATA probe (SEQ ID NO: 15) formed a sequence-specific DNA-protein complex when incubated with nuclear extracts of HL-5 cells (Fig. 6B). The formation of this complex was prevented by addition of a 100-fold excess of the unlabeled probe but not of an unrelated GAS element. The complex formation was
30 dependent on the intact GATA sequence, because mutations in the GATA sequence abolished the formation of the complex. Furthermore, the complex was not detected in the presence of a 100-fold excess of the unlabeled probe containing either the human or murine proximal GATA sequences. In contrast, a 100-fold excess of the unlabeled probes encompassing the mutant proximal GATA sequences (SEQ ID NOS: 12 and 14) had minimal effect on the complex formation. These data indicate
35 that the corin proximal GATA sequences and the consensus GATA probe bind to a common GATA protein(s).

To determine which GATA protein(s) was involved in the complex, we performed EMSA with the

labeled consensus GATA probe in the presence of antibodies against members of the GATA family. Antibodies against mouse GATA-1 (SC-1234x), GATA-3 (SC-266x), GATA-4 (SC-12237x) and GATA-6 (SC-7244x) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). As shown in Fig. 6C, an antibody against GATA-4 markedly inhibited the complex formation, whereas antibodies against GATA-1, -3 and -6 had little effect. To directly demonstrate the binding of GATA-4 to the proximal GATA sequence, we used the labeled human proximal GATA probe in the absence or presence of the same antibody against GATA-4. As shown in Fig. 6D, the antibody against GATA-4 completely inhibited the formation of a DNA-protein complex with a similar mobility to that of the complex formed with the consensus GATA probe. These data indicate that GATA-4 bound to the proximal GATA sequences, suggesting that the binding of GATA-4 to the proximal GATA sequences may contribute to the gene expression of corin in cardiac myocytes.

To corroborate whether the proximal GATA elements are actually required for the promoter activity, we mutated the wild-type sequence AGATAA to ACTTAA in the human or murine constructs that promoted the highest promoter activity (Figure 7). The mutant constructs, hCp405mutGATA and mCp646mutGATA, were constructed by an overlap PCR protocol (Ho S.N. et al., (1989) *Gene (Amst)* 77:51-59). Briefly, two separate PCR products, one for each half of the hybrid product, were generated with either an antisense or sense mutated GATA oligonucleotide and one outside primer. The two products were purified and mixed. A second PCR was then performed using the two outside primers. The PCR product was digested with *Sac* I and *Hind* III, and ligated into *Sac* I- and *Hind* III-digested pGL3-basic vector. All constructs were confirmed by restriction mapping and DNA sequencing. The mutations in the GATA element were the same as those made in the mutant GATA probes used in the EMSAs. When transfected into HL-5, the human and murine mutant constructs had 10% or 42% of promoter activities as compared to their respective wild type sequences. These results show that the proximal GATA elements are required for constitutive expression of the human or murine corin genes in cultured cardiomyocytes.

The preceding examples can be repeated with similar success by substituting the generically or specifically described reactants and/or operating conditions of this invention for those used in the preceding examples.

While the invention has been illustrated with respect to novel expression control regions for the human or mouse corin gene, it is apparent that variations and modifications of the invention can be made without departing from the spirit or scope of the invention.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated polynucleotide comprising a mammalian corin expression control region, wherein the control region modulates the transcription of a heterologous polynucleotide to which it is operably linked.

2. The polynucleotide of Claim 1, wherein the control region modulates transcription of a mammalian corin gene.

3. The polynucleotide of Claim 1, wherein the transcription occurs in cardiac tissue.

4. The polynucleotide of Claim 1, wherein the control region comprises a transcription regulation element, selected from the group consisting of GATA, Tbx-5, NKx2.5, or NF-AT binding sites.

5. The polynucleotide of Claim 1, wherein the control region binds to transcription regulatory proteins, wherein the proteins are selected from the group consisting of GATA-4, Tbx-5, Nkx2.5, Krppel-like factor, or NF-AT transcription factor.

6. The polynucleotide of Claim 1, wherein the mammal is a human.

7. The polynucleotide of Claim 6, wherein the polynucleotide has the sequence set forth in SEQ ID NO: 4.

8. The polynucleotide of Claim 6, wherein the polynucleotide has the sequence set forth in SEQ ID NO: 5.

9. The polynucleotide of Claim 6, wherein the polynucleotide has the sequence set forth in SEQ ID NO: 6.

10. A fragment or variant of the polynucleotide of Claim 1, wherein the fragment or variant is capable of transcribing the heterologous polynucleotide to which it is operably linked.

11. The fragment or variant of Claim 10, wherein the fragment or variant has a sequence which is at least 70% identical to SEQ ID NO: 4.

12. The fragment or variant of Claim 10, wherein the fragment or variant has a sequence which is at least 70% identical to SEQ ID NO: 5.

13. The fragment or variant of Claim 10, wherein the fragment or variant has a sequence which is at least 70% identical to SEQ ID NO: 6.

14. A vector comprising the corin expression control region of Claim 1.

15. A host cell comprising the vector of Claim 14.

16. A method of producing a polypeptide comprising expressing from the host cell of Claim 15 a polypeptide encoded by a heterologous polynucleotide operably linked to the corin expression control region.

17. A method of producing a polynucleotide comprising expressing from the host cell of Claim 15 an antisense molecule encoded by a heterologous polynucleotide operably linked to the corin expression control region.

18. A pharmaceutical composition comprising the vector of Claim 14 in a pharmaceutically acceptable carrier.

19. A pharmaceutical composition comprising the cell of Claim 15 in a pharmaceutically acceptable carrier.

20. A method of identifying an agent which modulates the expression of a human corin gene in a cell, wherein the method comprises:

- (a) producing a recombinant vector in which an isolated polynucleotide comprising a mammalian corin expression control region is operably linked to a reporter gene;
- (b) transfecting the cell with the recombinant vector;
- (c) treating the cell with the agent;
- (d) measuring the level of expression of the reporter sequence in the treated cell; and
- (e) comparing the level of expression of the reporter sequence in the presence of the agent to the level of expression in an transfected control cell which has not been treated

21. The method of Claim 20, wherein the cell is a cardiac myocyte cell.

22. A method for modulating the expression of a gene in a human subject, the method comprising:

- (a) producing a recombinant vector in which an isolated polynucleotide comprising a mammalian corin expression control region is operably linked to a heterologous polynucleotide;

(b) administering the vector in a therapeutically effective amount to the subject.

23. The method of Claim 22, wherein the heterologous polynucleotide encodes a therapeutic protein such as corin, ANP, B-type natriuretic peptide, phospholamban, ACE, or negative
5 dominant forms of these genes.

24. The method of Claim 23, wherein the heterologous polynucleotide encodes corin.

25. The method of Claim 22, wherein the heterologous polynucleotide encodes a
10 therapeutic polynucleotide such as an antisense RNA molecule or a catalytic RNA molecule.

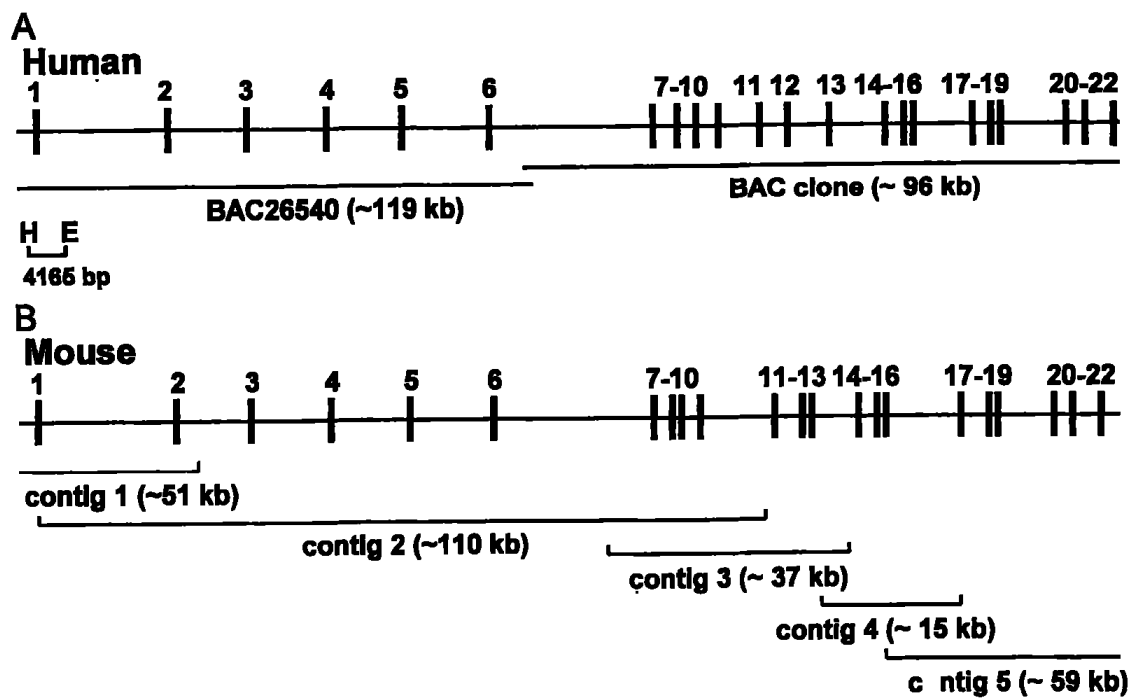
26. The method of Claim 22, wherein the control region is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 6.

15 27. A method for treating congestive heart failure, hypertension or myocardial infarction in a human subject, the method comprising administering a therapeutically effective amount of an isolated polynucleotide comprising a mammalian corin expression control region, operably linked to a gene selected from the group consisting of corin, ANP, B-type natriuretic peptide, phospholamban, ACE, or negative dominant forms of these genes, to the subject.

20

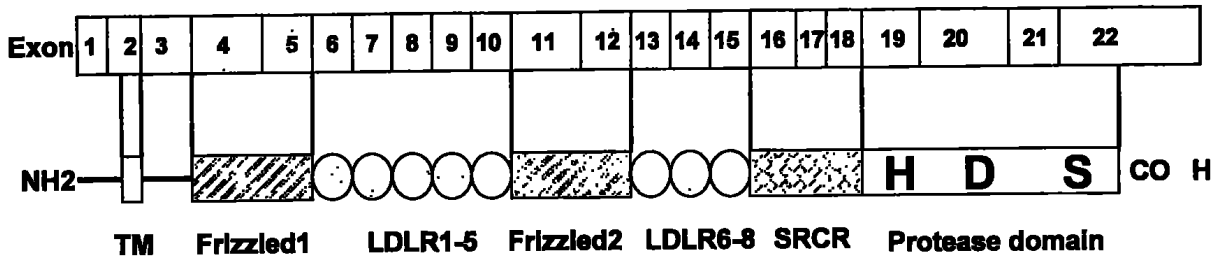
28. The method of Claim 27, wherein the gene is corin.

Figure 1



34

Figure 2



2/14

FIGURE 3- continued

NF-AT

-949 TTTATTAAATAACCTCATGAGTAATTTTCAAATTTCCATTAAGATCTTGATTGAAATTG h
 |
 -1232 CT-ACAGTATAACCT--TGAATAATTATTGAAATTT---TGAAAATTTTGATTAAAAATG m
 |
 -889 GATG-AAAAATCATTTCTAAGAAAA-----ACCCAATGAAGTGTTTT--- h
 |
 -1178 CATTTAAAACTCACGTTTAAGAAAACCTTAAATTTTTGTATCCTTGCGCGTTTTTTTTTTT m
 |
 -847 C--TTTGCCACA----TTTGACAATTGCCCTGGACTTGGTAAAGTAATCATTACTGTGTT h
 |
 -1118 CAATTTTCGATAAATATTTAAGAATTGTCTTGGGCTTC--AATGCAACCTTTGCTTTG-- m
 |

NF-AT

-793 GAGTACCTCCAGTGCCCTCCTTGACGCTGCCTTAGAAAAGGTAGCTGCTTTTGAATGACA h
 |
 -1062 GAATGTCTACACTGCTTTCCTTGACGCTA--TTAGAAT--GCAGCTCCCTGTC--TGATG m
 |
 -733 GGCAGGAATTTGTTTCGCTTTTAGGTTTCAGCCTGTAGGTGCCCTCTGCAGGAAATCAGNA h
 |
 -1008 GGCGCGAATTTGCTGGCCCCGTGAT-TTCAGCCTGGGCAGGTTCTTGTGACACAATCG--- m
 |
 -673 ACTAGGGTTTTGGAAGCAGTCAGGGTGGGGTTCTCCCTTGTCCTGCAGCCTCAGCAAAG h
 |
 -952 -----CAGGCCCGAGTTCTCC--TAGCCCATGAAGCT-----CAAAC m
 |

NF-AT

NF-AT

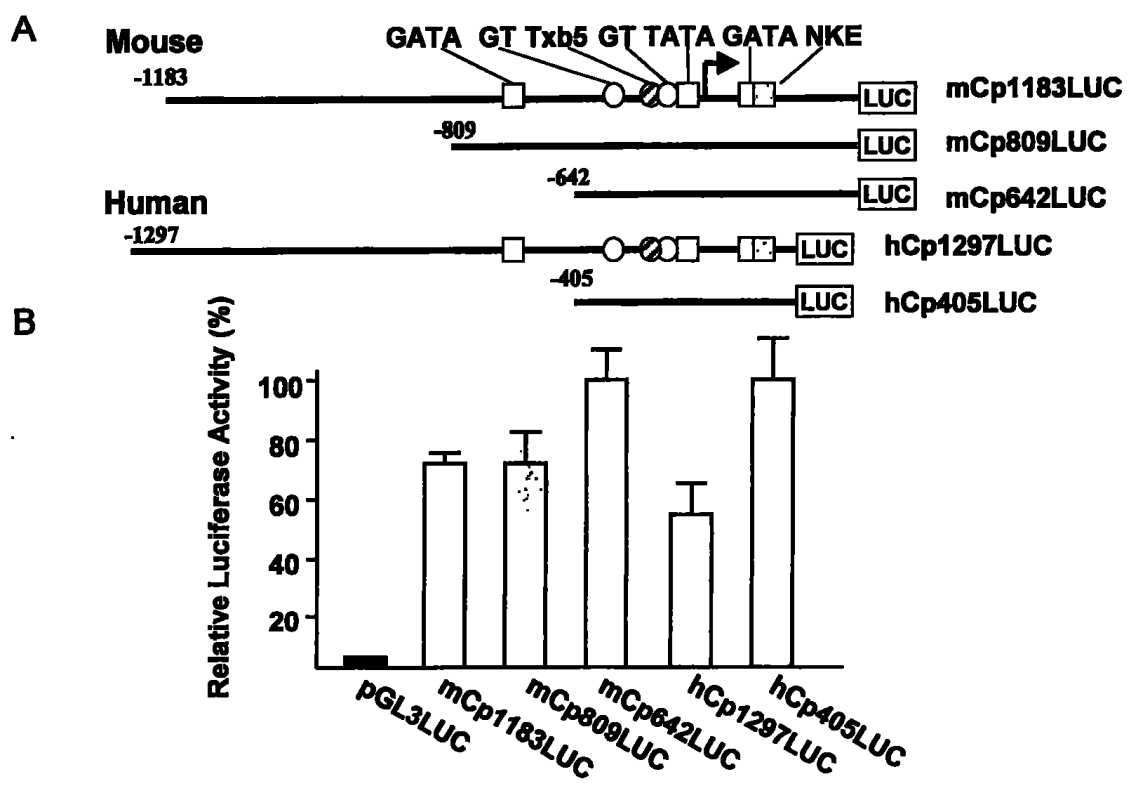
-613 ACTCAGGCAGTCTGGCAAAGCAGTTTCTTCAGCATACCTAACAGAACGCAAGTTTCCA- h
 |
 -917 AGCAACGCCGTTTCCCCC-----CCTAAACTTG--TAGCAGAAGACAGATTGCAA m
 |
 -554 TATGCCTGATGCAAATAATG---GCCT-CCAAACGTTAAACCTTTTTTGAGATAA---AC h
 |
 -868 TTTGTGTAACACGAATAATGCCCTGCCTTCGAAACCTGACATCTTTTCGAACACAACAAAC m
 |
 -501 TTGTTCTTTAATTGCCAGCGCCTGCAG---TTAATTTTGAT-----TGGCTACACTCT h
 |
 -808 TTGTCATTGGATCGCTAGTGTCTGAAGACATTCAATTTGATACTTGCTGGCTAGAATCC m
 |

GATA

-451 GGTTAAA---AGAAATGCTTTCGATGTGATATGGCAAATTTGGAGAAAAGTAACTCTT h
 |
 -748 TGTATGAGGGGATAGACTGTTCTAGATGTGATAATGAGAGTTCGGAAGAGAGCAGCCCTT m
 |
 -395 TTG-CTCCAACCAGTCTTCACAACCTTAACTTAATCGTCCTGTCCTTTTCTGCTGCC h
 |
 -688 TACACTGCTCAACAAAGTTCTGC--CCTCAACAAAGCAGCAAAGGCCAAAAGCTGCTGCC m
 |

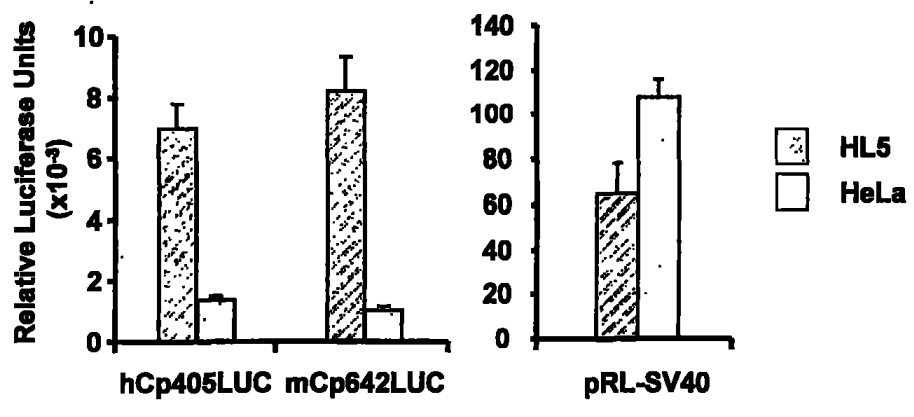
37

Figure 4



~~40~~

Figure 5



41

Figure 6A

-63	-22	
CGTAGAGGAGAGAAAAGCGACCAAGATAAAAGTGGACAGAAG		Human Corin GATA
CGTAGAGGAGAGAAAAGCGACCAACTTAAAGTGGACAGAAG		Mutant
-341	-299	
CATAGAGCAGAGAAAAGCGACCGAGATAAGAGTGGACAGAGG		Mouse Corin GATA
CATAGAGCAGAGAAAAGCGACCGACTTAAGAGTGGACAGAGG		Mutant
	CACTTGATAACAGAAAGTGATAACTCT	Consensus GATA
	CACTTCTTAACAGAAAGTCTTAACTCT	Mutant

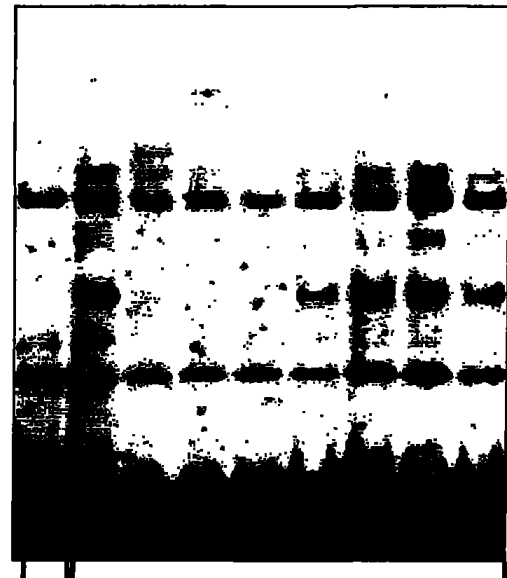
8/14

42

Figure 6B

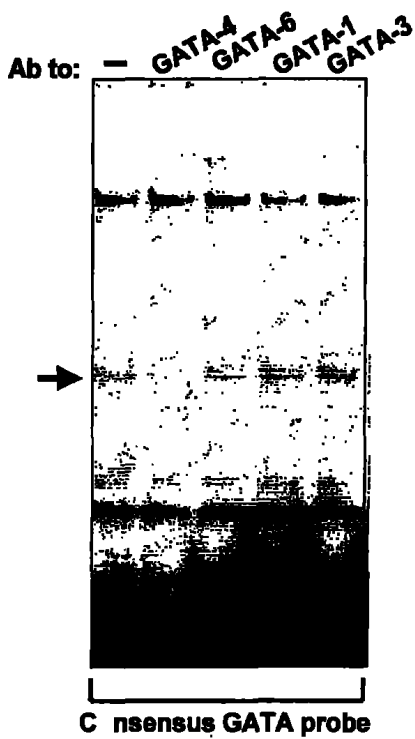
Competitors:

None
None
Consensus GATA
Human Corin GATA
Mouse Corin GATA
Consensus Mutant
Human Mutant
Mouse Mutant
Unrelated Oligo



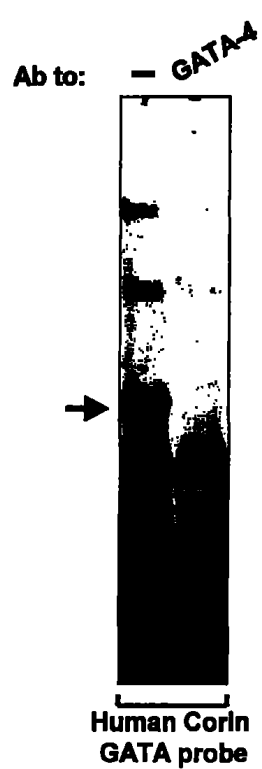
Mut. Cons nsus GATA pr b

Figure 6C



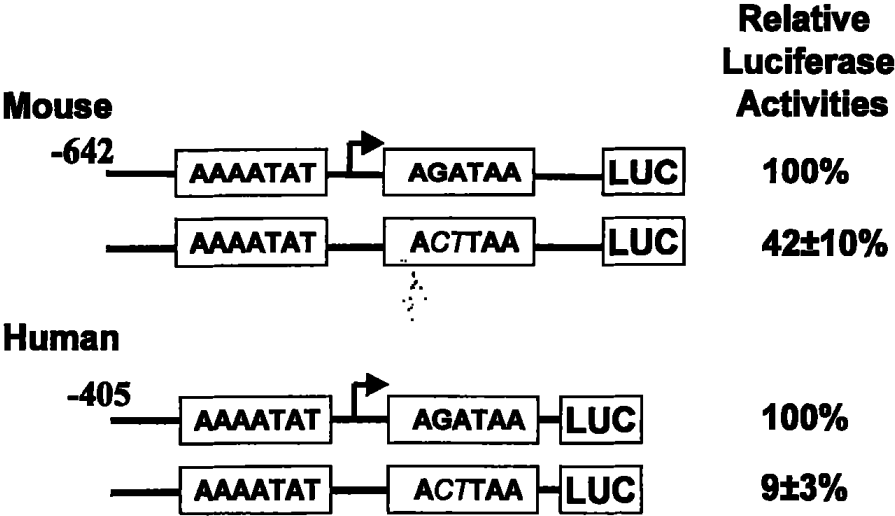
44

Figure 6D



44

Figure 7



46
46

FIGURE 8

-4037 AAGCTTCATG AGGGCAGGAG TGCAGTTTTG TTTATTACTG TAACCTCAGA GTAGAGAAGC
-3977 CTGGCCACAT AGTAGATGCT AGTATTCGTT TCCTAGGGCT GCTGTAACAG ATACCATACA
-3917 TGAGTTACTT AAAACAACAG AAATTTATTC TTTCACAGTT TAGGTGGCCA GAAGTCCCAA
-3857 ACCAAGATAT AACAAATTAT ATCTGCAAAG CCTTTATTTT CACAGAACCA CATTCTGAGG
-3797 TTCTGGGTGG ACATTAATTT GGCAGGGAGT AGTGGGGGGA CACTAACCTA CTACAGTGCT
-3737 CAGTAAATAT TTATTGGGTG AATGAAAATT CAGAGTGAT TCTAAGCTGT AAACCCCTTG
-3677 GATGTTTTCA TCACAGTCTT CTCTTAATAA CTGCTACAGA ACATAAGGAT TAGTTTGTGG
-3617 TCCCAGATTT TTTAGGCTCC AATTCTGCTT CTACCACTTT CTACTTGTTGA GCTCTTAGGC
-3557 AAGCTATTTA ACTTTGTAAG CCTCAGTTTC TTCTGTAAAA TGGTGACAAT AAGAAATAAC
-3497 AGTAAGTGCC CAATAAGTTT TAACTATTAT TATGTGCTA TAGCTATTTT AAAGCACTTT
-3437 CTATATGTAA TCCTCATAAC AACCGTATTA GGTGAGCCTA TTACACTTCT CATTTTATGA

NF-AT site

-3377 CAAAGGAAAC TAGATTTGTT TCAAGAATGA AAAACCTAGA AAATTATATG TCACTTTATG
-3317 AAGTGCCTGG CACATAGTAC ATAGAATAGC TTAGCTACAA TAATATAGAT ATGTGACTTT
-3257 ACCTCATAAC TTTAAGACAT CTCAAATTGA TTCACAAATC AGAAAAAAA TCTGAGGCAT
-3197 CAGATGTGAG GTGAGGTGAG GTGAGGCATC TCAGTTTTTG CACATATGGT TACTGTTATT
-3137 GAGGGAGCTC CATGTCATTG AGGGAGCTCC ACGTCATTGA GGGAGGACTG GGTGGGATGC
-3077 TGGCCAAAGG TAGGGGCATA TTTAGGCAGT GAAATTGCAG TTATGGGACC CCTCTATAGC
-3017 ACTAGATGTG TGAGAGGACT AAAAATAAAA TTCCCTTGAA ATTTCTTACA GGGTCATATA
-2957 TTACCTCCTT CCCAATGACT ACTGTGGTAT ATTAGAGTAG GGGATTGATG TCCCAGAAAT
-2897 ATTATGTACA TCAAACAGAA GATCTACACA AATTGTTTTA TCAGATACTG AATATATCAA
-2837 TGGGCTAGAG TGTATTATAG TACATATGGG TATGTTGTTT TCCCCCTTTT GACTAAATAA
-2777 ACTCTCCCCT CTCTGCAACA GGTAATTTTC CAGTTTACCT TTTTCTTGCT GTTTTTAATT
-2717 TTTTTTATTT TGAAGGCTTT GTATCTTTAT ATCTCAGCTG AAAATATTAC ATTCTAACTC
-2657 CCCAAAGCTA TTCTCACATT ATTTGCAAGT ATTTTTTCAT AGTTTACATG TTTGTGTATT
-2597 TGTTTAATAC ATTCCACAAG ACTGAAAGTC TTGGTGAGGG CAGGAACCTCT GTCTAGGTTG
-2537 TTCATCTGGC AGCCAGCAAA CCCAAAATAA GTATTAGTTG AATGAATAGC TAAATAGATG
-2477 AGCCATGGGG TAGCATATCT GTTTTAGCTA CTGCTTGCCCT GTTATCAFCCT TGGGATGCTG
-2417 CTGCTTCTC CGTGATCTCT TCTGTTCCTT AAATTGCTCT CAGTTGTAGT ACTAAGTACT
-2357 AATTTGATCT GTAATGTGAT ATGTGGCTGA AGTTTGCTCT GTAAAATCAC CGTTTCATGA

NF-AT site

-2297 GGTATATTCA ATATCTTTAA TTTTCCATA AATCTCTTCA AGGTTTGTGT GTGTTTTCTT
-2237 TTAAATTATC TAACTAGTTG GATGTATGCT TGAAGTGCTA GACAATAAAA GTTTCAATAG
-2177 GCTAGAAATG TTTCTTTTTG TAAATTTATT TTAAGAAACT AGATGATGGT TGTCACCTGA
-2117 AGCTGAAATG CAAATGTAGC TAGTTTTTTT TAAAGAATAA TTCAAATAGG TCATTAAAGA
-2057 TTACTATGAG CACACTGCAT ATTCAAATCA GTTTGAATAT GTTTTGAGAC TTCTAATAGT
-1997 TTATGATTCT TGACATTTTA ATGAGCACAC TGCATATTCA AATCAGTTTG AATATGTTTT
-1937 GAGACTTCTA ATAGTTTATG ATTCCTTGACA TTTTAAAAGT TTATTATAAA GAATATAAAA
-1877 CATCTTTACC CTCATTTTTT ATGTCAATTAC CTTCATGCAA AGAATACCTC AGGTATTAAT
-1817 TCTGGTGCTG TTGGTAACTA GAACTGGTTG GGTTTTCTTG CTAAAAGGAA GTTTAAAAAA

NF-AT site

-1757 TGTTTATTTT ACACCATTA TGAATTAGC TTTAGTTCTC AGAGGAACTA AAAGTGGAAA
-1697 AGTGAGGGAG ACTGATCGAC CCTATCTCAA ATCCACTGAC GTAGCTACTT TAATTTCTA

-1637 GTCCCTGTAG CACCTCCACC AGAGGGCAGA AAGTGGAAGA GAAAGAAGAT GAAATAGAAA
-1577 CTTGTACTTG GCCTCAGAAT GCCTGTAGAA ACCTTAGCAA TTGAATCCAG CCCTTATGTT
-1517 ATAGGCTGAG TTAAGTGTGG CCCAGAAAGA CTATGTGATT TGCTCACAGT TCCTGATTCC
Tbx5 site
-1457 CAGACTGGCA CTGCGGTGAT GGTGTGTGAT GAGGTAGTAT CTTAGTAAGA ACACAATCCA
-1397 GAAGTCACTG CCTCGGGGGA ATCCCAGCTC AGCTTCTTGC TAGCTTGCGT AGGCTGGTTA
-1337 CTTCACTTCA GCTCCCTGAA TCTGCTTCT TATCTCTAAA ATAAAAATAA TAGCTTCTTC
-1277 CTCAGAGTAG TTGGTGGAAC TGAAAGAATA CATGTAAAGT GCTTAGTATG ACACCTGCCA
-1217 CATAATATGA ACTGAATTAT TGTGAATTAT GATAAATTG TCAGATACTG GTTTACAAAT
-1157 CGGATGTTAG AATAACATGG AATCAGTGT TCAGTCATTT TACTATACAT ATGCAATATT
-1097 TTCTACATTT GATCTCACTT CAGAAACAAA ATACTGCCCC CCCCATTTTA CAAATGCATA
-1037 TTTTTTTCTC AGCAATAATG TTCAAGAACA AGTGCTTGGC CCATATTTTG TTGTCTTTAC
-977 ATGGCTTTCT TTAAATAATG GGGATGGATT TATTAAATAA CCTCATGAGT AATTTTCAA
NF-AT site
-917 ATTTCCATTA AGATCTTGAT TGAAATTGGA TGAAAAATCA TTTCTAAGAA AAACCCAATG
-857 AAGTGTTTTT CTTTGCCACA TTTGACAATT GCCTTGGACT TGGTAAAGTA ATCATTACTG
-797 TGTTGAGTAC CTCCAGTGCC CTCCTTGACG CTGCCCTAGA AAAGGTAGCT GCCTTTGAAT
-737 GACAGGCAGG AATTTGTTCC CTTTTAGGT TCAGCCTGTA GGTGCCCTCT GCAGGAAATC
-677 AGNAACTAGG GTTTTGGAAG CAGTCAGGT GGGGTCTCC CTGTCCCTG CAGCCTCAGC
NF-AT site
-617 AAAGACTCAG GCAGTCTGGC AAAAGCAGTT TCTTCAGCAT ACCTAACAGA ACGCAAGTTT
-557 CCATATGCCT GATGCAATA ATGGCCTCCA AACGTAAAC CTTTTTGAG ATAAACTTGT
-497 TCTTTAATTG CCAGCGCCTG CAGTTAATT TGATTGGCTA CACTCTGGTT AAAAGAAAAT
GATA
-437 GCTTTGATG TGATATGGCA AATTGGAGA AAAGTAACTC TTTTGCTCCC AACCAGTCTT
-377 CCACAACCTA AACTTAATCG TCTGTCTT TTTCTGCTGC CCTCGTGGAG TGTAAGTTTT
NF-AT site
-317 TGAGGGAGAC CAGCAGAAAC TGACTTTCCA TATGCCCTG AAGAATAACT TCTTTGAATG
GT box
-257 CAAAGAGGTG GGGACACGGA GGATCTGTCA TTACGGGTTA TTATGGGTGG GACCCAGAGA
Tbx5 site GT box TATA box
-197 CGGGAGTGAA GGGAGGGTGT GGGCCGCGGG TGGGATCTGT AGAGCAGACA AAATATGGGG
-137 CCCCTGGCGC TTAAAGTTCA GTTTGTCTCT CTTGAGCTTG GAGAAAATCA TCCGTAGTGC
GATA/NKE
-77 CTCCCCGGGG GACAGGTAGA GGAGAGAAAA GCGACCAAGA TAAAGTGGG CAGAAGAATA
Translation initiation site
-17 AGCGAGACTT TTTATCCATG AAACAGTCTC CTGCCCTCGC TCCGGAAGAG CGCTGCCGCA
Tbx5 site
GAGCCGGGTC CCCAAAGCCG gtaagatcga tgattcgctg tctaccgca gccaggtgtg
atggcctctt agtcccggtg aattc

<110> Pan, Junliang
Wu, Qingyu

<120> Control Sequence of the Human Corin Gene

<130> 52351AWOM1

<150> US 60/384,108

<151> 2002-05-31

<160> 16

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1888

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (922)..(922)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 1

aaagaagatg aaatagaaac ttgtacttgg cctcagaatg cctgtagaaa ccttagcaat	60
tgaatccagc ccttatgtta taggctgagt taactgtggc ccagaaagac tatgtgattt	120
gctcacagtt cttgattccc agactggcac tgcggtgatg gtgtgtgatg aggtagtatc	180
ttagtaagaa cacaatccag aagtcactgc ctccggggaa tcccagctca gcttcttgct	240
agcttgcgta ggctggttac ttcacttcag ctccctgaat ctgctttctt atctctaaaa	300
taaaaataat agcttcttcc tcagagtagt tgggtggaact gaaagaatac atgtaaagtg	360
ccttagtatga cacctgccac ataatatgaa ctgaattatt gtgaattatg ataaatttgt	420
cagatactgg tttaaaaatc ggatgttaga ataacatgga atcagtgttt cagtcatttt	480
actatacata tgcaatatatt tctacatttg atctcacttc agaaacaaaa tactgcccc	540
cccattttac aaatgcatat ttttttctca gcaataatgt tcaagaacaa gtgcttggcc	600
catattttgt tgtctttaca tggctttctt taaataatgg ggatggattt attaaataac	660
ctcatgagta attttcaaaa tttccattaa gatcttgatt gaaattggat gaaaaatcat	720
ttctaagaaa aacccaatga agtgtttttc ttgcccacat ttgacaattg ccttggactt	780
ggtaaagtaa tcattactgt gttgagtacc tccagtgcc tccttgacgc tgccttagaa	840
aaggtagctg cttttgaatg acaggcagga atttgttcgc cttttagggt cagcctgtag	900
gtgccctctg caggaaatca gnaactaggg ttttgaagc agtcagggtg gggttctccc	960
ttgtccctgc agcctcagca aagactcagg cagtctggca aaagcagttt cttcagcata	1020

WO 03/102135

PCT/US03/16741

3/11

aagctatttta	actttgtaag	cctcagtttc	ttctgtaaaa	tggtgacaat	aagaaataac	540
agtaagtgcc	caataagttt	taactattat	tatgtgtcta	tagctatttt	aaagcacttt	600
ctatatgtaa	tcctcataac	aaccgtatta	ggtgagccta	ttacacttct	cattttatga	660
caaaggaaac	tagatttggt	tcaagaatga	aaaacctaga	aaattatatg	tcactttatg	720
aagtgcctgg	cacatagtac	atagaatagc	ttagctacaa	taatatagat	atgtgacttt	780
acctcataac	tttaagacat	ctcaaattga	ttcacaaatc	agaaaaaaaa	tctgaggcat	840
cagatgtgag	gtgaggtgag	gtgaggcatc	tcagtttttg	cacatatggt	tactgttatt	900
gagggagctc	catgtcattg	agggagctcc	acgtcattga	gggaggactg	ggtgggatgc	960
tggccaaagg	taggggcata	tttaggcagt	gaaattgcag	ttatgggacc	cctctatagc	1020
actagatgtg	tgagaggact	aaaaataaaa	ttcctttgaa	atttcttaca	gggtcatata	1080
ttacctcctt	cccaatgact	actgtggtat	attagagtag	gggattgatg	tcccagaaat	1140
attatgtaca	tcaaacagaa	gatctacaca	aattgtttta	tcagatactg	aatatatcaa	1200
tgggctagag	tgtattatag	tacatatggg	tatgttggtt	tccccctttt	gactaaataa	1260
actctcccct	ctctgcaaca	ggtaaatttc	cagtttacct	ttttcttgct	gtttttaatt	1320
ttttttattt	tgaaggcttt	gtatctttat	atctcagctg	aaaatattac	attctaactc	1380
cccaaagcta	ttctcacatt	atttgcaagt	attttttcat	agtttacatg	tttgtgtatt	1440
tgtttaatac	attccacaag	actgaaagtc	ttggtgaggg	cagggaactct	gtctagggtg	1500
ttcatctggc	agccagcaaa	cccaaaataa	gtattagttg	aatgaatagc	taaatagatg	1560
agccatgggg	tagcatatct	gttttagcta	ctgcttgccct	gttatcatcc	tgggatgctg	1620
cttgcttctc	cgtgatctct	tcttgttcct	aaattgtctt	cagttgtagt	actaagtact	1680
aatttgatct	gtaatgtgat	atgtggctga	agtttgctct	gtaaaatcac	cgtttcatga	1740
ggtatattca	atatctttaa	tttttccata	aatctcttca	aggtttggtg	gtgttttctt	1800
ttaaattatc	taactagttg	gatgtatgct	tgaagtgcta	gacaataaaa	gtttcaatag	1860
gctagaaatg	tttctttttg	taaaattatt	ttaagaaact	agatgatggg	tgtcacttga	1920
agctgaaatg	caaatgtagc	tagttttttt	taaagaataa	ttcaaatagg	tcattaaaga	1980
ttactatgag	cacactgcat	attcaaatca	gtttgaatat	gttttgagac	ttctaatagt	2040
ttatgattct	tgacatttta	atgagcacac	tgcatattca	aatcagtttg	aatatgtttt	2100
gagacttcta	atagtttatg	attcttgaca	ttttaaaagt	ttattataaa	gaatataaaa	2160
catctttacc	ctcatttttt	atgtcattac	cttcattgca	agaatacctc	aggtattaat	2220
tctggtgctg	ttggtaacta	gaactgggtg	ggtttttctg	ctaaaaggaa	gtttaaaaaa	2280

WO 03/102135

PCT/US03/16741

5/11

gagccgggtc cccaaagccg gtaagatcga tgattcgctg tectaccgca gccagggtgtg 4140
 atggcctctt agtcccgggtg aattc 4165

<210> 3
 <211> 1817
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 3
 aactctgaaa tgaaagaaac tcaactgagc cttcaagatg ggtgaacgta caccactgt 60
 tccatcacag actgcttaac tctggccttc aggggtggagt tggcaaagt gtctcctggg 120
 ctctgggttc tcagatgggg ttctgtggg tgggtggtgtg cgctgaggca gtgtctcagt 180
 cagaactcag tcacaaaatg ccaccatctc tggggagtgt caggtcactg cctaccaaatt 240
 gacctcagcg gggttatgcca gttgcctctc atctctaagt taaagaggggt atgtgcaaaa 300
 tgcttagtgc agagcccggc atgctggaac actcaggttt gtgaattgtg aaacccttgt 360
 tagaaatggc atgcctcact gatgctggaa taacttgagg tcaagtgtcc ctcgctcttta 420
 acgacacata gatgatattc ccacactcca tgtcttttcg gaagcaaagt acccattacc 480
 acttccttcc actcgtacaa atgtgccttt gtccacacaa tgatactcaa ggtcttattg 540
 tctgcttact atatgtagcc ttctctagtgt gagatgggct acagtataac cttgaataat 600
 tattgaaatt ttgaaaattt tgattaaaaa tgcatttaaa actcacgttt aagaaaactt 660
 aaatttttgt tatccttggc ggtttttttt ttcaattttc gataaatatt taagaattgt 720
 cttgggcttc aatgcaacct ttgctttgga atgtctacac tgctttcctt gacgctatta 780
 gaatgcagct ccctgtctga tgggcgcgaa tttgctggcc cctgatttca gcctgggcag 840
 gttcttgtca gacaatcgca ggcccaggtt ctcttagccc atgaagctca aacagcaacg 900
 ccgtttcccc ccctaaactt gtagcagaag acagatttgc aatttgtgta acacgaataa 960
 tgctgcctt cgaaacctga catcttttcg aacacaacaa acttgtcatt ggatcgctag 1020
 tgtctgaaga cattcatttt gatacttgcc tggctagaat cctgtatgag gggatagact 1080
 gttctagatg tgataatgag agttcggaag agagcagccc ttacactgc tcaacaaagt 1140
 tctgccctca acaaagcagc aaaggccaaa agctgctgcc ccatagttga aggggttggt 1200
 tgtttgtttt ttccctggtg tggaggatgg gggcagtaga ctcttggtc tccatctgcc 1260
 atagaaaaat aacttttttg aaggctgggg tgggtatgga ggaactgtct cattaaggggt 1320
 tatgggtagg acccagagac gtgagtgaag ggagggagtgt gtctgcgggt ggggtctgcc 1380
 cagcagacaa aatatggggc tccaatcccc tgagtataac ttactccga gtgaggagaa 1440
 agacaccogt agtgcctctc ctcgagatcc atagagcaga gaaaagcgac cgagataaga 1500


```

tttctaagaa aaaccaaatg aagtgttttt ctttgccaca ttgacaatt gccttggact      480
tggtaaagta atcattactg tgttgagtac ctccagtgcc ctccctgacg ctgccttaga      540
aaaggtagct gcttttgaat gacaggcagg aatttgttcg ctttttaggt tcagcctgta      600
ggtgccctct gcaggaaatc agnaactagg gttttggaag cagtcagggt ggggttctcc      660
cttgtccctg cagcctcagc aaagactcag gcagtctggc aaaagcagtt tcttcagcat      720
acctaacaga acgcaagttt ccatatgcct gatgcaaata atggcctcca aacgttaaanc      780
cttttttgag ataaacttgt tctttaattg ccagcgctg cagttaattt tgattggcta      840
cactctggtt aaaagaaaat gtttctgatg tgatatggca aatttggaga aaagtaactc      900
ttttgctccc aaccagtctt ccacaactta aacttaatcg tctgtcctt tttctgctgc      960
cctcgtggag tgtaagtttt tgaggggagac cagcagaaac tgactttcca tatgcccctg     1020
aagaataact tctttgaatg caaagagggtg gggacacgga ggatctgtca ttacgggtta     1080
ttatgggttg gacccagaga cgggagtgaa gggaggggtgt gggccgcggg tgggatctgt     1140
agagcagaca aaatatgggg cccctggcgc ttaaagttca gtttgtctct cttgagcttg     1200
gagaaaatca tccgtagtgc ctccccgggg gacacgtaga ggagagaaaa gcgaccaaga     1260
taaaagtga cagaagaata agc                                             1283

```

```

<210> 6
<211> 4023
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc feature
<222> (3363)..(3363)
<223> n is a, c, g, or t

```

```

<400> 6
aagcttcatg agggcaggag tgcagttttg tttattactg taacctcaga gtagagaagc      60
ctggccacat agtagatgct agtattcggt tccatagggct gctgtaacag ataccataca     120
tgagttactt aaaacaacag aaatttattc tttcacagtt taggtggcca gaagtccaa      180
accaagatat aacaaattat atctgcaaag cttttatttc cacagaacca cattctgagg     240
ttctgggttg acattaattt ggcagggagt agtgggggga cactaaccta ctacagtgct      300
cagtaaatat ttattgggtg aatgaaaatt cagagtgtat tctaagctgt aaacccttg      360
gatgttttca tcacagtctt ctcttaataa ctgctacaga acataaggat tagtttgtgg      420
tcccagattt tttaggctcc aattctgctt ctaccacttt ctacttgtga gctcttaggc      480

```

WO 03/102135

PCT/US03/16741

9/11

tgttttat	tttt	acaccattaa	tgcaattagc	tttagttctc	agaggaacta	aaagtggaaa	2340
agtgagggag	actgatcgac	cctatctcaa	atccactgac	gtagctactt	taatttcata		2400
gtccctgtag	cacctccacc	agagggcaga	aagtggaa	gaaagaagat	gaaatagaaa		2460
cttgtacttg	gcctcagaat	gcctgtagaa	accttagcaa	ttgaatccag	cccttatgtt		2520
ataggctgag	ttaactgtgg	cccagaaaga	ctatgtgatt	tgctcacagt	tcttgattcc		2580
cagactggca	ctgcggtgat	gggtgtgtgat	gaggtagtat	cttagtaaga	acacaatcca		2640
gaagtcactg	cctcggggga	atcccagctc	agcttcttgc	tagcttgcgt	aggctggtta		2700
cttcacttca	gctccctgaa	tctgctttct	tatctctaaa	ataaaaataa	tagcttcttc		2760
ctcagagtag	ttggtggaac	tgaaagaata	catgtaaagt	gcttagtatg	acacctgcca		2820
cataatatga	actgaattat	tgtgaattat	gataaatttg	tcagatactg	gtttacaaat		2880
cggatgtag	aataacatgg	aatcagtggt	tcagtcattt	tactatacat	atgcaatatt		2940
ttctacattt	gatctcactt	cagaaacaaa	atactgcccc	ccccatttta	caaatgcata		3000
tttttttctc	agcaataatg	ttcaagaaca	agtgcctggc	ccatattttg	ttgtctttac		3060
atggctttct	ttaaataatg	gggatggatt	tattaaataa	cctcatgagt	aattttcaaa		3120
atttccatta	agatcttgat	tgaaattgga	tgaaaaatca	tttctaagaa	aaaccaatg		3180
aagtgttttt	ctttgccaca	tttgacaatt	gccttggact	tggtaaagta	atcattactg		3240
tgttgagtac	ctccagtgcc	ctccttgacg	ctgccttaga	aaaggtagct	gcttttgaat		3300
gacaggcagg	aatttgttcg	ccttttaggt	tcagcctgta	ggtgccctct	gcaggaaatc		3360
agnaactagg	gttttggaag	cagtcagggt	ggggttctcc	cttgctccctg	cagcctcagc		3420
aaagactcag	gcagtctggc	aaaagcagtt	tcttcagcat	acctaacaga	acgcaagttt		3480
ccatatgcct	gatgcaaata	atggcctcca	aacgttaaac	cttttttgag	ataaacttgt		3540
tctttaattg	ccagcgctg	cagttaattt	tgattggcta	cactctgggt	aaaagaaaat		3600
gctttcgatg	tgatatggca	aatttggaga	aaagtaactc	ttttgctccc	aaccagtott		3660
ccacaactta	aacttaatcg	tcctgtcctt	tttctgctgc	cctcgtggag	tgtaagtttt		3720
tgaggggagac	cagcagaaac	tgactttcca	tatgccctg	aagaataact	tctttgaatg		3780
caaagagggtg	gggacacgga	ggatctgtca	ttacgggtta	ttatgggtgg	gacccagaga		3840
cgggagtgaa	gggagggtgt	ggccccgagg	tgggatctgt	agagcagaca	aaatatgggg		3900
cccctggcgc	ttaaagttca	gtttgtctct	cttgagcttg	gagaaaatca	tccgtagtgc		3960
ctccccgggg	gacacgtaga	ggagagaaaa	gcgaccaaga	taaaagtgga	cagaagaata		4020
agc							4023

<210> 12
<211> 42
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe

<400> 12
cgtagaggag agaaaagcga ccaacttaaa agtggacaga ag 42

<210> 13
<211> 42
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe

<400> 13
catagagcag agaaaagcga ccgagataag agtggacaga gg 42

<210> 14
<211> 42
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe

<400> 14
catagagcag agaaaagcga ccgacttaag agtggacaga gg 42

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe

<400> 15
cacttgataa cagaaagtga taactct 27

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe

<400> 16
cacttcttaa cagaaagtct taactct 27

- (12) Publicación de la solicitud internacional bajo PCT
 - (19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional
 - (43) Fecha de publicación internacional : 11 de diciembre de 2003
(11-12-2003)
 - (10) Número de publicación internacional: **WO 03/102135 A2**
-

- (51) **Clasificación Internacional de patentes: C 12 N**
- (21) **Número de solicitud internacional: PCT/US03/16741**
- (22) **Fecha de presentación internacional: 28 de mayo de 2003 (28.03.2003)**
- (25) **Idioma de la presentación: inglés**
- (26) **Idioma de la publicación: inglés**
- (30) **Antecedentes de prioridad: 60/384,108 31 de mayo de 2002
(31.05.2002) US**
- (71) **Solicitante (para todos los estados designados excepto US): SCHERING
AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE], Müllerstrasse 178, 13342 Berlin
(DE).**
- (72) **Inventor; e**
- (75) **Inventores/solicitantes (solo para US): JAN, Junllang [DE/DE], 1220
Brewster Drive, El Cerrito, CA 94530 (US). WU, Qingyu [CN/US]: 1153
Camino Vallecito, Lafayette, CA 94549-2844 (US).**
- (74) **Agente: WASHTIEN, Wendy, L.; Berlex Biosciences, 2600 Hilltop Drive,
P. O. Box 4099, Richmond, CA 94804 (US)**
- (81) **Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC,
EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP,
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**
- (84) **Estados designados (regional): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).**

Publicado:

- sin informe de búsqueda internacional y a ser publicado nuevamente después de recibido el informe

Véanse las explicaciones („Guidance Notes on Codes an Abbreviations“) al comienzo de cada edición regular de la Gaceta-PCT para la explicación del código de dos dígitos y de las otras abreviaturas

- (54) **Título: Secuencias de control del gen de corina humano**

(57) Resumen: Nueva región de control de la expresión aislada de genes de corina de mamífero. Esta región de control activa preferencialmente la transcripción en células cardíacas. Se proveen métodos y composiciones para emplear esta región de control en la identificación de agentes capaces de modular la expresión de corina y en el tratamiento de enfermedades cardíacas.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
WENDY L. WASHTIEN
HERLEX BIOSCIENCES
2600 HILLTOP DRIVE
P.O. BOX 4099
RICHMOND, CA 94804

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of Mailing (day/month/year) 25 AUG 2004	
Applicant's or agent's file reference 52351AW08M1	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US03/16741	International filing date (day/month/year) 28 May 2003 (28.05.2003)
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 bis.1 and 90 bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 30 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1430 Alexandria, Virginia 22313-1430 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Karen A. [Signature] Telephone No. (703) 308-0196
--	--

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

(See notes on accompanying sheet)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 52351AWOM1	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US03/16741	International filing date (day/month/year) 28 May 2003 (28.05.2003)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 31 May 2002 (31.05.2002)
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.



None of the figures

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/16741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C07H 21/02, 21/04; A61K 48/00; C12N 15/85, 15/86; C12Q 01/68; C12P 19/34
US CL : 435/6, 91.1, 91.3, 325, 375; 536/23.1, 24.5; 514/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6, 91.1, 91.3, 325, 375; 536/23.1, 24.5; 514/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
STN, MEDLINE, CAPLUS, LIFESCI, EMBASE, USPATFULL, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WU ET AL. Characterization of the Corin-Mediated Pro-Atrial Natriuretic Peptide Processing in Murine Cardiac Myocytes. Circulation: Supplement II. 23 October 2001, Vol. 104, No. 17, see entire document.	1-28
Y	THE SANGER CENTRE ET AL. Toward a Complete Human Genome Sequence. Genome Research. October 1998, Vol. 8No. 11, pages 1097-1108, see sequence deposited referenced herein.	1-28
Y	YAN ET AL. Corin, a Transmembrane Cardiac Serine Protease, as a Pro-Atrial Natriuretic Peptide Convertase. Hypertension (Baltimore), October 2000, vol. 36, no. 4, pages 709-710, see entire document.	1-28
Y	HOOPER ET AL. Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes. European Journal of Biochemistry. December 2000, Vol. 267, No. 23, pages 6931-6937, see entire document.	1-28



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

24 November 2003 (24.11.2003)

Date of mailing of the international search report

25 AUG. 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1430
Alexandria, Virginia 22313-1430
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Karen A. Lacoursiere

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/16741

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAN ET AL. Corin: A Mosaic transmembrane Serine Protease Encoded by a Novel cDNA from Human Heart. FESAB Journal. 23 April 1999, Vol. 13, No. 7, page A1557, Abstract 1297, see entire document.	1-28
Y	KATOH ET AL. Molecular Cloning and characterization of MFRP, a Novel Gene Encoding a Membrane-Type Frizzled-Related Protein. Biochemical and Biophysical Research Communications. 23 March 2001, Vol. 282, No. 1, pages 116-123, see entire document.	1-28
X,T	PAN ET AL. Genomic Structures of the Human and Murine Corin Genes and Functional GATA Elements in Their Promoters. The Journal of Biological Chemistry. 11 October 2002, Vol. 277, No. 41, pages 38390-38398, see entire document.	1-28
Y	YAN ET AL. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. PNAS. 18 July 2000, Vol. 97, No. 15, pages 8525-8529, see entire document.	1-28
X,T	WU ET AL. Processing of Pro-atrial Natriuretic Peptide by Corin in Cardiac Myocytes. The Journal of Biological Chemistry. 10 May 2002, Vol. 277, No. 19, pages 16900-16905, see entire document.	1-28
Y	YAN ET AL. Corin, a Mosaic Transmembrane Serine Protease encoded by a Novel cDNA from Human Heart. The Journal of Biological chemistry. 21 May 1999, Vol. 274, No. 21, pages 14926-14935, see entire document.	1-28
Y	WO 99/64608 (SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT) 16 December 1999 (16.12.99), see entire document.	1-28
Y	WO 01/57188 (HYSEQ, INC.) 09 August 2001 (09.08.01), see entire document, especially sequences.	1-28

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

Remitante: EL ORGANISMO ENCARGADO DEL INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

A WASHTIEN, Wendy L. Berlex Biosciences 2800 Hilltop Drive P.O. Box 4099 Richmond, CA 94804 E.E.U.U.	PCT NOTIFICACIÓN DE ENVÍO DEL INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL O DE LA DECLARACIÓN (regla PCT N° 44.1)
Referencia del solicitante o del agente 62351AWOM10	Fecha de envío (día/mes/año) 25.06.2004
Solicitud Internacional N° PCT/US 03/16741	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 28 de mayo de 2003 (28.05.2003)
Solicitante SHERING AKTIENGESELLSCHAFT	

1. ☒	Se notifica al solicitante de la confección del Informe de Búsqueda Internacional y de que se lo envía aquí adjunto. Presentación de modificaciones y una declaración, según artículo 19: El solicitante puede modificar por su propia voluntad las reivindicaciones de la solicitud internacional (ver regla 48): ¿Cuándo? El plazo para la presentación de tales modificaciones es usualmente de dos meses a partir del envío del Informe de Búsqueda Internacional. ¿Dónde? Directamente en la Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin des Colombettes, CH-1211 Ginebra 20. Telefax N°: (41-22) 740.14.35 Otras indicaciones detalladas se pueden obtener en las observaciones de la hoja adjunta.
2. ☐	Se notifica al solicitante que no se confecciona un Informe de Búsqueda Internacional y de que, según el artículo 17(2)a, se envía aquí la declaración a tales efectos.
3. ☐	Acerca de la objeción contra el pago de una tasa(s) adicional(es) según la regla 40.2, se informa al solicitante que: ☐ la objeción y la resolución han sido enviadas desde aquí, junto con su solicitud de envío del texto, así como el requerimiento del solicitante de impulsar la objeción y la resolución, a los organismos designados por la Oficina Internacional. ☐ No existe ninguna resolución acerca de la objeción; el solicitante será informado en cuanto se tome una resolución.
4. Recordatorio	Bravemente tras el transcurso de 18 meses a partir de la fecha de prioridad la Oficina Internacional publicará la solicitud internacional. Si el solicitante quiere impedir o postergar la publicación, debe presentar en la Oficina Internacional, según la regla 90^{ter}.1 a 90^{ter}.3, antes de concluir las preparaciones técnicas para la publicación internacional, una declaración acerca del desistimiento de la solicitud internacional o de la reivindicación de prioridad. Cuando el solicitante desea postergar en hasta 30 meses (en algunos organismos hasta más) a partir de la fecha de prioridad el ingreso en la fase nacional, debe presentar, solo en determinadas oficinas designadas, una solicitud de Examen Preliminar Internacional dentro de los 19 meses a partir de la fecha de prioridad; de otra manera, el solicitante deberá realizar los actos prescritos para entrar en la fase nacional ante tales oficinas designadas dentro del plazo de 20 meses a partir de la fecha de prioridad.. Con respecto a otras oficinas designadas, se aplica el plazo de 30 meses (o más aún) si no se presenta una demanda en 19 meses. Ver el anexo del formulario PCT/IB/301 y, para los detalles de los plazos aplicables, oficina por oficina, ver el PCT Applicant Guide, Volume II, National Chapter y el sitio de Internet de WIPO.

Nombre y dirección postal de ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimil N° (703) 305-3230 Formulario PCT/ISA/220 (abril 2002)	Funcionario autorizado Karen A. Lacoursiere (Firmado) Telefono N°: (703)-308-0198 (ver notas en la hoja adjunta)
---	---

INSTRUCCIONES PARA EL FORMULARIO PCT/ISA/220 (continuación)

En el escrito adjunto deben estar indicadas las diferencias existentes entre las reivindicaciones de la versión presentada y las reivindicaciones modificadas. Así, para cada reivindicación de la solicitud internacional deben estar indicadas (indicaciones equivalentes para reivindicaciones distintas pueden estar aunadas), en particular, si:

- i) la reivindicación no está modificada;
- ii) la reivindicación fue eliminada;
- iii) la reivindicación es nueva;
- iv) la reivindicación reemplaza a una o a varias reivindicaciones de la versión presentada;
- v) la reivindicación es el resultado de la división de una reivindicación de la versión presentada;

A continuación se indican ejemplos de cómo se deben aclarar modificaciones en el escrito adjunto:

- 1- [cuando en lugar de 48 reivindicaciones originales, luego de la modificación de algunas reivindicaciones existen 61 reivindicaciones]:
"Las reivindicaciones 1 a 29, 31, 32, 34, 35, 37 a 48 son reemplazadas por reivindicaciones modificadas con la misma numeración; las reivindicaciones 30, 33 y 36 quedan sin modificar; las reivindicaciones 49 a 51 están agregadas."
- 2- [cuando en lugar de 16 reivindicaciones originales, luego de la modificación de todas las reivindicaciones existen 11 reivindicaciones]:
"Las reivindicaciones modificadas 1 a 11 están en lugar de las reivindicaciones 1 a 15"
- 3- [cuando originalmente existen 14 reivindicaciones y las modificaciones consisten en la eliminación de algunas reivindicaciones y el agregado de nuevas reivindicaciones]:
"Las reivindicaciones 1 a 6 y 14 están sin modificar; las reivindicaciones 7 a 13 son eliminadas; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17. "O": se eliminan las reivindicaciones 7 a 13; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17; todas las demás reivindicaciones quedan sin modificar."
- 4- [cuando se llevan a cabo distintos tipos de modificaciones]:
"Reivindicaciones 1 a 10 sin modificar; reivindicaciones 11 a 13, 16 y 19 eliminadas; reivindicaciones 14, 15 y 18 reemplazadas por la nueva reivindicación 14; reivindicación 17 dividida en las nuevas reivindicaciones 18, 16 y 17, nuevas reivindicaciones 20 y 21 agregadas."

"Declaración según artículo 19(1)" (Regla 48.4)

A las modificaciones se puede agregar una declaración mediante la cual se explican las modificaciones y se exponen sus consecuencias sobre la descripción y los dibujos (los que, según el artículo 19(1), no pueden ser modificados).

La declaración se publica junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas.

La misma debe estar redactada en el idioma en que se publica la solicitud internacional.

La misma debe ser corta y no debe comprender más de 500 palabras cuando está redactada en o traducida al idioma inglés.

La declaración no se debe confundir con el escrito adjunto que indica las diferencias existentes entre las reivindicaciones de la versión original y las reivindicaciones modificadas, y no reemplaza al último. Se la debe presentar en una hoja separada y caracterizar como tal en el título, con preferencia, mediante las palabras "Declaración según artículo 29(1)".

La declaración no debe contener manifestaciones desmerecedoras acerca del informe de búsqueda internacional o del significado de las publicaciones mencionadas en este informe. Solo se puede hacer referencia a publicaciones indicadas en el informe de búsqueda internacional que se relacionan con una reivindicación determinada, en el contexto de una modificación de esta reivindicación.

Consecuencias de una solicitud ya presentada sobre el examen preliminar internacional

Cuando en el momento de la presentación de modificaciones según el artículo 19 ya se requirió un requerimiento de examen preliminar internacional, el solicitante debería presentar al mismo tiempo, en su propio interés, junto con la presentación de las modificaciones (y cualquier declaración) ante la Oficina Internacional, una copia de las modificaciones ante el organismo encargado del examen preliminar internacional y, cuando es requerido, una traducción de tales modificaciones para proceder ante el organismo (ver regla 55.3 y regla 82.2 a), primera frase). Para mayor información, ver las notas al formulario de requerimiento (PCT/PEA/401).

Consecuencias de las modificaciones desde el punto de vista de la traducción de la solicitud internacional al ingresar en la fase nacional

Se hace notar al solicitante que, al ingresar en la fase nacional, en lugar de o adicionalmente a la traducción de las reivindicaciones en la versión original, se debe enviar una traducción de las reivindicaciones modificadas según el artículo 19 a los organismos designados / seleccionados.

Otros detalles acerca de las exigencias de cada organismo designado / seleccionado se obtienen en el *PCT Applicant Guide, Volume II*.

INSTRUCCIONES PARA EL FORMULARIO PCT/ISA/220

Estas instrucciones son indicaciones básicas para la presentación de modificaciones según el artículo 19. Estas observaciones se basan sobre los requisitos del Tratado de Cooperación Internacional en Materia de Patentes (PCT), del reglamento de aplicación y de las normas administrativas del mismo. Ante diferencias entre estas observaciones y los textos mencionados anteriormente son aplicables los últimos. Otros detalles se pueden obtener en el *PCT Applicant's Guide*, una publicación de la WIPO.

Las expresiones "artículo", "regla" y "párrafo" empleados en estas instrucciones se refieren siempre a las disposiciones del Tratado PCT, al reglamento de aplicación PCT o a las normas administrativas PCT.

INSTRUCCIONES CONCERNIENTES A MODIFICACIONES SEGÚN ARTÍCULO 19

Luego de recibir el Informe de Búsqueda Internacional, el solicitante tiene la posibilidad de modificar una vez las reivindicaciones de la solicitud internacional. Sin embargo, se debe hacer notar que, dado que todas las partes de la solicitud internacional (reivindicaciones, descripción y figuras) pueden ser modificadas durante el Examen Preliminar Internacional, no existe usualmente la necesidad de presentar modificaciones de las reivindicaciones según el artículo 19, excepto cuando el solicitante desea la publicación de estas reivindicaciones o presenta algún otro motivo para la modificación de las reivindicaciones de su publicación internacional, por ejemplo, a los fines de una protección provisoria. También se debe tomar en consideración que una protección provisoria se pueda obtener solo en algunos estados.

¿Que partes de una solicitud internacional pueden ser modificadas?

En el marco del artículo 17 solo pueden ser modificadas las reivindicaciones.

En la fase internacional, según el artículo 34, las reivindicaciones también pueden ser modificadas (o nuevamente modificadas) ante el organismo encargado del examen preliminar internacional. Según el artículo 34, la descripción y las figuras solo pueden ser modificadas ante el organismo encargado del Examen Preliminar Internacional.

Al ingresar en la fase nacional, según el artículo 28 o, en caso dado, el artículo 41, pueden ser modificadas todas las partes de la solicitud internacional.

¿Hasta cuando se pueden presentar modificaciones?

Dentro de los dos meses a partir del envío del Informe de búsqueda internacional o dentro de dieciséis meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde. No obstante, las modificaciones son consideradas como válidas cuando son enviadas a la Oficina Internacional luego del plazo establecido pero antes de la conclusión de las preparaciones técnicas para la publicación internacional (regla 48.1).

¿Dónde no se deben presentar las modificaciones?

Las modificaciones solo pueden ser presentadas ante la Oficina Internacional y no en la Oficina de Presentación o en el Organismo de Búsquedas Internacionales (regla 48.2).

Ver abajo donde se pueden presentar un requerimiento de Examen Preliminar Internacional.

¿En que forma pueden ser llevadas a cabo las modificaciones?

Una modificación puede proceder en la versión presentada mediante la eliminación de una o varias reivindicaciones, mediante el agregado de una o varias reivindicaciones nuevas o mediante modificaciones del texto de una o varias reivindicaciones.

Se debe presentar una hoja de reemplazo por cada hoja de reivindicaciones que, como consecuencia de una o varias modificaciones, se diferencia de la presentada originalmente.

Todas las reivindicaciones que aparecen una hoja de reemplazo deben estar numeradas con cifras arábigas. Así, cuando se elimina una reivindicación, las demás no deben ser numeradas nuevamente. En el caso de una nueva numeración, las reivindicaciones deben ser numeradas en forma consecutiva (normas administrativas, ítem 205b)).

Las modificaciones deben estar redactadas en el idioma en que fue publicada la solicitud internacional.

¿Qué antecedentes deben acompañar a las modificaciones?

Escrito adjunto (ítem 205b)):

Las modificaciones se deben presentar con un escrito adjunto.

El escrito adjunto no se publica junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas. No se debe confundir con "declaración según artículo 19(1)" (Ver abajo, "aclaración según artículo 19(1)").

El escrito adjunto puede estar redactado, a elección del solicitante, en idioma inglés o francés. En solicitudes internacionales vertidas en idioma inglés, el escrito adjunto debe estar redactado asimismo en idioma inglés y en las solicitudes internacionales redactadas en idioma francés en idioma francés.

64

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

PCT
Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente 52351AWOM1	PROCEDER Ver notificación del envío del informe de búsqueda internacional (formulario PCT/ISA/220), así como, en tanto corresponda, el siguiente punto 5.	
Referencia Internacional PCT/US 03/18741	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) 28 de mayo de 2003 (28/05/2003)	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 31 de mayo de 2002 (31/05/2002)
Solicitante SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el organismo de búsquedas internacionales y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este Informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 3 hojas.

- ☒ Se adjunta también una copia de cada uno de los antecedentes del estado de la técnica mencionados en este Informe

1. Fundamentos del Informe

- a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo, en tanto no se indique otra cosa en este punto, en el idioma en que se basa la solicitud internacional presentada.

- ☐ La búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre una traducción de la solicitud internacional suministrada a este organismo (regla 23.1 b)).

- b. Con respecto a los nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional, la búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre el protocolo de secuencias que

- ☒ está contenido en forma escrita en la solicitud internacional.
☒ fue presentado en forma legible por computadora junto con la solicitud internacional.
☐ fue suministrado posteriormente al organismo por escrito.
☐ fue suministrado posteriormente al organismo en forma legible por computadora.
☐ se presentó la declaración de que el protocolo de secuencia suministrado posteriormente no supera el contenido revelado en la solicitud internacional en el momento de la presentación.
☐ se presentó la declaración de que las informaciones vertidas en forma legible por computadora se corresponden con el protocolo de secuencias suministrado por escrito.

2. ☐ Determinadas reivindicaciones no eran investigables (ver campo I).

3. ☐ Falta de uniformidad de la invención (ver campo II).

4. Con respecto al título de la invención,

- ☒ se aprueba el texto tal como fue presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por este organismo como sigue:

5. Con respecto al resumen,

- ☒ se aprueba el texto tal como fue presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por este organismo de acuerdo con la regla 38.2 b), tal como aparece en el campo III. El solicitante puede presentar una posición ante este organismo en el transcurso de un mes a partir de la fecha del envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. La figura de las ilustraciones a ser publicada con el resumen es la figura N° _____

- ☐ como es sugerida el solicitante ☒ ninguna de las figuras
☐ porque el solicitante no sugiere ninguna figura.
☐ porque esta figura caracteriza mejor la invención.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Referencia Internacional PCT/US 03/16741
A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
IPC(7) :	C07H 21/02, 21/04; A61K 48/00; C12N 15/85, 15/86; C12Q 01/68; C12P 19/34	
US CL :	435/8, 91.1, 91.3, 325, 375, 538/23.1, 24.5, 514/44	
Según la clasificación internacional de patentes (IPC) o la clasificación internacional la IPC		
B. ÁMBITOS INVESTIGADOS		
Material mínimo investigado (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación)		
U.S. : 435/8, 91.1, 91.3, 325, 375, 538/23.1, 24.5, 514/44		
Documentación buscada pero distinta a la documentación mínima, en tanto pertenezcan al ámbito investigado		
Bancos electrónicos de datos consultados durante la búsqueda internacional (nombre del banco de datos y (cuando corresponde, expresiones de búsqueda empleadas)		
STN, MEDLINE, CAPLUS, LIFE8CI, EMBASE, USPATFULL, BIOSIS		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Denominación del documento, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Relevante para la reivindicación N°
A	WU ET AL., Characterization of the Corin-Mediated Pro-Atrial Natriuretic Peptide Processing in Murine Cardiac Myocytes. Circulation: Supplement II. 23 de octubre de 2001, Vol. 104, N° 17, ver todo el documento.	1 - 28
Y	THE SANGER CENTER ET AL., Toward a Complete Human Genome Sequence. Genome Research. Octubre 1998, Vol. 8, N° 11, pp. 1087 - 1108, ver aquí referencias de depósitos de secuencias.	1 - 28
Y	YAN ET AL., Corin, a Transmembrane Cardiac Serine Protease, as a Pro-Atrial Natriuretic Peptide Convertase. Hipertensión (Baltimore). Octubre 2000, Vol. 38, N° 4, pp. 709 - 710, ver todo el documento.	1 - 28
Y	HOOPER ET AL., Localization of the mosaic transmembrane serine protease Corin to heart myocytes. European Journal of Biochemistry. Diciembre de 2000, Vol. 267, N° 23, pp. 6831 - 6837, ver todo el documento.	1 - 28
☒ Otras publicaciones están listadas en la continuación del campo C		☐ Ver familia de patentes en el anexo
A	Categorías particulares indicadas en publicaciones que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante	*T*
B	documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional	*X*
L	publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada)	*Y*
O	publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones	*Z*
P	publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada	
Fecha de finalización de la búsqueda internacional 24 de noviembre de 2003 (24.11.2003)		Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional 25 de agosto de 2004)
Nombre y Código Postal del ISA/US Mail Stop PC, Attn.: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Fax: N° (703) 305-3230		Funcionario autorizado Karen A. Lacoursiere (Firmado) Teléfono N° (703)-308-0186

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/US 03/16741

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Denominación del documento, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Relevante para la reivindicación N°
Y	YAN ET AL., Corin: A Mosaic Transmembrane Serine Protease Encoded by a Novel cDNA from Human Heart. FESAB Journal. 23 de abril de 1999, Vol. 13, N° 7, pp. A1567, Abstract 1287, ver todo el documento.	1-28
Y	KATOH ET AL., Molecular Cloning and Characterization of MFRP, a Novel Gene Encoding a Membrane-Type Frizzled-Related Protein. Biochemical and Biophysical Research Communications. 23 de marzo de 2001, Vol. 282, N° 1, pp. 116-123, ver todo el documento.	1-28
X, T	PAN ET AL., Genomic Structures of the Human and Murine Corin Genes and Functional GATA Elements in Their Promoters. The Journal of Biological Chemistry. 11 de octubre de 2002, Vol. 277, N° 41, pp. 38380-38388, ver todo el documento.	1-28
Y	Yan ET AL., Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting system. PNAS. 18 de Julio de 2000, Vol. 87, N° 16, pp. 8525-8529, ver todo el documento.	1-28
X, T	WU ET AL., Processing of Pro-atrial Natriuretic Peptide by Corin in Cardiac Myocytes. The Journal of Biological Chemistry. 10 de mayo de 2002, Vol. 277, N° 19, pp. 16900-16905, ver todo el documento.	1-28
Y	YAN ET AL., Corin, a Transmembrane Cardiac Serine Protease encoded by a Novel cDNA from Human Heart. The Journal of Biological Chemistry. 21 de mayo de 1999, Vol. 274, N° 21, pp. 14928-14935, ver todo el documento.	1-28
Y	WO 99/64608 (SCERING AKTIENGESSELLSCHAFT) 16 de diciembre de 1999 (16.12.99), ver todo el documento.	1-28
Y	WO 01/57188 (HYSEQ, INC.) 09 de agosto de 2001 (09.08.01), ver todo el documento, en particular, las secuencias.	1-28

SECUENCIAS DE CONTROL DEL GEN DE CORINA HUMANO

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N°: 60/384.108, presentada el 31 de mayo, 2002, cuyo contenido se incorpora por completo en este documento a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención provee una nueva región de control de la expresión aislada de genes de corina de mamíferos. Esta región de control activa preferencialmente la transcripción en células cardíacas. Se proveen métodos y composiciones para emplear esta región de control en la identificación de agentes capaces de modular la expresión de corina y en el tratamiento de enfermedades cardíacas.

ANTECEDENTES

La corina, una serina proteasa transmembrana cardíaca, cumple una función importante en la conversión de péptidos natriuréticos pro-atriales (pro-ANP) en ANP (Yan, W. et al. (2000) *PNAS*, 97: 8525-8529; Wu et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 16900-16905). La ANP es una hormona cardíaca que reduce la presión sanguínea elevada promoviendo la excreción de sales, incrementando la producción urinaria, disminuyendo el volumen sanguíneo y relajando la tensión de los vasos de una manera dependiente del receptor. La ANP se ha relacionado con las principales enfermedades cardiovasculares tal como hipertensión e insuficiencia cardíaca (Burnett, J.C. et al.

(1986) *Science*, 231: 1145-1147). En ratones noqueados, una deficiencia ya sea de la ANP o de su receptor causa una hipertensión espontánea (John, S.W. et al. (1995) *Science* 267: 679-681; John, S.W. et al. (1996) *Am. J. Physiol.* 271, R109-R114; Lopez et al. (1995) *Nature* 378: 65-68). Se considera que el paso de activación de la conversión de pro-ANP en ANP es crítico en la regulación de la hormona cardíaca.

La corina tiene una estructura predicha de una proteína transmembrana de tipo II que contiene dos motivos ricos en cisteína tipo *frizzled*, ocho repeticiones del receptor de LDL, un dominio tipo receptor del secuestrante de macrófagos y un dominio de proteasa tipo tripsina en la región extracelular (Yan et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 14926-14935). La topología general de la corina es similar a la de otras serina proteasas transmembrana de tipo II incluyendo hepsina, enteroquinasa, MT-SP1/matriptasa, proteasa tipo tripsina de la vías respiratorias humanas, TMPRSS2, TMPRSS3/TADG-12, TMPRSS4, MSPL y *Stubble-stubloid*. Las topologías similares así como las distintas estructuras modulares sugieren que estas proteínas comprenden una familia de genes que evolucionó por duplicación y reordenamiento de exones ancestrales.

El gen humano abarca > 200 kb y contiene 22 exones. Los límites de intrones/exones están bien conservados entre las

especies, donde la mayoría de los exones codifican dominios estructurales. Se ha descrito previamente la clonación, tanto en ratones como en humanos, del ADNc que codifica la proteína corina (Yan et al. *ibid*). El análisis de transferencia Northern mostró que el ARNm de la corina es de gran expresión en el corazón de seres humanos. El análisis por hibridación con fluorescencia *in situ* permitió mapear el gen de la corina humana en el brazo corto del cromosoma 4 (4p12-13), donde se había localizado previamente el locus de una enfermedad cardíaca congénita que presenta un retorno venoso pulmonar completamente anómalo.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el aislamiento, la clonación y la identificación de las regiones de control de la expresión del gen de corina de mamíferos, incluyendo el promotor y otros elementos reguladores, y el uso de esta región de control de la expresión específica del corazón para identificar nuevos agentes que modulan la expresión del gen de corina y para tratar enfermedades cardíacas.

Para tal fin, uno de los objetos de la presente invención consiste en proveer un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina, donde dicha región de control modula la transcripción de cualquier polinucleótido heterólogo con el cual se liga

operativamente, incluyendo, a modo de ejemplo, el gen de corina humana.

La región de control de la expresión de la corina dirige la transcripción específica del corazón de los polinucleótidos heterólogos a los cuales está ligado operativamente, comprende uno o más elementos reguladores de la transcripción seleccionados del grupo formado por GATA, Tbx-5, NKx2.5, el factor de transcripción de tipo Krüppel o sitios de unión NF-AT, y tiene capacidad para unirse a las proteínas de la transcripción, por ejemplo GATA-4.

Otro objeto de la invención consiste en proveer polinucleótidos que comprenden una región de control de la expresión de corina humana. El polinucleótido preferido de la invención se localiza en los nucleótidos -4037 a -15 (SEQ ID N°: 6), más preferentemente en los nucleótidos -1297 a -15 (SEQ ID N°: 5) y más preferentemente aún en los nucleótidos -405 a -15 (SEQ ID N°: 4), donde dicha numeración es relativa al sitio de inicio de la traducción (ATG) del gen de corina humana o su cadena complementaria, tal como se muestra en la figura 8 (SEQ ID N°: 2).

De acuerdo con este aspecto de la invención también se proveen fragmentos y variantes de estos polinucleótidos.

Otro objeto de la invención consiste en proveer vectores que comprenden la región de control de la expresión de corina, o fragmentos o variantes de la misma. En otras

realizaciones, el vector también comprende un polinucleótido heterólogo, por ejemplo corina, ligado operativamente a la región de control de la expresión de corina. De acuerdo con este aspecto de la invención, también se proveen células huésped transfectadas con dichos vectores, y métodos para expresar los productos codificados por dichos polinucleótidos heterólogos.

Otro objeto de la invención consiste en proveer composiciones farmacéuticas que comprenden un vector que contiene la región de control de la expresión de corina ligada operativamente a un polinucleótido heterólogo o una célula huésped transfectada con dicho vector, en un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

Otro objeto de la invención consiste en proveer un método para identificar un agente que puede modular la expresión de un gen de corina humana en una célula, donde dicho método comprende:

- (a) producir un vector recombinante en el cual el polinucleótido aislado, que comprende una región de control de la expresión de la corina de mamífero, está ligado operativamente a un gen informante;
- (b) transfectar la célula con el vector recombinante;
- (c) tratar la célula con el agente;
- (d) medir el nivel de transcripción de la secuencia informante en la célula tratada; y

(e) comparar el nivel de expresión de la secuencia informante en presencia del agente con el nivel de expresión en una célula transfectada control que no ha sido tratada con el agente.

En una realización preferida, se utilizan miocitos cardíacos.

Otro objeto de la invención consiste en proveer un método para modular la expresión de un gen específico del corazón en un sujeto humano, donde dicho método comprende:

(a) producir un vector recombinante en el cual un polinucleótido aislado comprende una región de control de la expresión de la corina de mamíferos ligada operativamente a un polinucleótido heterólogo; y

(b) administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz en términos terapéuticos del vector.

Una realización preferida de este aspecto de la invención es un vector en el cual el polinucleótido heterólogo codifica corina. También son preferidas las realizaciones en las cuales la región de control de la expresión de corina se selecciona entre los polinucleótidos que poseen las secuencias de las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 o SEQ ID N°: 6.

Otro objeto de la invención consiste en proveer un método de tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión o infarto de miocardio en un sujeto

humano, donde dicho método comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad eficaz en términos terapéuticos de un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina, ligado operativamente a un gen seleccionado del grupo formado por corina, el péptido natriurético atrial (ANP), péptido natriurético de tipo B, fosfonolambano, enzima convertidora de angiotensina (ACE) o formas dominantes negativas de estos genes. Como alternativa, la región de control de la expresión de la corina puede estar ligada operativamente a un polinucleótido que codifica una molécula de ARN antisentido.

En una realización preferida de este aspecto de la invención el gen seleccionado es corina.

Otro aspecto de la invención consiste en proveer un método de tratamiento de un sujeto humano que sufre de insuficiencia cardíaca, donde dicho método comprende:

(a) producir un vector recombinante en el cual el polinucleótido aislado comprende una región de control de la expresión de la corina de mamífero, ligado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo formado por ANP, péptido natriurético de tipo B, fosfonolambano, ACE o formas dominantes negativas de estos genes; y

(b) administrar el vector recombinante, en un vehículo aceptable para uso farmacéutico, a dicho sujeto.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Organización de los genes de corina de mamífero. Organización de los genes de corina (A) humanos y (B) de ratón. Se secuenciaron dos clones BAC con una estrategia de *shotgun* [o rifle] y se indican los tamaños de las secuencias ensambladas del inserto. Las barras verticales indican exones. El clon de plásmido usado para la subclonación del BAC 26540 en el gen humano está indicado con los sitios de enzimas de restricción (H, *Hind* III; E, *Eco*RI). El inserto del subclon fue secuenciado utilizando un método de extensión con cebadores que emplea secuenciación automática. En la parte inferior se muestran las posiciones de los clones BAC, Contig y un clon plásmido que abarca el gen de la corina.

Figura 2. Posiciones de los límites de intrones-exones con relación al dominio de la proteína corina. Los exones 1 a 22 (panel superior) del gen de corina están alineados con sus correspondientes dominios de proteína. TM, dominio transmembrana; *Frizzled*, el dominio rico en cisteína tipo *frizzled*; LDLR, repeticiones del receptor de LDL; SRCR, dominio rico en cisteína del receptor del secuestrante; H, D y S, los residuos His, Asp y Ser de la tríada catalítica del dominio de la proteasa.

Figura 3. Alineación de las regiones flanqueadoras 5' de los genes de corina humanos (SEQ ID N°: 1) y de ratón

(SEQ ID N°: 3). La región flanqueadora 5', el exón 1 y parte del intrón 1 están alineados entre los genes humano y de murino. La numeración es relativa al iniciador de la traducción ATG (fuente resaltada y en cursiva). Los números indicados son diferentes en humanos y ratones debido a la divergencia en los primeros exones. La flecha indica la unión entre el primer exón e intrón del gen de corina humano y la secuencia de procesamiento del donante del intrón 1 humano está subrayada. Las secuencias reguladoras putativas están indicadas y resaltadas (sitio Tbx5 para unión a Tbx5, una caja T que contiene al factor de transcripción; NF-AT, un sitio de unión para el factor nuclear de células T activadas; GATA, un elemento de unión para proteínas GATA; caja GT para la unión a factores tipo Krüppel; caja TATA para la unión al factor de transcripción basal TFIID; y NKE, un motivo de unión para Nkx2.5). La secuencia NKE, que se superpone con la secuencia GATA proximal, está subrayada.

Figura 4. Análisis funcional de la actividad del promotor del gen de corina en cardiomiocitos cultivados. Diagrama de las construcciones informantes que contienen segmentos truncados en serie de la región flanqueadora 5' de genes de corina humanos y de murinos ligados al gen de la luciferasa (Panel A). Se indican las ubicaciones de los elementos reguladores putativos. Estas construcciones fueron co-transfectadas en células HL-5 de ratón con pRL-SV40, un

plásmido que expresa luciferasa de Rellina dirigido por el promotor viral SV40. La actividad luciferasa expresada por cada construcción se normalizó con la actividad de la luciferasa de Rellina expresada por el pRL-SV40 para cada transfección. Cada experimento de transfección se realizó por triplicado para cada construcción. Los datos representan la media $\pm$ D.E. de tres experimentos independientes (Panel B).

Figura 5. Expresión específica del corazón de las secuencias flanqueadoras 5' de los genes de corina humanos y de murinos. Los cardiomiocitos HL5 y las células epiteloides HeLa fueron transfectadas con las construcciones indicadas, cada una junto con la construcción control pRL-SV40. Las actividades de luciferasa y Rellina se expresan como unidades de luz por alícuota de 20 μ l de los extractos celulares de las células transfectadas. Cada experimento de transfección se efectuó por triplicado. Los datos representan la media $\pm$ D.E. de tres experimentos independientes.

Figura 6. Unión de proteínas nucleares a la secuencia reguladora que abarca el elemento GATA proximal.

A: Secuencias de los oligonucleótidos de la cadena superior usadas como sondas y competidores. Los motivos GATA en cada secuencia (SEQ ID N°: 11 y 13, para humanos y ratones, respectivamente) están resaltados y los nucleótidos

mutados (SEQ ID N°: 12 y 14, para humanos y ratones, respectivamente) están en cursiva. Los elementos GATA proximales de humanos y murinos son de las regiones indicadas de las secuencias flanqueadoras 5' de corina. La sonda consenso GATA (SEQ ID N°: 15) que contiene dos motivos GATA deriva de la región potenciadora específica del receptor de células T humanas.

B: La sonda consenso GATA marcada (SEQ ID N°: 15), o su sonda mutante (SEQ ID N°: 16), se incubó con extractos nucleares de células HL-5 en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de los oligonucleótidos no marcados indicados. La flecha indica un complejo de ADN-proteína dependiente de la secuencia GATA.

C: La sonda consenso GATA marcada se incubó con extractos nucleares de células HL-5 en presencia de anticuerpos contra proteínas GATA. La flecha indica el complejo de ADN-proteína cuya formación fue bloqueada por un anticuerpo contra GATA-4, pero no con anticuerpos contra GATA-1, -3 y -6.

D: El elemento GATA marcado de la corina humana se incubó con extractos nucleares de HL-5 en presencia o ausencia de un anticuerpo contra GATA-4. La flecha indica el complejo de ADN-proteína cuya formación fue bloqueada completamente en presencia del anticuerpo anti-GATA-4.

Figura 7. Análisis mutacional de los elementos GATA proximales conservados. Se introdujeron las mismas mutaciones (GATA en CTTA) que eliminan la unión de la proteína GATA-4 en EMSA en las construcciones informantes de luciferasa dirigidas por las regiones flanqueadoras 5' de -642 a -77 en ratón o de -405 a -15 en humano. Las construcciones mutantes y de tipo salvaje fueron transfectadas en células HL-5, cada una junto con la construcción control pRL-SV40. La actividad luciferasa expresada por cada construcción fue normalizada para la actividad luciferasa de Renilla expresada por pRL-SV40 para cada transfección. La actividad del promotor de cada construcción mutante se expresó como un porcentaje de la correspondiente construcción de tipo salvaje. Cada experimento de transfección se efectuó por triplicado. Los datos representan la media $\pm$ D.E. de tres experimentos independientes.

Figura 8. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 2) de la región flanqueadora 5' del gen de corina humano. La secuencia de 4165 pares de bases contiene la región flanqueadora 5', el primer exón y el comienzo del intrón 1 (en minúscula). Toda la numeración es relativa al sitio de inicio de la traducción (ATG, resaltado y subrayado). Los elementos reguladores putativos están resaltados. Las

abreviaturas de los elementos reguladores putativos se describieron en la leyenda de la figura 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el aislamiento, la clonación y la identificación de la región de control de la expresión del gen de corina específico del corazón, incluyendo el promotor y otros elementos reguladores. La región de control de la expresión de corina aislada, y fragmentos y variantes de la misma, son de utilidad en la construcción *in vitro* e *in vivo* de modelos experimentales para estudiar la modulación de la expresión del gen de corina y para identificar nuevos moduladores de la expresión del gen de corina. La región de control de la expresión también se puede usar en las terapias genéticas dirigidas a los estados de enfermedad del corazón, por ejemplo la insuficiencia cardíaca.

Definiciones

Tal como se utilizan en la memoria descriptiva, en los ejemplos y en las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado a continuación.

Un "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos, ya sea en la forma de cadenas simples o dobles. El término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos

de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces modificados de la estructura principal, que son sintéticos, naturales y no naturales, que presentan propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia, y que son metabolizados de manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitaciones, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, péptidos-ácidos nucleicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las cuales la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida por residuos mixtos básicos y/o de desoxiinosina (Batzner et al. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19: 5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 2605-08; Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell. Probes*, 8: 91-98). El término ácido nucleico se usa indistintamente con los términos gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

Una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente "variantes de procesamiento". De manera similar, una proteína particular codificada por un ácido nucleico abarca implícitamente cualquier proteína codificada por una variante de procesamiento de dicho ácido nucleico. Las "variantes de procesamiento", como lo sugiere su nombre, son los productos de procesamientos alternativos de un gen. Después de la transcripción, el transcripto inicial de ácido nucleico puede ser procesado de forma tal que los diferentes (alternativos) productos de procesamiento del ácido nucleico codifican distintos polipéptidos. Los mecanismos de producción de variantes de procesamiento varían, pero incluyen un procesamiento alternativo de exones. Los polipéptidos alternativos derivados del mismo ácido nucleico por transcripción directa también están comprendidos por esta definición. Cualquiera de los productos de una reacción de procesamiento, incluyendo las formas recombinantes de los productos de procesamiento, está incluido en esta definición.

El "gen de corina" se refiere a un gen que codifica una secuencia de aminoácidos contiguos que comparten al menos un 60% aproximadamente (preferentemente un 75%, 78%, 90%, y más preferentemente un 95% aproximadamente) de identidad con la secuencia de aminoácidos del gen de corina humano descrito en Yan et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 14926-14935).

La "región de control de la expresión de corina" o la "región de control de la expresión" se refiere a un polinucleótido ubicado dentro de la secuencia genómica 5' con respecto a la región de codificación de los genes de corina de mamífero naturales. En el gen de corina humano, la región de control de la expresión de corina comienza por el nucleótido -4165 y termina en el nucleótido -15 con relación al sitio de inicio de la traducción (ATG) del gen de corina, o su cadena complementaria, tal como se muestra en la figura 8. La región de control de la expresión de la corina puede activar la transcripción del gen de corina en el tejido cardíaco (miocitos). Los polinucleótidos que comprenden la región de control de la expresión de la corina pueden variar en un rango de 100 a 5000 nucleótidos de longitud; las realizaciones particulares de la región de control de la expresión de la corina funcional humana son de 4023, 1283 ó 391 nucleótidos (SEQ ID N°: 6, 5 y 4, respectivamente) de longitud. Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina son en general al menos un 70% homólogos de estas secuencias. En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina son al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% o 100% homólogos de estas secuencias. El término "región de control" no incluye los codones de inicio o terminación y las otras secuencias ya descritas en Yan et al. *ibid.* La

región de control de la expresión de la corina contiene sitios de unión para diversas proteínas reguladoras de la transcripción, por ejemplo GATA-4, que se pueden ligar de una manera que es sustancialmente la misma que en la naturaleza o de una manera artificial. La región de control de la expresión de la corina activa la transcripción del gen de corina o de otros polinucleótidos heterólogos que están ligados operativamente a la misma, en particular de una manera específica del corazón.

La "expresión específica del corazón" significa que el polinucleótido se transcribe con un mayor índice en células derivadas del corazón que en las células no cardíacas. Por consiguiente, la región de control de la expresión de la corina generalmente activará la transcripción de un polinucleótido ligado con una eficacia al menos 2 veces mayor en miocitos cardíacos que en las células no cardíacas, donde la expresión en cada caso se normaliza para la transcripción de otros polinucleótidos ligados al promotor/potenciador SV40 u otro promotor constitutivo.

Una o más "variantes" de los polinucleótidos, tal como se utilizan aquí, son polinucleótidos que difieren de la secuencia de polinucleótidos de un polinucleótido de referencia. En general, las diferencias son limitadas de modo que las secuencias de polinucleótidos de la referencia y la variante son bastante similares en general y en muchas

regiones son idénticas. Las diferencias son tales que no se ve alterada la función del polinucleótido y, si el polinucleótido normalmente codifica un polipéptido, el polipéptido resultante no está cambiado en cuanto a secuencia de aminoácidos o, aunque posee diferencias en la secuencia de aminoácidos, aún es funcionalmente idéntico.

Los "fragmentos", tal como se utilizan aquí, se refieren a un polinucleótido cuya secuencia de polinucleótidos es enteramente la misma que una parte, pero no toda, la secuencia de polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina mencionada precedentemente y variantes de la misma. Dichos fragmentos conservan la capacidad de la región de control de la expresión de corina para dirigir una transcripción específica del corazón de los polinucleótidos heterólogos a los cuales están ligados operativamente.

Los "elementos de inicio de la transcripción" se refieren a las secuencias en un promotor que especifican el sitio de inicio de la ARN polimerasa II. Los elementos del inicio de la transcripción pueden incluir cajas TATA, que dirigen el inicio de la transcripción de unas 25-35 bases hacia el extremo 3', o elementos iniciadores, que son secuencias localizadas cerca del propio sitio de inicio de la transcripción. Los promotores eucariotas comprenden en general elementos de inicio de la transcripción y ya sea

elementos promotores-proximales, elementos potenciadores distantes o ambos.

El término "recombinante" utilizado con referencia, por ejemplo, a una célula o a un ácido nucleico, a una proteína o a un vector, indica que dicha célula, ácido nucleico, proteína o vector ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico o una proteína heteróloga o indica una alteración del ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula deriva de una célula modificada de esa manera. Por consiguiente, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de lo contrario se expresan anormalmente, se subexpresan o no se expresan.

Un "potenciador" se refiere a una región reguladora de ADN que aumenta la transcripción. Un potenciador habitualmente se localiza fuera de la región promotora proximal, aunque no siempre es así, y se puede ubicar a varios kilobases o más del sitio de inicio de la transcripción, aún en posición 3' con respecto a la secuencia de codificación o dentro de los intrones del gen. Los promotores y potenciadores pueden conferir, ya sea solo o en combinación, una expresión específica de tejidos.

El término "silenciadora" se refiere a una región de control de ADN que, cuando está presente en el contexto

natural del gen de corina suprime la transcripción con dicho promotor, ya sea por sus propias acciones como un segmento de ADN discreto o a través de las acciones de factores que actúan en trans que se unen a dichos elementos y ejercen un control negativo de la expresión del gen. Este elemento puede cumplir un rol en el patrón de tipo restringido de expresión celular para el gen de corina, por ejemplo la expresión puede ser permisiva en los cardiomiocitos donde dicho silenciador puede estar inactivo, pero estar restringida en otros tipos celulares en los cuales dicho silenciador es activo. Este elemento puede, o no, funcionar aisladamente o en una construcción promotora heteróloga.

El término "aislado" con referencia, por ejemplo, a un polinucleótido significa que el material es eliminado de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se trata de un polinucleótido natural), y aislado o separado de al menos un componente adicional con el cual está asociado naturalmente. Por ejemplo, un polinucleótido natural presente en su huésped vivo natural no está aislado, pero el mismo polinucleótido, separado de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían formar parte de una composición, y aún estar aislados por cuanto dicha composición no forma parte de su entorno natural.

El "porcentaje de identidad", o identidad porcentual, con referencia a una secuencia, significa que dicha secuencia se compara con un elemento reivindicado o una secuencia descrita después de alinear dicha secuencia a comparar con la secuencia descrita o reivindicada. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad y de similitud entre dos secuencias se pueden llevar a cabo usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de dicho algoritmo matemático se describe en Karlin et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) descritos en Altschul et al. (1997) *Nucleic Acid Res.* 25: 3389-3402.

Una "gran severidad", tal como se utiliza aquí, significa, por ejemplo, incubar un transferido durante la noche (por ejemplo, al menos 12 horas) con una sonda de polinucleótidos larga en una solución de hibridación que contiene, por ejemplo, SSC 5X, SDS 0,5%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml y formamida 50%, a 42 °C. Los transferidos se pueden lavar bajo condiciones de gran severidad que permiten, por ejemplo, una falta de coincidencia de bp menor que un 5% (por ejemplo, dos lavados en SSC 0,1X y SDS 0,1% durante 30 min a 65 °C), seleccionando así las secuencias que poseen, por ejemplo, un 95% o más de identidad de secuencia.

Un polinucleótido se "expresa" cuando una copia de ADN del polinucleótido es transcrita en ARN.

Un polinucleótido está "ligado operativamente" a una región de control de la expresión de corina cuando la conjunción del polinucleótido y la región de control de la expresión de corina en una sola molécula da como resultado la transcripción del polinucleótido, más preferentemente en una transcripción específica del corazón (en los miocitos).

Un "polinucleótido heterólogo" se refiere a polinucleótidos, distintos de los de la región de control de la expresión de corina, que están ligados operativamente a una región de control de la expresión de corina y que se expresan preferencialmente en células específicas del corazón. El polinucleótido ligado codifica una molécula de utilidad terapéutica, por ejemplo un polipéptido, un ARN antisentido. Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a un material que está sustancialmente o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica, tal como electroforesis sobre gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta presión. Una proteína que es la especie predominante en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un ácido nucleico aislado es separado de los marcos de lectura

abiertos que flanquean al gen y codifican otras proteínas. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o una proteína dará lugar esencialmente a una banda en un gel de electroforesis. En particular, significa que el ácido nucleico o la proteína es al menos un 85% puro, más preferentemente al menos un 95% puro y con mayor preferencia al menos un 99% puro.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos comprenden un mimético químico artificial del correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales comprenden los aminoácidos que están codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que son modificados posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que presentan la misma estructura química básica que el aminoácido natural, es

decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos contienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos de péptidos modificados, pero que retienen la misma estructura química básica que los aminoácidos naturales. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que poseen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar al aminoácido natural.

En la presente se puede hacer referencia a los aminoácidos ya sea por sus símbolos conocidos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura en Bioquímica de IUPAC-IUB. Asimismo, se puede hacer referencia a los nucleótidos por su código de una sola letra comúnmente aceptado.

El término "variantes modificadas conservadoramente" se aplica a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas conservadoramente se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración

del código genético, hay una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos que codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos al aminoácido alanina. Por consiguiente, en cada posición donde una alanina es especificada por un codón, dicho codón puede ser alterado en cualquiera de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silentes", que comprenden una especie de variaciones modificadas conservadoramente. Aquí, cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe cada variación silente posible del ácido nucleico. El especialista comprenderá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que comúnmente es el único codón para metionina, y TGG, que comúnmente es el único codón para triptofano) puede ser modificado para obtener una molécula funcionalmente idéntica. Por lo tanto, cada variación silente de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está incluido implícitamente en cada secuencia descrita.

Con respecto a las secuencias de aminoácidos, el especialista comprenderá que es posible efectuar sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, de péptidos, polipéptidos o proteína que altera, añade o suprime un solo aminoácido o

bien, un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservadoramente", donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en el arte. Dichas variantes modificadas conservadoramente están incluidas y no excluyen las variantes polimórficas, los homólogos entre especies y los alelos de la invención.

Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que constituyen sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano. (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

Véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984).

Un "vector de expresión" se refiere a una construcción de ácido nucleico, generada por recombinación o síntesis, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados

que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede formar parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el vector de expresión incluye el ácido nucleico que será transcrito ligado operativamente a una región de control de la expresión, por ejemplo la región de control de la expresión de corina.

Un "excipiente aceptable para uso farmacéutico" se refiere a un vehículo aceptable, y cualquier sustancia auxiliar aceptable para uso farmacéutico requerida para que sea compatible con las condiciones fisiológicas, que no son tóxicos y que no afectan adversamente la actividad biológica de la composición farmacéutica suspendida o incluida en la misma. Los excipientes adecuados serán compuestos tales como manitol, succinato, glicina o albúmina de suero.

Una "cantidad eficaz en términos terapéuticos" se refiere a una cantidad de un compuesto de la invención que, cuando es administrado a un sujeto que lo necesita, es suficiente para el tratamiento, definido más adelante, de pacientes que sufren de, o que pueden desarrollar, enfermedades cardíacas. La cantidad de un compuesto que constituye una "cantidad eficaz en términos terapéuticos" varía dependiendo del compuesto, pero puede ser determinada mediante procedimientos de rutina por el especialista en el arte teniendo en cuenta su conocimiento y esta descripción..

Los términos "tratar" o "tratamiento", tal como se utilizan aquí, abarcan el tratamiento de enfermedades cardíacas e incluyen:

(a) prevenir la aparición de una enfermedad cardíaca en un ser humano, en particular cuando dicho ser humano tiene una predisposición para sufrir de estas afecciones;

(b) inhibir la enfermedad cardíaca, es decir detener su desarrollo; o

(c) aliviar una enfermedad cardíaca, es decir causar un retroceso de las afecciones.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con la clonación e identificación de la región de control de la expresión de un gen de corina de mamífero (por ejemplo ratón, ser humano), incluyendo el promotor y otros elementos reguladores y el uso de esta región de control de la expresión para identificar agentes que modulan la expresión del gen de corina y su uso en el tratamiento de enfermedades cardíacas. En particular, la invención se relaciona con polinucleótidos que comprenden una nueva región de control de la expresión de la corina humana y la capacidad de esta región de control para dirigir la expresión específica del corazón de polinucleótidos heterólogos ligados operativamente a la misma.

Aislamiento y caracterización de polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina

Esta invención se basa en técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley y Sons, Nueva York, NY, 1994).

Organización del gen de corina de mamífero

En la figura 1 se muestra la organización de los genes de corina humanos y de murinos y la ubicaciones de clones BAC (cromosoma artificial bacteriano), contig y un clon de plásmido que contiene a los genes de corina y sus regiones flanqueadoras 5'. Ambos genes de corina, humano y de murino, abarcan al menos 200 Kb y consisten de 22 exones y 21 intrones.

La secuencia de ADNc de corina predice una proteína compuesta de numerosos dominios discretos. Los límites entre los dominios de la proteína corresponden casi exactamente a los límites de exones/intrones de la estructura genómica, como se ilustra esquemáticamente en la figura 2. La cola citoplasmática por el extremo N-terminal está codificada por el exón 1 y la mitad del exón 2, seguido del dominio

transmembrana que está codificado por la otra mitad del exón 2. La región entre el dominio transmembrana y el primer dominio *frizzled* está codificada por el exón 3. Cada uno de los dominios *frizzled* está codificado por dos exones, cada uno de los ocho LDLR por un solo exón y el dominio rico en cisteína del receptor del secuestrante por tres exones. El dominio de proteasa por el extremo C-terminal está codificado por los exones 19 a 22, donde el exón 19 codifica la secuencia que incluye el sitio de activación proteolítica y el residuo histidina catalítico. Los exones 20 y 22 codifican las secuencias que incluyen los otros dos residuos catalítico, ácido aspártico y serina, respectivamente.

Clonación de la región de control de la expresión de corina

Para clonar los genes de corina humano y de murino y sus regiones flanqueadoras 5', se sintetizaron oligonucleótidos específicos correspondientes a las secuencias de ADNc de corina publicados para estos genes (Yan et. al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 14926-14935). Estos cebadores de oligonucleótidos fueron evaluados amplificando productos específicos en reacciones basados en PCR usando ADN genómico humano o murino. Los pares de cebadores que amplificaron exitosamente los productos específicos por la PCR se usaron luego en un examen basado en PCR para identificar clones BAC que contenían el gen de corina humano o murino y/o sus correspondientes regiones flanqueadoras 5'.

Los clones BAC positivos identificados fueron secuenciados directamente mediante una estrategia *shotgun* o subclonados en el pUC118 (PanVera/Takara, Madison, WI) para la secuenciación. El ensamblaje de las secuencias con *shotgun* se efectuó usando el paquete Staden (Bonfield et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 4992-4999).

Se obtuvieron cuatro clones BAC, dos contienen genes de corina humanos y dos contienen genes de corina de murinos, en un procedimiento basado en PCR. Se secuenciaron tres de los clones BAC usando una estrategia *shotgun* y estas secuencias, en combinación con la información en el archivo de seguimiento disponible en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Traces/trace.cgi>, <http://trace.ensembl.org>), que se usaron para ensamblar una secuencia contigua de 340 kb que contiene al gen de corina humano, y para determinar las secuencias de 5 contigs para el gen de corina de murinos. Para dicho gen de corina murino, se confirmó el orden de los 5 contigs por la existencia de varios pares de lectura apareados en los respectivos contigs vecinos. La distancia de los mismos permitió determinar que el tamaño del hueco o de la falta de coincidencia era menor que 500 bp, porque el tamaño del inserto de las bibliotecas *shotgun* disponibles al público estaba bien definido. Luego se analizaron las estructuras de los genes de corina humanos y de murinos. Sin embargo, la secuencia genómica humana de 340 kb no contenía

la región flanqueadora 5'. Se aisló un fragmento Hind III-EcoR I adicional de 4165 bp del BAC 26540, que incluía los primeros 3919 bp de la región flanqueadora 5', todos del exón 1 y parte del intrón 1 (enviado al banco de datos GenBank™/EBI con el número de acceso AF521006).

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina descritos en la presente derivaban todos del fragmento Hind III-EcoR I de 4165 bp (véase la figura 8, SEQ ID N°: 2) aislado del BAC26540. Estos polinucleótidos de la región de control de la expresión se obtuvieron con un método basado en PCR o con digestión con enzimas de restricción o una combinación de ambos. Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina de 4023 bp (SEQ ID N°: 6) se amplificaron a partir del fragmento Hind III-EcoR I de 4165 bp o del ADN genómico humano usando los cebadores F1 (5'-AAGCTTCATGAGGGCAGGAG-3') (SEQ ID N°: 7) y R1 (5'-GAGCTCGCTTATTCTTCTGTCCACTT-3') (SEQ ID N°: 8). De manera similar, se amplificaron los polinucleótidos la región de control de la expresión de la corina de 1283 bp (SEQ ID N°: 5) usando los cebadores F2 (5'-AAGCTTATAAAAATAATAGCTTCTTC-3') (SEQ ID N°: 9) y R1 y los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina de 391 bp (SEQ ID N°: 4) se amplificaron usando los cebadores F3 (5'-AAGCTTAGTAACTCTTTTGCTCCCAA-3') (SEQ ID N°: 10) y R1.

Cualquier tejido de mamífero, tal como leucocitos, de los cuales es posible extraer fácilmente el ADN, constituye una fuente adecuada de ADN genómico para el aislamiento de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina de mamífero.

Polinucleótidos funcionales de la región de control de la expresión de corina

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina descritos previamente fueron evaluados por su actividad de transcripción específica del corazón ligando operativamente los polinucleótidos de una región de control de la expresión dada a un gen informante, transfectando la construcción en miocitos cardíacos y evaluando luego la capacidad de la secuencia de polinucleótidos de dicha región de control de la expresión particular para dirigir una transcripción específica del corazón del gen informante. Los informantes de genes codifican típicamente proteínas que tienen una actividad enzimática fácilmente evaluable, que no está presente naturalmente en la célula huésped. Las proteínas informantes típicas para los promotores eucariotas incluyen cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciérnaga o luciferasa de Renilla, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, fosfatasa alcalina y proteína fluorescente

verde (GFP). El gen informante preferido es la luciferasa de luciérnaga.

El sistema para evaluar la actividad de la región de control de la expresión de corina puede ser una transfección transitoria o estable en líneas celulares cultivadas. Los vectores de ensayo que contienen los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina ligados operativamente a los genes informantes pueden ser transfectados en cualquier línea celular de mamífero para evaluar la actividad del promotor; por información sobre los métodos de cultivo celular, transfección y evaluación de genes informantes véase Ausubel et al. (2000), *supra*; *Transfection Guide*, Promega Corporation, Madison, WI (1998). Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina pueden ser evaluados por su actividad de transcripción específica del corazón por transfección de los vectores de ensayo en paralelo en líneas celulares derivadas y no derivadas del corazón. Típicamente, un vector control que comprende un segundo gen informante dirigido por un promotor conocido, por ejemplo, la luciferasa de *Renilla* dirigida por el promotor temprano/potenciador SV40 (pRL-SV40, Promega, Madison, WI) es co-transfectado junto con dicho vector de ensayo para controlar las variaciones en cuanto a eficacia de transfección o traducción del gen informante entre las distintas líneas celulares.

Como alternativa, la transcripción dirigida por los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina también puede ser detectada por medición directa de la cantidad de ARN transcrita de dicho gen informante. En estas realizaciones, el gen informante puede ser cualquier ácido nucleico que se pueda transcribir de secuencia conocida que no sea expresado de otra manera por la célula huésped. El ARN expresado a partir de las construcciones con los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina puede ser analizado mediante técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, transcripción inversa y amplificación del ARNm, aislamiento de ARN total o ARN poli A⁺, transferencia Northern, transferencia puntual, hibridación *in situ*, protección con RNasa, extensión con cebadores, tecnología de ordenamiento de polinucleótidos de gran densidad y semejantes.

La capacidad de la secuencia de polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina para activar la transcripción se evalúa típicamente con relación a una construcción de control. En una realización, se evalúa la capacidad de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina para activar la transcripción por comparación de la expresión de un gen informante ligado a dichos polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina con la expresión de un gen informante

idéntico no ligado a dicha secuencia. Por consiguiente, en una realización preferida, se compara la expresión de luciferasa entre pRL-SV40 y pRL-SV40, donde la secuencia de polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina fue insertada 5' con respecto al gen de luciferasa (véase el Ejemplo 2, Figura 4). En otras realizaciones, se puede comparar la actividad de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina con la de un promotor conocido. Por consiguiente, se compara la actividad de un gen informante dirigido por los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina con la actividad de un gen informante dirigido por un promotor ya caracterizado (por ejemplo, el promotor/potenciador SV40 en pGL3-Control, Promega, Madison, WI).

La especificidad del corazón de la transcripción dirigida por la región de control de la expresión de corina se puede evaluar comparando la transcripción de un gen informante en células que derivan y que no derivan de tejido cardíaco. Las líneas celulares derivadas del corazón adecuadas para evaluar la transcripción específica del corazón son AT-1 (Claycomb et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2979-2984), HL-1 (Lanson et al. (1992) *Circulation* 85: 1835-1841) y HL-5 (Wu et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 16900-16905). Una línea celular preferida es la línea celular HL-5. Se puede emplear cualquier línea celular de

mamífero fácilmente transfectable para evaluar la actividad de la región de control de la expresión de corina en células no cardíacas (por ejemplo, células HeLa, ATCC N° CCL2). En el Ejemplo 3 (Fig. 5), se demuestra la actividad específica del corazón de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina tanto humanos (hCp405LUC) como de ratón (mCp642LUC) mediante comparación de la expresión de luciferasa de luciérnaga a partir de vectores con y sin estos fragmentos de la región de control de la expresión en líneas celulares HL-5 y HeLa. Para cada ensayo, se normaliza la actividad de la región de control de la expresión de la corina con la actividad del promotor SV40 co-transfectado (es decir, pGL3-Control) con el fin de controlar la variabilidad entre las líneas celulares.

Una vez demostrada la actividad de transcripción específica del corazón de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina, se pueden efectuar y evaluar supresiones, mutaciones, reordenamientos y otras modificaciones de secuencia por su transcripción específica del corazón en los ensayos de la invención. Dichos derivados de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina son de utilidad para generar promotores más compactos, para disminuir la expresión basal en células no cardíacas, para eliminar secuencias represoras o para identificar nuevas proteínas reguladoras de la transcripción

específicas del corazón. Se pueden comparar las secuencias de la región de control de la expresión de corina de seres humanos y roedores para identificar elementos reguladores de la transcripción conservados, incluyendo aquellos que confieren una expresión específica del corazón.

Se pueden construir subfragmentos y derivados de la región de control de la expresión de corina utilizando los métodos de ADN recombinante convencionales conocidos en el arte. Uno de dichos métodos consiste en generar una serie de derivados de supresión dentro de la secuencia de la región de control de la expresión de corina (Ejemplo 2). La comparación de la actividad de transcripción de una serie de supresión, permite localizar los elementos que contribuyen o que disminuyen una transcripción específica del corazón. Sobre la base de dichos análisis, es posible diseñar derivados de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina. Por ejemplo, se pueden comparar elementos de la región de control de la expresión de corina con elementos reguladores específicos del corazón o ubicuos de promotores heterólogos para incrementar la especificidad cardíaca o la actividad de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina.

Vectores y células huésped

La presente invención también se relaciona con vectores que incluyen los polinucleótidos de la presente invención,

con células huésped que son manipuladas genéticamente con los vectores de la invención y con la producción de los polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes. Dichas técnicas se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 y Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1989.

Las células huésped pueden ser manipuladas genéticamente para incorporar polinucleótidos que contienen a la región de control de la expresión de corina de la presente invención, así como los polinucleótidos que contienen la región de control de la expresión de corina ligados operativamente a los genes que codifican corina u otros polipéptidos, con el fin de permitir la expresión del producto codificado por los polinucleótidos ligados, por ejemplo corina. Los polinucleótidos pueden ser introducidos en células huésped usando técnicas bien conocidas de infección, transducción, transfección, transvección y transformación. Los polinucleótidos se pueden introducir solos o con otros polinucleótidos. Dichos otros polinucleótidos se pueden independientemente, se pueden co-introducir o se pueden introducir unidos a los polinucleótidos de la invención.

Por consiguiente, por ejemplo, los polinucleótidos de

la invención pueden ser transfectados en células huésped junto con otro polinucleótido separado que codifica un marcador seleccionable, usando técnicas estándar de co-transfección y selección, por ejemplo, en células de mamífero. En este caso, los polinucleótidos se incorporarán en general de forma estable en el genoma de la célula huésped.

Como alternativa, los polinucleótidos se pueden unir a un vector que contiene un marcador seleccionable para su propagación en un huésped. La construcción del vector se puede introducir en las células huésped utilizando las técnicas ya mencionadas. En general, se introduce un vector de plásmido como ADN en la forma de un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. También se puede usar electroporación para introducir polinucleótidos en un huésped. Si el vector es un virus, puede ser empaquetado *in vitro* o se puede introducir en una célula empaquetadora y el virus empaquetado puede ser transducido en las células. Hay una amplia variedad de técnicas adecuadas para obtener polinucleótidos y para introducir polinucleótidos en células de acuerdo con este aspecto de la invención que son bien conocidas y de rutina para los especialistas en el arte. Dichas técnicas se revisan extensamente en Sambrook et al., citado previamente, que son ilustrativas de los numerosos manuales de

laboratorio que describen detalladamente estas técnicas. De acuerdo con este aspecto de la invención, el vector puede ser, por ejemplo, un vector plásmido, un vector de fago de cadena simple o doble, un vector viral de ARN o ADN de cadena simple o doble. Dichos vectores se pueden introducir en las células como polinucleótidos, preferentemente ADN, mediante técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en células. Los vectores, en el caso de vectores de fagos y virales, también y preferentemente se pueden introducir en las células como virus empaquetados o encapsulados mediante técnicas bien conocidas de infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes para la replicación o defectuosos para la replicación. En este último caso, la propagación viral generalmente tendrá lugar solamente en células huésped complementarias.

Los vectores preferidos, en determinados sentidos, son los que permiten la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención. En general, dichos vectores comprenden regiones de control que actúan en cis eficaces para la expresión en un huésped ligados operativamente al polinucleótido a expresar. Los factores apropiados que actúan en trans son suministrados por el huésped, son suministrados por un vector complementario o son suministrados por el propio vector con la introducción en el huésped.

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la invención se pueden insertar en el vector mediante cualquiera de las numerosas técnicas bien conocidas y de rutina. En general, la secuencia de ADN a expresar se une a un vector de expresión clivando la secuencia de ADN y el vector de expresión con una o más endonucleasas de restricción y posterior unión de los fragmentos de restricción usando la T4 ADN ligasa. Los procedimientos de restricción y ligación que se pueden usar para tal fin son bien conocidos y de rutina para los especialistas. Los procedimientos adecuados en este sentido, y para construir vectores de expresión usando técnicas alternativas, que también son bien conocidos y de rutina para los especialistas, se describen con gran detalle Sambrook et al., citado precedentemente.

Usos de la región de control de la expresión de corina

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la presente invención son de utilidad para expresar específicamente moléculas terapéuticas en células derivadas del corazón. La expresión específica del corazón de las moléculas terapéuticas se puede utilizar, por ejemplo, para tratar insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión e hipertrofia cardíaca. Por lo tanto, se pueden construir vectores que comprenden polinucleótidos terapéuticos ligados operativamente a los polinucleótidos de

la región de control de la expresión de corina de la presente invención y administrarlos a los pacientes para el tratamiento de enfermedades cardíacas y para desarrollar sustancias terapéuticas nuevas y mejoradas.

Se puede ligar operativamente cualquier polinucleótido terapéutico a los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina, incluyendo a modo de ejemplo, el polinucleótido que codifica corina. Típicamente, dichos polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina se incluyen en un casete de expresión y se inserta 5' con respecto al polinucleótido terapéutico a expresar. Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina se pueden ubicar inmediatamente proximales para el polinucleótido terapéutico, aunque los elementos potenciadores del polinucleótido de la región de control de la expresión de corina se puede ubicar en cualquier lado comprendido dentro de varios kilobases con respecto al polinucleótido terapéutico, incluyendo el extremo 3' del polinucleótido terapéutico y dentro de los intrones. La capacidad del polinucleótido de la región de control de la expresión de corina para conferir una transcripción específica del corazón a partir de una posición dada puede ser verificada ubicando al polinucleótido de la región de control de la expresión de corina en una configuración apropiada con relación a un gen informante y analizando la

actividad específica del corazón del gen informante como se describe en la presente.

El polinucleótido de la región de control de la expresión de corina se puede ligar directamente al polinucleótido que codifica una molécula terapéutica sin secuencias adicionales. En las realizaciones donde el polinucleótido de la región de control de la expresión de corina no incluye los elementos de inicio de la transcripción de corina, se deben suministrar elementos adicionales, tal como una caja TATA y sitios de inicio de la transcripción. Estos pueden ser los elementos de inicio de la transcripción nativos del gen terapéutico o pueden derivar de un promotor heterólogo eucariota o viral. Además, es posible incrementar el nivel de expresión del gen terapéutico incluyendo secuencias potenciadoras y de poliadenilación del gen terapéutico o de genes heterólogos, en tanto se conserve la especificidad de la expresión para el corazón (medida en los ensayos de la invención).

Los vectores para transfectar células derivadas del corazón *in vitro* e *in vivo*, los métodos para asegurar una expresión sostenida en células derivadas del corazón *in vivo*, los métodos para ligar operativamente los polinucleótidos terapéuticos a promotores específicos del corazón y los métodos para dirigir a los vectores hacia las células cardíacas *in vitro* o *in vivo*, las rutas de

///
/

administración y las dosificaciones para el tratamiento de enfermedades cardíacas con vectores terapéuticos se pueden consultar en Tang et al. (2002) *Methods* 28: 259-266; Phillips et al. (2002) *Hypertension* 39: 651-655; Prentice et al. (1997) *Cardiovas. Res.* 35: 567-574; Beggah AT et al. (2002) *PNAS* 99: 7160-7165; Monte et al. (2003) *J. Physiol.* 546: 49-61.

Por lo tanto, los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la presente invención se pueden utilizar para una expresión específica del corazón de diversos polinucleótidos terapéuticos. Los polinucleótidos terapéuticos expresados por los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina son activos por sí mismos (por ejemplo, polinucleótidos antisentido y catalíticos) o pueden codificar una proteína que tendrá beneficios terapéuticos.

Expresión de ribonucleótidos antisentido y catalíticos.

Uno de los tipos de polinucleótidos terapéuticos que puede ser expresado por los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina es ARN antisentido o ARNi (Fire, A. (1999) *Trends. Genet.* 15: 358-363; Sharp, P. (2001) *Genes Dev.* 15: 485-490). En dichas realizaciones, el polinucleótido de la región de control de la expresión de corina está ligado operativamente a un polinucleótido que, cuando es transcrito por las ARN polimerasas celulares,

tiene la capacidad de unirse a un ARNm blanco. La derivación de una secuencia antisentido, basada en una secuencia de ADNc que codifica una proteína blanco se describe, por ejemplo, en Stein & Cohen (1988) *Cancer Res.* 48: 2659-68 y van der Krol et al. (1988) *BioTechniques* 6: 958-76. La proteína blanco serán generalmente una proteína cuya presencia podría contribuir o incrementar las probabilidades de enfermedades cardíacas, por ejemplo la enzima convertidora de angiotensina, el receptor de angiotensina II o NF-ATC (Stein et al. (1998) *Amer. Heart J.* 135: 914-923; Levin et al. (1998) *New Eng. J. Med.* 339: 321-328; Keating y Goa (2003) *Drugs* 63: 47-70). Por consiguiente, la expresión específica del corazón de la molécula antisentido puede reducir preferencialmente la expresión de estas proteínas en los individuos de riesgo. Se ha descrito el uso exitoso de una expresión antisentido específica del corazón (Beggah AT et al. (2002) *PNAS* 99: 7160-7165). Dicho enfoque ha demostrado su eficacia en el tratamiento de fibrosis cardíaca e insuficiencia cardíaca usando una expresión específica del corazón (Lee et al. (1966) *Anticancer Res.* 16: 1805-11).

Además de los polinucleótidos antisentido, se pueden diseñar ribozimas para inhibir la expresión de moléculas blanco. Una ribozima es una molécula de ARN que cliva catalíticamente otras moléculas de ARN. Por lo tanto, los

polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la presente invención se pueden usar para expresar ribozimas específicamente en células derivadas del corazón ligando un polinucleótido que codifica una ribozima a un polinucleótido de la región de control de la expresión de corina. Se han descrito diferentes tipos de ribozimas, incluyendo ribozimas del grupo I, ribozimas de cabeza de martillo, ribozimas en horquilla, RNasa P y ribozimas de cabeza de hacha (véase, por ejemplo, Castanotto et al. (1994) *Adv. in Pharmacology* 25: 289-317 por una revisión general de las propiedades de las diferentes ribozimas). Las características generales de las ribozimas en horquilla se describen, por ejemplo, en Hampel et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 299-304; Hampel et al., Publicación de Patente Europea N°: 0 360 257 (1990); Patente de EE.UU. N°: 5.254.678. Los métodos para preparar ribozimas son bien conocidos por los especialistas en el arte (véase, por ejemplo, Wong-Staal et al., WO 94/26877; Ojwang et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 6340-44; Yamada et al. (1994) *Hum. Gene Ther.* 1: 39-45; Leavitt et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92: 699-703; Leavitt et al. (1994) *Hum. Gene Ther.* 5: 1115-20; y Yamada et al. (1994) *Virology* 205: 121-26).

Expresión de proteínas terapéuticas:

Se puede utilizar una amplia variedad de proteínas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades cardíacas. Por lo tanto, el polinucleótido de la región de control de la expresión de corina de la presente invención se puede usar para expresar polinucleótidos que codifican proteínas terapéuticas específicamente en células cardíacas. Las proteínas terapéuticas pueden ser de origen procariota, eucariota, viral o sintético. Cuando la proteína terapéutica no es originaria de mamíferos, la secuencia de codificación de la proteína puede ser modificada para maximizar la expresión en mamíferos de acuerdo con métodos conocidos en el arte (por ejemplo, utilización de codones de mamífero y sitios consenso de inicio de la traducción).

Las proteínas terapéuticas se pueden ligar operativamente a los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina para permitir una expresión específica en el corazón y emplear con éxito en el tratamiento de enfermedades cardíacas de cualquier etiología, incluyendo (a modo de ejemplo) enfermedad cardíaca isquémica, enfermedad cardíaca hipertensiva, enfermedad cardíaca valvular, miocarditis, cardiomiopatía de Chagas y cardiomiopatía idiopática. Dichas proteínas terapéuticas incluyen, a modo de ejemplo, proteínas tales como la corina, que convierte al pro-péptido natriurético atrial (pro-ANP) en ANP, ANP, que disminuye el volumen y la

presión sanguínea promoviendo la secreción de sodio y la vasodilatación, y el péptido natriurético de tipo B, (Stein et al. (1998) *Amer. Heart J.* 135: 914-923; Levin et al. (1998) *New Eng. J. Med.* 339: 321-328; Keating y Goa (2003) *Drugs* 63: 47-70), así como formas dominantes negativas de dichos genes, como corina (Wu et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 16900-16905).

Identificación de moduladores de la expresión de corina

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la presente invención se pueden utilizar para identificar nuevos moduladores que serán de utilidad en el control de enfermedades relacionadas con el corazón en mamíferos, en especial en el hombre, ejemplos de los cuales son: hipertensión cardiovascular, insuficiencia cardíaca congestiva o cardiomiopatías. Dichos moduladores son de utilidad en el tratamiento de un huésped con niveles anormales de expresión del gen de corina. Los moduladores del gen de corina también se pueden usar para tratar enfermedades y afecciones que son modificadas por el nivel de expresión del gen de corina, tal como, a modo de ejemplo, elasticidad mecánica, volumen sanguíneo, excreción de sales, producción urinaria y tono vasomotor. Los moduladores también son de utilidad para imitar en animales aquellas enfermedades o afecciones del hombre que se relacionan con el nivel de expresión de los polipéptidos seleccionados.

Específicamente, los agentes que se unen y modulan dicha expresión se pueden identificar por su capacidad para causar un cambio en el nivel de transcripción de un gen informante, por ejemplo de luciferasa, que ha sido ligado operativamente a un polinucleótido de la región de control de la expresión de corina, descrito precedentemente. (Véase el Ejemplo 2).

Los agentes evaluados en el método anterior se pueden seleccionar aleatoriamente o racionalmente o pueden ser diseñados. Tal como se utiliza aquí, se dice que un agente es seleccionado aleatoriamente cuando dicho agente se elige al azar sin tener en cuenta ninguna secuencia específica. Un ejemplo de agentes seleccionados aleatoriamente es el uso de una biblioteca química o un caldo de cultivo de un organismo o extracto de plantas (Bunin, et al. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10997-10998 y las referencias citadas en la misma).

Tal como se utiliza aquí, se dice que un agente es seleccionado racionalmente o diseñado cuando dicho agente se elige sobre una base no aleatoria que tiene en cuenta la secuencia del sitio de interés y/o su conformación con relación a la acción del agente.

Terapia genética

La presente invención provee polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina que pueden ser

transfectados en las células con fines terapéuticos *in vitro* e *in vivo*. Estos ácidos nucleicos se pueden insertar en cualquiera de numerosos vectores bien conocidos para la transfección de células y organismos blanco como se describirá más adelante. Los ácidos nucleicos son transfectados en células, *ex vivo* o *in vivo*, a través de la interacción del vector y la célula blanco. Típicamente, el ligamiento operativo de un polinucleótido de la región de control de la expresión de corina y un segundo polinucleótido, de utilidad terapéutica, genera una expresión específica del corazón de dicho segundo polinucleótido. Las composiciones son administradas a un paciente en una cantidad suficiente como para generar una respuesta terapéutica en dicho paciente. La cantidad adecuada para lograrlo se define como la "dosis o cantidad eficaz en términos terapéuticos".

Dichos procedimientos de terapia genética se han utilizado para corregir defectos genéticos, distintos tipos de cáncer e infecciones virales adquiridos y heredados en diversos contextos. La capacidad para expresar genes artificiales de utilidad terapéutica en humanos facilita la prevención y/o curación de muchas enfermedades importantes en el hombre, incluyendo muchas enfermedades que no se pueden tratar con otras terapias (por una revisión sobre procedimientos de terapia genética, véase Anderson (1992)

Science 256: 808-13; Nabel & Felgner, *TIBTECH* (1993), Vol. 11, págs. 211-17; Mitani & Caskey, *TIBTECH* (1993), Vol. 11, págs. 162-66; Mulligan, *Science* (1993), Vol. 260, págs. 926-32; Dillon, *TIBTECH* (1993), Vol. 11, págs. 167-75; Miller, *Nature* (1992), Vol. 357, págs. 455-60; Van Brunt, *Biotechnology* (1998), Vol. 6, págs. 1149-54; Vigne, *Restorative Neurol. Neurosci.* (1995), Vol. 8, págs. 35-36; Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* (1995), Vol. 51, págs. 31-44; Haddada et al., en *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Doerfler & Böhm eds., 1995); y Yu et al., *Gene Therapy* (1994), Vol. 1, págs. 13-26).

La distribución del gen o del material genético en la célula es el primer paso en el tratamiento de enfermedades basado en una terapia genética. Hay numerosos métodos de distribución que son bien conocidos por los especialistas en el arte. Preferentemente, los ácidos nucleicos son administrados para su aplicación en terapias genéticas *in vivo* o *ex vivo*. Los sistemas de distribución de vectores no virales incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo y ácidos nucleicos que forman complejos con un vehículo transportador, tal como un liposoma. Los sistemas de distribución de vectores virales incluyen virus a ADN y ARN, con genomas episómicos o integrados luego de su administración a la célula.

Los métodos de distribución no viral de ácidos nucleicos incluyen lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, policationes o lípidos: conjugados de ácidos nucleicos, ADN desnudo, viriones artificiales y captación de ADN mejorada por agentes. La lipofección se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N°: 5.049.386, 4.946.787; y 4.897.355, y los reactivos de lipofección se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para una lipofección eficaz con reconocimiento de receptores de polinucleótidos incluyen los de Felgner, WO 91/17424 y WO 91/16024. La distribución puede ser en células (administración ex vivo) o en tejidos blanco (administración in vivo).

La preparación de los complejos de lípido:ácido nucleico, incluyendo los liposomas dirigidos tal como complejos de inmunolípidos, es bien conocida para el especialista en el arte (véase, por ejemplo, Crystal, *Science* (1995), Vol. 270, págs. 404-10; Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* (1995), Vol. 2, págs. 291-97; Behr et al., *Bioconjugate Chem.* (1994), Vol. 5, págs. 382-89; Remy et al., *Bioconjugate Chem.* (1994), Vol. 5, págs. 647-54; Gao et al., *Gene Therapy* (1995), Vol. 2, págs. 710-22; Ahmad et al., *Cancer Res.* (1992), Vol. 52, págs. 4817-20; Patentes de

EE.UU. N°: 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028 y 4.946.787).

El uso de sistemas basados en ARN o ADN viral para la distribución de ácidos nucleicos aprovecha los procesos avanzados de dirigir un virus a células específicas en el cuerpo y transferir la carga viral al núcleo. Los vectores virales pueden ser administrados directamente a los pacientes (*in vivo*) o se pueden utilizar para el tratamiento de células *in vitro* y la posterior administración de las células modificadas a los pacientes (*ex vivo*). Los sistemas basados en virus convencionales para distribuir ácidos nucleicos pueden incluir los siguientes vectores: retrovirales, lentivirus, adenovirales, adenoasociados y *Herpes simplex* para la transferencia de genes. Los vectores virales constituyen actualmente el método más eficaz y versátil de transferencia de genes en células y tejidos de interés. La integración en el genoma huésped se puede lograr con los métodos de transferencia de genes con retrovirus, lentivirus y adenoasociados, que a menudo da como resultado una expresión a largo plazo del transgen insertado. Además, se han observado eficacias de transducción altas en muchos tipos celulares y tejidos blanco diferentes. En particular, actualmente existen al menos seis enfoques con vectores virales para la transferencia de genes en estudios clínicos, siendo por mucho los vectores retrovirales el sistema de uso

más frecuente. Todos estos vectores virales utilizan enfoques que comprenden complementación de vectores defectuosos por genes insertados en líneas celulares auxiliares para generar el agente de transducción.

El tropismo de un retrovirus puede ser alterado con la incorporación de proteínas de envoltura extrañas, que expanden así la población blanco potencial de células blanco. Los vectores lentivirales son vectores retrovirales capaces de transducir o infectar células que no están en división y típicamente producen títulos virales altos. La selección del sistema de transferencia de genes retrovirales dependerá entonces del tejido blanco. Los vectores retrovirales están compuestos de repeticiones terminales largas que actúan en *cis* con capacidad para empaquetar hasta 6-10 kbp de secuencia extraña. Las LTR mínimas que actúan en *cis* son suficientes para la replicación y el empaquetamiento de vectores, que luego se utilizan para integrar el gen terapéutico en la célula blanco con el fin de proveer una expresión permanente del transgen. Los vectores retrovirales de mayor uso incluyen los que se basan en el virus de leucemia murino (MuLV), virus de leucemia de gibones (GaLV), virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Buchscher et al., *J. Virol.* (1992), Vol. 66, págs. 2731-39; Johann et al., *J. Virol.* (1992),

Vol. 66, págs. 1635-40; Sommerfelt et al., *Virology* (1990), Vol. 176, págs. 58-59; Wilson et al., *J. Virol.* (1989), Vol. 63, págs. 2374-78; Miller et al., *J. Virol.* (1991), Vol. 65, págs. 2220-24; PCT/US94/05700).

Los vectores pLASN y MFG-S son ejemplos de vectores retrovirales que se han utilizado en estudios clínicos (Dunbar et al., *Blood* (1995), Vol. 85, págs. 3048-57; Kohn et al., *Nat. Med.* (1995), Vol. 1, págs. 1017-23; Malech et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1997), Vol. 94, págs. 12133-38). El vector PA317/pLASN fue el primer vector terapéutico utilizado en un estudio de terapia genética (Blaese et al., *Science* (1995), Vol. 270, págs. 475-80). Se han observado eficacias de transducción del 50% o más para los vectores empaquetados MFG-S (Ellem et al., *Immunol. Immunother.* (1997), Vol. 44, págs. 10-20; Dranoff et al., *Hum. Gene Ther.* (1997), Vol. 1, págs. 111-23).

En aquellas aplicaciones donde se prefiere una expresión transitoria del ácido nucleico, se emplean típicamente sistemas basados en adenovirus. Los vectores basados en adenovirus pueden ofrecer una eficacia de transducción muy alta en muchos tipos celulares y no requieren de división celular. Con dichos vectores se han obtenido títulos y niveles de expresión altos. Este vector se puede producir en grandes cantidades con un sistema relativamente simple. También se usan vectores de virus

adenoasociados ("AAV") para transducir células con ácidos nucleicos de interés, por ejemplo, en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos y en los procedimientos de terapia genética *in vivo* y *ex vivo* (véase, por ejemplo, West et al., *Virology* (1987), Vol. 160, págs. 38-47; Patente de EE.UU. N°: 4.797.368; WO 93/24641; Kotin, *Hum. Gene Ther.* (1994), Vol. 5, págs. 793-801; Muzyczka, *J. Clin. Invest.* (1994), Vol. 94, págs. 1351). La construcción de vectores de AAV recombinantes se describe en numerosas publicaciones, incluyendo la Patente de EE.UU. N°: 5.173.414; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* (1985), Vol. 5, págs. 3251-60; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* (1984), Vol. 4, págs. 2072-81; Hermonat & Muzyczka, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, (1984), Vol. 81, págs. 6466-70; y Samulski et al., *J. Virol.* (1989), Vol. 63, págs. 3822-28.

Los vectores recombinantes de virus adenoasociados (rAAV) constituyen un sistema de distribución de genes alternativo prometedor que se basa en el virus adenoasociado parvovirus de tipo 2 defectuoso y no patogénico. Todos los vectores derivan de un plásmido que solamente retiene las repeticiones terminales invertidas de AAV de 145 bp que flanquean al casete de expresión transgénico. Una transferencia eficaz de genes y una distribución estable del transgen debido a su integración en los genomas de la célula transducida son características clave para este sistema de

vectores (Wagner et al., *Lancet* (1998), Vol. 351, págs. 1702-03; Kearns et al., *Gene Ther.* (1996), Vol. 9, págs. 748-55).

Los vectores adenovirales recombinantes de replicación deficiente (Ad) se usan predominantemente en las terapias genéticas de expresión transitoria, porque se pueden producir con títulos muy altos y porque infectan rápidamente numerosos tipos celulares diferentes. La mayoría de los vectores de adenovirus son manipulados de modo tal que un transgen reemplaza a los genes Ad E1a, E1b y E3; a continuación, el vector de replicación defectuosa es propagado en células 293 humanas que suministran la función suprimida del gene en trans. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos *in vivo*, incluyendo células diferenciadas, que no están en división, tal como los que se pueden encontrar los tejidos de hígado, riñón y el sistema muscular. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad portadora. Un ejemplo del uso de un vector Ad en un estudio clínico comprendía una terapia con polinucleótidos para la inmunización antitumoral con inyecciones intramusculares (Stermán et al., *Hum. Gene Ther.* (1998), Vol. 9, págs.1083-92). Otros ejemplos del uso de vectores de adenovirus para la transferencia de genes en estudios clínicos incluyen Rosenecker et al., *Infection* (1996), Vol. 241, págs. 5-10; Welsh et al., *Hum. Gene Ther.*

(1995), Vol. 2, págs. 205-18; Alvarez et al., *Hum. Gene Ther.* (1997), Vol. 5, págs. 597-613; Topf et al., *Gene Ther.* (1998), Vol. 5, págs. 507-13; Sterman et al., *Hum. Gene Ther.* (1998), Vol. 9, págs. 1083-89.

En muchas aplicaciones de terapia genética, resulta deseable que el vector de dicha terapia genética sea distribuido con un alto grado de especificidad en un tipo de tejido particular. El viral vector es modificado típicamente para presentar especificidad por un tipo celular dado mediante expresión de un ligando como una proteína de fusión con una proteína de recubrimiento viral por la superficie externa del virus. Se elige un ligando con afinidad por un receptor de presencia conocida en el tipo celular de interés. Por ejemplo, Han et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1995), Vol. 92, págs. 9747-51, informaron que el virus de leucemia murino Moloney puede ser modificado para expresar la heregulina humana fusionada a gp70, y el virus recombinante infecta determinadas células de cáncer de mama humanas que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. Este principio se hace extensivo a otros pares de virus que expresan una proteína de fusión del ligando y el receptor expresado en la célula blanco. Por ejemplo, se pueden manipular fagos filamentosos para que expresen fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab o Fv) con una afinidad de unión específica para prácticamente

cualquier receptor celular de elección. Aunque la descripción anterior se aplica primariamente a vectores virales, se pueden aplicar los mismos principios a vectores no virales. Dichos vectores pueden ser manipulados para contener secuencias de captación específicas considerados favorables para su captación por células blanco específicas.

Composiciones farmacéuticas y administración

La presente invención también se relaciona con composiciones farmacéuticas que pueden comprender la región de control de la expresión de corina o un vector que comprende la región de control de la expresión, en combinación con un vehículo aceptable para uso farmacéutico. En una realización de la presente invención, el vehículo aceptable para uso farmacéutico es farmacéuticamente inerte.

Los vectores de terapia genética se pueden distribuir *in vivo* mediante administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o infusión intracraneal) o por aplicación tópica, como se describirá más adelante. Como alternativa, los vectores pueden ser administrados a las células *ex vivo*, tal como a células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejidos) o células madre hematopoyéticas donantes universales, seguido de reimplantación de las células en el paciente,

habitualmente después de seleccionar las células que han incorporado el vector.

La transfección de células *ex vivo* con fines de diagnóstico, investigación o para una terapia genética (por ejemplo, a través de una re-infusión de las células transfectadas en el organismo huésped) es bien conocida por los especialistas en el arte. En una realización preferida, se aíslan células del organismo, se transfectan con un ácido nucleico (gen o ADNc) y se vuelve a infundir en el organismo (por ejemplo, un paciente). Existen diversos tipos celulares adecuados para la transfección *ex vivo* que son bien conocidos por los especialistas en el arte (véase, por ejemplo, Freshney et al., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3ª ed., 1994)) y las referencias citadas en la misma por una discusión sobre cómo aislar y cultivar células de pacientes).

Los vectores (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen ácidos nucleicos terapéuticos también pueden ser administrados directamente al organismo para la transducción de células *in vivo*. Como alternativa, se puede administrar ADN desnudo. La administración se puede efectuar por cualquiera de las rutas usadas normalmente para introducir una molécula en contacto íntimo con células de tejidos o sangre. Los métodos de administración adecuados de dichos ácidos nucleicos se encuentran disponibles y son bien

conocidos por los especialistas en el arte y, aunque se puede emplear más de una ruta para administrar una composición particular, una determinada ruta a menudo puede ofrecer una reacción más inmediata y más eficaz que otra ruta.

Los vehículos aceptables para uso farmacéutico se determinan en parte por la composición particular que será administrada (por ejemplo, ácido nucleico, proteína, compuestos moduladores o células transducidas), así como por el método particular usado para administrar la composición. Por lo tanto, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas para la presente invención (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a ed., 1989). La administración se puede efectuar de cualquier manera conveniente, por ejemplo, por inyección, administración oral, inhalación o aplicación transdérmica.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir de: (a) soluciones líquidas, tal como una cantidad eficaz del ácido nucleico empaquetado suspendido en diluyentes, tal como agua, salina o PEG 400; (b) cápsulas, sachets o tabletas, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas

en tableta pueden incluir uno o más entre lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de papa, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, rellenos, aglutinantes, diluyentes, agentes amortiguadores del pH, agentes humectantes, conservantes, agentes saborizantes, colorantes, agentes desintegradores y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas en grageas pueden comprender al ingrediente activo en un saborizante, por ejemplo, sacarosa, así como en pastillas que comprenden al ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y emulsiones de acacia, geles y semejantes, que contienen, además del ingrediente activo, los vehículos conocidos en el arte.

El compuesto de elección, ya sea solo o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden conformar en formulaciones de aerosol (es decir, pueden ser "nebulizados") con el fin de ser administrados por inhalación. Las formulaciones en aerosol se pueden colocar en un propelente presurizado aceptable, tal como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y semejantes.

Las formulaciones adecuadas para una administración parenteral, tal como, por ejemplo, por las rutas intraarticular (en las articulaciones), intravenosa,

intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones para inyección acuosas y no acuosas, estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, soluciones amortiguadoras, bacteriostatos y solutos que vuelven a la formulación isotónica con respecto a la sangre del receptor pretendido, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. En la práctica de esta invención, las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por infusión intravenosa, por vía oral, tópica, intraperitoneal, intravesical o intratecal. La administración parenteral e intravenosa son los métodos preferidos de administración. Las formulaciones de las composiciones se pueden presentar en contenedores sellados con dosis unitarias o dosis múltiples, tal como ampollas y viales.

Las soluciones y suspensiones para inyección se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas del tipo descrito previamente. Las células transducidas con los ácidos nucleicos para una terapia ex vivo también se pueden administrar por vía intravenosa o parenteral según se describió previamente.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, deberá ser suficiente como para obtener una respuesta terapéutica beneficiosa en dicho

paciente en el tiempo. La dosis será determinada según la eficacia del vector particular empleado y la afección del paciente, así como el peso corporal o área de superficie del paciente a tratar. El tamaño de la dosis también se determinará según la existencia, naturaleza y extensión de cualquier efecto secundario adverso que pudiera acompañar la administración de un vector particular o el tipo celular transducido en un paciente particular.

Para determinar la cantidad eficaz de vector que será administrada, el especialista evaluará los niveles plasmáticos en circulación del vector, la toxicidad del vector, el progreso de la enfermedad y la producción de anticuerpos anti-vector. En general, la dosis equivalente de ácido nucleico desnudo de un vector comprende entre aproximadamente 1 μg y 100 μg para un paciente típico de 70 kilogramos, y las dosis de vectores que incluyen una partícula retroviral se calculan para obtener una cantidad equivalente de ácido nucleico terapéutico.

Para la administración, los compuestos y las células transducidas de la presente invención pueden administrarse a una dosis determinada por el valor de LD-50 del inhibidor, vector o tipo celular transducido, y los efectos secundarios del inhibidor, vector o tipo celular a diversas concentraciones, aplicado a la masa y estado general de

salud del paciente. La administración se puede llevar a cabo con dosis simples o divididas.

Conjuntos de elementos

La presente invención se relaciona además con envases y conjuntos de elementos farmacéuticos que comprenden uno o más contenedores rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones mencionadas de la invención. Con dichos contenedores se puede asociar una nota en la forma de una prescripción de una entidad reguladora de la elaboración, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando la aprobación por parte de dicha entidad de la elaboración, el uso o la venta del producto para su administración a seres humanos.

Ratones transgénicos

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la presente invención también se pueden usar para producir un mamífero transgénico, preferentemente un ratón. Dicho organismo transgénico es de utilidad, por ejemplo, para identificar y/o caracterizar agentes que modulan la expresión y/o actividad de dicho polinucleótido. Los animales transgénicos también son de utilidad como modelos de estados de enfermedad cardíaca.

La invención descrita en la presente también se relaciona con un animal transgénico no humano que comprende en su genoma una o más copias de los polinucleótidos de la

invención. Los animales transgénicos de la invención pueden contener en sus genomas múltiples copias de los polinucleótidos.

En una realización preferida, el animal transgénico comprende en su genoma una región de control de la expresión del gen de corina humano. La invención abarca una amplia variedad de organismos transgénicos no humanos, incluyendo por ejemplo, *Drosophila*, *C. elegans*, pez cebra y levadura. El animal transgénico de la invención es preferentemente un mamífero, por ejemplo, una vaca, cabra, oveja, conejo, primate no humano o rata, más preferentemente un ratón.

Los métodos para producir animales transgénicos son bien conocidos por los especialistas en el arte e incluyen, por ejemplo, recombinación de homólogos, mutagénesis (por ejemplo, ENU, Rathkolb et al. (2000) *Exp. Physiol.*, 85: 635-644), y el sistema de expresión de genes regulado por tetraciclina (por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N°: 6.242.667), y no se describirán con detalle en la presente. (Véase, por ejemplo, Wu et al, *Methods in Gene Biotechnology*, CRC 1997, págs. 339-366; Jacenko, O., *Strategies in Generating Transgenic Animals*, en *Recombinant Gene Expression Protocols*, Vol. 62 de *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 1997, págs. 399-424).

La presente invención también se relaciona con un animal no humano noqueado cuyo genoma contiene una región de

control de la expresión del gen de corina humano que está ligado operativamente a una secuencia informante y donde dicha región de control es eficaz para iniciar, terminar o regular la transcripción de dicha secuencia informante.

La interrupción funcional de la secuencia informante ligada operativamente a la secuencia de control se pueden efectuar de cualquier manera eficaz, incluyendo, por ejemplo, introducción de un codón de terminación en cualquier parte de la secuencia de codificación de modo tal que el polipéptido resultante queda biológicamente inactivo (por ejemplo, porque carece de un dominio catalítico, un dominio de unión al ligando, etc.), introducción de una mutación en un promotor u otra secuencia reguladora que sea eficaz para desactivarlo o reducir la transcripción de la secuencia informante de una secuencia exógena en la secuencia informante que lo inactiva. Los ejemplos de animales transgénicos que contienen genes funcionalmente interrumpidos son bien conocidas, por ejemplo, los que se describen en las Patentes de EE.UU. N°: 6.239.326, 6.225.525, 6.207.878.

Sin entrar en detalles, se considera que el especialista en el arte puede, a la luz de las descripciones precedentes, utilizar la presente invención de forma acabada. Todos los ejemplos se llevaron a cabo usando técnicas estándar, que son bien conocidas en el arte,

excepto cuando se describe de otra forma con mayor detalle. Las técnicas de biología molecular de rutina de los siguientes ejemplos se pueden realizar como se describe en los manuales de laboratorio estándar, tal como Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Las siguientes realizaciones específicas preferidas se deben considerar entonces como meramente ilustrativas, y no en un sentido limitativo del resto de la descripción en modo alguno. El contenido completo de todas las solicitudes, patentes y publicaciones citadas previamente se incorporan en este documento a modo de referencia.

Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de los genes de corina humano y de ratón que incluyen las regiones flanqueadoras 5'

Para clonar los genes de corina humanos y de murinos y sus regiones flanqueadoras 5', se sintetizaron oligonucleótidos específicos correspondientes a los extremos 5' y 3' de las secuencias de ADNc de corina. Estos cebadores de oligonucleótidos fueron evaluados amplificando productos específicos en reacciones basadas en PCR usando ADN genómico humano o murino. Las reacciones de PCR se efectuaron usando el Sistema de Reactivos para PCR (Life Technologies Inc.) con 30 ciclos de amplificación (1 min de desnaturalización a

94 °C, 1 min de alineación a 50 °C y 1 min de extensión a 72 °C) y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los pares de cebadores que amplificaron exitosamente los productos específicos de la PCR se usaron luego en un análisis basado en PCR para identificar clones BAC que contenían al gen de corina humano o murino y/o sus regiones de control de la expresión. El aislamiento del ADN de los clones BAC se efectuó de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Incyte Genomics, Palo Alto, CA). Los clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) que fueron identificados como positivos se confirmaron además mediante análisis Southern usando sondas de ADNc de corina humana y de murino marcadas con ³²P. Los clones BAC fueron secuenciados directamente con una estrategia *shotgun* o subclonados en el pUC118 (PanVera/Takara, Madison, WI) para su secuenciación. El ensamblaje de las secuencias del *shotgun* se efectuó usando el paquete de software Staden (MRC Laboratory of Molecular Biology; Bonfield et al. (1995) *Nucleic Acid Res.* 23: 4992-4999).

Se obtuvieron cuatro clones BAC, dos de los cuales contenían los genes de corina humano y dos los genes de murinos, con el estudio basado en PCR. Se secuenciaron tres clones BAC con una estrategia *shotgun* usando química de terminación con colorante. La combinación de los datos de *shotgun* con la información del archivo de seguimiento

disponible al público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Traces/trace.cgi>, <http://trace.ensembl.org>), permitió ensamblar secuencias contiguas de 340 kb que contenían al gen de corina humano, y 5 contigs para el gen de corina de murinos. El orden de los 5 contigs fue confirmado por la existencia de varios pares de lectura apareados en los respectivos contigs vecinos. La distancia entre los mismo permitió determinar que el tamaño del hueco era menor que 500 bp, porque el tamaño del inserto de las bibliotecas públicas de *shotgun* estaba bien definido. Luego se analizaron las estructuras de los genes de corina humanos y de murinos. Sin embargo, la secuencia genómica humana de 340 kb no contenía la región flanqueadora 5'. Se aisló un fragmento *Hind* III-*Eco*R I adicional de 4165 bp del BAC 26540, que incluía los primeros 3919 bp de la región flanqueadora 5', todo el exón 1 y parte del intrón 1 (enviado al banco de datos GenBank™/EBI con el número de acceso AF521006).

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina (SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6) fueron derivados todos del fragmento *Hind* III-*Eco*R I de 4165 bp (Figura 8; SEQ ID N°: 2) aislada del BAC26540, usando un método basado en PCR o digestión con enzimas de restricción o una combinación de ambos. Por ejemplo, el bp polinucleótido de la región de control de la expresión de

corina de 4023 bp (SEQ ID N°: 6) descrito en la presente se amplificó a partir del fragmento *Hind* III-*Eco*R I de 4165 bp o de ADN genómico humano usando los cebadores F1 (5'-AAGCTTCATGAGGGCAGGAG-3') (SEQ ID N°: 7) y R1 (5'-GAGCTCGCTTATTCTTCTGTCCACTT-3') (SEQ ID N°: 8). El polinucleótido de la región de control de la expresión de corina de 1283 bp (SEQ ID N°: 5) descrito en la presente se amplificó a partir del fragmento *Hind* III-*Eco*R I de 4165 bp o de ADN genómico humano usando los cebadores F2 (5'-AAGCTTATAAAAATAATAGCTTCTTC-3') (SEQ ID N°: 9) y R1. El polinucleótido de la región de control de la expresión de corina de 391 bp (SEQ ID N°: 4) descrito en la presente se amplificó a partir del fragmento *Hind* III-*Eco*R I de 4165 bp o de ADN genómico humano usando los cebadores F3 (5'-AAGCTTAGTAACTCTTTTGCTCCCAA-3') (SEQ ID N°: 10) y R1. Cualquier tejido de mamífero, tal como leucocitos, del cual se pueda extraer fácilmente el ADN constituye una fuente adecuada de ADN genómico para el aislamiento de los polinucleótidos de corina de mamífero.

Ejemplo 2: Actividad del promotor de las regiones flanqueadoras 5'

Se examinó la actividad del promotor de las regiones flanqueadoras 5' de los genes de corina preparando construcciones informantes en las cuales se habían ligado fragmentos truncados en serie de las secuencias

flanqueadoras 5' de los genes de corina humanos o de murinos a un gen de luciferasa sin promotor (véase la figura 4A).

Las construcciones informantes promotoras de corina humana, hCp1297LUC (región de control de la expresión de corina de 1283 bp (SEQ ID N°: 5) ligada al gen de luciferasa de luciérnaga) y hCp405LUC (bp región de control de la expresión de corina de 391 bp (SEQ ID N°: 4) ligada al gen de luciferasa de luciérnaga), fueron generadas en dos pasos: primero, una clonación basada en PCR de la región flanqueadora 5' del gen de corina humano desde -1297 o -405 a -15 (con relación al codón de inicio de la traducción ATG) usando cebadores que contienen sitios de restricción para *Sac* I y *Hind* III, respectivamente; y, segundo, la inserción de los respectivos productos de la PCR en los sitios *Sac* I y *Hind* III del vector básico pGL3 (Promega, Madison, WI).

De manera similar, también se obtuvieron las construcciones promotoras de corina de murinos, mCp1183LUC, mCp809LUC y mCp646LUC, con el enfoque de clonación basada en PCR descrito previamente. Los plásmidos para estas construcciones se prepararon usando el conjunto de elementos EndoFree Plasmid Maxi (Qiagen, Valencia, CA). La transfección de células HL-5 (Claycomb et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.* 95: 2979-2984) se efectuó usando un método basado en lipofectina de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Life Technologies). Brevemente,

se mezclaron 10 µg de ADN de cada una de las construcciones informantes de corina más 0,1 µg de pRL-SV40 (Promega, Madison, WI) con 20 µg de lipofectina en 1 ml de medio cérico reducido Opti-MEM I. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y luego se agregó a células HL-5 de ~70% de confluencia en una cavidad de placas de 6 cavidades. Después de incubar durante 6 hs, el medio se reemplazó por medio de cultivo fresco Ex-Cell 320; y 30 hs después se cosecharon las células transfectadas y se evaluaron las actividades de luciferasa de luciérnaga y Renilla. Se llevó a cabo un ensayo doble de actividad luciferasa de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Promega). Brevemente, se prepararon extractos celulares lisando las células transfectadas con 250 µl de solución amortiguadora de lisis pasiva recién diluida (Promega). Los lisados se congelaron y descongelaron una vez antes de una centrifugación a 13.000 rpm durante 5 min para agrupar los desechos celulares. Los sobrenadantes fueron transferidos a un tubo nuevo y se evaluó una alícuota de 20 µl de los sobrenadantes utilizando un sistema de Ensayo Informante de Luciferasa Doble. La luminiscencia de las muestras fue monitoreada con un luminómetro para microplacas LB96 V (EG&G Berthold), que medía la producción de luz (unidades de luz relativas) por una duración de 10 seg. Cada uno de los extractos celulares fue evaluado por triplicado. Cada

experimento de transfección para cada construcción se efectuó por triplicado. La actividad de la luciferasa de *Luciérnaga* se normalizó con la actividad de la luciferasa de *Renilla*.

Tal como se muestra en la figura 4B, las construcciones informantes de corina humana hCP1297LUC y hCP405LUC promovieron las actividades de luciferasa que eran significativamente mayores que los valores basales en células básicas pGL3 transfectadas. De manera similar, las construcciones de receptores de murinos mCp1183LUC, mCp809LUC y mCp646LUC promovieron significativamente las actividades luciferasa en comparación con las de las construcciones humanas. Estos datos sugieren que la secuencia en *cis* responsable de la mayor parte de la actividad del promotor se ubica entre los nucleótidos -405 a -15 o los nucleótidos -646 a -77 en los genes de corina humanos y de murinos, respectivamente.

Ejemplo 3: Demostración de la expresión específica del corazón

Para determinar si las construcciones eran mediadoras de la expresión específica del corazón, se transfectaron células HeLa (ATCC N° CCL2), que no expresan ARNm y proteína de corina, con las construcciones descritas previamente. A diferencia de sus grandes actividades en células HL-5, las construcciones hCp405LUC y mCp646LUC solamente presentaban

una actividad mínima del promotor en las células HeLa (Fig. 5). Como control, el pRL-SV40 transfectado simultáneamente promovió niveles más alto de la actividad luciferasa de Renilla en HeLa que en células HL-5, lo cual era indicativo que las células HeLa eran tan fácilmente transfectadas como las células HL-5 en estos experimentos. Estos resultados indican que las secuencias flanqueadoras 5' de los genes de corina de -405 a -15 de humanos o de -646 a -77 de los genes de corina de murinos contienen elementos que son suficientes para una expresión específica en cardiomiocitos cultivados.

Ejemplo 4: Elementos GATA proximales que se unen a GATA-4 necesarios para una función óptima de los promotores de corina.

Las regiones flanqueadoras 5' de los nucleótidos -405 a -15 en humanos o de los nucleótidos -646 a -77 en ratón fueron suficientes para promover niveles altos de expresión genética en cardiomiocitos cultivados pero no en células HeLa. Esto sugiere que estas regiones contienen los elementos reguladores responsables de la expresión específica de cardiomiocitos. La inspección de estas regiones reveló una secuencia consenso GATA conservada (denominadas secuencias GATA proximales).

Para determinar si las secuencias GATA proximales en verdad se unen a las proteínas GATA, se prepararon extractos nucleares a partir de células HL-5 en fase de crecimiento

exponencial como se describe en la literatura (Schreiber E. et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 6419) y se llevó a cabo un ensayo de cambio de movilidad electroforética competitiva (EMSA) usando una sonda de oligonucleótidos GATA consenso bien caracterizada (Redondo, J.M. et al. (1990) *Science* 247(4947), 1225-9) y sondas que abarcaban cada una de las secuencias GATA proximales (Figura 6A). Las sondas de oligonucleótidos de cadena doble que contienen dos secuencias GATA consenso o secuencias GATA mutadas (GATA por CTTA) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology. Se sintetizaron las secuencias de las sondas (véase la figura 6A) que contienen la GATA de corina humana o de murinos (SEQ ID N°: 11 y 13, respectivamente) o la GATA mutada de corina humana y de murinos (GATA por CTTA) (SEQ ID N°: 12 y 14, respectivamente) y se purificaron por HPLC. Las sondas de oligonucleótidos se marcaron por el extremo 5' con T4 polinucleótido quinasa (Life Technologies) usando [γ - 32 P]-ATP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech). Los ensayos de cambio de movilidad sobre gel se llevaron a cabo como se describió previamente (Pan, J. & McEver R.P. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 22600-22608). Como era de esperar, la sonda consenso GATA marcada (SEQ ID N°: 15) formó un complejo de ADN-proteína específico de la secuencia cuando se incubaba con extractos nucleares de células HL-5 (Fig. 6B). Se impidió la formación de este complejo por adición de

un exceso de 100 veces de la sonda no marcada pero no de un elemento GAS no relacionado. La formación del complejo era dependiente de la secuencia GATA intacta, porque las mutaciones en la secuencia GATA impidieron la formación del complejo. Aún más, el complejo no se detectó en presencia de un exceso de 100 veces de la sonda no marcada que contenía las secuencias GATA proximales ya sea humanas o de murinos. Por el contrario, un exceso de 100 veces de las sondas no marcadas que contenían las secuencias GATA proximales mutantes (SEQ ID N°: 12 y 14) tenía un efecto mínimo sobre la formación del complejo. Estos datos indican que las secuencias GATA proximales de corina y la sonda consenso GATA se unen a una o más proteínas GATA comunes.

Para determinar cuáles eran la o las proteínas GATA comprometidas en el complejo, se realizó un EMSA con la sonda consenso GATA marcada en presencia de anticuerpos contra miembros de la familia GATA. Los anticuerpos contra GATA-1 de ratón (SC-1234x), GATA-3 (SC-268x), GATA-4 (SC-12237x) y GATA-6 (SC-7244x) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Tal como se muestra en la figura 6C, un anticuerpo contra GATA-4 inhibió marcadamente la formación del complejo, en tanto los anticuerpos contra GATA-1, -3 y -6 tenían poco efecto. Para demostrar directamente la unión de GATA-4 con la secuencia GATA proximal, se usó la sonda GATA proximal humana marcada en

ausencia o presencia del mismo anticuerpo contra GATA-4. Tal como se muestra en la figura 6D, el anticuerpo contra GATA-4 inhibió por completo la formación de un complejo ADN-proteína con una movilidad similar a la del complejo formado con la sonda consenso GATA. Estos datos indican que GATA-4 se unía a las secuencias GATA proximales, lo cual sugería que la unión de GATA-4 a las secuencias GATA proximales pueden contribuir en la expresión del gen de corina en miocitos de corazón.

A fin de corroborar si los elementos GATA proximales realmente son necesarios para la actividad del promotor, se mutó la secuencia de tipo salvaje AGATAA en ACTTAA en las construcciones humanas o de murinos que promovían la mayor actividad del promotor (Figura 7). Las construcciones mutantes, hCp405mutGATA y mCp646mutGATA, se construyeron con un protocolo de PCR con superposición (Ho S.N. et al., (1989) *Gene (Amst)* 77: 51-59). Brevemente, se generaron dos productos de PCR separados, uno para cada mitad del producto híbrido, con un oligonucleótido GATA mutado orientado en el sentido del marco de lectura o antisentido y un cebador externo. Los dos productos se purificaron y mezclaron. Luego se efectuó una segunda PCR usando los dos cebadores externos. El producto de la PCR fue digerido con *Sac* I y *Hind* III, y se ligó en el vector básico pGL3 digerido con *Sac* I y *Hind* III. Todas las construcciones fueron

confirmadas mediante mapeo de restricción y secuenciación del ADN. Las mutaciones en el elemento GATA eran las mismas que las efectuadas en la sonda GATA mutante que se utiliza en los EMSA. Cuando eran transfectadas en HL-5, las construcciones mutantes humanas y de murinos presentaban un 10% o 42% de actividad promotora en comparación con sus respectivas secuencias de tipo salvaje. Estos resultados muestran que los elementos GATA proximales son necesarios para la expresión constitutiva de los genes de corina humana o de murinos en cardiomiocitos cultivados.

Los ejemplos precedentes se pueden repetir con un éxito similar sustituyendo los reactivos genérica o específicamente descritos y/o las condiciones operativas de esta invención por los utilizados en los ejemplos precedentes.

En tanto la invención se ilustró con respecto a las nuevas regiones de control de la expresión para el gen de corina humano o de ratón, resulta evidente que es posible efectuar variaciones y modificaciones de la invención sin apartarse del espíritu o alcance de la invención.

85 ~~147~~
147

REIVINDICACIONES:

1. Un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina de mamífero, donde dicha región de control modula la transcripción de un polinucleótido heterólogo al cual está ligado operativamente.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde dicha región de control modula la transcripción de un mamífero gen de corina de mamífero.
3. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde la transcripción tiene lugar en el tejido cardíaco.
4. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde la región de control comprende un elemento de regulación de la transcripción seleccionado del grupo formado por sitios de unión a GATA, Tbx-5, NKx2.5 o NF-AT.
5. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde la región de control se une a proteínas reguladoras de la transcripción, donde dichas proteínas se seleccionan del grupo formado por GATA-4, Tbx-5, Nkx2.5, factor tipo Kruppel o factor de transcripción NF-AT.
6. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde el mamífero es un ser humano.
7. El polinucleótido de la reivindicación 6, donde el polinucleótido presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 4.

8. El polinucleótido de la reivindicación 6, donde el polinucleótido presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 5.
9. El polinucleótido de la reivindicación 6, donde el polinucleótido presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 6.
10. Un fragmento, o una variante, del polinucleótido de la reivindicación 1, donde dicho fragmento o variante puede transcribir el polinucleótido heterólogo al cual está ligado operativamente.
11. El fragmento, o la variante, de la reivindicación 10, donde dicho fragmento o variante tiene una secuencia que es al menos un 70% idéntica a la SEQ ID N°: 4.
12. El fragmento o la variante de la reivindicación 10, donde dicho fragmento o dicha variante tiene una secuencia que es al menos un 70% idéntica a la SEQ ID N°: 5.
13. El fragmento o la variante de la reivindicación 10, donde dicho fragmento o variante tiene una secuencia que es al menos un 70% idéntica a la SEQ ID N°: 6.
14. Un vector que comprende la región de control de la expresión de corina de la reivindicación 1.
15. Una célula huésped que comprende al vector de la reivindicación 14.
16. Un método para producir un polipéptido que comprende expresar en la célula huésped de la reivindicación 15 un

polipéptido codificado por un polinucleótido heterólogo ligado operativamente a la región de control de la expresión de corina.

17. Un método para producir un polinucleótido que comprende expresar en la célula huésped de la reivindicación 15 una molécula antisentido codificada por un polinucleótido heterólogo ligado operativamente a la región de control de la expresión de corina.

18. Una composición farmacéutica que comprende al vector de la reivindicación 14 en un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

19. Una composición farmacéutica que comprende la célula de la reivindicación 15 en un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

20. Un método para identificar un agente que modula la expresión de un gen de corina humano en una célula, donde dicho método comprende:

(a) producir un vector recombinante que contenga un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina de mamífero ligado operativamente a un gen informante;

(b) transfectar la célula con el vector recombinante;

(c) tratar la célula con el agente;

(d) medir el nivel de expresión de la secuencia informante en la célula tratada; y

(e) comparar el nivel de expresión de la secuencia informante en presencia del agente con el nivel de expresión en una célula control transfectada que no ha sido tratada.

21. El método de la reivindicación 20, donde la célula es un miocito cardíaco.

22. Un método para modular la expresión de un gen en un sujeto humano, donde dicho método comprende:

(a) producir un vector recombinante que contenga un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina de mamífero ligado operativamente a un polinucleótido heterólogo;

(b) administrar el vector en una cantidad eficaz en términos terapéuticos a dicho sujeto.

23. El método de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE dicho polinucleótido heterólogo codifica una proteína terapéutica tal como corina, ANP, péptido natriurético de tipo B, fosfolambano, ACE o formas dominantes negativas de estos genes.

24. El método de la reivindicación 23, donde el polinucleótido heterólogo codifica corina.

25. El método de la reivindicación 22, donde el polinucleótido heterólogo codifica un polinucleótido terapéutico tal como una molécula de ARN antisentido o una molécula de ARN catalítica.

26. El método de la reivindicación 22, donde la región de control se selecciona del grupo formado por la SEQ ID N°: 4, la SEQ ID N°: 5 o la SEQ ID N°: 6.

27. Un método de tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión o infarto de miocardio en un sujeto humano, donde dicho método comprende administrar una cantidad eficaz en términos terapéuticos de un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina de mamífero, ligado operativamente a un gen seleccionado del grupo formado por corina, ANP, péptido natriurético de tipo B, fosfolambano, ACE o formas dominantes negativas de estos genes, a dicho sujeto.

28. El método de la reivindicación 27, donde dicho gen es de corina.

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 52351AWOM1

Box No. I TITLE OF INVENTION

Control Sequences of the Human Corin Gene

Box No. II APPLICANT

☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
Muehlenstrasse 178
D-13342 Berlin
DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

DE

State (that is, country) of residence:

DE

This person is applicant
for the purposes of:☐ all designated
States☒ all designated States except
the United States of America☐ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

PAN, Junliang
1220 Brewster Drive
El Cerrito, CA 94530
US

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (if this check-box
is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant
for the purposes of:☐ all designated
States☐ all designated States except
the United States of America☒ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authority as:

☒ agent☐ common
representative

Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

WASHTIEN, Wendy L.
BERLEX BIOSCIENCES
2600 Hilltop Drive
P.O. Box 4099
Richmond, California 94804
US

Telephone No.

(510) 262-5411

Facsimile No.

(510) 262-7095

Teleprinter No.

N/A

Agent's registration No. with the Office

36,301

☐ Address for correspondence: Mark this check-box when no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. II FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

WU, Qingyu
1153 Camino Vallecito
Lafayette, CA 94549-2844
US

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

CN

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☒ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☐ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☐ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☐ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION OF STATES Mark the applicable check-boxes below least one must be marked

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

- ☐ AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)
- ☐ EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☐ EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, BG Bulgaria, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, CZ Czech Republic, DE Germany, DK Denmark, EE Estonia, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, SI Slovenia, SK Slovakia, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | | |
|--|---|--|
| ☐ AE United Arab Emirates | ☐ GM Gambia | ☐ NZ New Zealand |
| ☐ AG Antigua and Barbuda | ☐ HR Croatia | ☐ OM Oman |
| ☐ AL Albania | ☐ HU Hungary | ☐ PH Philippines |
| ☐ AM Armenia | ☐ ID Indonesia | ☐ PL Poland |
| ☐ AT Austria | ☐ IL Israel | ☐ PT Portugal |
| ☐ AU Australia | ☐ IN India | ☐ RO Romania |
| ☐ AZ Azerbaijan | ☐ IS Iceland | ☐ RU Russian Federation |
| ☐ BA Bosnia and Herzegovina | ☐ JP Japan | ☐ SC Seychelles |
| ☐ BB Barbados | ☐ KE Kenya | ☐ SD Sudan |
| ☐ BG Bulgaria | ☐ KG Kyrgyzstan | ☐ SE Sweden |
| ☐ BR Brazil | ☐ KP Democratic People's Republic of Korea | ☐ SG Singapore |
| ☐ BY Belarus | ☐ KR Republic of Korea | ☐ SK Slovakia |
| ☐ BZ Belize | ☐ KZ Kazakhstan | ☐ SL Sierra Leone |
| ☐ CA Canada | ☐ LC Saint Lucia | ☐ TJ Tajikistan |
| ☐ CH & LI Switzerland and Liechtenstein | ☐ LK Sri Lanka | ☐ TM Turkmenistan |
| ☐ CN China | ☐ LR Liberia | ☐ TN Tunisia |
| ☐ CO Colombia | ☐ LS Lesotho | ☐ TR Turkey |
| ☐ CR Costa Rica | ☐ LT Lithuania | ☐ TT Trinidad and Tobago |
| ☐ CU Cuba | ☐ LU Luxembourg | |
| ☐ CZ Czech Republic | ☐ LV Latvia | ☐ TZ United Republic of Tanzania |
| ☐ DE Germany | ☐ MA Morocco | ☐ UA Ukraine |
| ☐ DK Denmark | ☐ MD Republic of Moldova | ☐ UG Uganda |
| ☐ DM Dominica | ☐ MG Madagascar | ☐ US United States of America |
| ☐ DZ Algeria | ☐ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia | ☐ UZ Uzbekistan |
| ☐ EC Ecuador | ☐ MN Mongolia | ☐ VC Saint Vincent and the Grenadines |
| ☐ EE Estonia | ☐ MW Malawi | ☐ VN Viet Nam |
| ☐ ES Spain | ☐ MX Mexico | ☐ YU Yugoslavia |
| ☐ FI Finland | ☐ MZ Mozambique | ☐ ZA South Africa |
| ☐ GB United Kingdom | ☐ NO Norway | ☐ ZM Zambia |
| ☐ GD Grenada | | ☐ ZW Zimbabwe |
| ☐ GE Georgia | | |
| ☐ GH Ghana | | |

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ☐ | ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ | ☐ |

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Supplemental Box If it Supplemental Box is not used, this sheet should not be inc. in the request.

1. If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(1) to (4) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information; in such case, write "Continuation of Box No. ..." (Indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:
 - (i) If more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
 - (ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
 - (iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor-applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
 - (iv) If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;
 - (v) If, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;
 - (vi) If, in Box No. VI, there are more than five earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.
2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.

Continuation of Box No. IV

MIYAMOTO, Neil G.
Berlex Biosciences
2600 Hilltop Drive
P.O. Box 4099
Richmond, California 94804
US

Telephone No. 510 669-4699
Facsimile No. 510 262-7095
Agent's registration No. 50,370

SHAW, Melissa A.
Berlex Biosciences
2600 Hilltop Drive
P.O. Box 4099
Richmond, California 94804
US

Telephone No. 510 660-4290
Facsimile No. 510 262-7095
Agent's registration No. 38,301

HERMENAUI, Ronald S.
Berlex Biosciences
2600 Hilltop Drive
P.O. Box 4099
Richmond, California 94804
US

Telephone No. 510 669-4483
Facsimile No. 510 262-7095
Agent's registration no.: 34,620

ZELANO, Anthony J.
Miller, White, Zelano & Branigan, P.C.
Arlington Courthouse Plaza 1
2200 Clarendon Boulevard, Suite 1400
Arlington, Virginia 22202
US

Telephone No. 703 243-6333
Facsimile No. 703 243-6410
Agent's registration No. 32,542

Box No. IX CHECK LIST	LANGUAGE OF FILING																																																						
This international application contains: (a) in paper form, the following number of sheets: <table style="width: 100%;"> <tr> <td>request (including declaration sheets)</td> <td style="text-align: right;">6</td> </tr> <tr> <td>description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)</td> <td style="text-align: right;">30</td> </tr> <tr> <td>claims</td> <td style="text-align: right;">3</td> </tr> <tr> <td>abstract</td> <td style="text-align: right;">1</td> </tr> <tr> <td>drawings</td> <td style="text-align: right;">14</td> </tr> <tr> <td>Sub-total number of sheets</td> <td style="text-align: right;">54</td> </tr> <tr> <td>sequence listings</td> <td style="text-align: right;">11</td> </tr> <tr> <td>tables related thereto</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2"><i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i></td> </tr> <tr> <td>Total number of sheets</td> <td style="text-align: right;">65</td> </tr> </table> (b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listings (ii) ☐ tables related thereto (c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listings (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the ☐ sequence listings ☐ tables related thereto <i>(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)</i>	request (including declaration sheets)	6	description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	30	claims	3	abstract	1	drawings	14	Sub-total number of sheets	54	sequence listings	11	tables related thereto		<i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i>		Total number of sheets	65	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): <table style="width: 100%;"> <tr> <td>1. ☒ fee calculation sheet</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>2. ☐ original separate power of attorney</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>3. ☐ original general power of attorney</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>5. ☐ statement explaining lack of signature</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>7. ☐ translation of international application into (language):</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>9. ☒ sequence listings in computer readable form (indicate type and number of carriers)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Rule 134er only (and not as part of the international application): Disk 1</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 134er</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>11. ☒ other (specify): <u>UNKNOWN</u></td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> </table>	1. ☒ fee calculation sheet	:	2. ☐ original separate power of attorney	:	3. ☐ original general power of attorney	:	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:	5. ☐ statement explaining lack of signature	:	6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:	7. ☐ translation of international application into (language):	:	8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:	9. ☒ sequence listings in computer readable form (indicate type and number of carriers)	:	(i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Rule 134er only (and not as part of the international application): Disk 1	:	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 134er	:	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column	:	10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers)	:	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)	:	(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)	:	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:	11. ☒ other (specify): <u>UNKNOWN</u>	:
request (including declaration sheets)	6																																																						
description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	30																																																						
claims	3																																																						
abstract	1																																																						
drawings	14																																																						
Sub-total number of sheets	54																																																						
sequence listings	11																																																						
tables related thereto																																																							
<i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i>																																																							
Total number of sheets	65																																																						
1. ☒ fee calculation sheet	:																																																						
2. ☐ original separate power of attorney	:																																																						
3. ☐ original general power of attorney	:																																																						
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:																																																						
5. ☐ statement explaining lack of signature	:																																																						
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:																																																						
7. ☐ translation of international application into (language):	:																																																						
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:																																																						
9. ☒ sequence listings in computer readable form (indicate type and number of carriers)	:																																																						
(i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Rule 134er only (and not as part of the international application): Disk 1	:																																																						
(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 134er	:																																																						
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column	:																																																						
10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers)	:																																																						
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)	:																																																						
(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)	:																																																						
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:																																																						
11. ☒ other (specify): <u>UNKNOWN</u>	:																																																						
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: English																																																						
Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE <i>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</i> Wendy L. Washien, Reg. No. 36,301 Agent for Applicants 																																																							

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application: 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	
For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	

PCT

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Request

P.L. receiving Office use only

International Application No.

Date stamp of the receiving Office

Applicant's or agent's
file reference

52351AWOM1

Applicant

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al.

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE 240.00 [T]

2. SEARCH FEE 936.00 [S]

International search to be carried out by EP

(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)

3. INTERNATIONAL FEE

Basic Fee

Where items (b) and/or (c) of Box No. IX apply, enter Sub-total number of sheets } _____

Where items (b) and (c) of Box No. IX do not apply, enter Total number of sheets } _____

[b1] first 30 sheets 476.00 [b1]

[b2] 35 x 12.00 = 420.00 [b2]
number of sheets in excess of 30 fee per sheet

[b3] additional component (only if sequence listings and/or tables related thereto are filed in computer readable form under Section 801(a)(i), or both in that form and on paper, under Section 801(a)(ii)):

400 x _____ = _____ [b3]
fee per sheet

Add amounts entered at b1, b2 and b3 and enter total at B 896.00 [B]

Designation Fees

The international application contains all designations.5 x 104.00 = 520.00 [D]
number of designation fees payable (maximum 5) amount of designation fee

Add amounts entered at B and D and enter total at I [I]

(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 25% of the sum of the amounts entered at B and D.)

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT (if applicable) 20.00 [P]

5. TOTAL FEES PAYABLE \$2,612.00

Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box

TOTAL

☐ The designation fees are not paid at this time.

MODE OF PAYMENT

☒ authorization to charge
deposit account (see below)☐ postal money order☐ cash☐ coupons☐ cheque☐ bank draft☐ revenue stamps☐ other (specify):

AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT

(This mode of payment may not be available at all receiving Offices)

☒ Authorization to charge the total fees indicated above.☒ (This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving Office so permit) Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.☒ Authorization to charge the fee for priority document.Receiving Office: RO/ USDeposit Account No.: 02-2117Date: May 28, 2003Name: Wendy L. WashtienSignature: Wendy L. Washtien

PCT

SOLICITUD

El abajo firmante solicita que la presente
Solicitud Internacional
sea procesada de acuerdo con el
Tratado de Cooperación Internacional
en Materia de Patentes

Solicitud Internacional N°
Fecha de presentación Internacional
Nombre de la oficina receptora y Solicitud PCT Internacional
Referencia del solicitante o del agente: 52351AWOM1 (en caso deseado) (máximo: 12 caracteres)

Campo N° I TÍTULO DE LA INVENCION Secuencias de control del gen de corina humano		
Campo N° II SOLICITANTE ☐ Esta persona es también inventor		
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre; para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia). SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Muesstrasse 178 D - 13342 Berlin DE	Teléfono N°	
	Facsimil N°	
	Teleprinter N°	
	N° de registro del solicitante, con la oficina	
Estado (esto es, país) de nacionalidad: DE	Estado (esto es, país) de residencia: DE	
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados ☒ Todos los estados designados excepto E.E.U.U. ☐ Únicamente E.E.U.U. ☐ Los estados indicados en el campo suplementario		
Campo N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)		
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre; para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia). PAN, Junliang 1220 Brewster Drive El Cerrito, CA 94530 E.E.U.U.	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☒ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)	
	N° de registro del solicitante, con la oficina	
	Estado (esto es, país) de nacionalidad: US	Estado (esto es, país) de residencia: US
	Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados ☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U. ☒ Únicamente E.E.U.U. ☐ Los estados indicados en el campo suplementario	
☒ Otros solicitantes y/u (otros) inventores están indicados en una hoja de continuación.		
Campo N° IV AGENTE O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA		
La persona identificada abajo por este medio ha sido autorizada a actuar en nombre de(los) solicitante(s) ante los organismos internacionales competentes ☒ Agente ☐ Representante común		
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre; para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país). WASHTIEN, Wendy L. BERLEX BIOSCIENCES 2800 Hilltop Drive P.O. Box 4089 Richmond, California 94804 E.E.U.U.	Teléfono N° (510) 282-5411	
	Facsimil N° (510) 282-7085	
	Teleprinter N° N/A	
	N° de registro del solicitante, con la oficina 38,301	
	☐ Dirección Postal: marcar este casillero cuando no está/ha sido autorizado ningún agente o representante común, utilizando el espacio de arriba en lugar de indicar una dirección particular a la cual debe ser enviada la correspondencia.	

Hoja N° 2

Continuación de Campo N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)	
Si no es utilizado ninguno de los siguientes subcampos, no incluir esta hoja en el requerimiento	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia). WU, Qingyu 1153 Camino Vallecito Lafayette, CA 94549-2844 E.E.U.U.	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☒ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo) N° de registro del solicitante, con la oficina
Estado (esto es, país) de nacionalidad: CN	Estado (esto es, país) de residencia: US
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados ☒ Todos los estados designados excepto E.E.U.U. ☐ Únicamente E.E.U.U. ☐ Los estados indicados en el campo suplementario	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo) N° de registro del solicitante, con la oficina
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados ☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U. ☐ Únicamente E.E.U.U. ☐ Los estados indicados en el campo suplementario	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo) N° de registro del solicitante, con la oficina
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados ☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U. ☐ Únicamente E.E.U.U. ☐ Los estados indicados en el campo suplementario	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo) N° de registro del solicitante, con la oficina
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados ☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U. ☐ Únicamente E.E.U.U. ☐ Los estados indicados en el campo suplementario	

[] Otros solicitantes y/u (otros) inventores están indicados en una hoja de continuación.

Campo Nº V

-DESIGNACIÓN DE ESTADOS (marcar abajo el casillero apropiado, marcar a lo menos uno)

Las siguientes designaciones se hacen aquí de acuerdo con la regla 4.9 (a)

Patente Regional

☐

AP

Patente ARIPO: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudán, SL Sierra Leona, SZ Swazilandia, TZ República Unida de Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, y cualquier otro estado que sea signatario del Protocolo de Harare y del PCT. (si se desea otro tipo de protección o tratamiento, especificar en la línea punteada).....

☐

EA

Patente Eursiática: AM Armenia, AZ Azerbaijón, BY Bielorrusia, KG Kirguistán, KZ Kazajistán, MD República de Moldavia, RU Federación Rusa, TJ Tayikistán, TM Turkmenistán, y cualquier otro estado que sea signatario de la Convención Eursiática de Patentes y del PCT.

☐

EP

Patente Europea: AT Austria, BE Bélgica, CH y LI Suiza y Liechtenstein, CY Chipre, CZ República Checa, DE Alemania, DK Dinamarca, EE Estonia, ES España, FI Finlandia, FR Francia, GB Gran Bretaña, GR Grecia, IE Irlanda, IT Italia, LU Luxemburgo, MC Mónaco, NL Holanda, PT Portugal, SE Suecia, SI Eslovenia, SK Eslovaquia, TR Turquía, y cualquier otro estado que sea signatario de la Convención Europea de Patentes y del PCT.

☐

OA

Patente OAPI: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF República Central Africana, CG Congo, CI Costa de Marfil, CM Camerún, GA Gabón, GN Guinea, GQ Guinea Ecuatorial, GW Guinea Bissau, ML Malí, MR Mauritania, NE Níger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, y cualquier otro estado que sea miembro del OAPI y signatario del PCT. (si se desea otro tipo de protección o tratamiento, especificar en la línea punteada).....

Patente Nacional (si se desea otro tipo de protección o tratamiento, especificar en la línea punteada)

☐

AE

Emiratos Árabes Unidos.....

☐

AG

Antigua y Barbuda.....

☐

AL

Albania.....

☐

AM

Armenia.....

☐

AT

Austria.....

☐

AU

Australia.....

☐

AZ

Azerbaijón.....

☐

BA

Bosnia y Herzegovina.....

☐

BB

Barbados.....

☐

BG

Bulgaria.....

☐

BR

Brasil.....

☐

BY

Bielorrusia.....

☐

BZ

Beliza.....

☐

CA

Canadá.....

☐

CH y LI

Suiza y Liechtenstein.....

☐

CN

China.....

☐

CO

Colombia.....

☐

CR

Costa Rica.....

☐

CU

Cuba.....

☐

CZ

República Checa.....

☐

DE

Alemania.....

☐

DK

Dinamarca.....

☐

DM

Dominica.....

☐

DZ

Argelia.....

☐

EC

Ecuador.....

☐

EE

Estonia.....

☐

ES

España.....

☐

FI

Finlandia.....

☐

GB

Gran Bretaña.....

☐

GD

Grenada.....

☐

GE

Georgia.....

☐

GH

Ghana.....

☐

GM

Gambia.....

☐

HR

Croacia.....

☐

HU

Hungría.....

☐

ID

Indonesia.....

☐

IL

Israel.....

☐

IN

India.....

☐

IS

Islandia.....

☐

JP

Japón.....

☐

KE

Kenya.....

☐

KG

Kirguistán.....

☐

KP

República Popular Democrática de Corea.....

☐

KR

República de Corea.....

☐

KZ

Kazajistán.....

☐

LC

Santa Lucía.....

☐

LK

Sri Lanka.....

☐

LR

Liberia.....

☐

LS

Lesotho.....

☐

LT

Lituania.....

☐

LU

Luxemburgo.....

☐

LV

Letonia.....

☐

MA

Marruecos.....

☐

MD

República de Moldavia.....

☐

MG

Madagascar.....

☐

MK

Ex República Yugoslava de Macedonia.....

☐

MN

Mongolia.....

☐

MW

Malawi.....

☐

MX

México.....

☐

MZ

Mozambique.....

☐

NO

Noruega.....

☐

NZ

Nueva Zelanda.....

☐

OM

Omán.....

☐

PH

Filipinas.....

☐

PL

Polonia.....

☐

PT

Portugal.....

☐

RO

Rumania.....

☐

RU

Federación Rusa.....

☐

SC

Seychelles.....

☐

SD

Sudán.....

☐

SE

Suecia.....

☐

SG

Singapur.....

☐

SK

Eslovaquia.....

☐

SL

Sierra Leona.....

☐

TJ

Tayikistán.....

☐

TM

Turkmenistán.....

☐

TN

Túnez.....

☐

TR

Turquía.....

☐

TT

Trinidad y Tobago.....

☐

TZ

República Unida de Tanzania.....

☐

UA

Ucrania.....

☐

UG

Uganda.....

☐

US

E.E.U.U.....

☐

UZ

Uzbekistán.....

☐

VC

San Vicente y Las Granadinas.....

☐

VN

Vietnam.....

☐

YU

Yugoslavia.....

☐

ZA

Sudáfrica.....

☐

ZM

Zambia.....

☐

ZW

Zimbabwe.....

Casillas reservadas para designar estados que formen parte del PCT luego de la edición de esta hoja

☐

☐

Declaración preventiva de designación: adicionalmente a las designaciones efectuadas arriba, el solicitante también hace, de acuerdo con la regla 4.9(b), todas las designaciones permitidas por el PCT, excepto aquellas indicadas en el Campo Suplementario como excluidas del ámbito de esta declaración. El solicitante declara que tales designaciones suplementarias están sujetas a confirmación y que cualquier designación no confirmada antes de la expiración de los 15 meses a partir de la fecha de prioridad se abandonada por el solicitante a la expiración de este plazo. (La confirmación (incluyendo tasas) debe acceder a la oficina receptora dentro de tal plazo de 15 meses).

Formulario PCT/RO/101 (hoja 2) (enero 2003)

Ver notas al formulario de Solicitud

Mozan

Campo Suplementario		Si el campo suplementario no es utilizado, esta hoja no se debe incluir en la solicitud	
1.	En el caso de que en uno de los campos, excepto los campos VIII(i) a (v), para los cuales está provista una continuación especial, sea insuficiente el espacio para suministrar toda la información, escribir "continuación del campo N°....." (indicar el número del campo) y suministrar la información de la misma manera que la requerida de acuerdo con las leyendas del campo en el que el espacio era insuficiente, en particular:	Continuación del campo N° IV	
		MIYAMOTO, Neil G. Berlex Biosciences 2800 Hilltop Drive P.O. Box 4089 Richmond, California 94804 E.E.U.U.	
(i)	Si más de dos personas están indicadas como solicitantes y/o inventores y no está disponible una "hoja de continuación": en tal caso, escribir "Continuación del campo N° II" e indicar, para cada persona adicional, el mismo tipo de información que la requerida en el Campo N° II. El país de la dirección indicado en este campo es el estado (esto es, el país) de residencia del solicitante si no está indicado abajo el estado de residencia;	Teléfono N°: 510 688-4889 Facsimil N°: 510 282-7085 N° de registro del agente: 50,370	
		SHAW, Melissa A. Berlex Biosciences 2800 Hilltop Drive P.O. Box 4089 Richmond, California 94804 E.E.U.U.	
(ii)	Si en el campo N° II o en cualquier Subcampo del campo N° III está marcada la indicación "los estados indicados en el campo suplementario": en este caso, escribir "Continuación de campo N° II" o "Continuación del campo N° III" o "Continuación de los campos N° II y N° III" (según sea el caso), indicar el nombre de(la/s) solicitante(s) involucrados y, próximo a (cada uno de) tales nombres, el estado, (y/o, cuando corresponda, Patente ARIPO, Eursática, Europea u OAPI), los fines por los cuales la persona nombrada es solicitante.	Teléfono N°: 510 688-4280 Facsimil N°: 510 282-7085 N° de registro del agente: 38,301	
		HERMENAU, Ronald S. Berlex Biosciences 2800 Hilltop Drive P.O. Box 4089 Richmond, California 94804 E.E.U.U.	
(iii)	Si en el campo N° II o en cualquier Subcampo del campo N° III el inventor o el inventor/solicitante no es inventor a los fines de todos los estados designados o a los fines de E.E.U.U.: en tal caso, escribir "Continuación de campo N° II" o "Continuación del campo N° III" o "Continuación de los campos N° II y N° III" (según sea el caso), indicar el nombre de(la/s) inventor(es) involucrados y, próximo a (cada uno de) tales nombres, el estado, (y/o, cuando corresponda, Patente ARIPO, Eursática, Europea u OAPI), a los fines por los cuales la persona nombrada es inventor;	Teléfono N°: 510 688-4483 Facsimil N°: 510 282-7085 N° de registro del agente: 34,620	
		ZELANO, Anthony J. Millan, White, Zelano & Branigan, P.C. Arlington Courthouse Plaza 1 2200 Clarendon Boulevard, Suite 1400 Arlington, Virginia 22202 E.E.U.U.	
(iv)	Si existe(n) otro(s) agente(s) adicionalmente a los indicados en el campo N° IV: en tal caso, escribir "Continuación de campo N° IV" e indicar, para cada uno de los otros agentes, el mismo tipo de información que la requerida en el campo N° IV;	Teléfono N°: 703 243-6333 Facsimil N°: 703 243-6410 N° de registro del agente: 32,542	
(v)	Si en el campo N° V el nombre de un estado (u OAPI) es acompañado por la indicación "patente de adición" o "certificado de adición", o si en el campo N° V el nombre de E.E.U.U. es acompañado por una indicación "continuación" o "continuación-parte": en tal caso, escribir "Continuación del campo N° V", el nombre de cada estado (u OAPI) involucrado y luego el nombre de cada estado (u OAPI), el número del título o solicitud relacionado y la fecha de otorgamiento del título o solicitud relacionado;		
(vi)	Si en el campo N° VI existen más de cinco solicitudes anteriores cuya prioridad es reclamada: en tal caso, escribir "Continuación del campo N° VI" e indicar, para cada solicitud adicional anterior, el mismo tipo de información que la requerida en el campo N° VI.		
2.	Si con respecto a la declaración preventiva de designación contenida en el campo N° V, el solicitante desea excluir algún(los) estado(s) del ámbito de esta declaración: en tal caso, escribir "Designación(ones) excluida(s) de la declaración preventiva de designación" e indicar el nombre del código de dos letras de cada estado excluido de esta manera.		

Campo Nº VI

-REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Por este medio se reivindica la prioridad de la(s) siguiente(s) solicitud(es):

Fecha de presentación de la solicitud anterior (día/mes/año)	Número de la Solicitud anterior	Cuando la solicitud anterior es:		
		Solicitud nacional: país o miembro de WTO	Solicitud regional: * Oficina regional	Solicitud Internacional: Oficina receptora
Item (1) 01 de mayo de 2002 (31-05-02)	80/384,108	US		
Item (2)				
Item (3)				
Item (4)				
Item (5)				

☐ Otras reivindicaciones de prioridad están indicadas en el campo suplementario

Se solicita a la oficina receptora preparar y transmitir a la Oficina Internacional una copia certificada de la(s) solicitud(es) anterior(es) (solo si la solicitud anterior fue presentada ante el organismo que es la oficina receptora a los fines de la presente solicitud internacional) identificada(s) arriba como:

☐ Todos los items

☐ Item (1)

☐ Item (2)

☐ Item (3)

☐ Item (4)

☐ Item (5)

☐ otros, ver campo suplementario

* Cuando la solicitud anterior es una solicitud ARIPO, indicar en el campo suplementario a lo menos un país participe de la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial o un miembro de la Organización Mundial de Comercio ante el cual se presentó la solicitud anterior (regla 4.10(b)(ii):

Campo Nº VII

Organismo de Búsqueda Internacional

Elección de Organismo de Búsqueda Internacional (ISA): (indicar el organismo elegido cuando dos o más Organismos de Búsqueda Internacional son competentes para llevar a cabo la búsqueda internacional; se puede utilizar el código de dos letras):

ISA/EP

Solicitud para utilizar resultados de búsquedas anteriores; referencia a tal búsqueda: (cuando una búsqueda anterior fue llevada a cabo por o solicitada ante el Organismo de Búsqueda Internacional):

Fecha(día/mes/año) Número País (u oficina regional)

Fecha(día/mes/año) Número País (u oficina regional)

Campo Nº VIII

Declaraciones

En los campos VIII(i) a (v) están contenidas las siguientes declaraciones (marcar abajo los casilleros correspondientes e indicar en la columna derecha la cantidad de cada tipo de declaración):

		Cantidad de declaraciones
☐	Campo Nº VIII(i) Declaración sobre la identidad del inventor	:
☐	Campo Nº VIII(ii) Declaración sobre el carácter del solicitante y la fecha de presentación internacional a aplicar para el otorgamiento de la patente	:
☐	Campo Nº VIII(iii) Declaración sobre el carácter del solicitante y la fecha de presentación internacional a aplicar para reivindicar la prioridad de la solicitud anterior	:
☐	Campo Nº VIII(iv) Declaración sobre actividad inventiva (solo para los propósitos de designación de E.E.U.U.)	:
☐	Campo Nº VIII(v) Declaración sobre revelaciones no perjudiciales o excepciones por falta de novedad	:

Campo Nº IX Listado de verificación; Lengua de presentación		
Esta solicitud Internacional contiene: a) en forma de papel, la siguiente cantidad de hojas Solicitud (incluyendo hojas de declaración) : 6 Descripción (excluyendo listados de secuencias y/o tablas relacionadas con los mismos) : 30 Reivindicaciones : 3 Resumen : 1 Ilustraciones : 14 Subtotal cantidad de hojas : 54 Listados de secuencias : 11 Tablas relacionadas : (para ambos, cantidad real de hojas si está presentado en forma de papel, esté o no presentado también en forma legible por computadora; ver (c) más abajo) Total cantidad de hojas : 65 b) ☐ Solo en forma legible por computadora (Sección 80(a)(i)) (i) ☐ Listados de secuencias (ii) ☐ Tablas relacionadas c) ☐ También en forma legible por computadora (Sección 80(a)(ii)) (i) ☐ Listados de secuencias (ii) ☐ Tablas relacionadas Tipo y cantidad de soportes (disquete, CD-ROM- CD-R, u otro) En los cuales están contenidos los ☐ Listados de secuencias ☐ Tablas relacionadas Las copias adicionales deben ser indicadas en los ítem 9(ii) y/o 10 (ii), en la columna derecha)	Esta solicitud Internacional está acompañada por los ítem siguientes (marcar abajo los casilleros aplicables e indicar en la columna derecha la cantidad de cada ítem): 1. ☒ Hoja de cálculo de tasas : 2. ☐ Poder separado original del agente : 3. ☐ Poder general original del agente : 4. ☐ Copia del poder general del agente, Nº de referencia al estado: : 5. ☐ Declaración explicando la falta de firma : 6. ☐ Documento(s) de prioridad indentificado(s) en el campo VI como ítem: : 7. ☐ Traducción de la solicitud Internacional al (idioma): : 8. ☐ Indicaciones separadas concernientes a organismos u otro material biológico depositados : 9. ☒ Listados de secuencias en forma legible por computadora (indicar tipo y cantidad de soportes) (i) ☐ Copia suministrada solo a los fines de la búsqueda Internacional, según la regla 13ter (y no como parte de la solicitud Internacional) : Disco1 (ii) ☐ (solo si el casillero (b)(i) o (c)(i) está marcado en la columna izquierda) copias adicionales, incluyendo, cuando corresponde, la copia destinada a la búsqueda Internacional según la regla 13ter : (iii) ☐ Junto con declaraciones relevantes para identificar la(s) copia(s) con los listados de secuencias mencionados en la columna izquierda : 10. ☐ Tablas en forma legible por computadora relacionadas con los listados de secuencias (indicar tipo y cantidad de soportes) (i) ☐ Copia suministrada solo a los fines de la búsqueda Internacional, según la regla 802 (b-quater) (y no como parte de la solicitud Internacional) : (ii) ☐ (solo si el casillero (b)(i) o (c)(i) está marcado en la columna izquierda) copias adicionales, incluyendo, cuando corresponde, la copia destinada a la búsqueda Internacional según la regla 802 (b-quater) : (iii) ☐ Junto con declaraciones relevantes para identificar la(s) copia(s) con las tablas mencionadas en la columna izquierda : 11. ☐ Otros (especificar): transmisión :	Cantidad de ítem
Figura de las ilustraciones que pueden acompañar el resumen	Lengua de presentación de la Solicitud Internacional	Inglés
Campo Nº X Firma del solicitante, agente o representante común Próximo a cada una de las firmas indicar el nombre de la persona, firmante y la capacidad por la cual firma (si tal capacidad no es obvia por lectura de la solicitud) Wendy L. Washtien, reg. Nº 36,301 Agente de los solicitantes Firmado		

Para uso exclusivo de la Oficina Receptora		
1. Fecha de recepción real de la solicitud Internacional pretendida:	2. Ilustraciones ☐ Recibidas ☐ No recibidas	
3. Fecha corregida de la recepción real debido a escritos o ilustraciones que completan la solicitud Internacional pretendida y recibidos más tarde pero en término:		
4. Fecha de recepción en término de las correcciones requeridas según artículo PCT 11(2):		
5. Organismo de Búsqueda Internacional (cuando dos o más son competentes) ISA/		
6. ☐ Transmisión de copia de búsqueda demorada hasta el pago de la tasa de búsqueda		

Para uso exclusivo de la Oficina Internacional	
Fecha de recepción de la copia registrada por la Oficina Internacional:	Ver Notas al formulario de Solicitud

PCT
HOJA DE CÁLCULO DE TASAS
Anexo de la solicitud

—Para uso exclusivo de la oficina receptora—

Solicitud Internacional N°

Sello fechador de la oficina receptora

Referencia de presentación del
solicitante o del agente: 52351AWOM1

CÁLCULO DE LAS TASAS PRESCRIPTAS

1. TASA DE TRANSMISIÓN	240.00	T
2. TASA DE BÚSQUEDA	938.00	S
Búsqueda Internacional llevada a cabo por <u>EP</u> (Si dos o más organismos de búsqueda internacional son competentes para llevar a cabo la búsqueda internacional, indicar el nombre del organismo que es seleccionado para llevar a cabo la búsqueda internacional)		
3. TASA INTERNACIONAL		
Tasa Básica		
Donde se aplican los ítem (b) y/o (c) del campo N° IX, Ingresar subtotal cantidad de hojas		
Donde no se aplican los ítem (b) y (c) del campo N° IX, Ingresar total cantidad de hojas		
b1 Primeras 30 hojas	478.00	b1
b2 $\frac{35}{\text{Cantidad de hojas}} \times \frac{12.00}{\text{Tasa por hoja}} =$	420.00	b2
b3 Componente adicional (solo si los listados de secuencias y/o tablas relacionadas con los mismos están presentados en forma legible por computadora, según la sección 801(a)(i), o ambos en tal forma y en papel, según la sección 801(a)(ii)		
$400 \times \frac{\text{Tasa por hoja}}{\text{hoja}} =$		b3
Sumar montos de b1, b2, b3 e Ingresar tal suma en B ...	898.00	B
Tasas de designación		
La solicitud internacional contiene <u>TODAS</u> las designaciones		
$\frac{5}{\text{Cantidad de tasas de designación a pagar (máximo 5)}} \times \frac{104.00}{\text{Monto de tasa de designación}} =$	520.00	D
Sumar montos de B y D e Ingresar tal suma en I		I
(Los solicitantes de ciertos estados tienen derecho a una reducción del 75 % de la tasa internacional. Cuando el solicitante tiene (o todos los solicitantes tienen) este derecho, el total a ser ingresado en I es el 25 % de la suma de los montos ingresados en B y D.)		
4. TASA POR DOCUMENTO DE PRIORIDAD (si es aplicable)	20.00	P
5. TOTAL DE TASAS A PAGAR	2,612.00	
Sumar montos de T, S, I y P e Ingresar tal suma en TOTAL	TOTAL	

☐ Las tasas de designación aún están sin pagar

FORMA DE PAGO

- | | | | |
|---|--|---|--|
| ☒ Autorización para debitar en cuenta (ver abajo) | ☐ Giro bancario | ☐ Efectivo | ☐ Cupones |
| ☐ Cheque | ☐ Giro bancario | ☐ Estampillas fiscales | ☐ Otros (especificar) |

AUTORIZACIÓN PARA DEBITAR (O ACREDITAR) EN CUENTA BANCARIA

Esta forma de pago no está disponible en todas las oficinas Receptoras

Oficina receptora: /RO US

☒ Autorización para debitar el total de las tasas indicadas Arriba

Cuenta bancaria N°: 02-2117

☒ (Este casillero solo debe marcarse si los permiten las condiciones para cuenta bancaria de la oficina receptora)

Fecha: 28 de mayo de 2003

Autorización para debitar cualquier déficit o acreditar cualquier sobre pago del total de las tasas indicadas arriba

Nombre: Wendy L. Washien

☒ Autorización para debitar la tasa para el documento de Prioridad

Firma: (Firmado)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pan, Junliang
Wu, Qingyu

<120> Secuencias de control del gen de corina humano

<130> 52351ANOM1

<150> US 60/384.108

<151> 2002-05-31

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 1898

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> caract_misc

<222> (922)..(922)

<223> n es a, c, g o t

<400> 1

aaagaagatg aaatagaaac ttgtacttgg cctcagaatg cctgtagaaa ccttagcaat	60
tgaatccagc ccttatgtta taggctgagt taactgtggc ccagaaagac tatgtgattt	120
gctcacagtt cttgattccc agactggcac tgcggtgatg gtgtgtgatg aggtagtatc	180
ttagtaagaa cacaatccag aagtcactgc ctcgggggaa tcccagctca gcttcttgct	240
agcttgcgta ggctgggttac ttcacttcag ctccctgaat ctgctttctt atctctaaaa	300
taaaaaaat agcttcttcc tcagagtagt tgggtggaact gaaagaatac atgtaaagtg	360
cttagtatga cacctgccac ataatatgaa ctgaattatt gtgaattatg ataaatttgt	420
cagatactgg ttacaaatc ggatgttaga ataacatgga atcagtgttt cagtcatttt	480
actatacata tgcaatattt tctacatttg atctcacttc agaaacaaaa tactgcccc	540
cccattttac aaatgcatat ttttttctca gcaataatgt tcaagaacaa gtgcttggcc	600
catattttgt tgtctttaca tggctttctt taaataatgg ggatggattt attaaataac	660
ctcatgagta attttcaaaa tttccattaa gatcttgatt gaaattggat gaaaaatcat	720
ttctaagaaa aacccaatga agtggttttc tttgccacat ttgacaattg ccttggactt	780
ggtaaagtaa tcattactgt gttgagtacc tccagtgcc tccttgacgc tgccttagaa	840
aaggtagctg cttttgaatg acaggcagga atttgttcgc cttttagggt cagcctgtag	900

```

gtgccctctg caggaaatca gnaactaggg ttttgaagc agtcaggggtg gggttctccc 960
ttgtccctgc agcctcagca aagactcagg cagtctggca aaagcagttt cttcagcata 1020
cctaacagaa cgcaagtttc catatgcctg atgcaaataa tggcctccaa acgttaaacc 1080
ttttttgaga taaacttggt ctttaattgc cagcgctgc agttaatttt gattggctac 1140
actctgggta aaagaaaatg ctttcgatgt gatatggcaa atttgagaa aagtaactct 1200
tttgctccca accagtcttc cacaacttaa acttaatcgt cctgtccttt ttctgctgcc 1260
ctcgtggagt gtaagttttt gaggagacc agcagaaact gactttccat atgcccctga 1320
agaataactt ctttgaatgc aaagagggtg ggacacggag gatctgtcat tacgggttat 1380
tatgggtggg acccagagac gggagtgaag ggagggtgtg gcccgcggtt gggatctgta 1440
gagcagacaa aatatggggc ccctggcgct taaagttcag tttgtctctc ttgagcttgg 1500
agaaaatcat ccgtagtgc tccccggggg acacgtagag gagagaaaag cgaccaagat 1560
aaaagtggac agaagaataa gcgagacttt ttatccatga aacagtctcc tgccctcgct 1620
ccggaagagc gctgccgcag agccgggtcc ccaaagccgg taagatcgat gattcgctgt 1680
cctaccgcag ccagggtgtg tggcctctta gtcccggtga attcagggtc agcccctccc 1740
gccccgtcc tctcctccgc ccgatgccac ctccctcccc agccgccggt gagctccgc 1800
tctgacagtt ccgcgctcag cgccctgcac ccagttccca ggcgcacggc cctgggtccc 1860
accaccaccc cggtcgcccc gcgccga 1888

```

```

<210> 2
<211> 4165
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> caract_misc
<222> (3363)..(3363)
<223> n es a, c, g o t

```

```

<400> 2
aagcttcatg agggcaggag tgcagttttg tttattactg taacctcaga gtagagaagc 60
ctggccacat agtagatgct agtattcggt tcctagggct gctgtaacag ataccataca 120
tgagttactt aaaacaacag aaattttattc ttccacagtt taggtggcca gaagtcccaa 180
accaagatat aacaaattat atctgcaaag cctttatttc cacagaacca cattctgagg 240
ttctgggtgg acattaattt ggcagggagt agtgggggga cactaaccta ctacagtgtc 300

```

cagtaaatat ttattgggtg aatgaaaatt cagagtgtat tctaagctgt aaaccccttg	360
gatgttttca tcacagtctt ctcttaataa ctgctacaga acataaggat tagtttgtgg	420
tcccagattt tttaggctcc aattctgctt ctaccacttt ctacttgtga gctcttaggc	480
aagctattta actttgtaag cctcagtttc ttctgtaaaa tggtgacaat aagaaataac	540
agtaagtgcc caataagttt taactattat tatgtgtcta tagctatttt aaagcacttt	600
ctatatgtaa tcctcataac aaccgtatta ggtgagccta ttacacttct cattttatga	660
caaaggsaac tagatttggt tcaagaatga aaaacctaga aaattatatg tcactttatg	720
aagtgcctgg cacatagtac atagaatagc ttagctacaa taatatagat atgtgacttt	780
acctcataac ttttaagacat ctcaaatga ttcacaaatc agaaaaaaaa tctgaggcat	840
cagatgtgag gtgagggtgag gtgaggcatc tcagtttttg cacatatggt tactgttatt	900
gagggagctc catgtcattg agggagctcc acgtcattga gggaggactg ggtgggatgc	960
tggccaaagg taggggcata tttaggcagt gaaattgcag ttatgggacc cctctatagc	1020
actagatgtg tgagaggact aaaaaataaaa ttcotttgaa atttcttaca gggtcataata	1080
ttacctcctt cccaatgact actgtggtat attagagtag gggattgatg tcccagaaat	1140
attatgtaca tcaaacagaa gatctacaca aattgtttta tcagatactg aatatatcaa	1200
tgggctagag tgtattatag tacatatggg tatgttgttt tccccctttt gactaaataa	1260
actctccccct ctctgcaaca ggtaaatttc cagtttacct ttttcttgct gtttttaatt	1320
ttttttattt tgaaggcttt gtatctttat atctcagctg aaaatattac attctaactc	1380
cccaaagcta ttctcacatt atttgcaagt attttttcat agtttacatg tttgtgtatt	1440
tgtttaatac attccacaag actgaaagtc ttggtgaggg caggaactct gtctagggtg	1500
ttcatctggc agccagcaaa cccaaaataa gtattagttg aatgaatagc taaatagatg	1560
agccatgggg tagcatatct gttttagcta ctgcttgccct gttatcatcc tgggatgctg	1620
cttgcttctc cgtgatctct tcttgttott aaattgtctt cagttgtagt actaagtact	1680
aatttgatct gtaatgtgat atgtggctga agtttgctct gtaaaatcac cgtttcatga	1740
ggtatatcca atatcttttaa tttttccata aatctcttca aggttttgtgt gtgttttctt	1800
ttaaattatc taactagttg gatgtatgct tgaagtgcta gacaataaaa gtttcaatag	1860
gctagaaatg tttctttttg taaaattatt ttaagaact agatgatggt tgtcacttga	1920
agctgaaatg caaatgtagc tagttttttt taaagaataa ttcaaatagg tcattaaaga	1980

ttactatgag cacactgcat attcaaatca gtttgaatat gttttgagac ttctaatagt	2040
ttatgattct tgacatttta atgagcacac tgcataattca aatcagtttg aatatgtttt	2100
gagacttcta atagtttatg attcttgaca ttttaaaagt ttattataaa gaatatataaa	2160
catctttacc ctcatTTTTT atgtcattac cttcatgcaa agaatacctc aggtattaat	2220
tctggtgctg ttggttaacta gaactgggtg ggttttcttg ctaaaaggaa gtttaaaaaa	2280
tgtttatTTT acaccattaa tgcaattagc tttagttctc agaggaacta aaagtggaaa	2340
agtgagggag actgatcgac cctatctcaa atccactgac gtagctactt taatttcata	2400
gtccctgtag cacctccacc agagggcaga aagtggaga gaaagaagat gaaatagaaa	2460
cttgtagctg gcctcagaat gcctgtagaa accttagcaa ttgaatccag cccttatgtt	2520
ataggctgag ttaactgtgg ccagaaaga ctatgtgatt tgctcacagt tcttgattcc	2580
cagactggca ctgcggtgat ggtgtgtgat gaggtagtat cttagtaaga acacaatcca	2640
gaagtcactg cctcggggga atcccagctc agcttcttg ctagcttgctg aggtgggta	2700
cttcacttca gctccctgaa tctgctttct tatctctaaa ataaaaataa tagcttcttc	2760
ctcagagtag ttggtggaac tgaagaata catgtaaagt gcttagtatg acacctgcca	2820
cataatatga actgaattat tgtgaattat gataaatttg tcagatactg gtttacaat	2880
cggatgttag aataacatgg aatcagtggt tcagtcattt tactatacat atgcaatatt	2940
ttctacattt gatctcactt cagaacaaa atactgcccc cccatttta caaatgcata	3000
tttttttctc agcaataatg ttcaagaaca agtgcttggc ccatattttg ttgtctttac	3060
atggctttct ttaaataatg gggatggatt tattaataaa cctcatgagt aattttcaaa	3120
atttcatta agatcttgat tgaaattgga tgaaaaatca tttctaaga aaaccaatg	3180
aagtgtttt ctttgccaca ttgacaatt gccttggact tggtaaagta atcattactg	3240
tgttgagtac ctccagtgc ctccttgacg ctgccttaga aaaggtagct gcttttgaat	3300
gacaggcagg aatttgttcg ctttttaggt tcagcctgta ggtgccctct gcaggaaatc	3360
agnaactagg gttttggaag cagtcagggt ggggttctcc cttgtccctg cagcctcagc	3420
aaagactcag gcagtctggc aaaagcagtt tcttcagcat acctaacaga acgcaagttt	3480
ccatatgcct gatgcaaata atggcctcca aacgttaaac cttttttgag ataaacttgt	3540
tctttaattg ccagcgctg cagttaattt tgattggcta cactctggtt aaaagaaat	3600
gctttcgatg tgatatggca aatttggaga aaagtaactc ttttgctccc aaccagtctt	3660
ccacaactta aacttaatcg tctgtcctt tttctgctgc cctcgtggag tgtaagtttt	3720

tgagggagac cagcagaaac tgactttcca tatgcccctg aagaataact tctttgaatg 3780
 caaagaggtg gggacacgga ggatctgtca ttacgggtta ttatgggtgg gaccagaga 3840
 cgggagtga gggaggggtg gggccgcggg tgggatctgt agagcagaca aaatatgggg 3900
 cccctggcgc ttaaagttca gtttgtctct cttgagcttg gagaaaatca tccgtagtgc 3960
 ctccccgggg gacacgtaga ggagagaaaa gcgaccaaga taaaagtgga cagaagaata 4020
 agcgagactt tttatccatg aaacagtctc ctgccctcgc tccggaagag cgctgccgca 4080
 gagccgggtc cccaaagccg gtaagatcga tgattcgctg tcctaccgca gccaggtgtg 4140
 atggcctctt agtcccgggtg aattc 4165

<210> 3
 <211> 1817
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 3
 aactctgaaa tgaaagaaac tcaactgagc cttcaagatg ggtgaacgta caccactgt 60
 tccatcacag actgcttaac tctggccttc aggggtggagt tggcaaagt gtctcctggg 120
 ctctgggttc tcagatgggg ttctgtggg tgggtgggtg cgctgaggca gtgtctcagt 180
 cagaactcag tcacaaaatg ccaccatctc tggggagtgt caggtcactg cctaccaaatt 240
 gacctcagcg ggttatgcca gttgcctctc atctctaagt taaagagggg atgtgcaaaa 300
 tgcttagtgc agagcccggc atgctggaac actcaggttt gtgaattgtg aaacccttgt 360
 tagaaatggc atgcctcact gatgctggaa taacttgagg tcaagtgtcc ctcgtcttta 420
 acgacacata gatgatattc ccacactcca tgtcttttcg gaagcaaagt acccattacc 480
 acttccttcc actcgtacaa atgtgccttt gtccacacaa tgatactcaa ggtcttattg 540
 tctgcttact atatgtagcc ttctctagt gagatgggct acagtataac cttgaataat 600
 tattgaaatt ttgaaaattt tgattaaaaa tgcatttaaa actcacgttt aagaaaactt 660
 aaatttttgt tacccttggc gggttttttt ttcaattttc gataaatatt taagaattgt 720
 cttgggcttc aatgcaacct ttgctttgga atgtctacac tgctttcctt gacgctatta 780
 gaatgcagct ccctgtctga tgggcgcgaa tttgctggcc cctgatttca gcctgggcag 840
 gttcttgtca gacaatcgca gggccgagtt ctcttagccc atgaagctca aacagcaacg 900
 ccgtttcccc ccctaaactt gtagcagaag acagatttgc aatttgtgta acacgaataa 960
 tgcctgcctt cgaaacctga catcttttcg aacacaacaa acttgtcatt ggatcgctag 1020

tgtctgaaga cattcatttt gatacttgcc tggctagaat cctgtatgag gggatagact 1080
 gttctagatg tgataatgag agttcggaag agagcagccc tttaactgc tcaacaaagt 1140
 tctgccctca acaaagcagc aaaggccaaa agctgctgcc ccatagttga agggttggtt 1200
 tgtttgtttt ttccctggtg tggaggatgg gggcagtaga ctcttggtc tccatctgcc 1260
 atagaaaaat aacttttttg aaggctgggg tgggtatgga ggaactgtct cattaagggg 1320
 tatgggtagg acccagagac gtgagtgaag ggaggagtg gtctgcgggt ggggtctgcc 1380
 cagcagacaa aatatggggc tccaatcccc tgagtataac ttcactccga gtgaggagaa 1440
 agacacccgt agtgcctctc ctcgagatcc atagagcaga gaaaagcgac cgagataaga 1500
 gtggacagag gagaagata tggtcacgaa acggccccc gcccttgctc cggaggagta 1560
 cagccgccga gctgacgcc caaagagggt aagatccacc ctctcgctc ctccagcaca 1620
 caggctcgct ggcctgagtc ctggtgactt cagagtcaac ctttttctc cctgtccctt 1680
 cctcctttca tcgggtgcc cctccttccc gtccgtaggt cagtgagcac agacttctca 1740
 gtggctcgtt ctagtcccca ggcagacggt ccctcactcc tgtggcttgg cgtcggagac 1800
 gctggcagtc atgggca 1817

<210> 4
 <211> 391
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4
 agtaactctt ttgctcccaa ccagtcttcc acaactaaa cttaatcgtc ctgtcctttt 60
 tctgctgccc tcgtggagtg taagtttttg agggagacca gcagaaactg actttccata 120
 tgcccctgaa gaataacttc tttgaatgca aagagggtggg gacacggagg atctgtcatt 180
 acgggttatt atgggtggga ccagagacg ggagtgaagg gaggtgtgg ccgcgggtg 240
 ggatctgtag agcagacaaa atatggggcc cctggcgctt aaagttcagt ttgtctctct 300
 tgagcttggg gaaaatcatc cgtagtgcct ccccggggga cacgtagagg agagaaaagc 360
 gacgaagata aaagtggaca gaagaaatag 391

<210> 5
 <211> 1283
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (623)..(623)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 5
 ataaaaataa tagcttcttc ctcagagtag ttggtggaac tgaagaata catgtaaagt 60
 gcttagtatg acacctgcca cataatatga actgaattat tgtgaattat gataaatttg 120
 tcagatactg gtttacaaat cggatgttag aataacatgg aatcagtgtt tcagtcattt 180
 tactatacat atgcaatatt ttctacattt gatctcactt cagaacaaca atactgcccc 240
 ccccatttta caaatgcata tttttttctc agcaataatg ttcaagaaca agtgcttggc 300
 ccatattttg ttgtctttac atggctttct ttaaataatg gggatggatt tattaataa 360
 cctcatgagt aattttcaaa atttccatta agatcttgat tgaattgga tgaanaatca 420
 tttctaagaa aaacccaatg aagtgttttt ctttgccaca ttgacaatt gccttggact 480
 tggtaaagta atcattactg tgttgagtag ctccagtgcc ctccctgacg ctgccttaga 540
 aaaggtagct gcttttgaat gacaggcagg aatttgttcg ccttttaggt tcagcctgta 600
 ggtgccctct gcaggaaatc agnaactagg gttttggaag cagtcagggt ggggttctcc 660
 cttgtccctg cagcctcagc aaagactcag gcagtctggc aaaagcagtt tcttcagcat 720
 acctaacaga acgcaagttt ccatatgcct gatgcaaata atggcctcca aacgttaaac 780
 cttttttgag ataaacttgt tctttaattg ccagcgcctg cagttaattt tgattggcta 840
 cactctggtt aaaagaaaat gctttcgatg tgatatggca aatttggaga aaagtaactc 900
 ttttgcctcc aaccagtctt ccacaactta aacttaatcg tccgtgcctt tttctgctgc 960
 cctcgtggag tgtaagtttt tgagggagac cagcagaaac tgactttcca tatgcccctg 1020
 aagaataact tctttgaatg caaagagggtg gggacacgga ggatctgtca ttacgggtta 1080
 ttatgggttg gaccagaga cgggagtgaa gggaggggtg gggccgcggg tgggatctgt 1140
 agagcagaca aaatatgggg cccctggcgc ttaaagttca gtttgtctct cttgagcttg 1200
 gagaaatca tccgtagtgc ctccccgggg gacacgtaga ggagagaaaa gcgaccaaga 1260
 taaaagtgga cagaagaata agc 1283

<210> 6
 <211> 4023
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> caract_misc

<222> (3363)..(3363)

<223> n es a, c, g o t

<400> 6

aagcttcatg agggcaggag tgcagttttg tttattactg taacctcaga gtagagaagc	60
ctggccacat agtagatgct agtattcggt tcctagggct gctgtaacag ataccatata	120
tgagttactt aaaacaacag aaattttattc ttccacagtt taggtggcca gaagtcccaa	180
accaagatat aacaaattat atctgcaaag cctttatttc cacagaacca cattctgagg	240
ttctgggtgg acattaattt ggcagggagt agtgggggga cactaaccta ctacagtgtc	300
cagtaaatat ttattgggtg aatgaaaatt cagagtgtat tctaagctgt aaacccttg	360
gatgttttca tcacagtctt ctcttaataa ctgctacaga acataaggat tagtttgtgg	420
tcccagattt tttaggctcc aattctgctt ctaccacttt ctacttgtga gctcttaggc	480
aagctattta actttgtaag cctcagtttc ttctgtaaaa tgggtgacaat aagaataaac	540
agtaagtgcc caataagttt taactattat tatgtgtcta tagctatttt aaagcacttt	600
ctatatgtaa tcctcataac aaccgtatta ggtgagccta ttacacttct cattttatga	660
caaaggaaac tagatttgtt tcaagaatga aaaacctaga aaattatatg tcactttatg	720
aagtgcctgg cacatagtac atagaatagc ttagctacaa taatatagat atgtgacttt	780
acctcataac ttttagacat ctcaaattga ttcacaaatc agaaaaaaaa tctgaggcat	840
cagatgtgag gtgagggtgag gtgaggcatc tcagtttttg cacatatggt tactgttatt	900
gaggggagctc catgtcattg agggagctcc acgtcattga gggaggactg ggtgggatgc	960
tggccaaagg taggggcata tttaggcagt gaaattgcag ttatgggacc cctctatagc	1020
actagatgtg tgagaggact aaaaataaaa ttcctttgaa atttcttaca gggcatata	1080
ttacctcctt cccaatgact actgtggtat attagagtag gggattgatg toccagaaat	1140
attatgtaca tcaaacagaa gatctacaca aattgtttta tcagatactg aatatatcaa	1200
tgggctagag tgtattatag tacatatggg tatgttgttt tccccctttt gactaaataa	1260
actctcccct ctctgcaaca ggtaaatttc cagtttacct ttttcttgct gtttttaatt	1320
ttttttattt tgaaggcttt gtatctttat atctcagctg azaatattac attctaactc	1380
cccaaagcta ttctcacatt atttgcaagt attttttcat agtttacatg tttgtgtatt	1440
tgtttaatac attccacaag actgaaagtc ttggtagagg caggaaactct gtctagggtg	1500
ttcatctggc agccagcaaa cccaaaataa gtattagttg aatgaatagc taaatagatg	1560

agccatgggg tagcatatct gttttagcta ctgcttgccct gttatcatcc tgggatgctg 1620
 cttgcttctc cgtgatctct tcttgttctt aaattgtctt cagttgtagt actaagtact 1680
 aatttgatct gtaatgtgat atgtggctga agtttgctct gtaaaatcac cgtttcatga 1740
 ggtatattca atatctttaa tttttccata aatctcttca aggtttgtgt gtgttttctt 1800
 ttaaattatc taactagttg gatgtatgct tgaagtgcta gacaataaaa gtttcaatag 1860
 gctagaaatg tttctttttg taaaattatt ttaagaaact agatgatggg tgtcacttga 1920
 agctgaaatg caaatgtagc tagttttttt taaagaataa ttcaaatagg tcattaaaga 1980
 ttactatgag cacactgcat attcaaatca gtttgaatat gttttgagac ttctaatagt 2040
 ttatgattct tgacatttta atgagcacac tgcatattca aatcagtttg aatatgtttt 2100
 gagacttcta atagtttatg attcttgaca ttttaaaagt ttattataaa gaatataaaa 2160
 catctttacc ctcatTTTTT atgtcattac cttcatgcaa agaatacctc aggtattaat 2220
 tctggtgctg ttggttaacta gaactgggtg ggttttcttg ctaaaaggaa gtttaaaaaa 2280
 tgtttatttt acaccattaa tgcaattagc ttttagttctc agaggaacta aaagtggaaa 2340
 agtgagggag actgatcgac cctatctcaa atccactgac gtagctactt taatttcata 2400
 gtccctgtag cacctccacc agagggcaga aagtggaga gaaagaagat gaaatagaaa 2460
 cttgtacttg gcctcagaat gcctgtagaa accttagcaa ttgaatccag cccttatgtt 2520
 ataggctgag ttaactgtgg cccagaaaga ctatgtgatt tgctcacagt tcttgattoc 2580
 cagactggca ctgcggtgat ggtgtgtgat gaggtagtat cttagtaaga acacaatcca 2640
 gaagtcactg cctcggggga atcccagctc agcttcttgc tagcttgctg aggctggtta 2700
 cttcacttca gctccctgaa tctgctttct tatctctaaa ataaaaataa tagcttcttc 2760
 ctcagagtag ttggtggaac tgaaagaata catgtaaagt gcttagtatg acacctgcca 2820
 cataatatga actgaattat tgtgaattat gataaatttg tcagatactg gtttacaat 2880
 cggatgttag aataacatgg aatcagtggt tcagtcattt tactatacat atgcaatatt 2940
 ttctacattt gatctcactt cagaaacaaa atactgcccc cccatttta caaatgcata 3000
 ttttttctc agcaataatg ttcaagaaca agtgcttggc ccatattttg ttgtctttac 3060
 atggctttct ttaaataatg gggatggatt tattaaataa cctcatgagt aattttcaaa 3120
 atttccatta agatcttgat tgaaattgga tgaaaaatca tttctaagaa aaaccaatg 3180
 aagtgttttt ctttgccaca ttgacaatt gccttgact tggtaaagta atcattactg 3240

tggtgagtac ctccagtgcc ctccttgacg ctgccttaga aaaggtagct gcttttgaat 3300
gacaggcagg aatttgttcg ccttttaggt tcagcctgta ggtgccctct gcaggaaatc 3360
agnaactagg gttttggaag cagtcagggg ggggttctcc cttgtccctg cagcctcagc 3420
aaagactcag gcagtctggc aaaagcagtt tcttcagcat acctaacaga acgcaagttt 3480
ccatatgcct gatgcaaata atggcctcca aacgttaaac cttttttgag ataaacttgt 3540
tctttaattg ccagcgcctg cagttaattt tgattggcta cactctgggtt aaaagaaaat 3600
gctttcgatg tgatatggca aatttgaga aaagtaactc ttttgcctcc aaccagtctt 3660
ccacaactta aacttaatcg tcctgtcctt tttctgctgc cctcgtggag tgtaagtttt 3720
tgaggggagac cagcagaaac tgactttcca tatgccctg aagaataact tctttgaatg 3780
caaagagggtg gggacacgga ggatctgtca ttacgggtta ttatgggtgg gacccagaga 3840
cgggagtgaa gggaggggtgt ggcccgcggg tgggatctgt agagcagaca aaatatgggg 3900
cccctggcgc ttaaagttca gtttgtctct cttgagcttg gagaaaatca tccgtagtgc 3960
ctccccgggg gacacgtaga ggagagaaaa gcgaccaaga taaaagtgga cagaagaata 4020
agc 4023

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 7
aagcttcattg agggcaggag 20

<210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 8
gagctcgctt attcttctgt ccactt 26

<210> 9
<211> 26
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 9
aagcttataa aaataatagc ttcttc 26

<210> 10
<211> 26
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 10
aagcttagta actcttttgc tcccaa 26

<210> 11
<211> 42
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 11
cgtagaggag agaaaagcga ccaagataaa agtggacaga ag 42

<210> 12
<211> 42
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 12
cgtagaggag agaaaagcga ccaacttaaa agtggacaga ag 42

<210> 13
<211> 42
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 13
catagagcag agaaaagcga ccgagataag agtggacaga gg 42

<210> 14

<211> 42
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 14
catagagcag agaaaagcga ccgacttaag agtggacaga gg

42

<210> 15
<211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 15
cacttgataa cagaaagtga taactct

27

<210> 16
<211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sonda

<400> 16
cacttcttaa cagaaagtct taactct

27

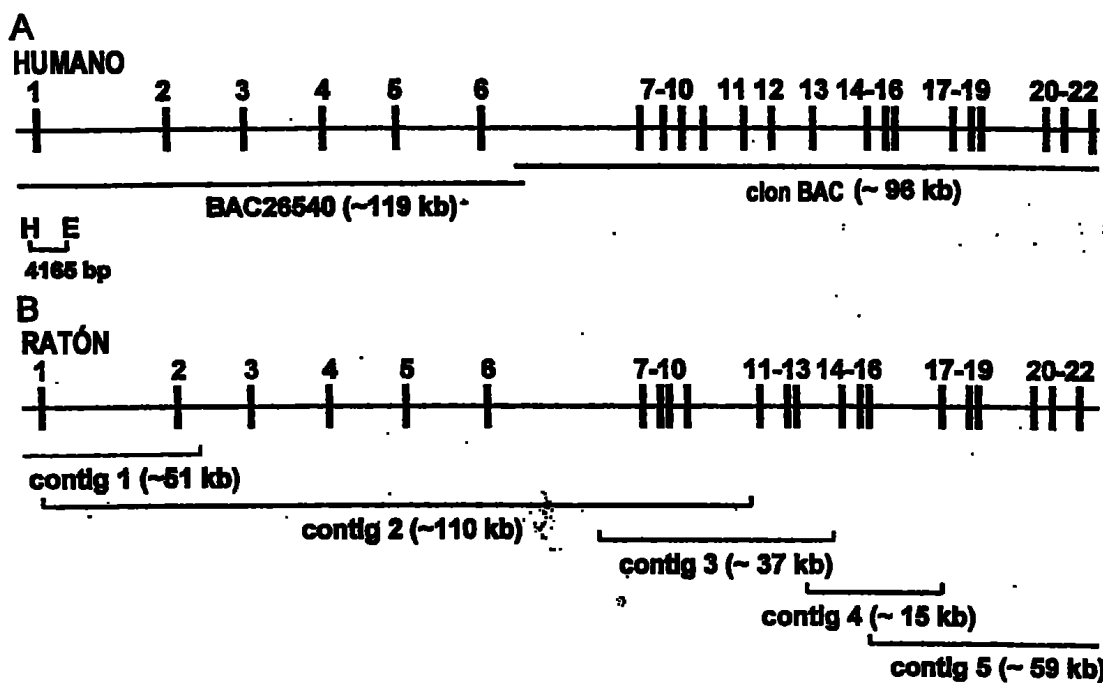
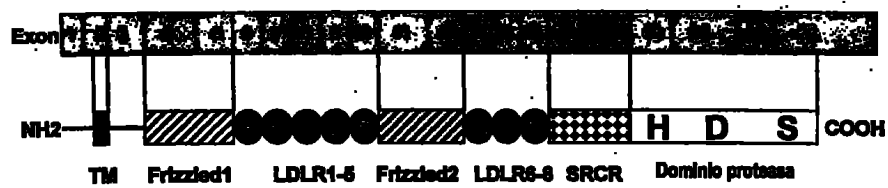
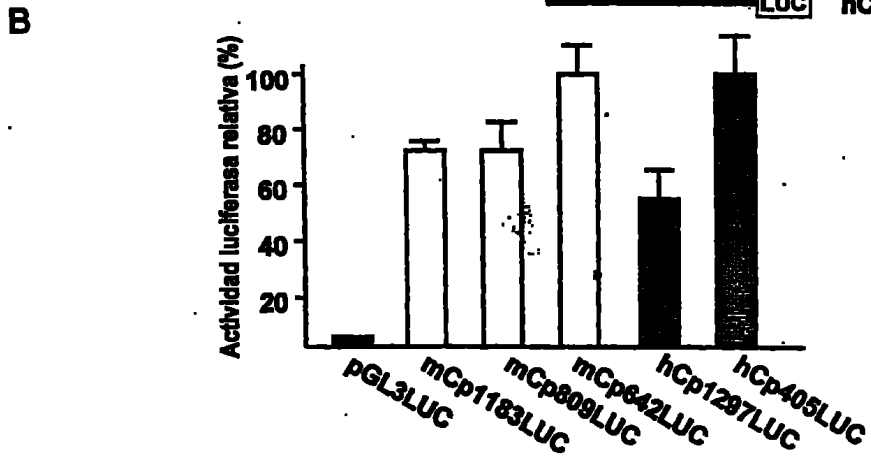
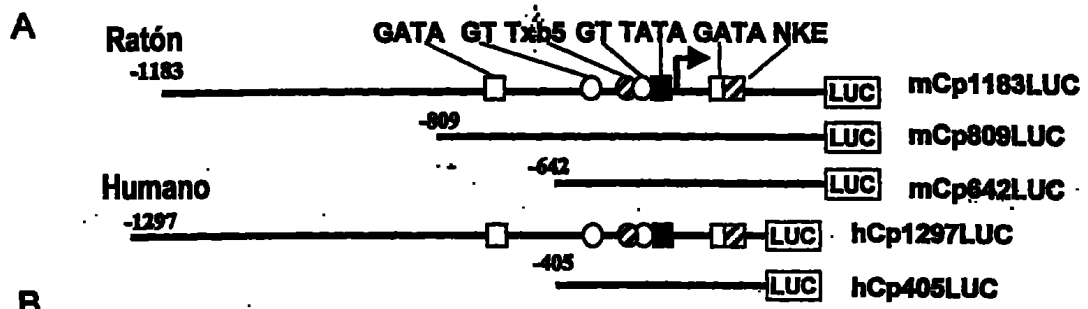


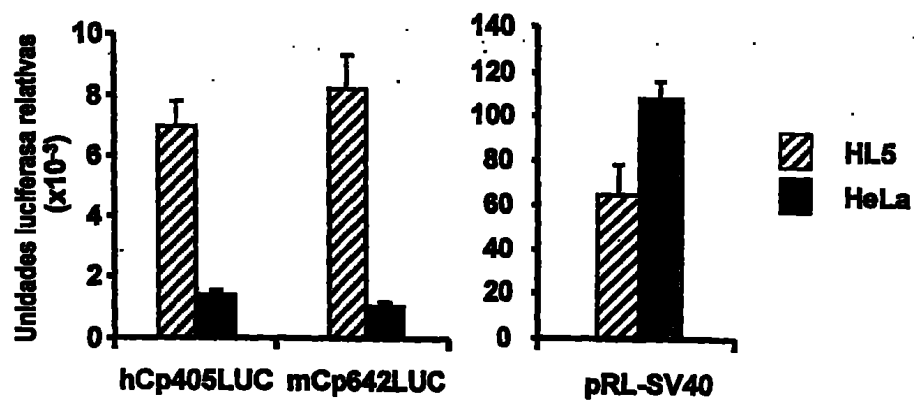
FIGURA 1
1/14



2/14
FIGURA 2



6/14
FIGURA 4



7/14
FIGURA 5

-83 -22
CGTAGAGGAGAGAAAAGCGACCAAGATAAAAGTGGACAGAAG
CGTAGAGGAGAGAAAAGCGACCAACTTAAAGTGGACAGAAG

Mutante GATA
de corina humana

-341 -299
CATAGAGCAGAGAAAAGCGACCGAGATAAGAGTGGACAGAGG
CATAGAGCAGAGAAAAGCGACCGACTTAAGAGTGGACAGAGG

Mutante GATA
de corina de ratón

CACTTGATAACAGAAAGTGATAACTCT
CACTTCTTAACAGAAAGTCTTAACTCT

Mutante GATA
consenso

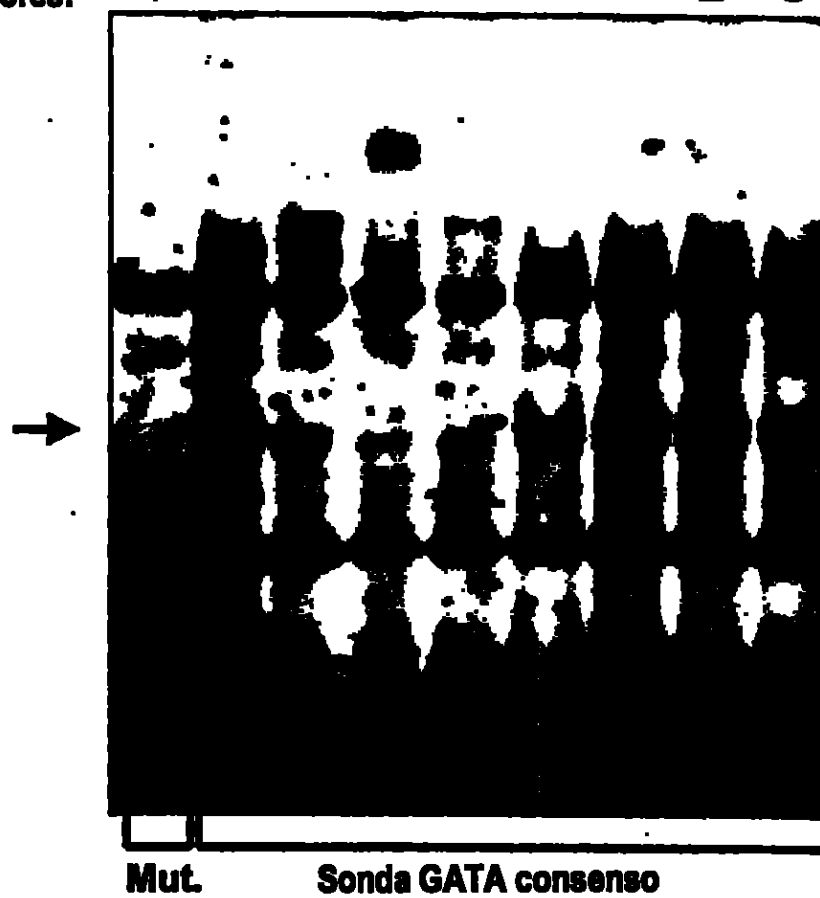
8/14
FIGURA 6A

185

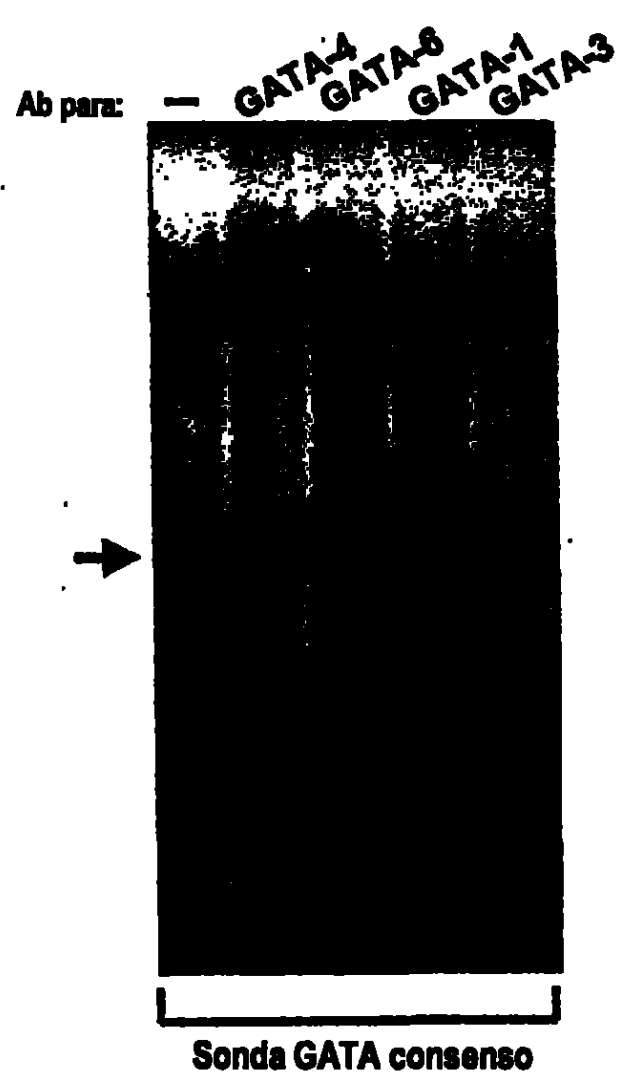
9/14
FIGURA 6B

Competidores:

. 0 3 5 8 3 - 2
0 3 5 8 3 - 2
GATA consenso
GATA de corina humana
GATA de corina de ratón
Mutante consenso
Mutante humano
Mutante de ratón
Oligo no relacionado

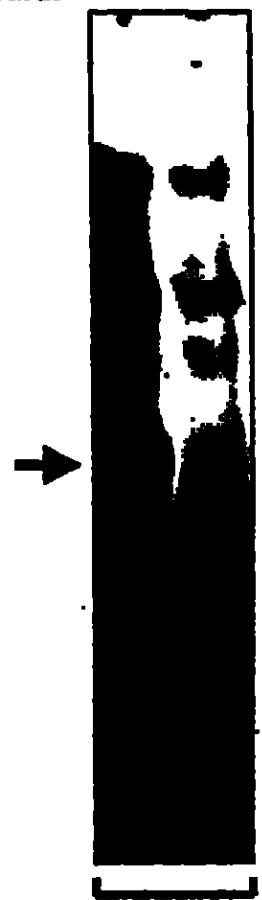


10/14
FIGURA 6C

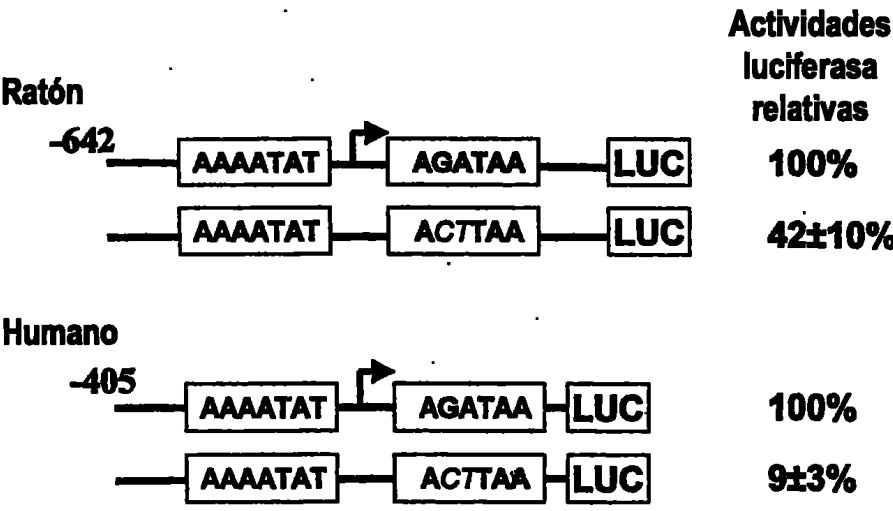


11/14
FIGURA 6D

Ab para: — GATA-4



Sonda GATA de corina humana



12/14
FIGURA 7

189

13/14
FIGURA 8

-4037 AAGCTTCATG AGGCGAGGAG TUCAGTTTGG TTTATTTACTG TAACCTCAGA GTAGAGAAGC
-3977 CTGGCCACAT AGTAGATGCT AGTATTCGTT TCCTAGGGCT GCTGTACAG ATACCATACA
-3917 TGAGTTACTT AAAACAACAG AATTTTATTC TTTCACAGTT TAGGTGGCCA GAGTCCCAA
-3857 ACCAAGATAT AACAAATTAT ATCTGCAAG CCTTTATTTT CACAGAACCA CATTCTGAGG
-3797 TTCTGGGTGG ACATTAAATT GGCAGGGAGT AGTGGGGGGA CACTAACCTA CTACAGTCT
-3737 CAGTAATAT TTTTGGGTG AATGAAATT CAGAGTGTAT TCTAAGCTGT AAACCCCTTG
-3677 GATGTTTTCA TCACAGTCTT CTCTAATAA CTGCTACAGA ACATAAGGAT TAGTTTGTGG
-3617 TCCGAGATT TTTAGGCTCC AATCTGCTT CTACACTTT CTACTTGTGA GCTCTTAGGC
-3557 AAGCTATTTA ACTTTGTAG CCTCAGTTT TCTGTAAA TGGTGACAT AAGAAATAAC
-3497 AGTAAGTGCC CAATAAGTTT TAACATTAT TATGTGTCTA TAGCTATTTT AAAGCACTTT
-3437 CTATATGTA TCCTCTAAC AACCTATTA GGTGAGCCTA TTACACTTCT CATTATATGA

slido NF-AT

-3377 CAAAGGAAAC TAGATTGTT TCAAGATGA AAAACCTAGA AAATTATATG TCACTTTATG
-3317 AAGTGCCTGG CACATAGTAC ATAGATAGC TTAGCTACAA TATATAGAT ATGTGACTTT
-3257 ACCTCATAAC TTAAGACAT CTCAAATGA TTCACAAATC AGAAAAAAA TCTGAGGCAT
-3197 CAGTGTGAG GTGAGGTGG GTGAGGCTC TCAGTTTGG CACATAGGT TACTGTTATT
-3137 GAGGAGCTC CATGTCATT AGGAGCTCC ACCTCATGA GGGAGGACTG GTTGGATGC
-3077 TGGCCAAAGG TAGGGGCATA TTTAGGCAAT GAAATTGAG TTATGGACC CCTCTATAGC
-3017 ACTAGATGTG TGAGAGGACT AAAATAAAA TTCTTTGAA ATTCTTACA GGTTCATATA
-2957 TTACTCTCTT CCAATGACT ACTGTGTAT ATTAGATAG GGGATTGATG TCCGAGAAT
-2897 ATTATGTACA TCAACAGAA GATCTACAC AATTGTTTA TCAGTACTG AATATATCAA
-2837 TGGCTAGAG TGTATTTAG TACTATGGG TATGTTGTT TCCCCCTTTT GACTAAATAA
-2777 ACTCTCCCT CTCGCAACA GGTAAATTC CAGTTTACCT TTTCTTGTCT GTTTTAAAT
-2717 TTTTTATTT TGAAGGCTT GTATCTTAT ATCTGAGCTG AAAATATTAC ATTCTAATC
-2657 CCCAAGCTA TTCTCAGAT ATTGCAAGT ATTTTTCAT AGTTTACATG TTGTGTATT
-2597 TGTTAATAC ATTCCACAG ACTGAAAGTC TTGTGAGGG CAGGAAGCTCT GTCTAGGTTG
-2537 TTCATCTGC AGCCAGCAA CCCAAATAA GTATTAGTTG AATGAATAGC TAAATAGATG
-2477 AGCCATGGG TAGCATATCT GTTTAGCTA CTGCTGCTT GTTATCATCC TGGATGCTG
-2417 CTGCTTCTC CTTGATCTCT TCTGTCTCT AATTGTCTT CAGTTGTAGT ACTAAGTACT
-2357 AATTGATCT GTAATGTGAT ATGTGCTGA AATTGCTCT GTAAATCAC CGTTTCATGA

slido NF-AT

-2297 GGTATATTCA ATATCTTAA TTTTCCATA AATCTCTCA AGGTTTGTGT GTGTTTCTT
-2237 TTAATTTATC TAACTAGTTG GATGATGCT TGAAGTGCTA GACAATAAAA GTTTCAATAG
-2177 GCTAGAAATG TTTCTTTTG TAAATTTAT TTAAGAACT AGATGATGTT TGTCACTTGA
-2117 AGCTGAAATG CAAATGTAG TAGTTTTTT TAAAGAATAA TTCAAATAGC TCATTAAAGA
-2057 TTACTATGAG CACACTGCAT ATTCAAATCA GTTTGAATAT GTTTTGAGAC TTCTAATAGT
-1997 TTATGATTC TACATTTTA ATGACACAC TGCATATTCA AATCAGTTTG AATATGTTTT
-1937 GAGACTTCTA ATAGTTTATG ATTCTTGACA TTTTAAAGT TTATTATAAA GAATATAAAA
-1877 CATCTTACC CTCATTTTT ATGTCTTAC CTTCATGCAA AGAATACCTC AGGTATTAT
-1817 TCTGGTCTG TTGGTAACTA GAAGTGGTG GTTTTCTTG CTAAAAGGAA GTTTAAAAAA

slido NF-AT

-1757 TGTTTATTTT ACACCATTA TGCATTAGC TTAGTTCTC AGAGGACTA AAGTGAAAA
-1697 AGTGAGGAG ACTGATGAC CCTATCTCA ATCCACTGAC GTAGCTACTT TAATTTATA

14/14

FIGURA 8 - continuación

-1637 GTCCCTGTAG CACCTCCACC AGAGGGCAGA AAGTGGAGA GAAAGAAGAT GAATAGAAA
 -1577 CTTGTACTTG GCCTCAGAAAT GCCTGTAGAA ACCTTAGCAA TTGAATCCAG CCGTTATGTT
 -1517 ATAGGCTGAG TTAAGTGTG CCCAGAAAGA CTATGTGATT TGCTCACAGT TCITGATTCC
 sitio Tbx5
 -1457 CAGACTGGCA CTGCGGTGAT GGTGTGTGAT GAGGTAGTAT CTTAGTAAAG ACACAATCCA
 -1397 GAAGTCACAG CCTCGGGGGA ATCCAGGCTC AGCTTCTTGC TAGCTTGGCT AGGCTGGTTA
 -1337 CTTCACTTCA GCTCCCTGAA TCTGCTTTCT TATCTCTAAA ATAAAAATAA TAGCTTCTTC
 -1277 CTCAGAGTAG TTGTTGGAAC TGAAGAATA CATGTAAAGT GCTTAGTATG ACACCTGCCA
 -1217 CATATATGA ACTGATTAT TGTGAATTAT GATAAATTG TCAGATACTG GTTACAAAT
 -1157 CGATGTATG AATAACATG AATCAGTGT TCAGTCATT TACTATACAT ATGCAATATT
 -1097 TTCTACATTT GATCTCACTT CAGAAACAAA ATACTGCCCC CCGCATTTTA CAAATGCATA
 -1037 TTTTITCTC AGCAATAATG TTCAAGAAC AGTGCTTGGC CCATATTTG TTGTCTTAC
 -977 ATGGCTTCT TTAATAATG GGGATG sitio TATTAATAA CCTCATGAGT AATTTTCAA
 sitio NF-AT
 -917 ATTTCATTA AGATCTTGAT TGAATTGGA TGAATAATCA TTCTAAGAA AAACCCAATG
 -857 AAGTGTTTT CTTGCCACA TTGACAAAT GCCTTGGACT TGGTAAGTA ATCATTAAGT
 -799: TGTGAGTAC CTCCAGTCC CTCCCTGACG CTGCTTAGA AAGGTAGCT; GCTTTGAAAT
 -737 GACAGGCAGG AATTGTGCG CCTTTAGGT TCAGGCTGTA GGTGCCCTT GCAGGAATC
 -677 AGAACTAGG GTTTTGGAG CAGTCAGGT GGGGTCTCC CTGTCCCTG CAGCCTCAGC
 sitio NF-AT
 -617 AAGACTCAG GCAGTCTGGC AAAGCAGTT TCTTCAGCAT ACCTAACAGA ACGCAAGTT
 -557 CCATATGCT GATGCAATA ATGGCTCCA AACGTAAAC CTTTTTGAG ATAACTGT
 -497 TCTTTAATTG CCAGGCGCTG CAGTTAATT TGAATGCTA CACTCTGTT AAAGAAAAT
 GATA
 -437 GCTTTCGATG TGAATAGCA AATTGAGAG AAGTAACTC TTTTGTCCC AACCACTTT
 -377 CCACAACATA AACTTAATG TCTGTCTT TTTCTCTGC CCTCGTGAG TGTAAATTT
 sitio NF-AT
 -317 TGAGGGAGAC CAGCAGAAC TGACTTTCCA TATGCCCTG AAGAATAACT TCTTTGAATG
 caja GT
 -257 CAAGAGGTG GGGACACGA GGTCTGTCA TTACGGTTA TTATGGGTG GACCCAGAGA
 sitio Tbx5 caja GT caja TATA
 -197 CGGAGTGAA GGGAGGTGT GGGCCCGGG TGGATCTGT AGAGCAGACA AAATATGGG
 -137 CCCCTGGCG TTAAAGTCA GTTTGTCTT CTGAGCTTG GAGAAAATCA TCCATAGTGC
 GATA/NKE
 -77 CTCCCCGGG GACAGTAGA GGAGAGAAA GCGACCAAGA TAAAGTGA CAGAAGATA
 Sitio de inicio de la traducción
 -17 AGCGAGACTT TTATCCATG AAACAGTCTC CTGCCCTCGC TCCGGAGAG CCGTCCGCA
 sitio Tbx5
 GAGCCGGTC CCCAAAGCG gtaagatega tgattogetg tectaccgca gccaggtgtg
 atggeecttt agtcccggtg aattc

PATENT COOPERATION TREATY

192

PCT

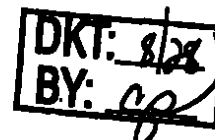
From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

WASHTIEN, Wendy, L.
Berlex Biosciences
2800 Hilltop Drive
P.O. Box 4099
Richmond, CA 94804
United States of America



Date of mailing (day/month/year) 12 August 2003 (12.08.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 52351AWOM1	
International application No. PCT/US03/16741	International filing date (day/month/year) 28 May 2003 (28.05.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 31 May 2002 (31.05.02)
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
31 May 2002 (31.05.02)	60/384,108	US	07 July 2003 (07.07.03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.89.85	Authorized officer Sita COPPOLINO Telephone No. (41-22) 338 8451
--	--

Form PCT/AB/304 (July 1998)

006788495

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

193

PCT

Notificación de Recepción de Copia Registrada

(Regla PCT 24.2(a))

De la OFICINA INTERNACIONAL

A:

WASHTIEN, Wendy L.
Berlex Bio Sciences
2800 Hilltop Drive
P.O. Box 4099
Richmond, CA 94804
E.E.U.U.

Fecha de envío (día/mes/año): 12 de agosto de 2003 (12.08.03)	NOTIFICACIÓN IMPORTANTE
Referencia del solicitante o del agente: 52351AWOM1	Solicitud Internacional N°: PCT/US 03/16741

Se notifica al solicitante por este medio que la Oficina Internacional ha recibido la copia registrada de la Solicitud Internacional, como se detalla abajo.

Nombre(s) del(los) solicitante(s) y países para los cuales son solicitadas

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT (para todos los países designados excepto E.E.U.U.)
PAN, Junliang et al. (para E.E.U.U.)

Fecha de recepción	28 de mayo de 2003 (28.05.03)
Fecha de prioridad reivindicada	31 de mayo de 2002 (31.05.02)
Fecha de recepción de la copia registrada por La Oficina Internacional	30 de junio de 2003 (30.06.03)

Lista de Oficinas designadas:

AP: GH, GM, KE, LS, MV, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR
OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
Nacional: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MV, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

ATENCIÓN

El solicitante debe verificar cuidadosamente los datos que aparecen en esta notificación. En caso de cualquier discrepancia entre estos datos y las indicaciones de la solicitud internacional, el solicitante debe informar inmediatamente a la Oficina Internacional.

Además, el solicitante debe prestar atención a la información contenida en el anexo, relacionada con:

- ☒ plazo para ingresar en la fase nacional – ver Información importante actualizada (como la de abril de 2002)
- ☒ confirmación de designaciones preventivas (si corresponde)
- ☐ requerimientos con respecto a documentos de prioridad (si corresponde)

Se envía una copia de esta notificación a la Oficina Receptora y al Organismo de Búsqueda Internacional.

La Oficina Internacional de WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Suiza	Funcionario autorizado: Sra COPPOLINO
Facsimil N°: (41-22) 338.89.85 Formulario PCT/IB/301 (abril 2002)	Teléfono N°: (41-22) 338 8451 005798494

INFORMACIÓN DE PLAZOS PARA INGRESAR EN LA FASE NACIONAL

Se recuerda al solicitante que la "fase nacional" debe ser ingresada ante cada una de las oficinas designadas indicadas en la carátula de esta notificación mediante el pago de tasas nacionales y suministrando traducciones, tal como está prescrito por los artículos 22 y 39 y las leyes nacionales aplicables. Además, el solicitante debe cumplir con otros requerimientos especiales aplicables de determinadas oficinas. Es responsabilidad del solicitante asegurar que los pasos necesarios para ingresar en la fase nacional estén ejecutados en el tiempo establecido. La mayoría de las oficinas no expiden recordatorios para los solicitantes con respecto al ingreso en la fase nacional.

El plazo aplicable para ingresar en la fase nacional es, con sujeción a lo que dice el siguiente párrafo, de 30 meses a partir de la fecha de prioridad, no solo con respecto a cualquier oficina seleccionada en la que se presentó una demanda de Examen Preliminar Internacional antes de la expiración de 18 meses a partir de la fecha de prioridad (ver artículo 39(1)), sino también, en ausencia de la presentación de tal demanda, con respecto a cualquier oficina designada en la cual se aplica el artículo 22(1), modificado en sus efectos a partir del 1 de abril de 2002, en relación con tal oficina designada. Para mayores detalles, ver la PCT Gazette N° 44/2001, del 1 de noviembre de 2001, pp. 19928, 19932 y 19934, así como los ejemplares de PCT Newsletter, octubre y noviembre de 2001 y febrero 2002.

En la práctica, los plazos distintos a 30 meses se aplican continuamente, para varios períodos de tiempo, con respecto a determinadas oficinas designadas o seleccionadas. Para actualizaciones normales de los plazos aplicables (20, 21, 30 o 31 meses, u otros plazos), oficina por oficina, remítase a la PCT Gazette (parte "Section IV", publicada semanalmente), el PCT Newsletter (mensual) y a los capítulos nacionales relevantes que figuran en el volumen II la Guía PCT del Solicitante (del cual la versión en papel se actualiza usualmente dos veces al año y la versión de Internet semanalmente). Finalmente, en el sitio de Internet de WIPO está disponible una tabla acumulativa de todos los tiempos límites aplicables para ingresar en la fase nacional, mediante vínculos con varias páginas, el sitio incluye aquellos de Gazette, Newsletter y guía, en <http://wipo.int/pct/en/index/html>.

La información acerca de los requerimientos para presentar una demanda de Examen Preliminar Internacional se encuentra en la Guía PCT del Solicitante, volumen I/A, capítulo IX. Hacemos notar que solo un solicitante que tenga la nacionalidad o sea residente de un país signatario del PCT comprometido por el capítulo II posee los derechos para presentar la demanda de Examen Preliminar Internacional (actualmente, todos los estados signatarios del PCT están comprometidos por el capítulo II).

CONFIRMACIÓN DE DESIGNACIONES PREVENTIVAS

Esta notificación lista solo designaciones específicas realizadas bajo la regla 4.9(a) en el requerimiento. Es importante verificar que estas designaciones sean correctas. Los errores en la designación pueden ser corregidos cuando las designaciones preventivas fueron efectuadas según la regla 4.9(b). Se recuerda por este medio al solicitante que toda designación preventiva debe ser confirmada de acuerdo con la regla 4.9(c) antes de la expiración de 18 meses a partir de la fecha de prioridad (este plazo no será extendido). Si no se confirma, será automáticamente considerada como abandonada por el solicitante. No existirán recordatorios ni invitaciones. La confirmación de una designación consiste en la presentación de un escrito especificando el estado designado concerniente (con indicación del tipo de protección o tratamiento deseado) y el pago de las tasas de designación y de confirmación. El escrito de confirmación y el pago deben llegar a la oficina receptora en el plazo de 18 meses.

REQUERIMIENTOS CON RESPECTO A LOS DOCUMENTOS DE PRIORIDAD

Para los solicitantes que aún no cumplieron con los requerimientos con respecto a los documentos de prioridad, se les recuerda lo siguiente.

Cuando se reivindica la prioridad de una solicitud nacional, regional o internacional anterior, el solicitante debe enviar una copia de tal solicitud anterior, certificada por el Organismo al cual fue presentado ("el documento de prioridad") a la oficina receptora (que lo transmitirá a la Oficina Internacional) o directamente a la Oficina Internacional antes de la expiración de 18 meses a partir de la fecha de prioridad, estableciendo que todo documentos de prioridad ha sido enviado a la Oficina Internacional antes de la fecha de la publicación internacional o de la solicitud internacional, en cuyo caso tal documento será considerado como haber sido recibido por la Oficina Internacional el último día del término de 18 meses (regla 17.1(a)).

Cuando el documento de prioridad es distribuido por la oficina receptora, el solicitante puede, en lugar de enviar el documento de prioridad, requerir de la oficina receptora que prepare y transmita el documento de prioridad a la Oficina Internacional. Tal requerimiento debe ser efectuado antes de la expiración del plazo de 18 meses y puede quedar sujeto por la oficina receptora al pago de una tasa (regla 17.1(b)).

Si el documento de prioridad concerniente no es enviado a la Oficina Internacional o si no se efectuó el requerimiento a la oficina receptora de que prepare y transmita el documento de prioridad (y se pagó la correspondiente tasa, si es pertinente) dentro del plazo aplicable bajo los párrafos precedentes, un estado designado debe pasar por alto la reivindicación de prioridad, pues está establecido que tal estado no designado debe pasar por alto la reivindicación de prioridad concerniente antes de dar al solicitante una oportunidad, al entrar en la fase nacional, de suministrar el documento de prioridad en un tiempo límite razonable con las circunstancias.

Cuando se reivindican varias prioridades, la fecha de prioridad a ser considerada para el propósito de computar el plazo de 18 meses es la fecha de presentación de la solicitud más antigua por la que se reivindica prioridad.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

USUARIO INDICADOR

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente. () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. () ()
- Descripción de la invención. () ()
- Dibujos de ser estos pertinentes. () ()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

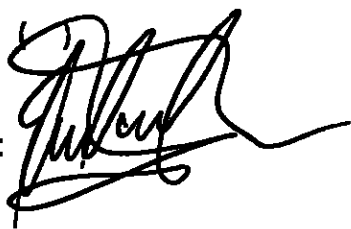
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. () ()
- Representación gráfica o folográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas () ()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud. () ()
- Representación gráfica del esquema de trazado () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable: 

Fecha:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 04129429 00000000
Fecha (UMB): 2004-12-28 17:26:35
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 194

2020

Bogotá D C
Doctor(a)
GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO
Apoderado(a)
SCHERING AG

No de Expediente	04-129329
Solicitud internacional	PCT/US03/16741
Fecha límite inicio fase nacional	2004-12-31
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	001

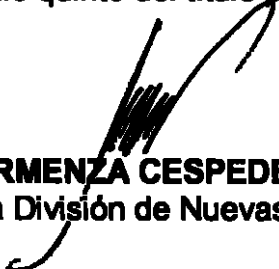
12021

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- El solicitante debe adjuntar la traducción de todas las modificaciones efectuadas a la solicitud, previas a la fecha límite para inicio de fase nacional.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,
202063 **04 FEB. 2005**