



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 779**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)	C07K 14/47 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 5/10 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)	A61K 38/17 (2006.01)
A61P 5/48 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03777257 .1**

96 Fecha de presentación : **04.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1568768**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.2005**

54 Título: **Proteína que se une a Akt2.**

30 Prioridad: **05.12.2002 JP 2002-354155**
08.08.2003 JP 2003-206952

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.08.2009

73 Titular/es: **Astellas Pharma Inc.**
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome
Chuo-ku, Tokyo, JP

72 Inventor/es: **Endo, Yuki;**
Endoh, Hideki;
Ueda, Yoshitaka;
Kato, Miyuki y
Inabe, Kazunori

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Proteína que se une a Akt2.

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con un nuevo polipéptido que se une a Akt2 y con un nuevo polinucleótido codificante de dicho polipéptido, un vector que contiene dicho polinucleótido, una célula transformada que contiene dicho vector y un método para rastrear una sustancia que inhibe la unión del polipéptido antes mencionado a Akt2.

10 **Antecedentes de la invención**

La insulina es segregada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas y reduce el nivel de azúcar en sangre actuando principalmente sobre el músculo, el hígado y el tejido adiposo e incorporando de este modo el azúcar de la sangre en las células para efectuar su almacenamiento y su consumo. La diabetes mellitus es inducida por una acción insuficiente de esta insulina y están presentes dos tipos en sus pacientes, a saber, el tipo 1, que tiene un trastorno de la producción o secreción de insulina, y el tipo 2, que tiene una dificultad en la aceleración del metabolismo de los carbohidratos por la insulina. El nivel de azúcar en sangre en estos dos pacientes se vuelve mayor que el de una persona sana, pero, mientras que la insulina en sangre es absolutamente insuficiente en el tipo 1, se produce resistencia a la insulina en el tipo 2, en donde la incorporación o el consumo del azúcar en sangre por las células no se acelera a pesar de la presencia de insulina. La diabetes mellitus de tipo 2 es una así llamada enfermedad relacionada con el estilo de vida, que se genera debido a una sobrealimentación, a falta de ejercicio, a estrés y a causas similares, además de la predisposición hereditaria. Hoy en día, el número de pacientes de esta diabetes mellitus de tipo 2 está sufriendo un rápido aumento en las naciones avanzadas, que va acompañado del aumento en la ingestión de calorías, y este tipo ocupa el 95% de los pacientes de diabetes mellitus en Japón. Por consiguiente, hay una necesidad cada vez mayor no sólo de un fármaco hipoglicémico simple como agente terapéutico para la diabetes mellitus, sino también de un estudio que pretenda tratar la diabetes mellitus de tipo 2 con el fin de acelerar el metabolismo de carbohidratos mediante el mejoramiento de la resistencia a la insulina.

Actualmente, se prescriben inyecciones de insulina para el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus de tipo 1. Por otra parte, además de las inyecciones de insulina, se conocen agentes hipoglicémicos a base de sulfonilurea (preparaciones SU), que provocan la secreción de insulina actuando sobre las células β del páncreas, y agentes hipoglicémicos a base de biguanida, que tienen acciones de aumento de la utilización de los azúcares e inhibición de la gluconeogénesis mediante una acción de glicolisis anaerobia y de inhibición de la absorción intestinal de azúcar, así como inhibidores de la α -glucosidasa, que retrasan la digestión y la absorción de sacáridos, como agentes hipoglicémicos prescritos para los pacientes tipo 2. Aunque éstos mejoran indirectamente la resistencia a la insulina, los derivados de tiazolidina han sido utilizados en los últimos años como agentes que mejoran directamente la resistencia a insulina. Su acción es acelerar la incorporación de glucosa en las células y el uso de glucosa en las células. Es sabido que los derivados de tiazolidina actúan como agonistas del receptor gamma activado que responde a proliferadores de peroxisomas ("PPAR γ ") (cfr. referencia no patente 1). Sin embargo, es sabido que las tiazolidinodionas no sólo mejoran la resistencia a la insulina, sino que también tienen un efecto colateral de inducción de edema (cfr. referencia no patente 2, referencia no patente 3). Como esta inducción de edema es un grave efecto colateral que da lugar a hipertrofia cardíaca, hay una demanda de moléculas diana de mayor utilidad para el desarrollo de fármacos que PPAR γ para mejorar la resistencia a la insulina.

La señal de la acción de la insulina se transfiere a las células a través de un receptor de insulina sobre la membrana celular. Dos rutas, primera y segunda, están presentes en esta ruta de acción de la insulina (cfr. referencia no patente 4). En la primera ruta, la señal se transfiere por orden del receptor de insulina activado a Akt1 (PKB α) o Akt2 (PKB β), o PKC γ o PKC ζ , a través de IRS-1, IRS-2, PI 3 kinasa y PDK 1, y se acelera la incorporación de azúcar desde el resto extracelular como resultado por translocación de un transportador de glucosa GLUT 4 existente en el interior de la célula a la membrana celular (cfr. referencia no patente 5). Por otra parte, en la segunda ruta, la señal se transfiere del receptor de insulina a CrK II, C3G y TC 10 en ese orden a través de c-Cbl y CAP, y se acelera la incorporación de azúcar por GLUT 4 como resultado (cfr. referencia no patente 6). Sin embargo, existen porciones que aún no están claras en cuanto a los detalles de estas rutas de transducción de la señal de insulina y no está claro, en particular, el mecanismo que finalmente media en la aceleración de la incorporación de azúcar por parte de las células por estas señales a través del transportador de glucosa.

Akt2 está presente en la primera ruta de señal de la insulina antes mencionada y se activa por fosforilación por estimulación de la estimulación de la insulina a través de PDK 1. La Akt2 activada transfiere la señal como una kinasa por fosforilación de una proteína como su sustrato. Se ha dicho que un ratón homo-knockout en el que se suprimió artificialmente un gen codificante de la proteína Akt2 muestra un fenotipo de tipo diabetes de tipo 2 debido a una reducida sensibilidad a la insulina principalmente en músculo e hígado. En base a estos hechos, se ha considerado que Akt2 es un factor mediador de señal que funciona incorporando azúcar a las células en respuesta a la señal de insulina y su inhibición funcional induce resistencia a la insulina por interceptación parcial de la transducción de la señal de insulina (cfr. referencia no patente 7).

Referencia no patente 1

“The Journal of Biological Chemistry” (USA), 1995, vol. 270, pp. 12953-12956.

Referencia no patente 2

“Diabetes Frontier” (USA), 1999, vol. 10, pp. 811-818.

Referencia no patente 3

“Diabetes Frontier” (USA), 1999, vol. 10, pp. 819-824.

Referencia no patente 4

“The Journal of Clinical Investigation” (USA), 2000, vol. 106, no. 2, pp. 165-169.

Referencia no patente 5

“The Journal of Biological Chemistry” (USA), 1999, vol. 274, no. 4, pp. 1865-1868.

Referencia no patente 6

“Nature” (England), 2001, vol. 410, no. 6831, pp. 944-948.

Referencia no patente 7

“Science” (USA), 2002, vol. 292, no. 2, pp. 1728-1731.

Descripción de la invención

En base a la información antes citada, los presentes inventores consideraron que se puede mejorar la resistencia a la insulina cuando se puede aumentar la función de Akt2. Se consideró que se puede alcanzar este objeto aumentando la actividad de la propia Akt2 o regulando la actividad de un factor intracelular recién identificado que se une a Akt2 y controla así su actividad. Sin embargo, como la Akt2 es una kinasa, es difícil regular su actividad enzimática en sentido creciente mediante un fármaco. Por consiguiente, se identificó una proteína que se une a Akt2 mediante un sistema de dos híbridos de levadura. Como resultado, se pudo clonar un ADNc derivado de ratón de una nueva secuencia de nucleótidos codificante de una proteína AKBP 2 (Proteína 2 de unión a Akt2) que se une a Akt2. Además, dado que la cantidad expresada de esta proteína estaba considerablemente aumentada en el tejido muscular y adiposo de ratones modelo de diabetes mellitus en comparación con individuos normales, se vio que esta proteína es un factor causante del estado mórbido de la diabetes mellitus. Además, al poder clonar un gen AKBP 2 ortólogo humano, se vio que dicho gen se expresa en células grasas como tejido que responde a la insulina y que la AKBP 2 humana se une también a Akt2, como en el caso de la AKBP 2 murina. Además de esto, detectando que la actividad kinasa de Akt2 se reduce por sobreexpresión de la AKBP 2 de ratón, se vio que se induce la resistencia a la insulina por interceptación de la señal de insulina por AKBP 2, es decir, que la resistencia a la insulina mejora inhibiendo la unión de AKBP 2 a Akt2. En consecuencia, se construyó un sistema de cribado para un agente mejorador de la resistencia a la insulina y/o un agente mejorador del metabolismo de carbohidratos haciendo uso de la interacción de AKBP 2 con Akt2.

Con estos resultados, se llevó a cabo la presente invención proveyendo de un nuevo polipéptido útil en el cribado de un agente mejorador de la resistencia a la insulina y/o un agente mejorador del metabolismo de carbohidratos, un polinucleótido codificante del polipéptido antes mencionado, un vector de expresión que contiene el polinucleótido antes mencionado, una célula transformada con el vector de expresión antes mencionado, un método para cribar un agente mejorador de la resistencia a la insulina y/o un agente mejorador del metabolismo de carbohidratos y un método para producir una composición farmacéutica para el mejoramiento de la resistencia a la insulina y/o el mejoramiento del metabolismo de carbohidratos.

Es decir, la presente invención se relaciona con

[1] un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4, o una secuencia de aminoácidos en la que se han suprimido, substituido y/o insertado de 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4, y que se une a Akt2;

[2] un polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4;

[3] un polinucleótido codificante del polipéptido descrito en [1] o [2];

[4] un vector de expresión que contiene el polinucleótido descrito en [3];

[5] una célula transformada con el vector de expresión descrito en [4];

[6] un método para cribar una sustancia que inhibe la unión a Akt2 de un polipéptido descrito en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2 o un polipéptido consistente en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 90% o más con respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4 y que se une a Akt2, que consiste en

dejar que (1) el polipéptido antes mencionado o una célula que expresa el polipéptido antes mencionado contacte con (2) una sustancia de ensayo;

medir la unión de dicho polipéptido a Akt2, y

seleccionar una sustancia que inhibe la unión antes mencionada;

[7] el método de cribado descrito en [6], donde la sustancia inhibidora de la unión es un agente mejorador de la resistencia a la insulina y/o un agente mejorador del metabolismo de carbohidratos;

[8] el método de cribado descrito en [6] o [7], donde la etapa de medición de la unión de (1) el polipéptido descrito en [1] o [2] o un polipéptido consistente en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 90% o más con respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4 y que se une a Akt2, a (2) Akt2 es una etapa de medición de un cambio en Akt2 en base al cambio en la unión antes mencionada.

No se sabe virtualmente nada sobre las secuencias idénticas a los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención descritos en las SEC. ID. N° 1 a 4. Aunque se ha informado de secuencias que tienen homología con los polinucleótidos de la presente invención en una base de datos de secuencias GenBank como números de acceso AX714043, BC042155 y BC049110 después de la fecha de prioridad de esta solicitud, se trata de una mera descripción de secuencias y no se hace ninguna descripción de su uso ilustrativo. Además, una base de datos de secuencias GenPept lleva, como número de acceso AK056090, un polipéptido consistente en una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen 68 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 4 como uno de los polipéptidos de la presente invención, y, como número de acceso AK019105, un polipéptido consistente en una secuencia de aminoácidos en la que se han suprimido 228 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 como uno de los polipéptidos de la presente invención y se han substituido 13 aminoácidos de la misma. Sin embargo, no existe información de que estos polipéptidos fueran realmente preparados y no existe información de cómo prepararlos. Además, tampoco se describe el uso ilustrativo de dichos polipéptidos. Los presentes inventores han descubierto los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención por vez primera y han revelado por vez primera que la sobreexpresión de la proteína y el aumento de su unión a Akt2 son factores causales del estado mórbido de la diabetes mellitus. Además, los métodos de cribado de la presente invención que hacen uso de la unión del polipéptido de la presente invención a Akt2 son métodos provistos por vez primera por los presentes inventores.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra la expresión de AKBP2 en células cultivadas. Las bandas 1 y 3 indican marcadores de peso molecular y la banda 2 un vector vacío y la banda 4 un caso de introducción de pcDNA-AKBP2.

La Fig. 2 (1) es un gráfico que muestra la comparación del nivel de expresión de AKBP2 en el tejido adiposo de ratones C57BL/6J normales cargados con una alimentación normal o una alimentación rica en grasas. El eje vertical del dibujo muestra el nivel de expresión relativo en la grasa de los ratones. La barra blanca muestra cuándo se cargó la alimentación normal y la barra negra cuándo se cargó la alimentación rica en grasas.

La (2) es un gráfico que muestra la comparación del nivel de expresión de AKBP2 en el músculo de ratones C57BL/6J normales cargados con una alimentación normal o una alimentación rica en grasas. El eje vertical del dibujo muestra el nivel de expresión relativo en el músculo de los ratones. La barra blanca muestra cuándo se cargó la alimentación normal y la barra negra cuándo se cargó la alimentación rica en grasas.

La (3) es un gráfico que muestra la comparación del nivel de expresión de AKBP2 en el tejido adiposo de ratones C57BL/6J normales y ratones KKA^y/Ta del modelo de diabetes mellitus. El eje vertical del dibujo muestra el nivel de expresión relativo en el tejido adiposo de los ratones. La barra blanca muestra el resultado de los ratones C57BL/6J normales y la barra rayada el de los ratones KKA^y/Ta del modelo de diabetes mellitus.

La (4) es un gráfico que muestra la comparación del nivel de expresión de AKBP2 en los músculos de ratones C57BL/6J normales y de los ratones KKA^y/Ta del modelo de diabetes mellitus. El eje vertical del dibujo muestra el

nivel de expresión relativo en el músculo de los ratones. La barra blanca muestra el resultado de los ratones C57BL/6J normales y la barra rayada el de los ratones KKA^y/Ta del modelo de diabetes mellitus.

Se muestra el nivel de expresión en C57BL/6J con alimentación normal como 1 en la comparación en (1) y (2) y se muestra el nivel de expresión en C57BL/6J como 1 en la comparación en (3) y (4), respectivamente.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la influencia de la sobreexpresión de AKBP2 de ratón en células grasas NIH3T3 L1 por la actividad enzimática Akt2. El eje vertical del dibujo muestra la actividad relativa y se muestra el valor de la actividad enzimática en las células infectadas con un virus control en condiciones de ausencia de estímulo de insulina como 1. El eje horizontal del dibujo muestra el período de estimulación de la insulina (minutos).

Mejor modo de desarrollar la invención

Lo que sigue describe la presente invención con detalle.

Polipéptido de la invención

Se incluyen el polipéptido de la presente invención

(1) un polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4 y

(2) i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4 y que se une a Akt2, o ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se han suprimido, sustituido y/o insertado de 1 a 10 (preferiblemente de 1 a 7, más preferiblemente de 1 a 5, aún preferiblemente de 1 a 3) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4 y que se une a Akt2 (al que se hará referencia de aquí en adelante como variante funcionalmente equivalente).

Los que reducen la actividad kinasa de Akt2 por unión a Akt2 son particularmente deseables como los polipéptidos de la presente invención.

Además, los polipéptidos de la presente invención no se limitan en particular a los polipéptidos derivados de humanos o de ratones, en la medida en que se encuentren bajo cualquiera de (1) y (2) antes mencionados, y los que derivan de otros vertebrados (v.g., rata, conejo, caballo, oveja, perro, mono, gato, oso, cerdo, aves domésticas y similares) quedan también aquí incluidos. Además, no se limitan a los polipéptidos naturales y también se incluyen en ellos mutantes artificialmente producidos, en la medida en que se encuentren bajo cualquiera de (1) y (2) antes mencionados.

El término “se une a Akt2” significa que un polipéptido se une a Akt2 (preferiblemente Akt2 humana, más preferiblemente el polipéptido codificado por el número de acceso del GenBank M95936) y se puede verificar si “se une” o no mediante los métodos siguientes.

Se expresa en una célula una longitud parcial o total de un polipéptido que se ha de examinar en cuanto a si se une o no, o una longitud parcial o total de un polipéptido que se ha de examinar fusionado a un marcaje (v.g., GST, Flag, His o similar). Como la célula antes mencionada, es deseable una célula que responda a la insulina, y de forma más ilustrativa es deseable una célula grasa, un hepatocito o una célula derivada de músculo esquelético. Se pueden concentrar la proteína Akt2 y una proteína que se une a la misma a partir de la célula antes mencionada por inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-Akt2. Se puede verificar si el polipéptido que se ha de examinar se une o no a Akt2 separando una solución concentrada de la Akt2 así obtenida y su proteína de unión por electroforesis en gel de poliacrilamida a través de un método convencionalmente conocido y realizando luego una transferencia Western usando un anticuerpo. En cuanto al anticuerpo para uso en este caso, se puede usar un anticuerpo para el polipéptido que se ha de examinar o un polipéptido que se ha de examinar preparado en base a su secuencia parcial, o un anticuerpo que reconozca el marcaje antes mencionado.

Además, la unión del polipéptido que se ha de examinar a un polipéptido puede ser también detectada combinando una transferencia Western similar a la antes mencionada con un método de captura *in vitro* (H. Matsushima y col., Jikken Kogaku (Experimental Engineering), Vol. 113, N° 6, p. 528, 1994) que usa un extracto de células en las que se expresa el polipéptido que se ha de examinar, o una solución mixta de proteínas preparadas por transcripción y traducción *in vitro* y proteína Akt2 purificada uniendo un marcaje (v.g., GST o similar). Preferiblemente, se puede detectar la unión usando una solución mixta de proteínas preparadas realizando directamente la transcripción y traducción *in vitro* de la proteína que se ha de examinar, como se muestra en el Ejemplo 6, a partir de un plásmido para uso en la expresión de la proteína que se ha de examinar (v.g., el plásmido para la expresión de la proteína AKBP2 preparado en el Ejemplo 1(5)), usando un kit de traducción *in vitro* (v.g., el kit TNT (Promega)). Más preferiblemente, se puede detectar la unión del polipéptido que se ha de examinar a Akt2 por el método descrito en el Ejemplo 6. El término “reducir la actividad kinasa de Akt2” significa que se reduce la actividad kinasa que posee Akt2 mediante la unión del polipéptido que se ha de examinar a Akt2. Se puede verificar si “se reduce la actividad kinasa” o no por el siguiente método.

Es sabido que la actividad kinasa de Akt2 se acelera cuando se fosforila la 473ª serina (Ser 473) o la 308ª treonina (Thr 308) en la molécula (Biochem. J., 1998, 335 (1-13)). Haciendo uso de esto, se puede detectar la presencia o ausencia de actividad Akt2 detectando la condición fosforilada de la Ser 473 o de la Thr 308 de Akt2 por una transferencia Western que utiliza un anticuerpo capaz de reaccionar específicamente con estos residuos fosforilados (v.g., anticuerpo antifosfoSer o similar). De forma más ilustrativa, se puede detectar la fosforilación de Akt2, a saber, la presencia o ausencia de actividad Akt2, lisando células (es deseable una célula que responda a la insulina, y de un modo más ilustrativo es deseable una célula grasa, un hepatocito o una célula derivada de músculo esquelético) en las que se expresa una parte o la totalidad de la longitud del polipéptido que se ha de examinar y, usando esto como muestra, llevando a cabo una transferencia Western, una transferencia Western por puntos o un método similar que emplee el anticuerpo anti-fosfoSer. Preferiblemente, ésta puede ser detectada por el método del Ejemplo 7. Cuando se observó reducción de la fosforilación de Akt2 (a saber, activación de Akt2) en este sistema de detección usando una muestra obtenida de una célula en la que se expresaba el polipéptido que se había de examinar, en comparación con una célula en la que no se expresaba el polipéptido que se había de examinar, se podía juzgar que el polipéptido que se había de examinar “reduce la actividad kinasa de Akt2”.

Además, también se puede verificar si “reduce la actividad kinasa de Akt2” o no por un método de ensayo de kinasa *in vitro* en el que se mide la captación de ácido fosfórico radiactivo basada en un sustrato cuando se usa una histona H2B, una proteína de fusión GSK-3 o similar como sustrato de Akt2 y se deja que reaccione con un inmunoprecipitado de Akt2. De un modo ilustrativo, se puede concentrar la proteína Akt2 a partir de un extracto de células (es deseable una célula que responda a la insulina, y de un modo más ilustrativo es deseable una célula grasa, un hepatocito o una célula derivada de músculo esquelético) en las que se expresa una parte del polipéptido que se ha de examinar o la totalidad de su longitud por inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-Akt2. Mezclando un sustrato de Akt2, tal como GST-crosstide (proteína de fusión con GST de GSK3-beta como sustrato fisiológico de Akt), con proteína Akt2 concentrada, se puede medir y determinar la actividad kinasa de Akt2 usando la fosforilación del sustrato como índice. Preferiblemente, se puede medir ésta mediante el método descrito en el Ejemplo 7. Cuando se observó reducción de la fosforilación del sustrato en este sistema de medición usando una muestra obtenida de una célula en la que se expresaba el polipéptido que se había de examinar, en comparación con una célula en la que no se expresaba el polipéptido que se había de examinar, se pudo juzgar que el polipéptido que se había de examinar “reduce la actividad kinasa de Akt2”.

Polinucleótido de la invención

El polinucleótido de la presente invención puede derivar de cualquier especie, siempre que codifique el polipéptido de la presente invención, a saber, un polipéptido representado por la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC. ID. Nº 2 o en la SEC. ID. Nº 4, o una variante funcionalmente equivalente del mismo. Se prefiere un polinucleótido consistente en una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC. ID. Nº 2 o en la SEC. ID. Nº 4, y aún se prefiere la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC. ID. Nº 1 o en la SEC. ID. Nº 3. En este sentido, se incluyen tanto ADN como ARN en el “polinucleótido” según esta descripción.

Se puede incluir todo tipo de mutantes en el polinucleótido de la presente invención, en la medida en que codifiquen el polipéptido de la presente invención. De un modo más ilustrativo, puede incluir mutantes alélicos que estén presentes en el mundo natural, mutantes que no estén presentes en el mundo natural y mutantes que tengan delecciones, sustituciones, adiciones e inserciones. La mutación antes mencionada se produce a veces por mutación natural, pero también puede ser efectuada realizando una modificación artificial. Todos los genes mutantes codificantes del polipéptido antes mencionado de la presente invención quedan incluidos en la presente invención, independientemente de la causa y del medio de la mutación del polipéptido antes mencionado. Como el medio artificial antes mencionado que da lugar a la preparación de mutantes, por ejemplo, además de técnicas de ingeniería genética tales como el método de sustitución específico de bases (Methods in Enzymology, (1987), 154, 350, 367-382) y similares, se pueden citar medios de síntesis química, tales como el método de fosfotriéster, el método de fosfoamiduro y similares (Science, 150, 178, 1968). Mediante su combinación, es posible obtener un ADN acompañado de la sustitución de bases deseada. Alternativamente, es posible generar una sustitución en una base no específica en la molécula de ADN por repetición de PCR o permitiendo la presencia del ion manganeso o similar en la solución de reacción.

El polinucleótido y el polipéptido de la presente invención pueden ser fácilmente producidos y obtenidos por técnicas generales de ingeniería genética en base a la información de secuencias desvelada por la presente invención.

El polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención puede ser preparado, por ejemplo, del siguiente modo, pero puede ser preparado no sólo por este método, sino también por operaciones convencionalmente conocidas, según “Molecular Cloning, Sambrook, J. y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989” y similares.

Por ejemplo, se pueden citar (1) un método que utiliza PCR, (2) técnicas generales de ingeniería genética (a saber, un método en el cual se selecciona un transformante que contiene aminoácidos deseados a partir de transformantes transformados con una librería de ADNc), (3) un método de síntesis química o similares. Cada método de producción puede ser llevado a cabo del mismo modo que como se describe en WO 01/34785.

Mediante el método que utiliza PCR, se puede producir el polinucleótido aquí descrito, por ejemplo, por el procedimiento descrito en el “Modo para desarrollar la invención”, 1) Método de producción de un gen de proteína, a) Primer método de producción, de la referencia de patente antes mencionada. En cuanto a la “célula o tejido humano

que tiene capacidad de producir la proteína de la presente invención” en dicha descripción, se pueden citar, por ejemplo, las células adiposas. Se extrae el ARNm total a partir de células adiposas humanas o murinas. A continuación, se puede sintetizar un ADNc de primera hebra sometiendo este ARNm a una reacción de transcriptasa inversa en presencia de cebadores aleatorios o de cebadores oligo dT. Se puede obtener el polinucleótido de la presente invención o una parte del mismo sometiendo el ADNc de primera hebra así obtenido a reacción en cadena de polimerasa (“PCR”) usando dos tipos de cebadores que se interponen en una región parcial del gen de interés. De forma más ilustrativa, el polinucleótido de la presente invención puede ser producido, por ejemplo, por los métodos descritos en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 4.

Mediante el método que utiliza técnicas generales de ingeniería genética, se puede producir el polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención, por ejemplo, por el procedimiento descrito en el “Modo para desarrollar la invención”, 1) Método de producción de un gen de proteína, b) Segundo método de producción, de la referencia de patente antes mencionada.

Mediante el método que utiliza síntesis química, se puede producir el polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención, por ejemplo, por el procedimiento descrito en el “Modo para desarrollar la invención”, 1) Método de producción de un gen de proteína, c) Tercer método de producción, d) Cuarto método de producción, de la referencia de patente antes mencionada.

Haciendo uso de la secuencia nucleotídica parcial o completa del polinucleótido así obtenido de la presente invención, se puede detectar específicamente el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención en cada tejido individual o en varios tejidos.

Como ejemplos de dicho método de detección, se incluyen la “RT-PCR” (reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa), el análisis de transferencia Northern, la hibridación *in situ* y métodos similares.

Métodos de producción del vector de expresión, de la célula y del polipéptido de la invención

También se incluye en la presente invención un método para producir el polipéptido de la presente invención, que se caracteriza por el hecho de que se cultiva la célula transformada de la presente invención.

Se puede usar el polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención, obtenido del modo antes mencionado, para expresar el polipéptido de la presente invención en un tubo de ensayo o en una célula de ensayo conectándolo a una secuencia debajo de un promotor apropiado, mediante métodos convencionalmente conocidos descritos en “Molecular Cloning, Sambrook, J. y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989” y similares.

De forma ilustrativa, añadiendo un polinucleótido que contiene una secuencia promotora especificada arriba del codón de iniciación para el polipéptido de la presente invención obtenido como se ha mencionado anteriormente, es posible efectuar la expresión del polipéptido de la presente invención por transcripción y traducción en un sistema libre de células del gen usando éste como plantilla.

Alternativamente, la expresión del polipéptido de la presente invención en una célula resulta posible cuando se integra el polinucleótido antes mencionado codificante del polipéptido de la presente invención en un plásmido vector apropiado y se introduce en forma de plásmido en una célula huésped. Alternativamente, se puede preparar y usar una célula en la que se haya integrado dicha construcción en el ADN cromosómico. De forma más ilustrativa, un fragmento aislado que contenga un polinucleótido puede transformar células huésped de eucariontes y procariontes integrándose de nuevo en un plásmido vector apropiado. Más aún, es posible efectuar la expresión del polipéptido de la presente invención en células huésped respectivas introduciendo un promotor apropiado y una secuencia implicada en la expresión génica en estos vectores. La célula huésped no está particularmente limitada, siempre que pueda detectar la expresión del polipéptido de la presente invención a nivel de ARNm o a nivel de proteína. Lo más deseable es usar una célula derivada del tejido graso o una célula derivada de músculo como célula huésped, en donde la Akt2 endógena está abundantemente presente.

El método para expresar un gen transformando una célula huésped puede ser llevado a cabo, por ejemplo, por el método descrito en el “Modo para desarrollar la invención”, 2) Método para producir el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención y la proteína recombinante de la presente invención, de la referencia de patente antes mencionada. El vector de expresión no está particularmente limitado, en la medida en que contenga un polinucleótido deseado. Un ejemplo del mismo es un vector de expresión obtenido insertando el polinucleótido deseado en un vector de expresión convencionalmente conocido eventualmente seleccionado en respuesta a la célula huésped que se haya de usar. La célula de la presente invención puede ser obtenida, por ejemplo, transfectando una célula huésped deseada con el vector de expresión antes mencionado. De manera más ilustrativa, un vector de expresión para una proteína deseada puede ser obtenido, por ejemplo, integrando un polinucleótido deseado en un vector de expresión para células de mamífero, pcDNA3.1, como se describe en el Ejemplo 2, y se puede producir la célula transformada de la presente invención incorporando dicho vector de expresión en la célula 293 usando el método del fosfato de calcio.

Se puede cultivar la célula transformada deseada obtenida anteriormente según un método general y se produce la proteína deseada mediante dicho cultivo. En cuanto al medio que se ha de usar en dicho cultivo, se pueden seleccionar

eventualmente diversos tipos generalmente utilizados en respuesta a la célula huésped empleada. Por ejemplo, en el caso de la célula 293 antes mencionada, se puede usar medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un componente sérico (v.g., suero bovino fetal (FBS) o similar), al que se añade además G418. Como célula transformada de la presente invención, es deseable una célula que exprese el polipéptido de la presente invención.

Cultivando la célula de la presente invención, se puede detectar, determinar y también purificar el polipéptido de la presente invención producido en la célula. Por ejemplo, es posible detectar y purificar el polipéptido de la presente invención por transferencia Western o inmunoprecipitación usando un anticuerpo que se une al polipéptido de la presente invención. Alternativamente, expresando el polipéptido de la presente invención como una proteína de fusión con una proteína apropiada de marcaje (v.g., glutatión-S-transferasa (GST), proteína A, β -galactosidasa, proteína de unión a maltosa (MBP) o similar), se puede detectar el polipéptido de la presente invención por transferencia Western o inmunoprecipitación usando un anticuerpo específico para dicha proteína de marcaje y purificarlo usando la proteína de marcaje. De un modo más ilustrativo, se puede purificar haciendo uso de una proteína de marcaje de la siguiente manera.

Se puede obtener el polipéptido de la presente invención (v.g., el polipéptido representado por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4) integrando el polinucleótido de la presente invención (v.g., el polinucleótido representado por la SEC. ID. N° 1 o la SEC. ID. N° 3), por ejemplo, en un vector de fusión a un marcaje de His, más ilustrativamente, por ejemplo en el pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) o similar descrito en el Ejemplo 1, para efectuar su expresión en una célula cultivada, purificándolo usando un marcaje de His y eliminando luego el resto del marcaje. Por ejemplo, se diseña el plásmido de expresión AKBP2 murino o humano preparado en el Ejemplo 1 o en el Ejemplo 5 usando pcDNA3.1/V5-His-TOPO de tal forma que V5 y el marcaje His se adicionan al extremo C de AKBP2 en ambos casos. En consecuencia, se puede purificar la proteína AKBP2 a partir de las células cultivadas en las que se expresa AKBP2 mostradas en el Ejemplo 2 o en el Ejemplo 5, usando el marcaje de His. De forma ilustrativa, la proteína AKBP2 fusionada al marcaje de His puede ser aislada de un extracto de células rotas uniéndola a Ni^{2+} -NTA-Agarosa (Funakoshi) y centrifugando el producto, según métodos conocidos (Jikken Igaku (Experimental Medicine) Supplement, Tanpakushitsu-no Bunshikan Sogosayo Jikkenhou (Experimentation on Intermolecular Interaction of Protein), página 32, 1996, Nakahara y col.). Más ilustrativamente, se desprenden por raspado células que expresan el polipéptido de la presente invención cultivadas usando matraces de cultivo (v.g., placa de Petri de 10 cm de diámetro) después de añadir un volumen apropiado (v.g., 1 ml) de una solución tampón y centrifugando luego a 1.5000 rpm durante 5 minutos y se añade una cantidad apropiada (v.g., 50 μM) de Ni^{2+} -NTA-Agarosa substituida por una solución tampón apropiada al sobrenadante así separado y se mezcla bien (v.g., 10 minutos o más de agitación usando un rotor). A continuación, se separa el sobrenadante y se extrae por centrifugación (v.g., 2.000 rpm durante 2 minutos) y se centrifuga de nuevo añadiendo una cantidad apropiada (v.g., 0,5 ml) de una solución tampón ajustada a pH 6,8, efectuando así un lavado. Después de repetir esto 3 veces, se añade una cantidad apropiada (v.g., 50 μl) de EDTA 100 mM, se deja que la mezcla repose durante 10 minutos y se recupera después el sobrenadante, permitiendo así la purificación del polipéptido liberado de la presente invención. Como solución tampón antes mencionada, se puede usar, por ejemplo, una solución tampón B (urea 8 M, Na_2HPO_4 0,1 M, NaH_2PO_4 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0). Se puede separar el marcaje de His en la molécula de proteína purificada de la molécula, por ejemplo, por un diseño tal que el marcaje de His se fusione al lado N-terminal y usando TAGZyme System (Qiagen).

Alternativamente, según la ocasión lo requiera, se puede purificar mediante un método que no utilice una proteína de marcaje, por ejemplo por varias operaciones de separación que hagan uso de las propiedades físicas y de las propiedades químicas de la proteína consistente en el polipéptido de la presente invención. De forma ilustrativa, se pueden citar como ejemplos el uso de ultrafiltración, centrifugación, filtración por gel, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y cromatografía líquida de alto rendimiento.

El polipéptido de la presente invención puede ser producido por síntesis química general según la información de secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N° 2 o en la SEC. ID. N° 4. De forma ilustrativa, se incluyen métodos de síntesis peptídica en fase líquida y en fase sólida. Su síntesis puede ser llevada a cabo uniendo sucesivamente un aminoácido después de otro, o sintetizando un fragmento peptídico consistente en varios aminoácidos y uniéndolo. El polipéptido de la presente invención obtenido por estos medios puede ser purificado según los diversos métodos antes mencionados.

Método de inspección de la diabetes mellitus

Usando una sonda que se hibride con el polinucleótido de la presente invención en condiciones estrictas, se puede examinar la cantidad expresada de un polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención y se puede realizar el diagnóstico de la diabetes mellitus usando el aumento de la cantidad expresada (preferiblemente la cantidad expresada en el tejido graso) como índice. En el método de inspección de la diabetes mellitus, el término “condiciones estrictas” significa condiciones en las cuales no se produce una unión inespecífica y, de forma ilustrativa, significa condiciones en las cuales se usa una solución de SSC 0,1x (solución salina-tampón citrato de sodio) que contiene un 0,1% de laurilsulfato de sodio (SDS) y la temperatura es de 65°C. Como sonda, se usa un ADN de al menos 15 pb de longitud de cadena y que tiene al menos una parte o la totalidad de la secuencia (o una secuencia complementaria de la misma) del polinucleótido de la presente invención.

Según el método para detectar diabetes mellitus, se puede detectar si el sujeto tiene o no diabetes mellitus dejando que las sondas antes mencionadas contacten con una muestra de ensayo y analizando el producto unido de un polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención (v.g., ARNm o ADNc derivado del mismo) y de la sonda antes mencionada por un método de análisis convencionalmente conocido (v.g., transferencia Northern). Además, también se puede analizar la cantidad de expresión aplicando la sonda antes mencionada a una punta de ADN. Cuando la cantidad del producto unido antes mencionado, a saber, la cantidad de un polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención, está aumentada en comparación con personas sanas, se puede juzgar que el sujeto tiene diabetes mellitus.

Como método para medir el nivel expresado del polinucleótido de la presente invención, es posible emplear métodos en los cuales se mide el nivel expresado detectando el polipéptido de la presente invención. Como ejemplos del método de inspección que se ha de usar, se incluyen la transferencia Western, la inmunoprecipitación, el ELISA y métodos similares, que hacen uso de un anticuerpo que une una muestra de ensayo al polipéptido de la presente invención, o de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la presente invención. Al determinar la cantidad del polipéptido de la presente invención contenida en la muestra de ensayo, se puede usar el polipéptido de la presente invención como cantidad estándar. Además, el polipéptido de la presente invención es útil para preparar un anticuerpo que se une al polipéptido de la presente invención. Cuando la cantidad del polipéptido de la presente invención está aumentada en comparación con personas sanas, se puede juzgar que el sujeto tiene diabetes mellitus.

Método de cribado de la invención

Utilizando (1) el polipéptido de la presente invención, (2) un polipéptido consistente en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 90% o más con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4 y que se une a Akt2 (al que se hará referencia en adelante como polipéptido homólogo), o (3) un polipéptido como proteína codificada por un polinucleótido que se hibrida con el polinucleótido que tiene la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. N° 1 o la SEC. ID. N° 3 en condiciones estrictas y que se une a Akt2 (al que se hará referencia en adelante como polipéptido de hibridación), se puede construir un método para cribar una sustancia que tiene una acción mejoradora de la resistencia a la insulina y/o una sustancia que tiene una acción mejoradora del metabolismo de carbohidratos (a saber, agentes mejoradores de la diabetes mellitus) haciendo uso de la interacción de los polipéptidos antes mencionados (a saber, el polipéptido de la presente invención, el polipéptido homólogo y el polipéptido de hibridación) con la Akt2 kinasa. En general, se hace referencia al polipéptido de la presente invención, al polipéptido homólogo antes mencionado y al polipéptido de hibridación antes mencionado como un polipéptido para el cribado de la presente invención.

El polipéptido homólogo según esta descripción no está particularmente limitado, en la medida en que sea un polipéptido consistente en una secuencia de aminoácidos con una homología del 90% o más con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4 y que se una a Akt2, pero, en cuanto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4, es deseable un polipéptido consistente en una secuencia de aminoácidos con una homología de preferiblemente el 95% o más, más preferiblemente el 98% o más.

En este sentido, el término “homología” antes mencionado, tal como se utiliza en esta descripción, significa un valor (Identidades) obtenido usando parámetros preparados como defecto por recuperación del programa Clustal (Higgins y Sharp, Gene, 73, 237-244, 1998; Thompson y col., Nucl. Acids Res., 22, 4673-4680, 1994). Los parámetros antes mencionados son los siguientes. Como Parámetros de Alineación Múltiple, Penalización de Intervalo 15,00, Penalización de Longitud de Intervalo 6,66, Sec. Divergentes de Retraso (%) 30 y Peso de Transición de ADN 0,50, y como Parámetros de Alineación por Pares, Penalización de Intervalo 15,00 y Penalización de Longitud de Intervalo 6,66, por Slow-Accurate.

En cuanto a las “condiciones estrictas” para el polipéptido de hibridación de esta descripción en las cuales un polinucleótido codificante del polipéptido de hibridación de esta descripción se hibrida con el polinucleótido que tiene la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. N° 1 o la SEC. ID. N° 3, se trata de condiciones de “SSPE 5x, solución de Denhard 5x, SDS al 0,5%, formamida al 40%, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón y 37°C durante la noche” como condiciones para la hibridación, y condiciones de “SSPE 5x, solución de Denhard 5x, SDS al 0,5%, formamida al 50%, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón y 42°C durante la noche” como condiciones más estrictas. Además, las condiciones para el lavado son “SSC 5x, SDS al 1% y 42°C” como condiciones suaves, “SSC 0,5x, SDS al 0,1% y 42°C” como condiciones normales y “SSC 0,2x, SDS al 0,1% y 65°C” como condiciones más estrictas.

También se incluye en el método de cribado de la presente invención un método para cribar una sustancia que inhibe la unión del polipéptido antes mencionado con Akt2, caracterizado por consistir en una etapa en la que se permite que el polipéptido para cribado de la presente invención o una célula que expresa el polipéptido para cribado de la presente invención contacte con una sustancia de ensayo; una etapa de medición de la unión de dicho polipéptido con Akt2, y una etapa de selección de una sustancia que inhibe la unión antes mencionada. Las células que expresan el polipéptido para cribado de la presente invención pueden ser células transformadas con un vector de expresión que contiene un polinucleótido codificante del polipéptido para cribado de la presente invención o células que existen de forma natural y que expresan el polipéptido de la presente invención, pero son deseables células transformadas.

Dado que AKBP2 como uno de los polipéptidos para cribado de la presente invención se une a Akt2, que su expresión se reduce en ratones modelo de diabetes mellitus y que la actividad Akt2 se reduce en células grasas en las que se sobreexpresaba el AKBP2 murino, se vio que el polipéptido de la presente invención controla negativamente la señal de insulina a través de su unión a Akt2. Así, se pueden cribar un agente mejorador de la resistencia a insulina y/o un agente mejorador del metabolismo de carbohidratos mediante el método de cribado antes mencionado.

En los métodos de cribado antes mencionados, se puede llevar a cabo la etapa de medición de la unión del polipéptido para cribado de la presente invención o de las células que expresan el polipéptido para cribado de la presente invención con Akt2 detectando directamente la unión del polipéptido para cribado de la presente invención con Akt2, o se puede llevar también a cabo midiendo el cambio de Akt2 causado por un cambio de la unión antes mencionada.

Aunque no está particularmente limitada, como ejemplos de la sustancia de ensayo que se puede usar en los métodos de cribado de la presente invención se incluyen compuestos de disponibilidad comercial (incluyendo péptidos), diversos compuestos convencionalmente conocidos registrados en archivos químicos (incluyendo péptidos), un grupo de compuestos obtenidos por las técnicas de química combinatoria (N.K. Terrett, M. Gardner, D.W. Gordon, R.J. Kobylecki y J. Steele, Tetrahedron, 51, 8135-73, (1995)), sobrenadantes de cultivos de microorganismos, componentes naturales derivados de plantas y de organismos marinos, extractos de tejidos animales o compuestos (incluyendo péptidos) obtenidos por modificación química o biológica de un compuesto seleccionado por los métodos de cribado de la presente invención.

Los métodos de cribado antes mencionados no están limitados y se pueden poner como ejemplos los siguientes métodos de cribado.

1) *Método de cribado que utiliza la fosforilación de Akt2*

Es sabido que la actividad kinasa de Akt2 se acelera cuando se fosforila la 473^a serina (Ser 473) o la 308^a treonina (Thr 308) de la molécula (Biochem. J., 1998, 335 (1-13)). Haciendo uso de esto, se puede detectar la presencia o ausencia de actividad Akt2 detectando la condición fosforilada de la Ser 473 o de la Thr 308 de Akt2 por una transferencia Western que utiliza un anticuerpo capaz de reaccionar específicamente con estos residuos fosforilados (v.g., anticuerpo antifosfoSer o similar).

Una célula de ensayo que expresa una parte o la totalidad del polipéptido para cribado de la presente invención no se trata o se trata con una sustancia de ensayo. Como células de ensayo, son deseables células que responden a la insulina, y más ilustrativamente se desean células grasas, hepatocitos o células derivadas de músculo esquelético. Se lisa la célula no tratada o tratada con una sustancia de ensayo y, utilizando esto como muestra, se puede detectar la fosforilación de Akt2, a saber, la presencia o ausencia de la actividad Akt2, haciendo uso de una transferencia Western, de una transferencia Western por puntos o de un método similar que utilice el anticuerpo anti-fosfoSer. Preferiblemente, se puede detectar ésta por el método del Ejemplo 7. En este sistema de detección, se puede seleccionar una sustancia usada para tratar una muestra en la que se observó aceleración de la fosforilación de Akt2 (a saber, la activación de Akt2) en comparación con una muestra no tratada con la sustancia de ensayo como sustancia que inhibe la unión del polipéptido para cribado de la presente invención con Akt2, y, en base a esto, se puede cribar un agente mejorador de la resistencia a insulina y/o un agente mejorador del metabolismo de carbohidratos, a saber, una sustancia que tiene un efecto de tratamiento de la diabetes mellitus. Como tal sustancia, es deseable seleccionar una sustancia que muestre un valor de DE₅₀ de la acción de aceleración de la fosforilación de Akt2 de 10 μ M o menos, preferiblemente de 1 μ M o menos, más preferiblemente de 0,1 μ M o menos, en dicho método de cribado.

2) *Método de cribado que utiliza un método de kinasa in vitro*

También se puede detectar la actividad Akt2 por un método de ensayo de kinasa *in vitro* en el que se mide la captación de ácido fosfórico radiactivo basada en un sustrato cuando se usa una histona H2B, una proteína de fusión GSK-3 o similar como sustrato de Akt2 y se deja que reaccione con un inmunoprecipitado de Akt2. De forma ilustrativa, no se tratan o se tratan células de ensayo que expresan parte o la totalidad del polipéptido para cribado de la presente invención con una sustancia de ensayo. Como células de ensayo, son deseables células que responden a la insulina, y más ilustrativamente son deseables células grasas, hepatocitos o células derivadas de músculo esquelético. Se puede concentrar la proteína Akt2 activada a partir de las células antes mencionadas por inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-Akt2. Mezclando un sustrato de Akt2, tal como GST-crosstide (proteína de fusión GST de secuencia GSK3-beta como sustrato fisiológico de Akt), con proteína Akt2 concentrada, se puede medir y determinar la actividad kinasa de Akt2 usando la fosforilación del sustrato como índice. Preferiblemente, ésta puede ser medida por el método descrito en el Ejemplo 7. Es posible usar las mediciones de kinasa como métodos de cribado de un gran número de compuestos, haciendo uso de los métodos de ensayo de kinasa total (Waga y col., J. Immunol. Methods, 190, pp. 71-77, 1996). En estos sistemas de medición, se pueden seleccionar sustancias usadas para tratar muestras en las que se observó aceleración de la actividad kinasa de Akt en comparación con muestras no tratadas con las sustancias de ensayo como sustancias que inhiben la unión del polipéptido para cribado de la presente invención con Akt2, y en base a esto, se pueden cribar agentes mejoradores de la resistencia a insulina y/o agentes mejoradores del metabolismo de carbohidratos, a saber, sustancias que tienen efectos de tratamiento de la diabetes mellitus. Como tales sustancias, es deseable seleccionar una sustancia que muestre un valor de DE₅₀ de la acción de aceleración de la kinasa Akt2 de 10 μ M o menos, preferiblemente de 1 μ M o menos, más preferiblemente de 0,1 μ M o menos, en dichos métodos de cribado.

3) Método de cribado que utiliza la unión del polipéptido para cribado de la presente invención con Akt2

Como el polipéptido para cribado de la presente invención controla de forma negativa la señal de insulina a través de su unión a Akt2, se puede poner como ejemplo el siguiente método de cribado que usa la unión del polipéptido para cribado de la presente invención con Akt2 como índice. De forma ilustrativa, no se tratan o se tratan células de ensayo que expresan una parte o la totalidad del polipéptido para cribado de la presente invención, o una parte o la totalidad del polipéptido para cribado de la presente invención que se fusiona con un marcaje (v.g., GST, Flag, His o similar), con una sustancia de ensayo. Como células de ensayo, son deseables células que responden a la insulina, y de forma más ilustrativa son deseables células grasas, hepatocitos o células derivadas de músculo esquelético. Se pueden concentrar la proteína Akt2 y una proteína que se une a la misma a partir de las células antes mencionadas por inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-Akt2. En esta etapa de concentración, es deseable que la misma sustancia de ensayo usada en el tratamiento antes mencionado de las células esté contenida en la solución de reacción. Se puede seleccionar una sustancia de ensayo que inhiba la unión del polipéptido para cribado de la presente invención con Akt2 separando la solución concentrada así obtenida de Akt2 y su proteína de unión por electroforesis en gel de poliacrilamida usando un método convencionalmente conocido y midiendo la cantidad del polipéptido para cribado de la presente invención por transferencia Western usando un anticuerpo. Como tal sustancia, es deseable seleccionar una sustancia que muestre un valor de CI_{50} de la acción de inhibición de la unión del polipéptido de la presente invención con Akt2 de 10 μM o menos, preferiblemente de 1 μM o menos, más preferiblemente de 0,1 μM o menos, en el método de cribado antes mencionado. En cuanto al anticuerpo para uso en este caso, se puede usar un anticuerpo específico para el polipéptido para cribado de la presente invención o para el polipéptido para cribado de la presente invención preparado en base a su secuencia parcial (v.g., anticuerpo anti-AKBP2), o un anticuerpo que reconozca el marcaje antes mencionado.

En los métodos de cribado anteriores 1) a 3), se pueden usar las células de ensayo sin estimular o estimulando con insulina, pero preferiblemente se pueden usar las células de ensayo realizando una estimulación con insulina.

Además, también se pueden seleccionar sustancias de ensayo que inhiben la unión del polipéptido para cribado de la presente invención con Akt2 combinando una transferencia Western similar a la anteriormente mencionada con un método de captura *in vitro* (H. Matsushima y col., Jikken Kogaku (Experimental Engineering), Vol. 13, N° 6, p. 528, 1994), usando proteína Akt2 purificada uniendo un marcaje (v.g., GST o similar) a partir de un extracto de células en las que se expresa el polipéptido para cribado de la presente invención, o una solución mixta de proteínas preparadas realizando una transcripción y una traducción *in vitro*, a la que se añade o no una sustancia de ensayo. Preferiblemente, las sustancias de ensayo que inhiben la unión de Akt2 al polipéptido para cribado de la presente invención pueden ser también seleccionadas usando una solución mixta de proteínas preparadas realizando directamente una transcripción y una traducción *in vitro* de una proteína consistente en el polipéptido de la presente invención (v.g., proteína AKBP2) como se muestra en el Ejemplo 6, a partir de un plásmido que expresa el polipéptido para cribado de la presente invención (v.g., el plásmido de expresión AKBP2 preparado en el Ejemplo 1(5)) usando un kit de traducción *in vitro* (v.g., TNT Kit (Promega)). Cada uno de estos métodos hace posible cribar un gran número de sustancias de ensayo no realizando una electroforesis en gel de poliacrilamida, sino realizando una transferencia Western por puntos convencionalmente conocida. Además, es posible realizar un cribado para seleccionar una sustancia de ensayo capaz de inhibir la unión de Akt2 al polipéptido para cribado de la presente invención, según métodos ELISA convencionalmente conocidos, que consisten en añadir una sustancia de ensayo a un lisado de células en las que se expresan simultáneamente el polipéptido para cribado de la presente invención expresado fusionando un marcaje similar al antes citado y Akt2. Además, es posible seleccionar una sustancia de ensayo que inhiba la unión de Akt2 al polipéptido para cribado de la presente invención cribándola a partir de la gran mayoría de la población mediante la detección de la actividad CAT o luciferasa existente, utilizando el sistema de dos híbridos convencionalmente conocido para células de mamífero (Clontech) y disponiendo la Akt2 fusionada a la región de unión a ADN de GAL 4 como cebo y el polipéptido para cribado de la presente invención fusionado a la región aceleradora de la transcripción de VP 16 en el lado de la presa.

50 Método para producir una composición farmacéutica para mejorar la resistencia a la insulina y/o mejorar el metabolismo de carbohidratos

También se incluye en la presente invención un método para producir una composición farmacéutica para mejorar la resistencia a la insulina, caracterizado por consistir en una etapa de realización de un cribado usando el polipéptido para cribado de la presente invención y una etapa de preparación de una preparación farmacéutica.

La composición farmacéutica que contiene una sustancia obtenida por el método de cribado de la presente invención como ingrediente activo puede ser preparada usando soportes, rellenos y/u otros aditivos generalmente usados en la producción de preparaciones farmacéuticas, en respuesta al tipo de ingrediente activo antes mencionado.

Como administración, se pueden citar la administración oral mediante tabletas, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos micronizados, polvos, soluciones para uso oral o similares, o la administración parenteral por inyecciones para inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraarticular o similares, supositorios, preparaciones para administración percutánea, preparaciones para administración transmucosa o similares. En particular, es deseable la inyección parenteral en el caso de péptidos que se digieren en el estómago, por inyección intravenosa o similares.

En la composición sólida para uso en la administración oral, se pueden mezclar una o más sustancias activas con al menos un diluyente inerte, tal como lactosa, manitol, glucosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa,

almidón, polivinilpirrolidona, silicato de aluminio y de magnesio o similares. En la forma habitual, la composición antes mencionada puede contener otros aditivos aparte del diluyente inerte, tales como un lubricante, un agente desintegrante, un agente estabilizante, un agente solubilizante o de ayuda a la solubilización o similares. Según la ocasión lo requiera, las tabletas o las píldoras pueden ir revestidas con un revestimiento de azúcar o con una película de una sustancia gástrica o entérica o similares.

La composición líquida para administración oral puede contener, por ejemplo, emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires o similares y puede contener un diluyente inerte generalmente utilizado, tal como agua purificada o alcohol etílico. La composición antes mencionada puede contener aditivos aparte del diluyente inerte, tales como un agente humectante, un agente suspensor, un edulcorante, un aroma o un antiséptico.

Las inyecciones para administración parenteral pueden incluir soluciones, suspensiones o emulsiones asépticas acuosas o no acuosas. Las soluciones o suspensiones acuosas pueden incluir, por ejemplo, agua destilada para inyección, suero fisiológico o similares como diluyente. Como diluyente para uso en las soluciones o suspensiones no acuosas, se pueden incluir, por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (v.g., aceite de oliva), alcoholes (v.g., etanol), polisorbato 80 o similares. La composición antes mencionada puede contener además un agente humectante, un agente emulsor, un agente dispersante, un agente estabilizante, un agente solubilizante o de ayuda a la solubilización, un antiséptico o similares. La composición antes mencionada puede ser esterilizada, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, mezcla de un germicida o irradiación. Alternativamente, se puede usar produciendo una composición sólida estéril y disolviéndola en agua estéril u otro solvente estéril para inyección antes de su uso.

La dosis puede ser eventualmente decidida considerando la potencia de actividad del ingrediente activo, a saber, la sustancia obtenida por el método de cribado de la presente invención, los síntomas, la edad, el sexo y similares de cada paciente que haya de ser tratado.

Por ejemplo, en el caso de la administración oral, la dosis es en general aproximadamente de 0,1 a 100 mg, preferiblemente de 0,1 a 50 mg, al día por adulto (como 60 kg de peso corporal). En el caso de la administración parenteral en forma de inyecciones, es de 0,01 a 50 mg, preferiblemente de 0,01 a 10 mg, al día.

Ejemplos

Se describe la presente invención a continuación en base a ejemplos, pero la invención no se restringe a dichos ejemplos. En este sentido, a menos que se indique en contrario, éstos pueden ser llevados a cabo según métodos convencionalmente conocidos ("Molecular Cloning, Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989", y similares). Además, cuando se usan reactivos y kits de disponibilidad comercial, éstos pueden ser llevados a cabo según las instrucciones adjuntas a los mismos.

Ejemplo 1

Clonación del gen AKBP2 de ratón y construcción de un vector de expresión

(1) Clonación del gen Akt2

Usando los oligonucleótidos representados por la SEC. ID. N° 5 y la SEC. ID. N° 6, diseñados en relación a la secuencia de ADNc descrita en el número de acceso M95936 de una base de datos génica GenBank, como cebadores y un ADNc de músculo esquelético humano (Marathon-Ready™ cDNA; Clontech) como plantilla, se llevó a cabo una PCR usando una ADN polimerasa (ADN polimerasa Pyrobrest (Takara Shuzo)) en condiciones de desnaturalización térmica a 95°C durante 3 minutos, 40 repeticiones de un ciclo consistente en 98°C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos y 74°C durante 1 minuto y 30 segundos, y calentamiento además a 74°C durante 7 minutos. Se clonó el ADNc Akt2 humano insertando el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 1,5 kpb en el sitio de reconocimiento EcoRV de un plásmido pZerO™-2.1 (Invitrogen). Se determinó la secuencia nucleotídica del ADNc Akt2 clonado en el vector mediante un kit de secuenciación (Applied Biosystems) y un secuenciador (secuenciador de ADN ABI 3700, Applied Biosystems), usando los oligonucleótidos antes mencionados representados por la SEC. ID. N° 5 y la SEC. ID. N° 6, confirmando así que su secuencia coincidía con la secuencia reportada.

(2) Preparación del plásmido de expresión para dos híbridos de levadura

Con objeto de insertar el ADNc Akt2 humano en un vector de expresión para dos híbridos de levadura, se diseñaron cebadores pDBtrp (Invitrogen) representados por la SEC. ID. N° 7 y la SEC. ID. N° 8 añadiendo una región homóloga con 40 nucleótidos en la parte anterior y en la parte posterior del sitio de multiclonación del vector pDBtrp al lado 5' y al lado 3' de la secuencia del gen Akt2 humano. Se llevó a cabo una PCR usando el plásmido Akt2 clonado anteriormente como plantilla y usando una ADN polimerasa (ADN polimerasa Pyrobrest; Takara Shuzo), calentando a 98°C (1 minuto) y repitiendo luego 35 veces un ciclo consistente en 98°C (5 segundos), 55°C (30 segundos) y 72°C (5 minutos). El fragmento de ADN obtenido como resultado tiene la región codificante completa del gen Akt2 humano.

Se añadieron simultáneamente el vector pDBtrp convertido en una cadena lineal por digestión con las enzimas de restricción Sall y NcoI y el fragmento de PCR que contenía ADNc Akt2 obtenido anteriormente a la cepa de levadura MaV203 para dos híbridos (Invitrogen), que se transformó entonces por un método de acetato de litio (Guthrie C. y Fink R., Guide to Yeast Genetics y Molecular Biology, Academic, San Diego, 1991). Como resultado, se produjo recombinação homóloga en la célula de levadura y se formó un plásmido en el que se insertó el ADNc Akt2 en el sitio de multiclonación de pDBtrp (al que se hará aquí referencia en adelante como pDB-Akt2). Se seleccionaron células de levadura que tenían el plásmido pDB-Akt2 cultivando en un medio mínimo sintético sólido (DISCO, agarosa al 20%) del que se había eliminado el triptófano como marcador de selección del plásmido, se trataron las células de levadura con zimoliasa (Seikagaku Kogyo) a 37°C durante 30 minutos y se aislaron y purificaron luego los plásmidos por el método alcalino y se llevó a cabo la determinación de sus secuencias nucleotídicas usando un kit de secuenciación (Applied Biosystems) y un secuenciador (secuenciador de ADN ABI 3700, Applied Biosystems) para seleccionar aquéllos en los que el ADNc Akt2 estaba insertado junto con la región codificante y el marco de traducción de la región de unión a ADN GAL 4 de pDBtrp.

(3) Preparación de una librería de ADNc derivado de tejido graso de ratón

Comprando ratones C57BL/6J machos de 12 semanas de edad y ratones C57BL/KsJ-+m/+m machos de 13 semanas de edad de CLEA Japan, se preparó ARN poli(A)⁺ a partir de grasa del epidídimo según el método de preparación de ARNm descrito en Experimental Medicine Supplement, Bio-manual Series 2, Gene Library Preparation Method (escrito en Japonés, editado por H. Nojima; publicado por Yohdosha el 20 de Febrero de 1994). Usando el ZAP-cDNA Synthesis Kit fabricado por Stratagene y según el protocolo adjunto al mismo, se realizaron una síntesis de primera hebra y una síntesis de segunda hebra usando 5 µg de ARN y se hizo que los extremos del ADNc de doble hebra fueran lisos, se ligó con el adaptador EcoRI adjunto al kit y se digirió después con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Se realizó una fraccionación por tamaño usando una columna spin (CHROMA SPIN-400; Clontech) y se eliminaron los fragmentos más cortos. Se digirió una porción de 100 µg de un vector pACT2 (Clontech) con la enzima de restricción XhoI, se trató con una fosfatasa alcalina (Bacterial Alkaline Phosphatase; Takara Shuzo) y se digirió luego con la enzima de restricción EcoRI y se aplicó a una columna spin (CHROMA SPIN-1000; Clontech). Según el método de preparación de librerías de ADNc descrito en Experimental Medicine Supplement, Bio-manual Series 2, Gene Library Preparation Method (editado por H. Nojima; publicado por Yohdosha el 20 de Febrero de 1994), se ligaron el vector y el ADNc y se trató la muestra tras la ligación con una copa de filtro (UFCP3TK50) fabricada por Millipore. Usando la *Escherichia coli* para electroporación fabricada por GIBCO BRL (ElectroMAX™ DH10B™ Cells), se llevó a cabo una transformación por el método de electroporación y se cultivó durante la noche en un agitador usando 1.000 ml de un medio de cultivo. Después de confirmar la presencia de 10⁶ o más colonias independientes en el medio de cultivo, se purificaron los plásmidos usando un kit de purificación de plásmidos (Qiagen Plasmid Kit; Qiagen) y según el protocolo adjunto al kit.

(4) Cribado de dos híbridos de levadura

Se suspendió la cepa de levadura antes mencionada MaV203 para dos híbridos transformada por pDB-Akt2 en 400 ml de medio líquido YPD (DIFCO), se cultivó a 30°C durante aproximadamente 6 horas hasta que la absorbancia a una longitud de onda de 590 nanómetros resultó ser de 0,1 a 0,4 y se convirtió luego en células competentes por el método de acetato de litio y se suspendió la cantidad final en 1,0 ml de tampón litio-tris 0,1 M. Se transformaron las células con 20 µg de la librería de ADNc derivado de tejido graso de ratón preparada en (3) antes mencionado y se seleccionaron las células cultivando en un medio mínimo sintético sólido (DISCO, agarosa al 20%) del que se habían eliminado el triptófano y la leucina como marcadores de selección respectivos de pDB-Akt2 y la librería, obteniendo así un transformante en el que se introdujeron ambos plásmidos. Al mismo tiempo, con objeto de seleccionar una célula que tuviera un gen indicador activado *HIS3* que se expresa cuando se une una proteína de fusión del dominio de unión a ADN GAL4 artificialmente expresado en el sistema de dos híbridos a una proteína de fusión del dominio de activación transcripcional de GAL4, se cultivaron las células transformadas a 30°C durante 5 días en el medio mínimo sólido (agarosa al 20%) del que se había eliminado la histidina junto con el triptófano y la leucina y al que se añadieron 20 mM de 3AT (3-amino-1,2,4-triazol; Sigma) como inhibidor de la enzima codificada por *HIS3*. Se obtuvieron colonias de levaduras resistentes a 3AT que mostraban que se expresa una proteína que se une a Akt2 en las mismas condiciones. Se cultivaron estas células de levadura en el medio sólido YPD durante 24 horas y se examinó luego la expresión del gen *lacZ*, que es diferente de *HIS3*, pero que es un indicador de unión del sistema de dos híbridos, usando la actividad β-galactosidasa como índice. En cuanto a la actividad β-galactosidasa, se transfirieron las células de levadura del medio a una película de nitrocelulosa, congelada en nitrógeno líquido y descongelada después a temperatura ambiente, y se puso el filtro sobre un papel de filtro empapado con una solución al 0,4% de X-GAL (Sigma) y se dejó reposar a 37°C durante 24 horas para medir el cambio de color a azul provocado por la β-galactosidasa. Seleccionando colonias en las que los contenidos de células transferidas al filtro cambiaban de blanco a azul, se especificaron células de levadura que expresaban una proteína que se une a Akt2 y se extrajeron los plásmidos derivados de la librería de las células según el método del Yeast Protocols Handbook de Clontech. Se determinaron las secuencias nucleotídicas de los fragmentos génicos contenidos en ellos por medio de un kit de secuenciación (Applied Biosystems) y un secuenciador (secuenciador de ADN ABI 3700, Applied Biosystems) usando la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. N° 9 (una secuencia que se une a la región GAL4 AD; derivada del vector de clonación pACT2 con número de acceso del GenBank U29899) como cebador, y se confirmó como resultado que la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. N° 1 estaba allí contenida.

(5) Determinación del codon de iniciación del gen AKBP2 del ratón

Como resultado del antes mencionado punto (4), se obtuvo un plásmido derivado de librería que tenía un fragmento génico que contenía la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. N° 1. Por consiguiente, con objeto de determinar el codon de iniciación del gen contenido en dicho fragmento, se sintetizó un cebador de la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. N° 10, que corresponde a una cadena complementaria de una secuencia nucleotídica de desde la 1.034ª posición hasta la 1.011ª posición de la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. N° 1 (Prologo) y se intentó amplificar el ADNc de longitud completa derivado de un producto de expresión de dicho gen de la librería de ADNc derivado de tejido graso antes mencionada por PCR usando dicho cebador y el cebador antes mencionado de la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. N° 9. Se llevó a cabo la PCR usando una ADN polimerasa (TAKARA LA Taq; Takara Shuzo) y calentando a 94°C (3 minutos) y repitiendo luego 35 veces un ciclo consistente en 94°C (30 segundos), 58°C (1,5 minutos) y 72°C (4 minutos). Se clonaron los fragmentos de ADN de la solución de reacción en un vector de expresión (pcDNA3.1/V5-His-TOPO; Invitrogen) usando TOPO TA Cloning System (Invitrogen). Se determinaron las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de ADN insertados en los plásmidos así obtenidos usando un cebador (TOPO TA Cloning Kit; Invitrogen; SEC. ID. N° 11) que se une a la región del promotor T7 en el vector, un kit de secuenciación (Applied Biosystems) y un secuenciador (secuenciador de ADN ABI 3700, Applied Biosystems). Como resultado, se obtuvieron plásmidos que contenían moléculas de ADNc de diversas longitudes que tenían la secuencia de dicho gen, pero las longitudes de cadena de las moléculas más largas de ADNc eran casi iguales a la del ADNc derivado del producto de transcripción obtenido en el punto (4) antes mencionado. Dado que varias pruebas mostraron el mismo resultado, se vio que la longitud de cadena de la secuencia del producto de transcripción de dicho gen casi coincidía con la del ADNc obtenido en (4). En base a esto, se vio que el primer ATG de la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. N° 1 es el codon de iniciación de dicho gen, de tal forma que se confirmó el marco abierto de lectura de dicho gen representado por la SEC. ID. N° 1. Se llamó a este gen AKBP2 de ratón.

(6) Preparación del vector de expresión del AKBP2 de ratón

Como resultado del punto (4) antes mencionado, se obtuvo un plásmido derivado de librería que tenía un fragmento génico que contenía la longitud completa de la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. N° 1 y quedaba indicada la presencia de un factor que se une a Akt2. Además, se confirmó su marco abierto de lectura en el punto (5) antes mencionado. Por consiguiente, se sintetizaron los cebadores representados por la SEC. ID. N° 12 y la SEC. ID. N° 13 (Prologo) según la información de secuencias nucleotídicas mostrada en la SEC. ID. N° 1, y se amplificó un ADNc AKBP2 codificante de la proteína AKBP2 neta por PCR usando dichos cebadores y el plásmido obtenido en el punto (4) antes mencionado como plantilla. Estos dos tipos de cebadores de ADN tienen respectivamente secuencias nucleotídicas homólogas a secuencias parciales del lado 5' y del lado 3' del gen AKBP2 del ratón representado por la SEC. ID. N° 1. Se llevó a cabo una PCR usando una ADN polimerasa (Pyrobest DNA Polymerase; Takara Shuzo), calentando a 98°C (1 minuto) y repitiendo luego 35 veces un ciclo consistente en 98°C (5 segundos), 55°C (30 segundos) y 72°C (5 minutos). Como resultado de la separación del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa, se confirmó que se había amplificado un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kpb. Por consiguiente, se subclonó este fragmento de ADN en la solución de reacción en un vector de expresión (pcDNA3.1/V5-His-TOPO; Invitrogen) usando TOPO TA Cloning System (Invitrogen). Se diseñó el cebador representado por la SEC. ID. N° 13 usado en este caso de tal modo que la secuencia del codon de parada de AKBP2 quedó eliminado de forma que un epitopo V5 derivado de vector (derivado de la proteína V del paramixovirus SV 5, Southern J.A., J. Gen. Virol., 72, 1551-1557, 1991) y un marcaje His 6 (Lindner P., BioTechniques, 22, 140-149, 1997) se continuaban con el mismo marco del triplete del gen AKBP2 de ratón en el lado 3' tras la clonación. Se determinó la secuencia nucleotídica del fragmento de ADN insertado en el plásmido así obtenido usando un cebador (TOPO TA Cloning kit; Invitrogen; SEC. ID. N° 11) que se une a la región del promotor T7 en el vector, un kit de secuenciación (Applied Biosystems) y un secuenciador (secuenciador de ADN ABI 3700, Applied Biosystems). Como resultado, se confirmó que el ADNc AKBP2 de 1.719 pares de bases representado por la SEC. ID. N° 1 codificante de la proteína AKBP2 neta se había insertado en el vector de expresión antes mencionado pcDNA3.1/V5-His-TOPO, como ADN del que se había eliminado el codon de parada del lado 3' de la secuencia de ADN. Se hace referencia a este plásmido de expresión como pcDNA-AKBP2 en adelante.

*Ejemplo 2**Preparación de células cultivadas que expresan la proteína AKBP2**(1) Preparación de células de expresión de AKBP2*

Se introdujo el plásmido de expresión pcDNA-AKBP2 antes mencionado, preparado en el Ejemplo 1(5), o un vector vacío (pcDNA3.1/V5-His-TOPO) en las células 293 (Banco de Células). Se cultivaron las células 293 en una placa de cultivo de 6 pocillos (diámetro del pocillo 35 mm) hasta que llegaron a un estado de confluencia del 70%, añadiendo 2 ml de un medio esencial mínimo DMEM (Gibco) que contenía un 10% de suero bovino fetal (Sigma) a cada pocillo. Se introdujo transitoriamente el pcDNA-AKBP2 (3,0 µg/pocillo) en estas células mediante el método del fosfato de calcio (Graham y col., Virology, 52, 456, 1973; N. Arai, Gene Transfer and Expression/Analytical Method (escrito en Japonés), pp. 13-15, 1994). Después de 30 horas de cultivo, se eliminó el medio y se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfatos (a la que se hará referencia aquí en adelante como PBS) y se lisaron luego las células añadiendo 0,1 ml por pocillo de una solución de lisis celular (fosfato de potasio 100 mM (pH 7,8), 0,2% de Tritón X-100).

(2) *Detección de la proteína AKBP2*

Se añadió una porción de 10 μ l de tampón de muestra SDS 2x (Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), 3% de laurilsulfato de sodio, 20% de glicerol, β -mercaptoetanol 0,14 M, 0,02% de azul de bromofenol) a 10 μ l del lisado antes mencionado de células con expresión de AKBP2 del Ejemplo 2(1) y se trató éste a 100°C durante 2 minutos y se sometió después a electroforesis en SDS al 10%-gel de poliacrilamida para separar las proteínas contenidas en la muestra. Se transfirieron las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa usando un dispositivo de transferencia de tipo semiseco (Bio-Rad) y se llevó a cabo entonces la detección de la proteína AKBP2 sobre dicha membrana de nitrocelulosa por transferencia Western según el modo habitual. Se usó un anticuerpo monoclonal (Invitrogen) que reconoce el epitopo V5 fusionado al extremo C de AKBP2 como anticuerpo primario y se usó anticuerpo de fusión IgG de ratón-HRP (Bio-Rad) como anticuerpo secundario. Como resultado, tal como se muestra en la Fig. 1, se confirmó que se detecta una proteína de aproximadamente 70 kDa que corresponde a una proteína de fusión AKBP2-V5-His 6 consistente en 618 aminoácidos que contiene el marcaje del lado C-terminal consistente en 45 aminoácidos con dependencia de la transferencia génica del vector de expresión pcDNA-AKBP2. En base a esto, se reveló que se expresa ciertamente la región de longitud completa del gen AKBP2 de ratón antes mencionado clonado y que puede formar una estructura estable como proteína en las células cultivadas.

Ejemplo 3

20 *Medición del nivel de expresión de AKBP2 en ratones normales, ratones normales alimentados con una dieta rica en grasas y ratones del modelo de diabetes mellitus*

En base a la información antes mencionada, se vio que la proteína AKBP2 de ratón de la presente invención se une a Akt2 y se expresa en los tejidos que responden a la insulina, incluyendo tanto el adiposo como el muscular. Dado que la proteína Akt2 es un factor que actúa sobre la primera ruta de señal de la insulina, se consideró que la acción de la AKBP2 de la presente invención se relaciona con la resistencia a la insulina. En consecuencia, se realizó la medición del nivel de expresión del ARN mensajero (ARNm) del gen AKBP2 en músculo y grasa usando ratones modelo de diabetes mellitus de tipo 2 KKA^y/Ta (Iwatsuka y col., Endocrinol. Japon.: 17, 23-35, 1970, Taketomi y col., Horm. Metab. Res., 7, 242-246, 1975) y ratones C57BL/6J sanos alimentados con una dieta normal o con una dieta rica en grasas.

En cuanto al nivel de expresión génica, se midió el nivel de expresión del gen AKBP2 de ratón de la presente invención y se corrigió con el nivel de expresión medido simultáneamente del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Como sistema de medición, se usaron el Sistema de Detección de Secuencia PRISMTM 7700 y la Mezcla Maestra de PCR SYBR Green (Applied Biosystems). En este sistema de medición, se determina la cantidad expresada del gen de interés detectando y monitorizando el nivel de fluorescencia del pigmento SYBR Green I incorporado por el ADN de doble hebra amplificado por PCR en modo de tiempo real.

De forma ilustrativa, se realizó la medición mediante los procedimientos siguientes.

(1) *Preparación del ARN total*

Se utilizaron ratones C57BL/6J machos de 14 semanas de edad alimentados con una dieta habitual o con una dieta rica en grasas y ratones C57BL/6J machos y ratones KKA^y/Ta de 15 semanas de edad (todos ellos de CLEA Japan). Se llevó a cabo la alimentación con la dieta rica en grasas durante 9 semanas desde las 5 semanas de edad hasta las 14 semanas de edad. La composición de la dieta rica en grasas es la siguiente: caseína 29,8%, sacarosa 15,8%, mezcla vitamínica 1,3%, mezcla mineral 8,8%, polvo de celulosa 5,0%, metionina 0,5%, aceite de cártamo 28,9%, agua 10%. Por otra parte, se usó CE-2 (CLEA Japan) como alimentación normal. Se extrajeron el músculo y la grasa de cada uno de los ratones antes mencionados y se preparó el ARN total usando un reactivo para extracción de ARN (Isogen; Nippon Gene) y según sus instrucciones. Se trató entonces cada ARN total así preparado usando desoxirribonucleasa (Nippon Gene), se sometió a tratamiento con fenol/cloroformo y precipitación con etanol, se disolvió en agua estéril y se guardó a -20°C.

(2) *Síntesis de ADNc de una sola hebra*

Se realizó la transcripción inversa del ARN total para obtener ADNc de una sola hebra en un sistema de 20 μ l usando 1 μ g de ARN (grasa), 1 μ g de ARN (músculo de un ratón de 14 semanas de edad) o 0,25 μ g de ARN (músculo de un ratón de 15 semanas de edad) preparados en (1) y utilizando un kit para la reacción de transcripción inversa (AdvantageTM RT-for-PCR Kit; Clontech). Después de la transcripción inversa, se mezcló esto con 180 μ l de agua estéril y se guardó a -20°C.

(3) *Preparación de cebadores de PCR*

Se diseñaron cuatro oligonucleótidos (SEC. ID. N° 14 a SEC. ID. N° 17) como cebadores de PCR, descritos en el siguiente punto (4). Se usaron como una combinación de la SEC. ID. N° 14 con la SEC. ID. N° 15 para el gen AKBP2 de ratón y una combinación de la SEC. ID. N° 16 con la SEC. ID. N° 17 para el gen G3PDH.

(4) *Medición de la cantidad de expresión génica*

Se realizó la medición en tiempo real de la amplificación por PCR por medio del Sistema de Detección de Secuencia PRISM™ 7700 en un sistema de 25 µl según las instrucciones. En cada sistema, se usaron 5 µl de ADNc de una sola hebra, 12,5 µl de reactivo SYBR Green 2x y 7,5 pmol de cada cebador. En este caso, se usó el ADNc de una sola hebra conservado en (2) diluyendo 30 veces en cuanto a la G3PDH o diluyendo 10 veces en cuanto a la AKBP2 de ratón. En lugar del ADNc de una sola hebra, se diluyeron apropiadamente 0,1 g/µl de un ADN genómico de ratón (Clontech) y se usó una porción de 5 µl del mismo para la preparación de una curva de calibración. Se llevó a cabo una PCR calentando a 50°C durante 10 minutos, calentando a continuación a 95°C durante 10 minutos y repitiendo luego 45 ciclos de un proceso consistente en 2 etapas de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos.

Se corrigió la cantidad expresada del gen AKBP2 de ratón en cada muestra mediante la cantidad expresada del gen G3PDH en base a la fórmula siguiente.

$$[\text{Cantidad corregida de expresión de AKBP2}] = [\text{cantidad expresada de AKBP2 (datos brutos)}] / [\text{cantidad expresada de G3PDH (datos brutos)}]$$

La Fig. 2 muestra las cantidades relativas, donde se definió la cantidad expresada en ratones C57BL/6J con alimentación habitual como 1 al comparar las cantidades expresadas en grasa, y la cantidad expresada en C57BL/6J también como 1 al comparar las cantidades expresadas en tejido muscular.

Tal como se muestra en la Fig. 2, se confirmó que la expresión del gen AKBP2 de ratón de la presente invención está marcadamente aumentada en la grasa y en el músculo en el momento de la alimentación con la dieta rica en grasas, o en la grasa y en el músculo del ratón del modelo de diabetes mellitus. En consecuencia, se considera que la AKBP2 de ratón de la presente invención induce resistencia a la insulina por aceleración de la cantidad de expresión en grasa y músculo. En base a lo anterior, se puede concluir que la implicación de la AKBP2 de ratón de la presente invención en la resistencia a la insulina es grande.

Además, los resultados de este Ejemplo revelaron que el diagnóstico del estado mórbido de la diabetes mellitus puede ser realizado midiendo la cantidad de expresión de la AKBP2 de ratón.

Ejemplo 4

35 *Clonación del gen AKBP2 humano y su análisis de distribución de la expresión en diversos tejidos*

Se intentó amplificar el ADNc de longitud completa del gen ortólogo AKBP2 humano por el mismo método de PCR mostrado en el anterior Ejemplo 1(5), utilizando una librería de ADNc derivada de grasa humana (Clontech) como plantilla y un par de cebadores representados por la SEC. ID. N° 18 y la SEC. ID. N° 19. Cuando se determinó la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kpb obtenido como resultado según el mismo método que el mostrado en el Ejemplo 1, se confirmó que contiene el ADNc de longitud completa del gen representado por la SEC. ID. N° 3. Dicho ADNc génico es un nuevo gen que codifica el polipéptido representado por la SEC. ID. N° 4. Dicho gen es un gen ortólogo humano de AKBP2, en donde hay una homología del 76,8% con respecto al gen AKBP2 de ratón representado por la SEC. ID. N° 1, y el polipéptido codificado tiene una homología del 71,3% con respecto a la proteína AKBP2 de ratón representada por la SEC. ID. N° 2, respectivamente.

Por consiguiente, se intentó a continuación amplificar un fragmento de ADNc de aproximadamente 800 bases del lado 3' del gen AKBP2 humano a partir de muestras de ADNc derivadas de diversos tejidos humanos por PCR usando el cebador representado por la SEC. ID. N° 20 recién diseñada en base a la secuencia de dicho gen AKBP2 humano y el cebador antes mencionado representado por la SEC. ID. N° 19, y se examinó la presencia o ausencia de la expresión de AKBP2 en los respectivos tejidos. Se llevó a cabo una PCR mediante ADN polimerasa (ADN polimerasa Pyrobest; Takara shuzo) usando 2 µg de cada una de las diversas librerías de ADNc de tejidos humanos (Clontech) como plantilla y, después de calentar a 98°C (1 minuto), repitiendo 35 ciclos, consistente cada uno en 98°C (5 segundos), 55°C (30 segundos) y 72°C (5 minutos). Cuando se separaron los productos de PCR así obtenidos por electroforesis en gel de agarosa, se amplificó un fragmento de ADN deseado de aproximadamente 800 pares de bases que se consideraba contenía una secuencia parcial del lado del extremo 3' del gen AKBP2 humano a partir de cada una de las librerías de ADNc derivadas de músculo esquelético, de hígado y de grasa. Cuando se separaron estos fragmentos de ADN de los respectivos geles de agarosa y se determinaron respectivamente las secuencias nucleotídicas de dichos fragmentos de ADN según el método descrito en el anterior Ejemplo 1(4) usando el cebador representado por la SEC. ID. N° 20, se confirmó que son la secuencia parcial del lado del extremo 3' del gen AKBP2 humano representado por la SEC. ID. N° 3. En base a esto, se reveló que la expresión del gen AKBP2 humano está específicamente controlada en grasa, músculo, hígado y órganos limitados similares que responden a la señal de la insulina.

Como resultado de este Ejemplo, como la AKBP2 humana mostraba una alta homología con la AKBP2 de ratón y se observó su expresión en tejidos que responden a la insulina, se confirmó que tiene las mismas funciones que las de su contrapartida murina y que, por lo tanto, es útil para el diagnóstico de la diabetes mellitus y el cribado de un agente mejorador de la diabetes mellitus.

Ejemplo 5

Preparación de células cultivadas que expresan la proteína AKBP2 humana

- 5 Se subclonó el ADNc de longitud completa del gen AKBP2 antes mencionado obtenido en el Ejemplo 4 mediante el mismo método que el mostrado en el Ejemplo 1(6) antes mencionado. A continuación, se confirmó que el ADNc AKBP2 humano de 1.782 pares de bases representado por la SEC. ID. N° 3 codificante de la proteína AKBP2 humana neta estaba insertado en el vector de expresión pcDNA3.1/V5-His-TOPO antes mencionado, como ADN del que se eliminó el codon de parada del lado 3' de la secuencia de ADN. Se hace aquí referencia en adelante a este plásmido de expresión como pcDNA-AKBP2 humana. Introduciendo 5,1 µg por pocillo de este plásmido de expresión pcDNA-AKBP2 humana mediante el mismo método que en el Ejemplo 2(1), se detectó la expresión de proteína AKBP2 humana según el método del Ejemplo 2(2). Como resultado, se confirmó que se detectaba una proteína de aproximadamente 70 kDa que corresponde a una proteína de fusión AKBP2 humana-V5-His 6 consistente en 638 aminoácidos que contiene el marcaje del lado C-terminal consistente en 45 aminoácidos con dependencia de la transferencia génica del vector de expresión pcDNA-AKBP2 humana, de tal forma que se reveló que la región de longitud completa del gen AKBP2 humano clonado antes mencionado se expresa ciertamente en las células cultivadas y puede formar una estructura estable como proteína.

Ejemplo 6

- 20 *Inspección de la interacción entre la AKBP2 humana y Akt2*

(1) Preparación de un plásmido de expresión de Akt2 con fusión a GST

- 25 Con objeto de insertar ADNc Akt2 humano en un vector de expresión de fusión GST pGEX-3X (Amersham Bioscience), se dirigió el ADNc Akt2 humano obtenido en el Ejemplo 1(1) con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* y el vector pGEX-3X con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, respectivamente, convirtiéndolos así en cadenas lineales. Además, para utilizar los fragmentos representados por la SEC. ID. N° 21 y la SEC. ID. N° 22 como fragmentos para su ligación, se trataron por separado a 60°C durante 30 minutos como pretratamiento y se mezclaron luego y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Se mezcló una mezcla de este fragmento de ADNc Akt2 humano tratado, del vector pGEX-3X y del fragmento para ligación con una solución de ADN ligasa (kit de ligación de ADN II; Takara Shuzo) y se trató a 16°C durante 3 horas, preparando así un plásmido en el que el ADNc Akt2 estaba insertado en el sitio de multiclonación de pGEX-3X (al que se hará aquí referencia en adelante como pGEX-Akt2). Realizando la determinación de la secuencia nucleotídica mediante el uso del oligonucleótido representado por la SEC. ID. N° 23 como cebador y mediante el uso de un kit de secuenciación (Applied Biosystems) y de un secuenciador (secuenciador de ADN ABI 3700, Applied Biosystems), se seleccionaron aquéllas en las que la región codificante del ADNc Akt2 y el marco de traducción del marcaje GST del vector pGEX estaban insertados unidos.

- 40 *(2) Purificación de la proteína Akt2 con fusión a GST*

- Usando el plásmido pGEX-Akt2 obtenido en el punto (1) antes mencionado, se transformó *Escherichia coli* BL21 por el método del choque térmico y se cultivó durante la noche en un agitador usando 2,4 ml de un medio de cultivo, se inoculó la totalidad de su volumen en 400 ml de un medio de cultivo y se cultivó a 37°C durante 3 horas en un agitador, y se añadió luego IPTG (SIGMA) a una concentración final de 2,5 mM y se continuó el cultivo con agitación durante 3 horas para inducir la expresión de la proteína Akt2 con fusión a GST (a la que se hará aquí referencia en adelante como GST-Akt2). Mediante recuperación de las células, se purificó GST-Akt2 sobre perlas de glutatión sefarosa (Glutathione Sepharose 4B; Amersham Pharmacia) según un método convencionalmente conocido (H. Matsushime y col., Jikken Kogaku (Experimental Engineering), Vol. 113, N° 6, p. 528, 1994). Como control, se indujo la expresión de una proteína del resto GST solo (a la que se hará aquí referencia en adelante como proteína GST) y se purificó a partir de *Escherichia coli* BL21 transformada con pGEX-3X, del mismo modo que antes. Realizando una separación por electroforesis en SDS gel de poliacrilamida y una tinción con Azul Brillante Coomassie según métodos convencionalmente conocidos, se confirmó que se habían purificado las proteínas que tenían los pesos moleculares esperados (GST-Akt2: 79 kDa, proteína GST: 26 kDa).

- 55 *(3) Verificación de la unión bioquímica de la proteína Akt2 a la proteína AKBP2 humana*

- Usando la proteína Akt2 con fusión a GST (a la que se hará aquí referencia en adelante como GST-Akt2) preparada en el punto (2) antes mencionado, se verificó la presencia o ausencia de una interacción directa entre la proteína AKBP2 humana y la proteína Akt2 por el método de captura de GST (H. Matsushime y col., Jikken Kogaku, Vol. 113, N° 6, p. 528, 1994). Primeramente, usando 0,5 µg del pcDNA-AKBP2 humana preparado en el anterior Ejemplo 5 como plantilla y usando 40 µl de un kit TNT (TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System; Promega) y 1,3 MBq de un radioisótopo (redivue Pro-mix L-[³⁵S]; Amersham), se preparó proteína AKBP2 humana marcada con radioisótopo por transcripción y traducción *in vitro* según los protocolos adjuntos. Se mezcló una porción de 15 µl de esta solución de preparación de proteína AKBP2 humana con 1 µg de la proteína GST o de GST-Akt2 purificada sobre perlas de glutatión en el punto (2) antes mencionado y se agitó a 4°C durante 1 hora después de añadir 0,3 ml de Tampón A (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 10% de glicerol, NaCl 120 mM, EDTA 1 mM, EGTA 0,1 mM, PMSF 0,5 mM y 0,5% de NP-40). A continuación, se coprecipitó la proteína que se une a la proteína GST o a GST-Akt2 sobre perlas

por centrifugación. Se suspendió ésta en 0,5 ml de una solución tampón en la que se cambió la concentración de NaCl del Tampón A antes mencionado a 100 mM y se coprecipitó de nuevo por centrifugación. Después de repetir esta operación 4 veces, se separaron las proteínas del precipitado por electroforesis en SDS gel de poliácridamida según un método convencionalmente conocido y se detectó la proteína AKBP2 humana por autorradiografía. Como resultado, se detectó una banda que no se detecta cuando se mezcla la proteína GST cuando se mezcló GST-Akt2. En base a esto, se reveló que la AKBP2 humana como uno de los polipéptidos de la presente invención interacciona con la proteína Akt2 de forma similar al caso de la AKBP2 de ratón de la presente invención, demostrando así que estas moléculas de AKBP2 humanas y murinas son contrapartidas que desempeñan la misma función en ambas especies animales. En consecuencia, se vio que la AKBP2 humana de la presente invención está implicada en la inducción de resistencia a la insulina a través de su interacción con la proteína Akt2 de forma similar al caso de la AKBP2 murina de la presente invención.

Ejemplo 7

15 *Influencia de la sobreexpresión de la AKBP2 murina en células grasas NIH3T3 L1 sobre la actividad kinasa de Akt2*

Por los resultados de los análisis antes mencionados de dos híbridos de levadura y de unión bioquímica, se vio que Akt2 y AKBP2 interaccionan entre sí. Por consiguiente, se examinó la influencia de AKBP2 sobre la actividad enzimática (kinasa) de Akt2 por un ensayo de kinasa *in vitro* usando células NIH3T3 L1 cultivadas.

20 (1) *Preparación del sustrato GST-crosstide para el ensayo de kinasa in vitro*

Se mezclaron las moléculas de oligo-ADN sintéticas representadas por la SEC. ID. N° 24 y la SEC. ID. N° 25 codificantes de la región de fosforilación de GSK3 β , que es un sustrato fisiológico de Akt2, y se integraron en el sitio *EcoRI XhoI* del vector pGEX-6P-1. Se usó esto como GST-crosstide. Utilizando el plásmido GST-crosstide, se transformó *Escherichia coli* BL21 por el método del choque térmico y se cultivó durante la noche en un agitador usando 2,4 ml de un medio de cultivo, se inoculó la totalidad de su volumen en 400 ml de un medio de cultivo y se cultivó a 37°C durante 3 horas en un agitador, y luego se añadió IPTG (SIGMA) a una concentración final de 2,5 mM y se continuó el cultivo con agitación durante 3 horas para inducir la expresión de una proteína de fusión GST (a la que se hará aquí referencia en adelante como GST-crosstide). Recuperando las células, se purificó GST-crosstide sobre perlas de glutatión sefarosa (Glutathione Sepharose 4B; Amersham Pharmacia) según un método convencionalmente conocido (H. Matsushima y col., Jikken Kogaku (Experimental Engineering), Vol. 113, N° 6, p. 528, 1994). Realizando una separación de estas proteínas por electroforesis en SDS gel de poliácridamida y su tinción con Azul Brillante Coomassie según métodos convencionalmente conocidos, se confirmó que se había purificado la GST-crosstide.

35 (2) *Preparación de un virus con alta expresión de AKBP2 utilizando un vector de adenovirus*

Se cortó un fragmento génico codificante la AKBP2 de ratón del vector pcDNA-AKBP2 usando las enzimas de restricción *BamHI* y *SacII* y se insertó en el sitio de multiclonación (para *BglIII* y *NotI*) de un vector de adenovirus pAdTrack-CMV (obtenido de Johns Hopkins Cancer Center) usando los oligos de enlace de la SEC. ID. N° 26 y la SEC. ID. N° 27, que forman fragmentos de digestión *SacII* y *NotI*, obteniendo así un vector AKBP2/pAdTrack-CMV.

A continuación, se preparó una solución de adenovirus con un alto título capaz de expresar AKBP2 según un protocolo convencionalmente conocido ["A Practical Guide for using the AdEasy System" (HYPERLINK "http://www.coloncancer.org/adeasy.htm" "http://www.coloncancer.org/adeasy/protocol2.htm")]. Se preparó el adenovirus de control a partir de pAdTrack-CMV.

En este sentido, en cuanto a la cantidad de virus, se midió la absorbancia a 260 nm (A260) y se convirtió mediante la fórmula siguiente.

$$1 \text{ A260} = 1,1 \times 10^{12} \text{ partículas víricas} = 3,3 \times 10^{11} \text{ ufp/ml} \quad [\text{Fórmula}]$$

55 (3) *Sobreexpresión de la AKBP2 en células grasas NIH3T3 L1 e inmunoprecipitación de Akt2*

Se suspendieron células NIH3T3 L1 en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía un 10% de suero de ternera fetal (FCS) y se inocularon en porciones de 8×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos revestida de colágeno (Asahi Techno Glass). Al día siguiente, se reemplazó el medio con DMEM (10% de FCS) suplementado además con 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 250 nM de dexametasona y 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) para inducir la diferenciación de las células 3T3-L1. Dos días después, el medio volvió a ser 0,4 ml de DMEM (10% de FCS). A los cuatro días, se añadió un adenovirus que expresa AKBP2 al medio a una concentración de 8×10^{10} ufp por pocillo. Como control, se usó un adenovirus que expresa GFP sola.

Después de 36 horas de la infección por el adenovirus, se cultivaron las células durante 16 horas usando medio DMEM libre de suero, se estimularon con 100 nM de insulina durante un período predeterminado de tiempo (0, 30 ó 60 minutos) y se disolvieron luego inmediatamente en 500 μl de una solución de lisis celular (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM, Na_3VO_4 0,5 mM, 0,1% de 2-mercaptoetanol, NaF 50 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, β -glicerofosfato 10 mM, 1% de Tritón X-100 y PMSF 0,1 mM). Después de centrifugar a 15.000 rpm durante

20 minutos, se mezcló el sobrenadante con un anticuerpo anti-Akt2 (Upstate) y Proteína G-Sefarosa (Amersham) para efectuar la inmunoprecipitación. Se lavó el inmunoprecipitado dos veces con la solución de lisis celular, dos veces con una solución de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 0,03% de Brij 35 y 0,1% de 2-mercaptoetanol) y luego dos veces con una solución de reacción (MOPS 20 mM, pH 7,2, MgCl₂ 10 mM, β -glicerofosfato 25 mM, EDTA 5 mM y DTT 1 mM) y se sometió a la reacción de kinasa.

(4) Ensayo de kinasa *in vitro*

Se suspendió el anterior inmunoprecipitado en 20 μ l de la solución de reacción. Se le añadió la solución de reacción suplementada además con 15 μ M de ATP, 10 μ Ci de [γ^{32} P]-ATP y 3 μ g de GST-crosstide y se calentó a 30°C durante 20 minutos. Se detuvo la reacción añadiendo 10 μ l de tampón de muestra SDS 4x. Después de separar por electroforesis en SDS gel de poliacrilamida, se determinó la radiactividad incorporada en GST-crosstide analizándola mediante un Analizador de Bioimagen BAS 2000 (Fuji Photo Film). Como se muestra en la Fig. 3, la actividad kinasa de Akt2 en las células NIH3T3 L1 se redujo por sobreexpresión con AKBP2 a 0,82 veces en comparación con el control (GFP) en un estado no estimulado con insulina. Del mismo modo, cuando se observó el aumento de actividad de Akt2 por estimulación con 100 nM de insulina, las células infectadas con GFP mostraron un aumento de 1,39 veces (30 minutos) y 1,5 veces (60 minutos) en la actividad enzimática en comparación con el estado no estimulado, mientras que las células infectadas con el virus AKBP2 mostraron sólo 1,30 veces (30 minutos) y 1,22 veces (60 minutos) del aumento dependiente de la estimulación en la actividad. Además, como la fosforilación de la 473^a serina es importante para la activación de Akt2, se analizó la Akt2 antes mencionada inmunoprecipitada tras la estimulación con insulina por transferencia Western usando un anticuerpo anti-serina 473 fosforilada (New England Biolab), para encontrar que el estado fosforilado en el momento de no estimulación se redujo en las células infectadas con el virus AKBP2 en comparación con las células infectadas con virus control. Además, se vio una aceleración de la fosforilación dependiente de la estimulación hacia los 30 minutos de la estimulación con insulina tanto en las células infectadas con el virus AKBP2 como en las células infectadas con virus control, pero el grado de aceleración de la fosforilación se debilitó en las células infectadas con el virus AKBP2 en comparación con las células infectadas con virus control, de tal forma que se respaldaron los resultados del ensayo de kinasa *in vitro*. En base a los resultados anteriores, se considera que la AKBP2 de ratón de la presente invención interacciona con Akt2 e induce resistencia a la insulina reduciendo el aumento de la actividad enzimática insulino-dependiente, además de la actividad enzimática insulino-independiente.

Aplicabilidad industrial

Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención que tienen la propiedad de unirse a Akt2, reducen la actividad kinasa de Akt2 y aumentan el nivel de expresión en el estado mórbido de la diabetes mellitus son útiles para el diagnóstico de la diabetes mellitus. Además, los polipéptidos, polinucleótidos, vectores de expresión y células de la presente invención son útiles para el cribado de una sustancia que inhibe la unión de los polipéptidos de la presente invención a Akt2 (a saber, una sustancia que refuerza la función de Akt2). La sustancia seleccionada por dicho cribado es útil como sustancia candidata a agente mejorador de la resistencia a la insulina y a agente mejorador de la diabetes mellitus.

Texto libre de lista de secuencias

Se describe una explicación de "Secuencia artificial" en la entrada numérica <223> de la siguiente Lista de secuencias. De forma ilustrativa, cada una de las secuencias nucleotídicas representadas por las SEC. ID. N° 5 a 8 y 10 a 27 en la Lista de secuencias es una secuencia de cebador artificialmente sintetizada. La secuencia nucleotídica representada por la secuencia SEC. ID. N° 9 es una secuencia consistente en las bases que van de la posición 5.183^a (5') a la 5.162^a (3') de un vector de clonación pACT2 (GenBank U29899).

En lo que antecede, la invención ha sido descrita en base a las realizaciones especificadas, pero se incluyen en el alcance de la invención cambios y modificaciones que resulten obvios para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4, o una secuencia de aminoácidos en la que se han suprimido, substituido y/o insertado de 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4, y que se une a Akt2.

2. Un polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4.

3. Un polinucleótido codificante del polipéptido descrito en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2.

4. Un vector de expresión que incluye el polinucleótido descrito en la reivindicación 3.

5. Una célula transformada con el vector de expresión descrito en la reivindicación 4.

6. Un método de cribado de una sustancia que inhibe la unión de un polipéptido descrito en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2 o un polipéptido consistente en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 90% o más con respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4 y que se une a Akt2 con Akt2, que consiste en

dejar que (1) el polipéptido antes mencionado o una célula que expresa el polipéptido antes mencionado contacte con (2) una sustancia de ensayo,

medir la unión de dicho polipéptido a Akt2 y

seleccionar una sustancia que inhiba la unión antes mencionada.

7. El método de cribado descrito en la reivindicación 6, donde la sustancia inhibidora de la unión es un agente mejorador de la resistencia a la insulina y/o un agente mejorador del metabolismo de carbohidratos.

8. El método de cribado descrito en la reivindicación 6 o en la reivindicación 7, donde la etapa de medición de la unión de (1) el polipéptido descrito en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2 o un polipéptido consistente en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 90% o más con respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N° 2 o la SEC. ID. N° 4 y que se une a Akt2 con (2) Akt2 es una etapa de medición del cambio en Akt2 en base al cambio en la unión antes mencionada.

Fig. 1

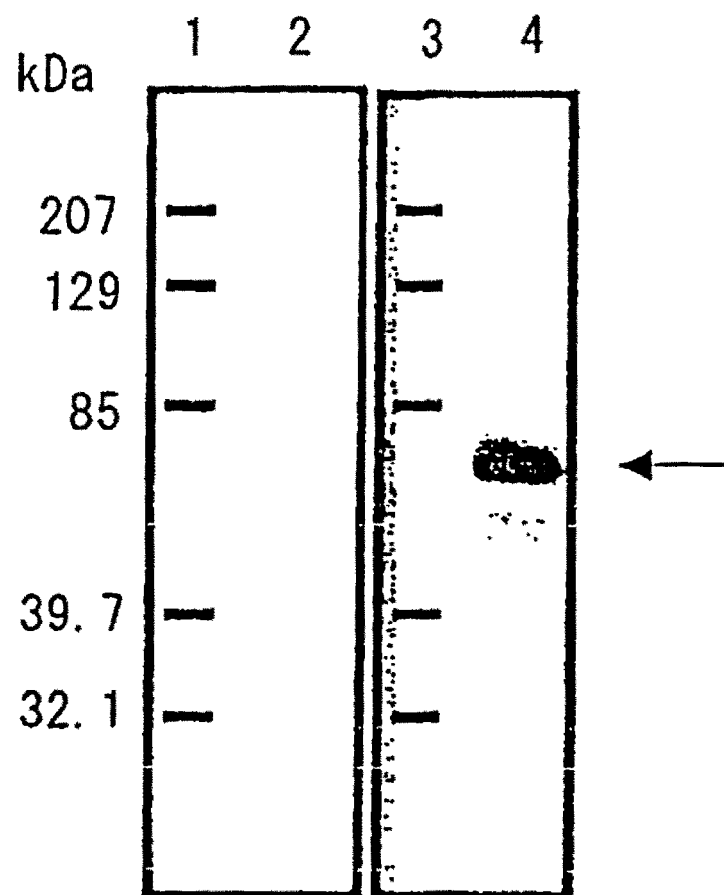
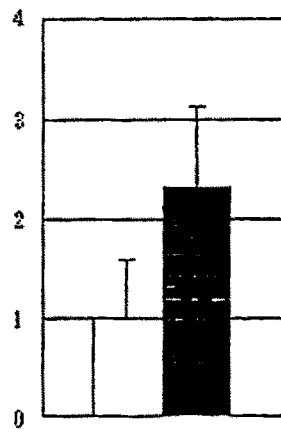
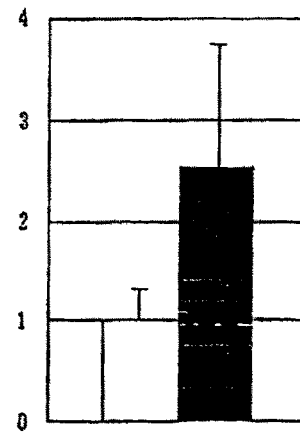


Fig. 2

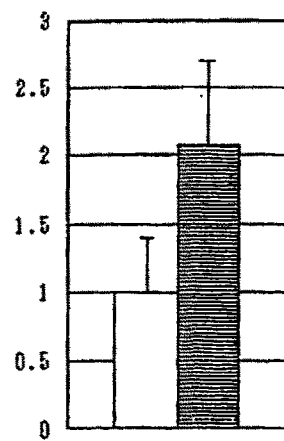
(1)



(2)



(3)



(4)

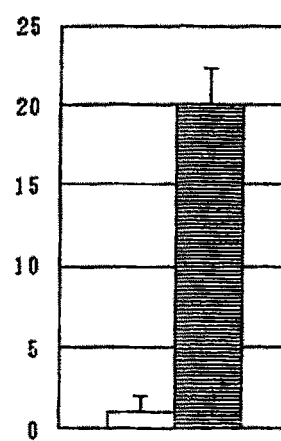
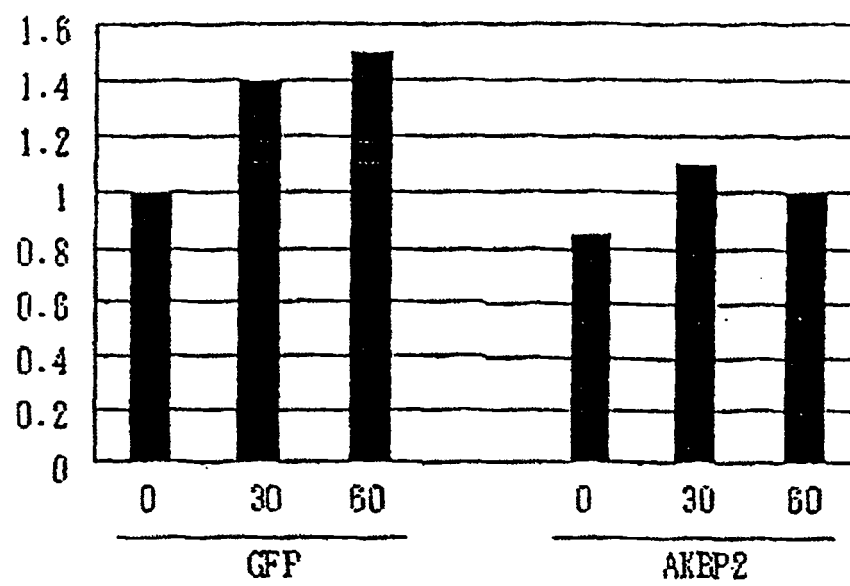


Fig. 3



ES 2 324 779 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd
<120> Proteína de interacción con Akt2
5 <130> Y0363-PCT
<150> JP2002-354155
<151> 05-12-2002
10 <150> JP2003-206952
<151> 08-08-2003
<160> 27
<170> PatentIn versión 3,1
15 <210> 1
<211> 1722
<212> ADN
20 <213> *Mus sp.*
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1719)
25 <223> Inventor: Endo, Yuki; Endoh, Hideki; Ueda, Yoshitaka; Kato, Miyuki; Inabe, Kazunori

<400> 1
30 atg gca gct gtg ccg ccc ctg cgg gac cgc ttg agc ttc ttg cat agg 48
 Met Ala Ala Val Pro Pro Leu Arg Asp Arg Leu Ser Phe Leu His Arg
 1 5 10 15
35
 ctc ccc atc ctg ttg aag ggg acc tca gat gat agc atc cca tgt cca 96
40
45
50
55
60
65

ES 2 324 779 T3

Leu Pro Ile Leu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Asp Ser Ile Pro Cys Pro

20

25

30

5

ggc tac ctg ttt gaa gag atc gcc aag att tcc cac gag tca cta ggc 144

Gly Tyr Leu Phe Glu Glu Ile Ala Lys Ile Ser His Glu Ser Leu Gly

10

35

40

45

agc agc cag tgc ctg ctg gag tac ctc ctg aac cgt ctg gac agc agc 192

Ser Ser Gln Cys Leu Leu Glu Tyr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Ser Ser

15

50

55

60

tcc ggc cac gtg aag ctc aag gtg cta aag atc ttg ctt tac ctg tgt 240

Ser Gly His Val Lys Leu Lys Val Leu Lys Ile Leu Leu Tyr Leu Cys

20

65

70

75

80

25

ggt cat ggc tct tcc tcc ttc ctc ctc atc ctc agg aga aac tct gct 288

Gly His Gly Ser Ser Ser Phe Leu Leu Ile Leu Arg Arg Asn Ser Ala

30

85

90

95

ctc atc caa gaa gcc acg gct ttc tca ggg cct cca gat cct ctt cac 336

Leu Ile Gln Glu Ala Thr Ala Phe Ser Gly Pro Pro Asp Pro Leu His

35

100

105

110

gga aat agc ttg tac cag aag gtg cgg gcg gct gcc cag gac ctg ggt 384

Gly Asn Ser Leu Tyr Gln Lys Val Arg Ala Ala Ala Gln Asp Leu Gly

40

115

120

125

agc acc ctg ttc tca gat gcc gtg cca cag cct cca tcg cag cca cct 432

Ser Thr Leu Phe Ser Asp Ala Val Pro Gln Pro Pro Ser Gln Pro Pro

50

130

135

140

cag atc ccg cct ccc gca ggc atg ggc gcc cag gcc aga cct ctt agt 480

Gln Ile Pro Pro Pro Ala Gly Met Gly Ala Gln Ala Arg Pro Leu Ser

55

145

150

155

160

gcc ctg caa ggc ttc ggc tac acg aag gag agc agc cgg aca ggc tcc 528

60

65

ES 2 324 779 T3

Ala Leu Gln Gly Phe Gly Tyr Thr Lys Glu Ser Ser Arg Thr Gly Ser
165 170 175

gca ggt gaa acc ttc ctc tcc acc atc cag agg gcc gca gag gta gtg 576

Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ser Thr Ile Gln Arg Ala Ala Glu Val Val
180 185 190

gct aat gct gtg cgt cct gga cct gat aat cct tgt acc aag gga ccc 624

Ala Asn Ala Val Arg Pro Gly Pro Asp Asn Pro Cys Thr Lys Gly Pro
195 200 205

ttg ccg tat ggt gat tcc tac cag cct gca gtg aca cct tca gct agc 672

Leu Pro Tyr Gly Asp Ser Tyr Gln Pro Ala Val Thr Pro Ser Ala Ser
210 215 220

cac aca cat ccc aac cct ggg aat cta ctc cct ggg gcc atc ctg ggg 720

His Thr His Pro Asn Pro Gly Asn Leu Leu Pro Gly Ala Ile Leu Gly
225 230 235 240

gcc aga gct gtg aga cac cag ccc ggg cag gct ggg ggc ggc tgg gat 768

Ala Arg Ala Val Arg His Gln Pro Gly Gln Ala Gly Gly Gly Trp Asp
245 250 255

gag ctg gac agc agt cct agt tcc cag aat tcc tcc tgc acc agc aac 816

Glu Leu Asp Ser Ser Pro Ser Ser Gln Asn Ser Ser Cys Thr Ser Asn
260 265 270

ctg agc agg gcc tcg gac tcg ggc agt cgg tct ggc agt gac agc cac 864

Leu Ser Arg Ala Ser Asp Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Ser His
275 280 285

tct ggc acc agc cgg gag cca ggc gac ctg gca gaa agg gct gag gcc 912

Ser Gly Thr Ser Arg Glu Pro Gly Asp Leu Ala Glu Arg Ala Glu Ala
290 295 300

acg ccc cca aat gac tgc cag caa gaa ctg aat cta gtg agg act gtg 960

ES 2 324 779 T3

Thr Pro Pro Asn Asp Cys Gln Gln Glu Leu Asn Leu Val Arg Thr Val
305 310 315 320

aca cag ggg cca cgt gtc ttc ctg agc cgt gag gag acg cag cac ttc 1008
Thr Gln Gly Pro Arg Val Phe Leu Ser Arg Glu Glu Thr Gln His Phe
325 330 335

atc aaa gag tgt ggc ctg ctc aac tgt gag gca gtg ctg gag ctg ctc 1056
Ile Lys Glu Cys Gly Leu Leu Asn Cys Glu Ala Val Leu Glu Leu Leu
340 345 350

ctg cgc cag ctg gtc ggg acc agt gag tgc gag cag atg agg gcg ctg 1104
Leu Arg Gln Leu Val Gly Thr Ser Glu Cys Glu Gln Met Arg Ala Leu
355 360 365

tgt gcc atc gcg tcc ttt ggg agt gct gac ctc ctg cct cag gag cac 1152
Cys Ala Ile Ala Ser Phe Gly Ser Ala Asp Leu Leu Pro Gln Glu His
370 375 380

gtc ctc ctc ctg tgc cga cag cag ctg cag gaa ctt ggc gcg ggc agc 1200
Val Leu Leu Leu Cys Arg Gln Gln Leu Gln Glu Leu Gly Ala Gly Ser
385 390 395 400

cct gga cct gtg acc aac aaa gcc acc aag atc ctg aga cat ttt gaa 1248
Pro Gly Pro Val Thr Asn Lys Ala Thr Lys Ile Leu Arg His Phe Glu
405 410 415

gcc tcc tgt gga caa cag ctc cct acc cta agg ctc tgt gcc cag ccc 1296
Ala Ser Cys Gly Gln Gln Leu Pro Thr Leu Arg Leu Cys Ala Gln Pro
420 425 430

aac tct gca gct gcc cct gtg ggc cca gct gac ctg ctg acc agc ccc 1344
Asn Ser Ala Ala Ala Pro Val Gly Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ser Pro
435 440 445

gtg cct gcc cct ggg agc cag gtc tgc ctc cag cct ctc agc tcc gcc 1392

ES 2 324 779 T3

Val Pro Ala Pro Gly Ser Gln Val Cys Leu Gln Pro Leu Ser Ser Ala

450

455

460

aca gtg gta ccc agg agt cct gtg ctc ttt cca tcc ccc aat acc tta 1440

Thr Val Val Pro Arg Ser Pro Val Leu Phe Pro Ser Pro Asn Thr Leu

465

470

475

480

cct ccg tct gct ctg gag gag ccc agc gag gtc cga acc caa ttg gtg 1488

Pro Pro Ser Ala Leu Glu Glu Pro Ser Glu Val Arg Thr Gln Leu Val

485

490

495

tgt tct agt gaa cag ggg aca gaa tct gag cag agg ctg gag aac aca 1536

Cys Ser Ser Glu Gln Gly Thr Glu Ser Glu Gln Arg Leu Glu Asn Thr

500

505

510

gac acc cca gag gat agc tcc agt ccg ctc ccg tgg agt ccc aac tct 1584

Asp Thr Pro Glu Asp Ser Ser Ser Pro Leu Pro Trp Ser Pro Asn Ser

515

520

525

ttg ttt gct ggc atg gag ctg gtg gct tgc ccc cgc ctg cct tgc cac 1632

Leu Phe Ala Gly Met Glu Leu Val Ala Cys Pro Arg Leu Pro Cys His

530

535

540

agc tgc cag gac ctc cag aca gat tta cag aag gtg acc aca gaa gct 1680

Ser Ser Gln Asp Leu Gln Thr Asp Leu Gln Lys Val Thr Thr Glu Ala

545

550

555

560

ccg gtt tca gag cca tca gct ttt gca ttt tta aac atg tga 1722

Pro Val Ser Glu Pro Ser Ala Phe Ala Phe Leu Asn Met

565

570

<210> 2

<211> 573

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

ES 2 324 779 T3

<400> 2

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

ES 2 324 779 T3

	130	135	140	
5				
	Gln Ile Pro Pro Pro Ala Gly Met Gly Ala Gln Ala Arg Pro Leu Ser			
10	145	150	155	160
15	Ala Leu Gln Gly Phe Gly Tyr Thr Lys Glu Ser Ser Arg Thr Gly Ser			
	165	170	175	
20	Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ser Thr Ile Gln Arg Ala Ala Glu Val Val			
	180	185	190	
25				
	Ala Asn Ala Val Arg Pro Gly Pro Asp Asn Pro Cys Thr Lys Gly Pro			
30	195	200	205	
35	Leu Pro Tyr Gly Asp Ser Tyr Gln Pro Ala Val Thr Pro Ser Ala Ser			
	210	215	220	
40	His Thr His Pro Asn Pro Gly Asn Leu Leu Pro Gly Ala Ile Leu Gly			
	225	230	235	240
45				
	Ala Arg Ala Val Arg His Gln Pro Gly Gln Ala Gly Gly Gly Trp Asp			
50	245	250	255	
55	Glu Leu Asp Ser Ser Pro Ser Ser Gln Asn Ser Ser Cys Thr Ser Asn			
	260	265	270	
60	Leu Ser Arg Ala Ser Asp Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Ser His			
65				

ES 2 324 779 T3

275

280

285

5

Ser Gly Thr Ser Arg Glu Pro Gly Asp Leu Ala Glu Arg Ala Glu Ala

290

295

300

10

Thr Pro Pro Asn Asp Cys Gln Gln Glu Leu Asn Leu Val Arg Thr Val

15

305

310

315

320

20

Thr Gln Gly Pro Arg Val Phe Leu Ser Arg Glu Glu Thr Gln His Phe

325

330

335

25

Ile Lys Glu Cys Gly Leu Leu Asn Cys Glu Ala Val Leu Glu Leu Leu

340

345

350

30

Leu Arg Gln Leu Val Gly Thr Ser Glu Cys Glu Gln Met Arg Ala Leu

35

355

360

365

40

Cys Ala Ile Ala Ser Phe Gly Ser Ala Asp Leu Leu Pro Gln Glu His

370

375

380

45

Val Leu Leu Leu Cys Arg Gln Gln Leu Gln Glu Leu Gly Ala Gly Ser

385

390

395

400

50

Pro Gly Pro Val Thr Asn Lys Ala Thr Lys Ile Leu Arg His Phe Glu

55

405

410

415

60

Ala Ser Cys Gly Gln Gln Leu Pro Thr Leu Arg Leu Cys Ala Gln Pro

65

ES 2 324 779 T3

	420	425	430
5			
	Asn Ser Ala Ala Ala Pro Val Gly Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ser Pro		
10	435	440	445
15	Val Pro Ala Pro Gly Ser Gln Val Cys Leu Gln Pro Leu Ser Ser Ala		
	450	455	460
20	Thr Val Val Pro Arg Ser Pro Val Leu Phe Pro Ser Pro Asn Thr Leu		
	465	470	475 480
25	Pro Pro Ser Ala Leu Glu Glu Pro Ser Glu Val Arg Thr Gln Leu Val		
30	485	490	495
35	Cys Ser Ser Glu Gln Gly Thr Glu Ser Glu Gln Arg Leu Glu Asn Thr		
	500	505	510
40	Asp Thr Pro Glu Asp Ser Ser Ser Pro Leu Pro Trp Ser Pro Asn Ser		
	515	520	525
45	Leu Phe Ala Gly Met Glu Leu Val Ala Cys Pro Arg Leu Pro Cys His		
50	530	535	540
55	Ser Ser Gln Asp Leu Gln Thr Asp Leu Gln Lys Val Thr Thr Glu Ala		
	545	550	555 560
60	Pro Val Ser Glu Pro Ser Ala Phe Ala Phe Leu Asn Met		
	565	570	
65	<210> 3		
	<211> 1782		

ES 2 324 779 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1782)

<223>

10 <400> 3

atg gct gcc gcg ccg ccg cta cgg gac cgc ctg agc ttt cta cac cgg 48

15 Met Ala Ala Ala Pro Pro Leu Arg Asp Arg Leu Ser Phe Leu His Arg

1 5 10 15

20 ctc ccg att ctc ctg aag ggg acg tcc gat gat gat gtc ccg tgt ccg 96

Leu Pro Ile Leu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Asp Asp Val Pro Cys Pro

20 25 30

25

ggc tac ctg ttt gaa gag att gct aaa atc tcc cac gag tct ccg ggc 144

30 Gly Tyr Leu Phe Glu Glu Ile Ala Lys Ile Ser His Glu Ser Pro Gly

35 40 45

35 agc agc cag tgc ctg ctg gag tac ctc ctg agc cgc ctg cac agc agc 192

Ser Ser Gln Cys Leu Leu Glu Tyr Leu Leu Ser Arg Leu His Ser Ser

50 55 60

40

tcc ggc cac ggg aag ctc aag gtg ctg aag atc ctg ctc tat ctg tgc 240

45 Ser Gly His Gly Lys Leu Lys Val Leu Lys Ile Leu Leu Tyr Leu Cys

65 70 75 80

50 agc cac ggc tcc tcc ttc ttc ctg ctc atc ctc aaa cgc aac tct gcc 288

Ser His Gly Ser Ser Phe Phe Leu Leu Ile Leu Lys Arg Asn Ser Ala

55

60

65

ES 2 324 779 T3

	85	90	95	
5	ttc atc cag gaa gct gca gct ttt gca ggg ccc cca gat cct ctg cac			336
	Phe Ile Gln Glu Ala Ala Ala Phe Ala Gly Pro Pro Asp Pro Leu His			
	100	105	110	
10	ggg aac agc ttg tac cag aag gtt cgc gcg gcc gcg cag gac ttg ggg			384
	Gly Asn Ser Leu Tyr Gln Lys Val Arg Ala Ala Ala Gln Asp Leu Gly			
15	115	120	125	
20	agc acc ctg ttc tcg gac acc gtg ttg ccg ctg gct ccc tcc cag cct			432
	Ser Thr Leu Phe Ser Asp Thr Val Leu Pro Leu Ala Pro Ser Gln Pro			
	130	135	140	
25	ctg ggg acc ccg cct gcc aca ggc atg ggc tcc cag gcc agg ccg cac			480
	Leu Gly Thr Pro Pro Ala Thr Gly Met Gly Ser Gln Ala Arg Pro His			
	145	150	155	160
30	agc acc ctc cag ggt ttc ggc tac agc aag gaa cac ggc cgc acg ggc			528
	Ser Thr Leu Gln Gly Phe Gly Tyr Ser Lys Glu His Gly Arg Thr Gly			
35	165	170	175	
40	tcg gca ggc gaa gcc ttc ctc tcc acc atc cag aag gcc gca gag gtg			576
	Ser Ala Gly Glu Ala Phe Leu Ser Thr Ile Gln Lys Ala Ala Glu Val			
	180	185	190	
45	gtg gcc agc gcc atg cgc ccc ggg ccc gag agt ccc agt acc cgg agg			624
	Val Ala Ser Ala Met Arg Pro Gly Pro Glu Ser Pro Ser Thr Arg Arg			
	195	200	205	
50	ctc ctg ccg cgg ggt gac acc tac cag cct gcc atg atg cct tca gcc			672
	Leu Leu Pro Arg Gly Asp Thr Tyr Gln Pro Ala Met Met Pro Ser Ala			
55	210	215	220	
60	agc cac ggt ccc cca acc ctg ggg aac cta ctc ccc ggg gcc att cca			720
	Ser His Gly Pro Pro Thr Leu Gly Asn Leu Leu Pro Gly Ala Ile Pro			

ES 2 324 779 T3

	225	230	235	240	
5	ggt ccc cga gct gtg agg cat cag cct ggg cag gcc gga ggg ggc tgg				768
	Gly Pro Arg Ala Val Arg His Gln Pro Gly Gln Ala Gly Gly Gly Trp				
		245	250	255	
10	gat gag ctg gac agc ggc ccc agc tct cag aat tcc tcc cag aac agc				816
	Asp Glu Leu Asp Ser Gly Pro Ser Ser Gln Asn Ser Ser Gln Asn Ser				
15		260	265	270	
	gac ctg agc agg gtc tgc gac tgc ggc agt cat tcc ggc agc gac agc				864
20	Asp Leu Ser Arg Val Ser Asp Ser Gly Ser His Ser Gly Ser Asp Ser				
		275	280	285	
25	cat tca ggg gcc agc cgg gag ccg ggt gac ctg gca gaa agg gtc gag				912
	His Ser Gly Ala Ser Arg Glu Pro Gly Asp Leu Ala Glu Arg Val Glu				
		290	295	300	
30	gtg gtg gcc ctg agt gac tgt cag cag gag ttg agc ttg gtg agg act				960
	Val Val Ala Leu Ser Asp Cys Gln Gln Glu Leu Ser Leu Val Arg Thr				
35	305	310	315	320	
	gtg act cgg gga cca cgc gcc ttc ctg agc cgc gag gag gca cag cac				1008
40	Val Thr Arg Gly Pro Arg Ala Phe Leu Ser Arg Glu Glu Ala Gln His				
		325	330	335	
45	ttc atc aaa gcg tgt gga ctg ctc aac tgt gag gcc gtg ctg cag ctg				1056
	Phe Ile Lys Ala Cys Gly Leu Leu Asn Cys Glu Ala Val Leu Gln Leu				
		340	345	350	
50	ctg acc tgc cac ctg cgt ggg acc agt gaa tgc acg cag ctg agg gcg				1104
	Leu Thr Cys His Leu Arg Gly Thr Ser Glu Cys Thr Gln Leu Arg Ala				
55		355	360	365	
	ctg tgt gcc atc gcc tcc ctg ggg agc agc gac ctc ctc ccc cag gag				1152
60	Leu Cys Ala Ile Ala Ser Leu Gly Ser Ser Asp Leu Leu Pro Gln Glu				
65					

ES 2 324 779 T3

	370	375	380	
5	cac atc ctc ctc cgc acc cgg ccg tgg ctg cag gag ctc agc atg ggc 1200			
	His Ile Leu Leu Arg Thr Arg Pro Trp Leu Gln Glu Leu Ser Met Gly			
10	385	390	395	400
	agc ccg gga cct gtg acc aac aag gcc acc aag atc ctg agg cac ttt 1248			
15	Ser Pro Gly Pro Val Thr Asn Lys Ala Thr Lys Ile Leu Arg His Phe			
	405	410	415	
	gag gcc tcc tgt ggg cag ctg tcc cct gcc cgg ggc acc tca gct gag 1296			
20	Glu Ala Ser Cys Gly Gln Leu Ser Pro Ala Arg Gly Thr Ser Ala Glu			
	420	425	430	
	cct ggc ccc aca gcc gcc ctc cca ggc cca tct gac ctg ctg acc gac 1344			
25	Pro Gly Pro Thr Ala Ala Leu Pro Gly Pro Ser Asp Leu Leu Thr Asp			
	435	440	445	
30	gct gtg cct ctc cct ggg agc cag gtc ttc ctg cag cct ctg agt tca 1392			
	Ala Val Pro Leu Pro Gly Ser Gln Val Phe Leu Gln Pro Leu Ser Ser			
35	450	455	460	
	acc ccg gtc tcg tcc cgg agc cct gct ccc tca tct ggg atg ccg tcc 1440			
40	Thr Pro Val Ser Ser Arg Ser Pro Ala Pro Ser Ser Gly Met Pro Ser			
	465	470	475	480
	agc cct gtg ccc acc cca ccc cca gat gcc tcc ccc att cca gcc ccc 1488			
45	Ser Pro Val Pro Thr Pro Pro Pro Asp Ala Ser Pro Ile Pro Ala Pro			
	485	490	495	
50	gga gac ccc agc gag gcc gag gcc aga ctg gca gaa agc agg cgg tgg 1536			
	Gly Asp Pro Ser Glu Ala Glu Ala Arg Leu Ala Glu Ser Arg Arg Trp			
55	500	505	510	
	aga cct gaa cgg atc ccg ggg ggc acg gac agc cca aag aga ggc ccc 1584			
60	Arg Pro Glu Arg Ile Pro Gly Gly Thr Asp Ser Pro Lys Arg Gly Pro			
65				

ES 2 324 779 T3

515

520

525

5 agc agc tgt gcg tgg agc cgc gac tcc ttg ttt gct ggc atg gag ctg 1632
 Ser Ser Cys Ala Trp Ser Arg Asp Ser Leu Phe Ala Gly Met Glu Leu
 530 535 540

10 gtg gcc tgt ccc cgc ctg gtg ggg gct ggg gct gct gcg gga gag tcc 1680
 Val Ala Cys Pro Arg Leu Val Gly Ala Gly Ala Ala Ala Gly Glu Ser
 15 545 550 555 560

20 tgt cct gat gct ccc cgc gcc ccc caa aca tcg tcc cag agg aca gca 1728
 Cys Pro Asp Ala Pro Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ser Gln Arg Thr Ala
 565 570 575

25 gcc aaa gag cct cct ggc tca gag ccg tca gct ttc gcg ttc ctg aac 1776
 Ala Lys Glu Pro Pro Gly Ser Glu Pro Ser Ala Phe Ala Phe Leu Asn
 580 585 590

30 gcc tga 1782
 Ala

35 <210> 4
 <211> 593
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

45 Met Ala Ala Ala Pro Pro Leu Arg Asp Arg Leu Ser Phe Leu His Arg
 1 5 10 15

50 Leu Pro Ile Leu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Asp Asp Val Pro Cys Pro
 20 25 30

55

60

65

ES 2 324 779 T3

Gly Tyr Leu Phe Glu Glu Ile Ala Lys Ile Ser His Glu Ser Pro Gly
35 40 45

5

Ser Ser Gln Cys Leu Leu Glu Tyr Leu Leu Ser Arg Leu His Ser Ser
50 55 60

10

Ser Gly His Gly Lys Leu Lys Val Leu Lys Ile Leu Leu Tyr Leu Cys
65 70 75 80

15

Ser His Gly Ser Ser Phe Phe Leu Leu Ile Leu Lys Arg Asn Ser Ala
85 90 95

20

Phe Ile Gln Glu Ala Ala Ala Phe Ala Gly Pro Pro Asp Pro Leu His
100 105 110

25

Gly Asn Ser Leu Tyr Gln Lys Val Arg Ala Ala Ala Gln Asp Leu Gly
115 120 125

35

Ser Thr Leu Phe Ser Asp Thr Val Leu Pro Leu Ala Pro Ser Gln Pro
130 135 140

40

Leu Gly Thr Pro Pro Ala Thr Gly Met Gly Ser Gln Ala Arg Pro His
145 150 155 160

50

Ser Thr Leu Gln Gly Phe Gly Tyr Ser Lys Glu His Gly Arg Thr Gly
165 170 175

55

60

65

ES 2 324 779 T3

Ser Ala Gly Glu Ala Phe Leu Ser Thr Ile Gln Lys Ala Ala Glu Val
180 185 190

5

Val Ala Ser Ala Met Arg Pro Gly Pro Glu Ser Pro Ser Thr Arg Arg
195 200 205

10

Leu Leu Pro Arg Gly Asp Thr Tyr Gln Pro Ala Met Met Pro Ser Ala
210 215 220

15

Ser His Gly Pro Pro Thr Leu Gly Asn Leu Leu Pro Gly Ala Ile Pro
225 230 235 240

20

Gly Pro Arg Ala Val Arg His Gln Pro Gly Gln Ala Gly Gly Gly Trp
245 250 255

30

Asp Glu Leu Asp Ser Gly Pro Ser Ser Gln Asn Ser Ser Gln Asn Ser
260 265 270

35

Asp Leu Ser Arg Val Ser Asp Ser Gly Ser His Ser Gly Ser Asp Ser
275 280 285

40

His Ser Gly Ala Ser Arg Glu Pro Gly Asp Leu Ala Glu Arg Val Glu
290 295 300

50

Val Val Ala Leu Ser Asp Cys Gln Gln Glu Leu Ser Leu Val Arg Thr
305 310 315 320

55

60

65

ES 2 324 779 T3

5	Val Thr Arg Gly Pro Arg Ala Phe Leu Ser Arg Glu Glu Ala Gln His	325	330	335	
10	Phe Ile Lys Ala Cys Gly Leu Leu Asn Cys Glu Ala Val Leu Gln Leu	340	345	350	
15	Leu Thr Cys His Leu Arg Gly Thr Ser Glu Cys Thr Gln Leu Arg Ala	355	360	365	
20					
25	Leu Cys Ala Ile Ala Ser Leu Gly Ser Ser Asp Leu Leu Pro Gln Glu	370	375	380	
30	His Ile Leu Leu Arg Thr Arg Pro Trp Leu Gln Glu Leu Ser Met Gly	385	390	395	400
35	Ser Pro Gly Pro Val Thr Asn Lys Ala Thr Lys Ile Leu Arg His Phe	405	410	415	
40					
45	Glu Ala Ser Cys Gly Gln Leu Ser Pro Ala Arg Gly Thr Ser Ala Glu	420	425	430	
50	Pro Gly Pro Thr Ala Ala Leu Pro Gly Pro Ser Asp Leu Leu Thr Asp	435	440	445	
55	Ala Val Pro Leu Pro Gly Ser Gln Val Phe Leu Gln Pro Leu Ser Ser	450	455	460	
60					
65					

ES 2 324 779 T3

Thr Pro Val Ser Ser Arg Ser Pro Ala Pro Ser Ser Gly Met Pro Ser
465 470 475 480

Ser Pro Val Pro Thr Pro Pro Pro Asp Ala Ser Pro Ile Pro Ala Pro
485 490 495

Gly Asp Pro Ser Glu Ala Glu Ala Arg Leu Ala Glu Ser Arg Arg Trp
500 505 510

Arg Pro Glu Arg Ile Pro Gly Gly Thr Asp Ser Pro Lys Arg Gly Pro
515 520 525

Ser Ser Cys Ala Trp Ser Arg Asp Ser Leu Phe Ala Gly Met Glu Leu
530 535 540

Val Ala Cys Pro Arg Leu Val Gly Ala Gly Ala Ala Ala Gly Glu Ser
545 550 555 560

Cys Pro Asp Ala Pro Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ser Gln Arg Thr Ala
565 570 575

Ala Lys Glu Pro Pro Gly Ser Glu Pro Ser Ala Phe Ala Phe Leu Asn
580 585 590

Ala

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

ES 2 324 779 T3

<400> 5		
5	cgtaccacgc tgccaccatg aatgagg	27
<210> 6		
<211> 27		
10 <212> ADN		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
15		
<400> 6		
20	gcagcgagcg tgcgtcctct gcgtggg	27
<210> 7		
<211> 61		
<212> ADN		
25 <213> Artificial		
<220>		
<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
30		
<400> 7		
35	agagagtagt aacaaaggct aaagacagtt gactgtatcg atgaatgagg tgtctgtcat	60
c		61
40 <210> 8		
<211> 58		
<212> ADN		
45 <213> Artificial		
<220>		
<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
50		
<400> 8		
55	tggagacttg accaaacctc tggcgaagaa gtccaaagct tcactcgcgg atgctggc	58
<210> 9		
<211> 22		
60 <212> ADN		
<213> Artificial		
<220>		
65 <223> Descripción de la secuencia artificial: la secuencia de las bases 5183 ^a (5') a 5162 ^a (3') en el vector de clonación pACT2 (GenBank U29899)		

ES 2 324 779 T3

<400> 9

cgcgtttgga atcactacag gg 22

5

<210> 10

<211> 24

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

15

<400> 10

cagttgagca ggccacactc ttg 24

20

<210> 11

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

30

<400> 11

taatacgact cactataggg 20

35

<210> 12

<211> 18

40 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

45

<400> 12

atggcagctg tgccgccc 18

50

<210> 13

<211> 21

55 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

60

<400> 13

catgtttaaa aatgcaaaag c 21

65

<210> 14

ES 2 324 779 T3

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 14
 10 catgtccagg ctacctgttt ga 22
 15 <210> 15
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 15
 25 caggcactgg ctgctgc 17
 30 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 16
 40 aaagtggaga ttgttgccat 20
 45 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 17
 55 ttgactgtgc cgttgaatt 19
 60 <210> 18
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

ES 2 324 779 T3

<400> 18

atggctgccg cgccgcc 17

5

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

10

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

15

<400> 19

ggcgttcagg aacgcgaaag 20

20

<210> 20

<211> 18

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

30

<400> 20

gactgtgact cggggacc 18

35

<210> 21

<211> 21

<212> ADN

40

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

45

<400> 21

gatccccggg tategcatcc a 21

50

<210> 22

<211> 21

<212> ADN

55

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

60

<400> 22

agcttggatg cgatacccg g 21

65

<210> 23

ES 2 324 779 T3

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 23
 10
 tttgcagggc tggcaagcc 19
 <210> 24
 15 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 24
 25
 aattcggaag gccagaact tcatcggtcg cagagggtc 39
 <210> 25
 30 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 25
 40
 tcgagaccct ctgcgaacga tgaagttctt ggccttcc 38
 <210> 26
 45 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 26
 55
 gggactacaa ggacgatgac gataagtagc 30
 <210> 27
 60 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

ES 2 324 779 T3

<400> 27

ggccgctact tatcgtcac gtccttgtag tcccgc

36

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65