



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 296 412**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99955151 .8**

(86) Fecha de presentación : **22.10.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1123387**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2001**

(54) Título: **Gen y proteína MN.**

(30) Prioridad: **23.10.1998 US 177776**
23.10.1998 US 178115

(73) Titular/es: **INSTITUTE OF VIROLOGY**
Slovak Academy of Sciences, Dubravská Cesta 9
842 46 Bratislava, SK

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

(72) Inventor/es: **Zavada, Jan;**
Pastorekova, Silvia y
Pastorek, Jaromir

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 296 412 T3

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

DESCRIPCIÓN

Gen y proteína MN.

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al área general de la genética médica y en los campos de la ingeniería bioquímica, la inmunocitoquímica y la oncología. De forma más específica, se refiere al gen MN - un gen celular que se considera un oncogén, que codifica la oncoproteína actualmente conocida de forma alternativa como proteína MN, la isoenzima MN/CA IX o la proteína MN/G250.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Zavada y cols., publicación de patente internacional número WO 93/18152 (publicada el 16 de septiembre de 1993) y la patente de Estados Unidos n.º 5.387.676 (expedida el 7 de febrero de 1996), describen la elucidación de la naturaleza biológica y molecular de MaTu que llevó al descubrimiento del gen y la proteína MN. Se encontró que el gen MN estaba presente en el ADN cromosómico de todos los vertebrados analizados y su expresión estaba fuertemente relacionada con la capacidad tumorigena.

20 La proteína MN se identificó por vez primera en las células HeLa, derivadas de un carcinoma humano de cuello de útero. Se encuentra en muchos tipos de carcinomas humanos (de forma notable en el de cuello de útero, de ovario, endometrio, renal, de vejiga, mama, colorrectal, de pulmón, esófago y próstata, entre otros). Se han encontrado muy pocos tejidos normales que expresen la proteína MN a un nivel significativo. Los tejidos normales que expresan MN incluyen la mucosa gástrica y el epitelio de vesícula humana y algunos otros tejidos normales del tracto alimentario. 25 Paradójicamente, se ha encontrado que la expresión del gen MN se ha perdido o está reducida en carcinomas y otras enfermedades preneoplásicas/neoplásicas en algunos tejidos que normalmente expresan MN, por ejemplo, la mucosa gástrica.

30 En general, la oncogénesis puede indicarse por la expresión anormal presión de la proteína MN. Por ejemplo, puede indicarse oncogénesis: (1) cuando la proteína MN está presente en un tejido que normalmente no expresa la proteína MN a un nivel significativo; (2) cuando la proteína MN está ausente de un tejido que normalmente la expresa; (3) cuando la expresión del gen MN está a un nivel significativamente aumentado, o a un nivel significativamente reducido del que normalmente se expresa en un tejido; o (4) cuando la proteína MN se expresa en un lugar anormal dentro de una célula.

35 Zavada y cols., documento WO 93/18152 y Zavada y cols., documento WO 95/34650 (publicados el 21 de diciembre de 1995) describen cómo el descubrimiento del gen y de la proteína MN y la fuerte asociación entre la expresión del gen MN y la capacidad tumorigena llevó a la creación de procedimientos que son tanto diagnósticos/pronósticos como terapéuticos para el cáncer y afecciones precancerosas. En ellos se proporcionaron los procedimientos y composiciones para identificar el inicio y la presencia de enfermedad neoplásica mediante la detección o la detección y cuantificación de la expresión anormal del gen MN en vertebrados. La expresión anormal del gen MN puede detectarse o detectarse y cuantificarse mediante una variedad de ensayos convencionales en muestras de vertebrados, por ejemplo, mediante inmunoensayos usando anticuerpos específicos contra MN para detectar o detectar y cuantificar el antígeno MN, mediante ensayos de hibridación o mediante ensayos de PCR, tales como RT-PCR, usando ácidos nucleicos de MN, tales como, ADNc de MN, para detectar o detectar y cuantificar ácidos nucleicos de MN, tales como, ARNm de MN.

50 Zavada y cols, en los documentos WO 93/18152 y WO 95/34650 describen la producción de anticuerpos específicos contra MN. Un anticuerpo específico contra MN representativo y preferido, el anticuerpo monoclonal M75 (Mab M75), se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC) en Manassas, VA (EE. UU.) con el número de ATCC HB 11128. El anticuerpo M75 se usó para descubrir e identificar la proteína MN y puede usarse para identificar fácilmente el antígeno MN en transferencias Western, en radioinmunoensayos e inmunocitoquímicamente, por ejemplo, en muestras de tejido que sean frescas, congeladas o fijadas en formalina, alcohol, acetona u otras sustancias y/o embebidas en parafina y desparafinadas. Otro anticuerpo específico representativo y preferido contra MN, Mab MN12, es segregado por el hibridoma MN 12.2.2, que se depositó en la ATCC con la denominación HB 11647. El Ejemplo 1 de Zavada y cols., documento WO 95/34650 proporciona resultados representativos de la tinción inmunocitoquímica de tejidos usando MAb M75, cuyos resultados apoyan la designación del gen MN como oncogén.

55 Muchos estudios han confirmado la utilidad diagnóstica/pronóstica de MN. Los siguientes artículos describen en uso del MAb específico contra MN M75 en el diagnóstico/pronóstico de lesiones de cuello de útero cancerosas y precancerosas: Leff, D. N., "Half a Century of HeLa Cells: Transatlantic Antigen Enhances Reliability of Cervical Cancer Pap Test, Clinical Trials Pending," BioWorld® Today: The Daily Biotechnology Newspaper, 9(55) (24 de marzo de 1998); Stanbridge, E. J., "Cervical marker can help resolve ambiguous Pap smears," Diagnostics Intelligence, 10(5): 11 (1998); Liao y Stanbridge, "Expression of the MN Antigen in Cervical Papanicolaou Smears Is an Early Diagnostic Biomarker of Cervical Dysplasia," Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 5: 549-557 (1996); Brewer y cols., "A Study of Biomarkers in Cervical Carcinoma and Clinical Correlation of the Novel Biomarker MN," Gynecologic Oncology, 63: 337-344 (1996); y Liao y cols., "Identification of the MN Antigen as a Diagnostic Bio-

marker of Cervical Intraepithelial Squamous and Glandular Neoplasia and Cervical Carcinomas," American Journal of Pathology, 145(3): 598-609 (1994).

5 *Lesiones colorrectales precancerosas y cancerosas.* Se ha detectado MN en las mucosas gástrica, intestinal y biliar normales. [Pastorekova y cols., Gastroenterology, 112: 398-408 (1997)]. El análisis inmunocitoquímico del intestino grueso normal reveló una tinción moderada en el colon proximal, siendo la reacción más débil en la parte distal. La tinción se confirmó en las superficies basolaterales de las células epiteliales criptales, la zona con mayor capacidad de proliferación. Dado que MN es mucho más abundante en el epitelio criptal en proliferación que en la parte superior de la mucosa, puede desempeñar un papel en el control de la proliferación y diferenciación de las células epiteliales intestinales. La proliferación celular aumenta de forma anormal en las lesiones precancerosas y cancerosas del epitelio colorrectal y, por lo tanto, se considera que es un indicador de la progresión del tumor colorrectal. [Risio, M., J. Cell Biochem, 16G: 79-87 (1992); y Moss y cols., Gastroenterology, 111: 1425-1432 (1996).]

10

15 Actualmente se considera que la proteína MN es la primera isoenzima anhidrasa carbónica (CA) asociada a tumores que se ha descrito. Las anhidrasas carbónicas (CA) forman una gran familia de genes que codifican metaloenzimas de cinc de gran importancia fisiológica. Como catalizadoras de la hidratación reversible del dióxido de carbono, estas enzimas participan en una variedad de procesos biológicos, que incluyen la respiración, calcificación, equilibrio ácido-base, resorción ósea, formación de humor acuoso, líquido cefalorraquídeo, saliva y ácido gástrico [se revisa en Dodgson y cols., The Carbonic Anhydrases, Plenum Press, Londres, páginas 398 (1991)]. Las CA están ampliamente 20 distribuidas en diferentes organismos vivos.

25 En los mamíferos, se han identificado al menos siete isoenzimas (CA I-VII) y algunas proteínas relacionadas con CA (CARP/CA VIII, RPTP- β , RPTP- τ) [Hewett-Emmett y Tashian, Mol. Phyl. Evol., 5: 50-77 (1996)], cuando el análisis de la secuencia deducida de los aminoácidos de MN reveló una sorprendente homología entre la parte central de la proteína MN y las anhidrasas carbónicas, que conservaban el sitio de unión de cinc así como el centro activo de la enzima. Después se encontró que la proteína MN se une al cinc y presenta actividad de CA. Basándose en esos datos, actualmente se considera que la proteína MN es la novena isoenzima anhidrasa carbónica - MN/CA IX. [Opavsky y cols., Genomics, 33: 480-487 (mayo de 1996)]. [Véase también, Hewett-Emmett, referencia anterior, donde se sugiere CA IX como nomenclatura.]

30 35 Las CA y proteínas relacionadas con CA muestran una gran diversidad tanto en su distribución tisular como en sus funciones biológicas putativas o establecidas [Tashian, R. E., Adv. in Genetics, 30: 321-356 (1992)]. Algunas de las CA se expresan en casi todos los tejidos (CA II), mientras que la expresión de otras parece ser más restringida (CA VI y CA VII en las glándulas salivares). En las células, pueden estar situadas en el citoplasma (CA I, CA II, CA III, y CA VII), en las mitocondrias (CA V), en los gránulos secretores (CA VI), o pueden estar asociados a la membrana (CA IV). De forma ocasional, se ha observado la localización nuclear de algunas isoenzimas [Parkkila y cols., Gut, 35: 646-650 (1994); Parkkila y cols., Histochem. J., 27: 133-138 (1995); Mori y cols., Gastroenterol., 105: 820-826 (1993)].

40 45 Las CA y las proteínas relacionadas con CA también difieren en las propiedades cinéticas y en la susceptibilidad a los inhibidores [Sly y Hu, Annu. Rev. Biochem., 64: 375-401 (1995)]. En el tracto alimentario, la actividad de la anhidrasa carbónica está implicada en muchas funciones importantes, tales como la secreción de saliva, la producción de ácido gástrico, jugos pancreáticos y bilis, transporte de agua e iones en el intestino, captación y biogénesis de ácidos grasos en el hígado. Se ha demostrado que existen al menos siete isoenzimas CA en diferentes regiones del tracto alimentario. Sin embargo, los estudios bioquímicos, citoquímicos e inmunocitoquímicos han revelado una considerable heterogeneidad en sus niveles y distribución [Swensen, E. R., "Distribution and functions of carbonic anhydrase in the gastrointestinal tract," En: The Carbonic Anhydrases. Cellular Physiology and Molecular Genetics, (Dodgson y cols. editores) Plenum Press, Nueva York, páginas 265-287 (1991); y Parkkila y Parkkila, Scan I. Gastroenterol., 31: 305-317 (1996)]. Aunque CA II se encuentra a lo largo de todo el canal alimentario, CA IV está ligado al tracto gastrointestinal inferior, CA I, III y V están presentes solamente en unos pocos tejidos, y la expresión de CA VI y VII se limita a las glándulas salivares [Parkkila y cols., Gut, 35: 646-650 (1994); Fleming y cols., J. Clin. Invest., 96: 2907-2913 (1995); Parkkila y cols., Hepatology, 24: 104 (1996)].

55 60 MN/CA IX presenta un número de propiedades que la distinguen de otras isoenzimas CA conocidas y pone en evidencia su relevancia en la oncogénesis. Esas propiedades incluyen su expresión dependiente de la densidad en cultivo celular (por ejemplo, células HeLa), su correlación con el fenotipo tumorígeno de los híbridos de células somáticas entre células HeLa y fibroblastos humanos normales, su estrecha asociación con varios carcinomas humanos y su ausencia de los tejidos normales correspondientes [por ejemplo, Zavada y cols., Int. J. Cancer, 54: 268-274 (1993); Pastorekova y cols., Virology, 187: 620-626 (1992); Liao y cols., Am. J. Pathol., 145: 598-609 (1994), Pastorek y cols., Oncogene, 9: 2788-2888 (1994); Cote, Women's Health Weekly: News Section, página 7 (30 de marzo de 1998); Liao y cols., Cancer Res., 57: 2827 (1997); Vermylen y cols., "Expression of the MN antigen as a biomarker of lung carcinoma and associated precancerous conditions," Proceedings AACR, 39: 334 (1998); McKiernan y cols., Cancer Res., 57: 2362 (1997); and Turner y cols., Hum. Pathol., 28(6): 740 (1997)]. Además, se ha demostrado el potencial de la transformación *in vitro* del ADNc de MN/CA IX en fibroblastos NIH 3T3 [Pastorek y cols., referencia anterior].

65 La proteína MN también se ha identificado con el antígeno G250. Uemura y cols., "Expression of Tumor-Associated Antigen MN/G250 in Urologic Carcinoma: Therapeutic Potential Target," J. Urol., 157 (4 Supl.): 377 (Resumen 1475; 50 1997) cita: "El análisis de las secuencias y la búsqueda en bases de datos revelaron que el antígeno es idéntico

a MN, un antígeno asociado a tumores humanos que se identificó en el carcinoma de cuello de útero (Pastorek y cols., 1994)."

Sumario de la invención

5 En una primera realización, la presente invención proporciona un polipéptido caracterizado porque se selecciona a partir de las SEC ID N.º: 137 y 138.

10 También se proporciona dicho polipéptido para usar en medicina, al igual que el uso de dicho polipéptido para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad preneoplásica y/o neoplásica, que se caracteriza por la expresión anormal de la proteína MN, mediante la inhibición del crecimiento de células preneoplásicas y/o neoplásicas de vertebrado que expresan la proteína MN de forma anormal.

15 En una realización adicional, la presente invención proporciona un complejo peptídico caracterizado porque comprende dicho polipéptido ligado covalentemente a polilisina, a la que está unido un ácido nucleico que codifica una proteína o un polipéptido citotóxicos ligados operativamente al promotor del gen MN, que cuando dicho complejo peptídico, se administra a una célula preneoplásica y/o neoplásica de vertebrado que expresa la proteína MN de forma anormal, inhibe el crecimiento de dicha célula.

20 Se prefiere dicho complejo peptídico en el que dicha proteína citotóxica es HSV timidina cinasa. Más preferiblemente, dicho ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica una citocina ligada operativamente a dicho promotor del gen MN.

25 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento de identificar una molécula orgánica o inorgánica que se une específicamente a un sitio de una proteína MN, a la que se adhieren las células de vertebrado en un ensayo de adhesión celular, estando constituido dicho sitio por una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir de las SEC ID N.º: 10 y 97-106, caracterizándose el procedimiento porque comprende analizar moléculas orgánicas e inorgánicas en dicho ensayo de adhesión celular e identificar moléculas que inhiben la adhesión de células de vertebrado a dicha proteína MN como que se unen específicamente a dicho sitio, y siendo dicha molécula de utilidad en el tratamiento de enfermedad preneoplásica y/o neoplásica, que se caracteriza por la expresión anormal de la proteína MN, comprendiendo dicho ensayo de adhesión celular:

- 35 (a) permitir que la proteína MN se una a un sustrato al que no se unen dichas células de vertebrado;
- (b) enjuagar la proteína MN no unida de dicho sustrato;
- (c) incubar dicha proteína MN unida con dicha molécula y con dichas células de vertebrado;
- 40 (d) enjuagar dichas las células de vertebrado no unidas de dicha proteína MN; y
- (e) determinar si dicha molécula inhibe la adhesión de dichas células de vertebrado a dicha proteína MN.

45 Preferiblemente, dicha molécula es inorgánica u orgánica, o es una proteína o un polipéptido. Dicha proteína o polipéptido pueden comprender una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir de las SEC ID N.º: 137 y 138. Más preferiblemente, dicho polipéptido se selecciona a partir de las SEC ID N.º: 137 y 138.

50 Se prefiere dicho procedimiento en el que dicha molécula orgánica o inorgánica, cuando está en contacto con una célula preneoplásica y/o neoplásica de vertebrado que expresa la proteína MN de forma anormal, inhibe el crecimiento de dicha célula. En dicho procedimiento, el sitio de la proteína MN al que se adhieren dichas células de vertebrado en dicho ensayo de adhesión celular está preferiblemente dentro del dominio de tipo proteoglicano de la proteína MN. Generalmente, dichas células de vertebrado son células de mamífero, preferiblemente células humanas.

55 Habiendo indicado el ámbito de la presente invención, ahora se describirá e ilustrará adicionalmente en contexto en términos más generales.

60 En el presente documento se identifica la localización del sitio de unión de la proteína MN. De importancia particular es la región dentro del dominio de tipo proteoglicano, aa 61-96 (SEC ID N.º: 97) que contiene una repetición en tándem de 6 veces de 6 aminoácidos, y dentro de la cual el epítopo para el MAb M75 reside en al menos dos copias, y dentro de la cual se considera que está localizado el sitio de unión de MN. Un sitio de unión alternativo de MN puede estar localizado en el dominio de CA.

También se identifican las proteínas MN y los polipéptidos MN que compiten por la unión a células con proteína MN inmovilizada. Dichas proteínas/polipéptidos MN evitan la adhesión intercelular y la formación de contactos intercelulares.

65 En el presente documento se describen procedimientos de ensayos de adhesión celular que se usan para identificar sitio(s) de unión de la proteína MN al/a los que se unen las células de vertebrado, preferiblemente las células de mamífero, más preferiblemente las células humanas. Dicho sitio de unión de MN se identifica después como una diana

terapéutica que puede bloquearse con anticuerpos específicos contra MN, o con moléculas inorgánicas u orgánicas, preferiblemente moléculas orgánicas, más preferiblemente proteínas/polipéptidos que se unen específicamente a dicho sitio.

5 También se describen procedimientos terapéuticos para tratar pacientes con enfermedad preneoplásica/neoplásica asociadas o caracterizadas por la expresión anormal de MN, procedimientos que se basan en el bloqueo de dicho sitio de unión de MN con moléculas, inorgánicas u orgánicas, pero preferiblemente moléculas orgánicas, más preferiblemente proteínas/polipéptidos, que se unen específicamente a dicho sitio de unión. El crecimiento de una célula preneoplásica/neoplásica de vertebrado que expresa la proteína MN de forma anormal puede inhibirse mediante la administración de dichas moléculas orgánicas o inorgánicas, preferiblemente moléculas orgánicas, más preferiblemente proteínas/polipéptidos en una cantidad terapéuticamente eficaz en una formulación fisiológicamente aceptable. Dicha proteína/polipéptido terapéutico preferido en el presente documento se considera que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo constituido por las SEC ID N.º: 107-109. Dichos heptapéptidos se considera que están compuestos por el/los complementario(s) de la proteína MN. ES de esperar que el bloqueo de la 10 interacción entre la proteína MN y su(s) complementario(s), provoque un descenso en el crecimiento tumoral.

15

Se proporciona además otros procedimientos terapéuticos en los que se inhibe el crecimiento de una célula preneoplásica o neoplásica de vertebrado, preferiblemente de mamífero, más preferiblemente de ser humano, que expresa la proteína MN de forma anormal. Dichos procedimientos comprenden transfectar dichas células con un vector que 20 comprende una secuencia de control de la expresión ligada operativamente a un ácido nucleico que codifica los dominios variables de un anticuerpo específico contra MN, en el que dichos dominios están separados mediante un péptido enlazado flexible, preferiblemente de la SEC ID N.º: 116. Preferiblemente dicha secuencia de control de la expresión comprende el promotor del gen MN.

25 Procedimientos terapéuticos todavía adicionales comprenden transfectar dicha célula con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína/polipéptido citotóxicos, tal como HSVtk, ligados operativamente al promotor del gen MN. Dicho vector terapéutico también puede comprender un ácido nucleico que codifica una citocina, tal como, IL-2 o IFN.

30 Los aspectos de la presente invención que se describen en el presente documento se describen en mayor detalle a continuación. Se describe el uso terapéutico de moléculas orgánicas o inorgánicas, preferiblemente de moléculas orgánicas. Las preferidas de dichas moléculas se unen específicamente a un sitio de la proteína MN al que se adhieren las células de vertebrado en un ensayo de adhesión celular, en el que dicha molécula cuando se analiza *in vitro* inhibe la adhesión de células a la proteína MN. Se prefieren además dichas moléculas que, cuando están en contacto con una 35 célula preneoplásica o neoplásica de vertebrado que expresa la proteína MN de forma anormal, inhiben el crecimiento de dicha célula. Dichas células de vertebrado preferiblemente son de mamífero y más preferiblemente de ser humano.

40 Preferiblemente dicha molécula es orgánica, y más preferiblemente dicha molécula orgánica es una proteína o un polipéptido. Todavía preferiblemente además, dicha proteína o polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo constituido por las SEC ID N.º: 107, 108, 109, 137 y 138. Todavía más preferiblemente, dicho polipéptido se selecciona a partir del grupo constituido por las SEC ID N.º: 107, 108, 109, 137 y 138.

45 El sitio de las proteínas MN a las que se adhieren las células de vertebrado en dicho ensayo de adhesión celular está preferiblemente dentro del dominio de tipo proteoglicano [SEC ID N.º: 50] o dentro del dominio de anhidrasa carbónica [SEC ID N.º: 51] de la proteína MN. Preferiblemente ese sitio comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo constituido por las SEC ID N.º: 10 y 97-106. Todavía preferiblemente además, ese sitio tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo constituido por las SEC ID N.º: 10 y 97-106.

50 Otro aspecto de esta invención se refiere a proteínas MN y polipéptidos MN que actúan de mediadores en la unión de células de vertebrado en un ensayo de adhesión celular, en el que dicha proteína MN o polipéptido MN cuando se introduce en el entorno del líquido extracelular de las células de vertebrado previene la formación de contactos intercelulares y la adhesión de dichas células de vertebrado entre sí. Dichas proteínas MN y polipéptidos MN pueden 55 ser de utilidad para inhibir el crecimiento de células preneoplásicas o neoplásicas de vertebrados que expresan la proteína MN de forma anormal, cuando dichas proteínas MN o polipéptidos MN se introducen en el entorno del fluido extracelular de dichas células de vertebrado. Dichas células de vertebrado preferiblemente son de mamífero y más preferiblemente de ser humano.

60 Dichas proteínas MN o polipéptidos MN que actúan de mediadoras en la unión de células de vertebrado en un ensayo de adhesión celular, preferiblemente tienen las secuencias de aminoácidos de la SEC ID N.º: 97, de la SEC ID N.º: 50, o de la SEC ID N.º: 51, más preferiblemente de la SEC ID N.º: 50. Todavía más preferiblemente dichas proteínas MN o polipéptidos MN comprenden secuencias de aminoácidos que se seleccionan a partir del grupo constituido por las SEC ID N.º: 10 y 97-106. De forma alternativa, dichos polipéptidos MN se seleccionan a partir del grupo 65 constituido por las SEC ID N.º: 10 y 97-106.

Las proteínas MN y polipéptidos MN representativos que actúan de mediadores en la unión de células de vertebrado en un ensayo de adhesión celular, se unen específicamente al anticuerpo monoclonal M75 que segregó el hibridoma

VUM75, que se depositó en la American Type Culture Collection con el n.º de ATCC HB 11128, o al anticuerpo monoclonal MN12 que segregó el hibridoma MN 12.2.2, que se depositó en la American Type Culture Collection con el n.º de ATCC HB 11647, o a ambos anticuerpos monoclonales.

5 Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento de identificar un sitio de una proteína MN al que se adhieren las células de vertebrado realizando pruebas con una serie de polipéptidos superpuestos de dicha proteína MN en un ensayo de adhesión celular con células de vertebrado, y determinando que si las células se adhieren a un polipéptido de dicha serie, entonces dicho polipéptido comprende un sitio en dicha proteína MN al que se adhieren las células de vertebrado.

10 Todavía otro aspecto de la presente invención es un vector que comprende una secuencia de control de la expresión ligado operativamente a un ácido nucleico que codifica los dominios variables de un anticuerpo específico contra MN, en el que dichos dominios están separados mediante un polipéptido enlazador flexible, y en el que dicho vector, cuando se transfecta a una célula preneoplásica o neoplásica de vertebrado que expresa la proteína MN de forma anormal, inhibe el crecimiento de dicha célula. Preferiblemente dicha secuencia de control de la expresión comprende el promotor del gen MN ligado operativamente a dicho ácido nucleico. Preferiblemente además, dicho polipéptido enlazador flexible tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 116, e incluso preferiblemente además, dicho promotor del gen MN tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º: 27.

20 Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína citotóxica o un polipéptido citotóxico ligado operativamente al promotor del gen MN, en el que dicho vector, cuando se transfecta a una célula preneoplásica o neoplásica de vertebrado que expresa la proteína MN de forma anormal, inhibe el crecimiento de dicha célula. En una realización preferida dicha proteína citotóxica es HSV 25 timidina cinasa. Preferiblemente, dicho vector comprende además un ácido nucleico que codifica una citocina ligado operativamente a dicho promotor del gen MN. En realizaciones alternativas y preferidas, dicha citocina es interferón o interleucina-2.

30 En el presente documento se caracteriza el promotor del gen MN. Se describe la identificación del sitio de unión para un represor de la transcripción de MN. El análisis mutacional indicó que es necesaria la repetición directa AGGGCacAGGGC [SEC ID N.º: 143] para la unión eficaz del represor.

La identificación de la proteína que se une al represor y la modificación de sus propiedades de unión es otra vía para modular la expresión de MN que conduciría a terapias contra el cáncer. Es de esperar que la supresión de la expresión de MN en células tumorales mediante la hiperexpresión de un regulador negativo provoque una disminución en el crecimiento tumoral. Se encontró que un complejo represor que comprende al menos dos subunidades se une a la SEC ID N.º: 115 del promotor del gen MN. Un complejo represor, que se encontró que estaba en contacto directo con la SEC ID N.º: 115 mediante reticulación por UV, comprendía dos proteínas que tienen pesos moleculares de 35 y 42 kilodaltons, respectivamente.

40 Abreviaturas

En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas:

45	aa	- aminoácido
	ATCC	- American Type Culture Collection
50	pb	- pares de bases
	BLV	- virus de la leucemia bovino
55	BSA	- albúmina de suero bovina
	BRL	- Bethesda Research Laboratories
60	CA	- anhidrasa carbónica
	CAM	- molécula de adhesión celular
65	CARP	- proteína relacionada con anhidrasa carbónica
	CAT	- cloramfenicol acetiltransferasa
	Ci	- curie
	cm	- centímetro

ES 2 296 412 T3

CMV	- citomegalovirus
cpm	- recuentos por minuto
5 extremo C	- extremo carboxilo
CTL	- linfocitos T citotóxicos
10 °C	- grados centígrados
10 DEAE	- dietilaminoetilo
15 DMEM	- Medio de Eagle modificado por Dulbecco
15 ds	- bicatenario
20 EDTA	- tetraacetato de etilendiamina
20 EGF	- factor de crecimiento epidérmico
20 EIA	- inmunoensayo enzimático
25 ELISA	- ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
25 EMSA	- ensayo de desplazamiento por movilidad electroforética
30 F	- fibroblastos
30 FACS	- estudio citofluorométrico
35 FCS	- suero de ternero fetal
35 FITC	- isotiocianato de fluoresceína
35 FTP	- Análisis de obtención de huellas mediante DNasa 1
40 GST-MN	- proteína de fusión de MN glutationa S-transferasa
40 GVC	- ganciclovir
45 H	- células HeLa
45 H-E	- hematoxilina-eosina
45 HEF	- fibroblastos de embrión humano
50 HeLa K	- células HeLa de tipo standard
50 HeLa S	- HeLa mutantes de Stanbridge D98/AH.2
50 H/F-T	- células híbridas de HeLa y fibroblastos que son tumorígenas; derivadas de HeLa D98/AH.2
55 H/F-T	- células híbridas de HeLa y fibroblastos que son tumorígenas; derivadas de HeLa D98/AH.2
55 HPV	- virus del papiloma humano
55 HRP	- peroxidasa de rábano
60 HSV	- virus herpes simplex
60 IC	- intracelular
65 IFN	- interferón
65 IL-2	- interleucina-2
Inr	- iniciador

ES 2 296 412 T3

	IPTG	- isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida
	kb	- kilobase
5	kbp	- pares de kilobases
	kd o kDa	- kilodaltons
10	KS	- keratan sulfato
	LCMV	- virus de la coriomeningitis linfocítica
	LTR	- repetición terminal larga
15	M	- molar
	mA	- miliamperio
20	MAb	- anticuerpo monoclonal
	MCSF	- factor estimulador de colonias de macrófagos
	ME	- mercaptoetanol
25	MEM	- medio mínimo esencial
	min.	- minuto(s)
30	mg	- miligramo
	ml	- mililitro
	mM	- milimolar
35	MMC	- mitomicina C
	mmol	- milimol
40	MLV	- virus de leucemia murino
	N	- concentración normal
	NEG	- negativo
45	ng	- nanogramo
	nm	- nanómetro
	nt	- nucleótido
50	extremo N	- extremo amino
	ODN	- oligodesoxinucleótido
55	ORF	- marco de lectura abierto
	PA	- Proteína A
	PBS	- solución salina tamponada con fosfato
60	PCR	- reacción en cadena de la polimerasa
	PEST	- combinación de las abreviaturas de una letra para prolina, ácido glutámico, serina, treonina
65	PG	- proteoglicano
	pl	- punto isoeléctrico

ES 2 296 412 T3

	PMA	- 12-miristato 13-acetato de forbol
	POS	- positivo
5	Py	- pyrimidina
	RACE	- amplificación rápida de extremos de ADNc
	RCC	- carcinoma de células renales
10	RIA	- radioinmunoensayo
	RIP	- radioinmunoprecipitación
15	RIPA	- ensayo de radioinmunoprecipitación
	RNP	- ensayo de protección contra RNasa
20	RT-PCT	- reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa
	SAC	- células de <i>Staphilococcus aureus</i>
	<i>S. aureus</i>	- <i>Staphilococcus aureus</i>
25	sc	- subcutáneo
	SDRE	- elemento de respuesta en función de la dosis en suero
	SDS	- dodecilsulfato sódico
30	SDS-PAGE	- electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
	SINE	- secuencia repetida intercalada corta
35	SP	- péptido de señal
	SP-RIA	- radioinmunoensayo en fase sólida
	SSDS	- sitio donante de ayuste sintético
40	SSH	- PCR supresiva sustractiva
	SSPE	- NaCl (0,18 M), fosfato sódico (0,01 M), EDTA (0,001 M)
45	TBE	- tampón de electroforesis de Tris-borato/EDTA
	TC	- cultivo tisular
	TCA	- ácido tricloroacético
50	Medio de TC	- medio de cultivo tisular
	TC	- cultivo tisular
55	tk	- timidina cinasa
	TM	- transmembrana
	TMB	- tetrametilbenzidina
60	Tris	- tris (hidroximetil)aminometano
	μ Ci	- microcurie
65	μ g	- microgramo
	μ l	- microlitro

ES 2 296 412 T3

μ M	- micromolar
VSV	- virus de estomatitis vesicular
5 W	- virus vaccinia
X-MLV	- virus de leucemia murino xenotrópico

10 *Líneas celulares*

- AGS -línea celular derivada de un carcinoma adenogástrico primario [Barranco y Townsend, Cancer Res., 43: 1703 (1983) e Invest. New Drugs, 1: 117 (1983)]; disponible en la ATCC con el código CRL 1739;
- 15 BL-3 - linfocitos B bovinos [ATCC CRL-8037; suspensión de células de leucemia; J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 40: 737 (1968)];
- C33 - una línea celular derivada de una biopsia de carcinoma de cuello de útero humano [Auersperg, N., J. Nat'l. Cancer Inst. (Bethesda), 32: 135-148 (1964)]; disponible en la ATCC con el código HTB-31;
- 20 C33A - células de carcinoma de cuello de útero humano [ATCC HTB-31; J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 32: 135 (1964)];
- COS - línea celular simia [Gluzman, Y., Cell, 23: 175 (1981)];
- 25 HeLa K - células HeLa de tipo estándar; línea celular de tipo epitelial aneuploide aislada de un adenocarcinoma de cuello de útero humano [Gey y cols., Cancer Res., 12: 264 (1952); Jones y cols., Obstet. Gynecol., 38: 945-949 (1971)] obtenida del Professor B. Korych, [Institute of Medical Microbiology and Immunology, Charles University; Praga, República Checa];
- 30 HeLa D98/AH.2 (también HeLa s) - Clon HeLa mutante que es deficiente en hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT⁻) amablemente suministrada por Eric J. Stanbridge [Department of Microbiology, College of Medicine, University of California, Irvine, CA (EE. UU.)] y reseñada en Stanbridge y cols., Science, 215: 252-259 (15 de enero de 1982); progenitora de las células híbridas H/F-N y H/F-T, también obtenidas de E.J. Stanbridge;
- 35 KATO III - línea celular preparada a partir de una forma metastásica de un carcinoma gástrico [Sekiguichi y cols., Japan I. Exp. Med. 48: 61 (1978)]; disponible en la ATCC con el código HTB-103;
- 40 NIH-3T3 - línea celular de fibroblastos murinos reseñada en Aaronson, Science, 237: 178 (1987);
- QT35 - células de fibrosarcoma de codorniz [ECACC: 93120832; Cell, 11: 95 (1977)];
- Raj - línea celular de linfoma de Burkitt humano [ATCC CCL86; Lancet, 1: 238 (1964)];
- 45 Rat2TK - línea celular (embrión de rata, mutante para timidina cinasa) que se derivó de un subclon de una cepa resistente a 5'-bromo-desoxiuridina de la línea celular de tipo fibroblasto de rata de Fischer 3T3; las células carecen de niveles apreciables de timidina cinasa nuclear [Ahrens, B., Virology, 113: 408 (1981)];
- 50 SiHa - línea celular de carcinoma escamoso de cuello de útero humano [ATCC HTB-35; Friedl y cols., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 135: 543 (1990)];
- XC - células derivadas de un rabdomiosarcoma de rata inducido con el virus de sarcoma de Rous [Svoboda, Monografía del J., Natl. Cancer Center Institute n.º 17, IN: "International Conference on Avian Tumor Viruses" (J.W. Beard editor), páginas 277-298 (1964)], amablemente proporcionadas por Jan Svoboda [Institute of Molecular Genetics, 55 Czechoslovak Academy of Sciences; Praga, República Checa]; y
- CGL1 - células híbridas de H/F-N (derivadas de HeLa D98/AH.2);
- CGL2 - células híbridas de H/F-N (derivadas de HeLa D98/AH.2);
- 60 CGL3 - células híbridas de H/F-T (derivadas de HeLa D98/AH.2);
- CGL4 - células híbridas de H/F-T (derivadas de HeLa D98/AH.2);

ES 2 296 412 T3

Símbolos de los nucleótidos y de las secuencias de aminoácidos

En el presente documento se usan los siguientes símbolos para representar los nucleótidos:

	<u>Símbolo de la base</u>	<u>Significado</u>
5	A	adenina
10	C	citosina
	G	guanina
	T	timina
15	U	uracilo
	I	inosina
20	M	A o C
	R	A o G
	W	A o T/U
25	S	C o G
	Y	C o T/U
30	K	G o T/U
	V	A o C o G
	H	A o C o T/U
35	D	A o G o T/U
	B	C o G o T/U
40	N/X	A o C o G o T/U

Existen veinte aminoácidos principales, cada uno de los cuales se especifica mediante una disposición diferente de tres nucleótidos adyacentes (código de triplete o codón), y que se unen en un orden específico formando una proteína característica. En el presente documento se usa la convención de tres letras o de una letra para identificar dichos aminoácidos, como por ejemplo, en la Figura 1 siguiente:

	<u>Nombre del aminoácido</u>	<u>Abrev de 3 letras</u>	<u>Abrev. De 1 letra</u>
50	Alanina	Ala	A
	Arginina	Arg	R
55	Asparagina	Asn	N
	Ácidoaspirático	Asp	D
	Cisteína	Cys	C
60	Ácidoglutámico	Glu	E
	Glutamina	Gln	Q
	Glicina	Gly	G
65	Histidina	His	H
	Isoleucina	Ile	I

5	Leucina	Leu	L
10	Lisina	Lys	K
15	Metionina	Met	M
20	Fenilalanina	Phe	F
25	Prolina	Pro	P
	Serina	Ser	S
	Treonina	Thr	T
	Triptófano	Trp	W
	Tirosina	Tyr	Y
	Valina	Val	V
	Desconocido otro	u	X

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A-C proporciona la secuencia de nucleótidos para un clon de ADNc de MN [SEC ID N.º: 1] aislado tal como se describe en el presente documento.

La Figura 1 A-C también describe la secuencia de aminoácidos prevista [SEC ID N.º: 2] codificada por el ADNc.

La Figura 2A-F proporciona una secuencia genómica completa de 10.898 pb de MN [SEC ID N.º: 5]. El recuento de las bases es el siguiente: 2654 A; 2739 C; 2645 G; y 2859 T. Los 11 exones generalmente se muestran en letras mayúsculas, pero el exón 1 se considera que empieza en la posición 3507 según se determinó mediante el ensayo de protección contra RNasa.

La Figura 3 es un mapa de restricción del ADNc de MN de longitud completa. El marco de lectura abierto se muestra en un recuadro abierto. Las líneas gruesas bajo el mapa de restricción ilustran los tamaños y posiciones de dos clones de ADNc superpuestos. Las flechas horizontales indican las posiciones de los cebadores R1 [SEC ID N.º: 7] y R2 [SEC ID N.º: 8] que se usan para la RACE en el extremo 5'. Los sitios de restricción relevantes son BamHI (B), EcoRV (V), EcoRI (E), PstI (Ps), PvuII (Pv).

La Figura 4 representa esquemáticamente la región genómica 5' de un clon genómico de MN en el que la numeración corresponde a los sitios de inicio de la transcripción estimados mediante RACE.

La Figura 5 proporciona un mapa de exones e intrones del gen MN/CA IX humano. Las posiciones y tamaños de los exones (numerados, recuadros sombreados), elementos de repetición Alu (recuadros blancos) y una secuencia relacionada con LTR (primer recuadro punteado sin numerar) se ajustan a la escala que se indica. Los exones que corresponden a dominios de la proteína MN/CA IX individuales están incluidos en los marcos de línea discontinua denominados PG (dominio de tipo proteoglicano), CA (dominio de anhidrasa carbónica), TM (ancla transmembrana) e IC (cola intracitoplasmática). Bajo el mapa, la alineación de las secuencias de aminoácidos ilustra el grado de homología entre la región PG de la proteína MN/CA (aa 53-111) [SEC ID N.º: 50] y el aggrecan humano (aa 781-839) [SEC ID N.º: 54].

La Figura 6 es una secuencia de nucleótidos para el promotor propuesto del gen MN humano [SEC ID N.º: 27]. Los nucleótidos se numeran a partir del sitio de iniciación de la transcripción de acuerdo con un ensayo de protección contra RNasa. Los potenciales elementos reguladores están suprarrayados. Los sitios de inicio de la transcripción se indican mediante asteriscos (protección contra RNasa) y puntos (RACE) sobre los nucleótidos correspondientes. La secuencia del 1^{er} exón se inicia bajo los asteriscos. El análisis por FTP del fragmento promotor MN4 reveló 5 regiones (I-V) protegidas tanto en la hebra codificante como en la no codificante, y dos regiones (VI y VII) protegidas en la hebra codificante pero no en la hebra no codificante.

La Figura 7 proporciona un esquema de la alineación de los clones genómicos MN de acuerdo con su posición relacionada con el sitio de inicio de la transcripción. Todos los fragmentos genómicos excepto Bd3 se aislaron a partir de una genoteca en lambda FIX II derivada de células HeLa. El Clon Bd3 se derivó de una genoteca de cerebro fetal humano.

La Figura 8 representa esquemáticamente la estructura de la proteína MN. Las abreviaturas son las mismas que se usan en la Figura 5.

La escala indica el número de aminoácidos.

5

Descripción detallada

En el presente documento, se considera que los términos "MN/CA IX" y "MN/CA9" son sinónimos de MN.

10 También, se considera que el antígeno G250 se refiere a una proteína/polipéptido de MN. [Uemura y cols., J. Urol. 157 (4 Supl.): 377 (Resumen 1475; 1997).]

15 MN/CA IX se identificó por vez primera en células HeLa, derivadas de un carcinoma de cuello de útero humano, tanto como proteína de la membrana plasmática como nuclear con un peso molecular aparente de 58 y 54 kilodaltons (kDa) según se estimó mediante transferencia Western. Está N-glicosilado con una única cadena de carbohidratos de 3 kDa y en condiciones no reductoras forma oligómeros ligados mediante S-S con [Pastorekova y cols., Virology, 187: 620-626 (1992); Pastorek y cols., Oncogene, 9: 2788-2888 (1994)]. MN/CA IX es una proteína transmembrana localizada sobre la superficie celular, aunque en algunos casos se ha detectado en el núcleo [Zavada y cols., Int. J. Cancer, 54: 268-274 (1993); Pastorekova y cols., referencia anterior].

20 MN se manifiesta en las células HeLa mediante una proteína gemela, p54/58N. Las inmunotransferencias usando un anticuerpo monoclonal que reacciona con p54/58N (MAb M75) revelaron dos bandas en 54 kd y 58 kd. Esas dos bandas pueden corresponder a un tipo de proteína que lo más probablemente difiere por el procesamiento postraducional. En el presente documento, la frase "proteína gemela" indica p54/58N.

25 Zavada y cols., documento WO 93/18152 y/o documento WO 95/34650 describen la secuencia de ADNc de MN (SEC ID N.º: 1) que se muestra en el presente documento en la Figura 1A-1C, la secuencia de aminoácidos de MN (SEC ID N.º: 2) que también se muestra en la Figura 1A-1C, y la secuencia genómica de MN (SEC ID N.º: 5) que se muestra en el presente documento en la Figura 2A-2F. El gen MN se organiza en 11 exones y 10 intrones.

30 35 Los primeros treinta y siete aminoácidos de la proteína MN que se muestran en la Figura 1A-1C corresponden al péptido de señal de MN putativo [SEC ID N.º: 6]. La proteína MN tiene un dominio extracelular [aminoácidos (aa) 38-414 de la Figura 1A-1C (SEC ID N.º: 87)], un dominio transmembrana [aa 415-434 (SEC ID N.º: 52)] y un dominio intracelular [aa 435-459 (SEC ID N.º: 53)]. El dominio extracelular contiene el dominio de tipo proteoglicano [aa 53-111 (SEC ID N.º: 50)] y el dominio de anhidrasa carbónica (CA) [aa 135-391 (SEC ID N.º: 51)].

Fármacos anticancerosos y anticuerpos que bloquean la interacción entre la proteína MN y las moléculas receptoras

40 La proteína MN se considera que es una diana singularmente adecuada para la terapia contra el cáncer debido a un número de razones que incluyen las siguientes. (1) Está localizada en la superficie celular, haciendo que sea accesible. (2) Se expresa en un porcentaje elevado de carcinomas humanos (por ejemplo, carcinomas de cuello de útero, renal, de colon, mama, esófago, pulmón, cabeza y cuello, entre otros), pero normalmente no se expresa en ningún grado significativo en los tejidos normales de los que se originan dichos carcinomas.

45 50 (3) Normalmente se expresa únicamente en la mucosa estomacal y en algunos epitelios del tracto digestivo (epitelio de vesícula biliar y de intestino delgado). Por lo tanto existe una barrera anatómica entre los tejidos preneoplásicos/neoplásicos que expresan MN y los tejidos normales que expresan MN. Así pueden administrarse fármacos, que incluyen anticuerpos, que pueden alcanzar tumores sin interferir con los tejidos normales que expresan MN.

55 (4) MAb M75 tiene una gran afinidad y especificidad por la proteína MN. (5) Se ha aislado el ADNc de MN y los clones genómicos de MN que abarcan las secuencias de codificación de la proteína y las de regulación de los genes. (6) Se ha demostrado que los anticuerpos específicos contra MN presentan una captación tumoral de entre las más altas reseñadas en estudios clínicos con anticuerpos antitumorales en tumores sólidos, tal como se demuestra para el anticuerpo químérico G250 en estudios en animales y en los ensayos clínicos de fase I con pacientes de carcinoma renal. [Steffens y cols., J. Clin. Oncol., 15: 1529 (1997).] También, los anticuerpos específicos contra MN presentan una baja captación en los tejidos normales.

60 Los datos, por ejemplo tal como los que se presentan en el presente documento, son consistentes con la siguiente teoría sobre cómo la proteína MN actúa en los tejidos normales y en los tejidos preneoplásicos/neoplásicos. En los tejidos normales (por ejemplo, en la mucosa estomacal), se considera que la proteína MN es un factor de diferenciación. Se une a su receptor normal S (en el estómago). Se ha demostrado que los carcinomas de estómago no contienen proteína MN.

65 La expresión ectópica de proteína MN en otros tejidos provoca la conversión de las células en cancerosas. Dicha expresión ectópica se considera que está provocada por la unión de la proteína MN con un receptor H alternativo (para

las células HeLa), junto con una ruta de transducción de señales que provoca la malignidad. Sería de esperar que los fármacos o anticuerpos que bloquean el sitio de unión de la proteína MN para el receptor H provocaran la reversión de las células prenoplásicas/neoplásicas a normales o indujeran su muerte.

5

Diseño y desarrollo de fármacos o anticuerpos que bloquean MN

Un procedimiento para diseñar y desarrollar fármacos que bloquean MN, por ejemplo, péptidos con una afinidad elevada por la proteína MN, o anticuerpos, tiene varias etapas. La primera, es realizar una prueba para determinar la unión de la proteína MN a receptores basada en el ensayo de adhesión celular que se describe más adelante. Ese mismo procedimiento se usaría también para realizar ensayos para determinar los fármacos que bloquean el sitio de unión de la proteína MN. A la vista de la existencia de receptores alternativos S y H, se usarían células de epitelio estomacal o revertentes (que contienen preferentemente receptores S), células HeLa (que contienen el receptor H y que carecen del receptor S) en el ensayo de adhesión celular.

15

Para identificar el sitio de unión al receptor de la proteína MN, pueden usarse variantes con delecciones de la proteína MN que carezcan de diferentes dominios para identificar la(s) región(es) responsable(s) de la interacción de la proteína MN con un receptor. El Ejemplo 2 identifica e ilustra cómo detectar otros sitios de unión de la proteína MN. Un sitio de unión de MN preferido se considera que es muy similar o idéntico al epítopo para MAb M75, que está localizado en al menos 2 copias dentro de la repetición en tandem de 6 veces de 6 aminoácidos [aa 61-96 (SEC ID N.º: 97)] del dominio de tipo proteoglycano de la proteína MN. Pueden prepararse variantes de delección más pequeñas dentro de ese dominio relevante, por ejemplo, proteínas de fusión únicamente sólo con pequeños segmentos de la proteína MN. También, puede realizarse la digestión controlada de la proteína MN con proteasas específicas seguida de separación de los productos.

25

Además, pueden sintetizarse péptidos que comprendan el sitio de unión esperado. Todos esos productos pueden analizarse en ensayos de adhesión celular, tal como se ejemplifica más adelante [Véase, por ejemplo, Pierschbacher y Ruoslahti, PNAS, 81: 5985 (1984); Ruoslahti y Pierschbacher, Science, 238: 491.]

30

Pueden construirse moléculas que bloqueen el sitio de unión del receptor MN. Por ejemplo, puede usarse un kit de colección de péptidos presentados en fagos [tal como el kit de la colección de 7-meros Ph.D®-7 de New England Biolabs; Beverly, MA (EE. UU.)] tal como se ejemplifica en los Ejemplos 2 y 3, para encontrar péptidos con afinidad elevada por las moléculas diana. La actividad biológica de los péptidos identificados se analizará *in vitro* por la inhibición de la adhesión celular a la proteína MN, por los efectos sobre la morfología celular y las características de crecimiento de las células tumorales relacionadas con MN (HeLa) y las células de control. [Symington, J. Biol. Chem. 267: 25744 (1992).] El cribado *in vivo* se realizará en ratones atípicos a los que se han inyectado células HeLa.

35

Se prepararán péptidos que contienen el sitio de unión de la proteína MN [por ejemplo MAP (péptidos con anticuerpos múltiples); Tam, J.P., PNAS (EE. UU.) 85: 5409 (1988); Butz y cols., Peptide Res., 7: 20 (1994)]. Los MAP se usarán para inmunizar animales para obtener anticuerpos (policlonales y/o monoclonales) que reconocen y bloquean el sitio de unión. [Véase, por ejemplo, Brooks y cols., Cell. 79: 1157 (1994).] Después se emplearía la “vacunación” para analizar la protección de los animales. Potencialmente podrían usarse anticuerpos en el sitio de unión de MN para bloquear la(s) interacción(es) de la proteína MN con otras moléculas.

40

También puede usarse el modelado por ordenador para diseñar moléculas con afinidad específica por la proteína MN que actuarían de mediadores de la inhibición estérica entre la proteína MN y su receptor. Un modelo por ordenador del sitio de unión de MN para el receptor contendría las características espaciales, electrostáticas, hidrófobas y otras de esta estructura. Se diseñarán las moléculas orgánicas complementarias a la estructura, que mejor encajen en el sitio de unión. También pueden analizarse de forma similar moléculas inorgánicas que podrían bloquear el sitio de unión de MN.

45

El uso de oncoproteínas como dianas para desarrollar nuevas sustancias terapéuticas contra el cáncer se considera convencional por los expertos en la técnica [Véase, por ejemplo, Mendelsohn y Lippman, “Growth Factors,” páginas 114-133, EN: De Vita y cols. (editores), Cancer: Principles and Practice of Oncology (4^a Ed.; Lippincott; Filadelfia, 1993).] En su sentido más amplio, el diseño de fármacos bloqueantes puede basarse en experimentos de inhibición competitiva. Dichos experimentos se han empleado para inventar fármacos desde el descubrimiento de las sulfonylamidas (inhibidores competitivos del ácido para-aminobenzoico, un precursor del ácido fólico). También, algunos citostáticos son inhibidores competitivos (por ejemplo, pirimidinas halogenadas, entre otros).

50

Sin embargo, la aplicación de dichas estrategias a MN es novedosa. Comparadas con otras moléculas relacionadas con tumores (por ejemplo factores de crecimiento y sus receptores), MN tiene la singular propiedad de expresarse de forma diferencial en los tejidos prenoplásicos/neoplásicos y normales, que están separados por una barrera anatómica.

55

Gen MN - Clonación y secuenciación

La Figura 1A-C proporciona la secuencia de nucleótidos de un clon de ADNc de MN de longitud completa aislado tal como se describe más adelante [SEC ID N.º: 1]. La Figura 2A-F proporciona una secuencia genómica de MN completa [SEC ID N.º: 5]. La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos para un promotor de MN propuesto [SEC ID N.º: 27].

Se entiende que debido a la degeneración del código genético, es decir, que un aminoácido es codificado por más de un codón [por ejemplo, los codones TTA, TTG, CTT, CTC, CTA y CTG codifican cada uno el aminoácido leucina (leu)], las variaciones de las secuencias de nucleótidos, por ejemplo, las SEC ID N.º: 1 y 5 en las que un codón se sustituye por otro, producirían una proteína o polipéptido sustancialmente equivalentes de acuerdo con esta invención. Todas dichas variaciones en las secuencias de nucleótidos del ADNc de MN y de las secuencias complementarias de ácidos nucleicos están incluidas en el alcance de esta invención.

Se entiende además que las secuencias de nucleótidos que se describen en el presente documento y que se muestran en las Figuras 1, 2 y 6, representan únicamente las estructuras precisas de las secuencias de ADNc, genómicas y de los promotores de los nucleótidos aislados y que se describen en el presente documento. Es de esperar que se encuentren secuencias de nucleótidos ligeramente modificadas o que puedan ser modificadas mediante técnicas conocidas en la técnica que codifiquen proteínas y polipéptidos MN sustancialmente similares u homólogas, por ejemplo, que tengan epítotos similares, y se considera que dichas secuencias de nucleótidos y proteínas/polipéptidos son equivalentes para el fin de esta invención. Se considera que el ADN o ARN que tengan codones equivalentes están dentro del alcance de la invención, al igual que las secuencias de ácidos nucleicos sintéticos que codifican proteínas/polipéptidos homólogos o sustancialmente homólogos a proteínas/polipéptidos MN, así como aquellas secuencias de ácido nucleico que se hibridarían a dichas secuencias ejemplares [SEC ID N.º 1, 5 y 27] en condiciones restrictivas, o que, excepto por la degeneración del código genético, se hibridarían a dichas secuencias de nucleótidos de ADNc en condiciones de hibridación restrictivas. Las modificaciones y variaciones de secuencias de ácidos nucleicos que se indican en el presente documento se considera que producen secuencias que son sustancialmente iguales a las secuencias MN ejemplares y fragmentos de las mismas.

En el presente documento se considera que las condiciones de hibridación restrictivas conforman unas condiciones de hibridación estándar que en la técnica se considera que son restrictivas. Por ejemplo, generalmente se entiende que las condiciones restrictivas engloban condiciones de salinidad relativamente baja y/o de temperatura elevada, tal como las que proporciona NaCl 0,02 M a 0,15 M a temperaturas de 50°C a 70°C. Las condiciones menos restrictivas, tales como sal 0,15 M a 0,9 M a temperaturas que varían en el intervalo de 20°C a 55°C pueden hacerse más restrictivas añadiendo cantidades crecientes de formamida, que sirve para desestabilizar los dúplex hibridados al igual que el aumento de temperatura.

Las condiciones de hibridación restrictivas ejemplares se describen en Sambrook y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, páginas 1.91 y 9.47-9.51 (Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY; 1989); Maniatis y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, páginas 387-389 (Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY; 1982); Tsuchiya y cols., Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 71(6): 721-725 (Junio de 1991).

Zavada y cols., documento WO 95/34650 describieron cómo se aisló y secuenció un clon de ADNc parcial de MN, un clon de ADNc de longitud completa de MN y clones genómicos de MN. También, Zavada y cols., Int. I. Cancer, 54: 268 (1993) describen el aislamiento y la secuenciación de un ADNc parcial de MN de 1397 pb de longitud. En resumen, los intentos de aislar un clon de longitud completa de la adenoteca de ADNc original no dieron resultado. Por lo tanto, los inventores realizaron una rápida amplificación de los extremos de ADNc (RACE) usando los cebadores específicos de MN, R1 y R2 [SEC ID N.º: 7 y 8], derivados de la región 5' del clon de ADNc original. El producto de la RACE se insertó en pBluescript, y toda la población de plásmidos recombinantes se secuenció con un cebador específico de MN ODN1 [SEC ID N.º: 3]. De ese modo, se obtuvo una secuencia fiable justo en el extremo 5' del ADNc de MN tal como se muestra en la Figura 1 [SEC ID N.º: 1].

De forma específica, se realizó una RACE usando 5' RACE System [GIBCO BRL; Gaithersburg, MD (EE. UU.)] de la forma siguiente. Se usó 1 µg de ARNm (igual que anteriormente) como plantilla para la síntesis de la primera hebra de ADNc que se cebó con el oligonucleótido no codificante específico de MN, R1 (5'-TGGGGTTCTTGAG GATCTCCAGGAG-3') [SEC ID N.º: 7]. El producto de la primera hebra se precipitó dos veces en presencia de acetato de amonio y se le unió una cola de C homopolimérica en su extremo 3' mediante TdT. El ADNc con la cola se amplificó después mediante PCR usando a un cebador anidado, R2 (5'-CTCTAACTTCAGGGAGCCCTTCTT-3') [SEC ID N.º: 8] y un cebador de anclaje que se híbrida con la cola homopolimérica (5'-CUACUACUACUAGGC CACCGTCGAC TAGTACGGGI IGGGIIGGGIIG-3') [SEC ID N.º: 9]. El producto amplificado se digirió con las enzimas de restricción BamHI y Sall y se clonó en el plásmido pBluescript II KS. Después de la transformación, el ADN plasmídico se purificó de la población completa de células transformadas y se usó como plantilla para la secuenciación con el cebador específico de MN ODN1 [SEC ID N.º: 3; un 29-mero 5' CGCCCAAGTGGGTCATCTTCCC CAGAAGAG 3'].

Para estudiar la regulación de MN, se aislaron clones genómicos de MN. Se aisló un clon genómico de MN (Bd3) de una colección de cósmidos humanos preparada con cerebro fetal humano usando ADNc de MN como sonda y los

ES 2 296 412 T3

cebadores específicos de MN derivados del extremo 5' del ADNc de ODN1 [SEC ID N.º: 3, referencia anterior] y de ODN2 [SEC ID NO.: 4; 19-mero (5' GGAATCCTCCTGCATCCGG 3')]. El análisis de la secuencia reveló que el clon genómico abarcaba una región aguas arriba de un sitio de inicio de la transcripción de MN y que terminaba en el sitio de restricción de BamHI localizado dentro del ADNc de MN. De forma similar pueden aislarse otros clones genómicos de MN.

La Figura 7 proporciona un esquema de la alineación de los clones genómicos de MN de acuerdo con el sitio de inicio de la transcripción. Los plásmidos que contienen el clon A4a y los subclones XE1 y XE3 se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC) el 6 de junio de 1995, respectivamente con los n.º de depósito de la ATCC 10 97199, 97200, y 97198.

Estructura de exones e intrones de la región genómica de MN completa

15 La secuencia completa de los clones superpuestos contiene 10.898 pb (SEC ID N.º: 5). La Figura 5 representa la organización del gen MN humano, que muestra la localización de los 11 exones así como los 2 elementos de repetición de Alu aguas arriba y los 6 intrónicos. Todos los exones son pequeños, variando en el intervalo de 27 a 191 pb, a excepción del primer exón que tiene 445 pb. Los tamaños de los intrones varían en el intervalo de 89 a 1400 pb. El dominio de CA lo codifican los exones 2-8, mientras que los exones 1, 10 y 11 corresponden respectivamente al 20 dominio de tipo proteoglicano, el ancla transmembrana y la cola citoplasmática de la proteína MN/CA IX. La Tabla 1 a continuación lista las secuencias donantes y receptoras del ayuste que son conformes con las secuencias de ayuste de consenso que incluyen el motivo AG-GT [Mount, Nucleic Acids Res. 10: 459-472 (1982)].

25

TABLA 1

Estructura de exones e intrones del gen MN humano

Exón	Tamaño	Posición genómica**	SEC ID N.º	ayuste 5'	SEC ID N.º
1	445	*3507-3951	28	AGAAG gtaagt	67
2	30	5126-5155	29	TGGAG gtgaga	68
3	171	5349-5519	30	CAGTC gtgagg	69
4	143	5651-5793	31	CCGAG gtgagc	70
5	93	5883-5975	32	TGGAG gtacca	71
6	67	7376-7442	33	GGAAG gtcagt	72
7	158	8777-8934	34	AGCAG gtgggc	73
8	145	9447-9591	35	GCCAG gtacag	74
9	27	9706-9732	36	TGCTG gtgagt	75
10	82	10350-10431	37	CACAG gtattt	76
11	191	10562-10752	38	ATAAT Fin	

55

60

65

Intrón	Tamaño	Posición genómica**	SEC ID N. ^º	5'	ayuste	SEC N. ^º	ID	
1	1174	3952-5125	39	atacag	GGGAT	77		
2	193	5156-5348	40	ccccag	GCGAC	78		
3	131	5520-5650	41	acgcag	TGCAA	79		
4	89	5794-5882	42	tttcag	ATCCA	80		
5	1400	5976-7375	43	ccccag	GAGGG	81		
6	1334	7443-8776	44	tcacag	GCTCA	82		
7	512	8935-9446	45	ccctag	CTCCA	83		
8	114	9592-9705	46	ctccag	TCCAG	84		
9	617	9733-10349	47	tcgcag	GTGACA	85		
10	130	10432-10561	48	acacag	AAGGG	86		

**las posiciones se refieren a la numeración de los nt de la secuencia

genómica completa incluida la región flanqueante en 5' [Figura 2A-F]

* el número corresponde al sitio de inicio de la transcripción que se determina más adelante mediante ensayo de protección contra RNasa

Mapeo del los sitios de iniciación y terminación de la transcripción génica de MN

Zavada y cols., documento WO 95/34650 describe el procedimiento del mapeo de los sitios de iniciación y terminación de la transcripción génica de MN. Se usó un ensayo de protección contra RNasa para el mapeo preciso del extremo 5' del gen MN. La sonda era una copia de ARN de 470 nucleótidos marcada uniformemente (nt -205 a + 265) [SEC ID N.^º: 55], que se hibridó al ARN total de células HeLa y CGL3 que expresaban MN y se analizó en un gel de secuenciación. Ese análisis ha demostrado que la transcripción génica de MN se inicia en sitios múltiples, siendo el extremo 5' del tránsrito más largo 30 nt más largo que el anteriormente caracterizado mediante RACE.

Caracterización de la región flanqueante en 5'

El clon genómico Bd3 aislado a partir de una colección de cósmidos de cerebro fetal humano se encontró que abarcaba una región de 3,5 kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen MN. No contiene ninguna región codificante significativa. Dos repeticiones Alu están situadas en las posiciones -2587 a -2296 [SEC ID N.^º: 56] y -1138 a -877 [SEC ID N.^º: 57] (con respecto al inicio de la transcripción determinado mediante RNP).

El análisis de la secuencia de nucleótidos del ADN 5' del inicio de la transcripción (a partir del nt -507) no reveló ninguna caja TATA reconocible a la distancia esperada del inicio del primer exón. Sin embargo, la presencia de potenciales sitios de unión para los factores de transcripción sugiere que esta región puede contener un promotor para el gen MN. Hay diversas secuencias de consenso para los factores de transcripción AP1 y AP2 así como para otros elementos reguladores, que incluyen un sitio de unión p53 [Locker y Buzard, J., ADN Sequencing and Mapping, 1: 3-11 (1990); Imagawa y cols. Cell, 51: 251-260 (1987); El Deiry y cols., Nat. Genet. 1: 44-49 (1992)]. Aunque la región promotora putativa contiene 59,3% de C+G, no presenta los atributos adicionales de las islas ricas en CpG que son habituales en los promotores sin TATA de los genes de mantenimiento [Bird, Nature, 321: 209-213 (1986)]. Otra clase de genes que carecen de caja TATA utilizan el elemento iniciador (Inr) como promotor. Muchos de estos genes no son activos constitutivamente, sino que se regulan durante la diferenciación o el desarrollo. El Inr tiene una secuencia de consenso de PyPyPyPyPyPyPy [SEC ID N.^º: 23] y abarca el sitio de inicio de la transcripción [Smale y Baltimore, Cell, 57: 103-113 (1989)]. Existen dos de dichas secuencias de consenso en el promotor putativo de MN; sin embargo, no coinciden con el inicio de la transcripción (Figura 6).

Se encontró una región interesante en mitad del gen MN. La región es de aproximadamente 1,4 kb de longitud [nt 4.600-6.000 de la secuencia genómica; SEC ID N.^º: 49] y abarca desde la parte 3' del 1^{er} intrón al final del 5^º exón.

ES 2 296 412 T3

- La región tiene las características de una isla rica en CpG habitual, con un contenido de 62,8% de C + G y 82 CpG: 131 GpC dinucleótidos. Además, existen múltiples sitios de unión putativos para los factores de transcripción AP2 y Sp1 [Locker y Buzard, referencia anterior; Briggs y cols., Science, 234: 47-52 (1986)] que se concentran en el centro de esta área. Particularmente, el 3^{er} intrón de 131 pb de longitud contiene tres secuencias de consenso Sp1 y tres AP2.
- 5 Esos datos indican la posible implicación de esa región en la regulación de la expresión del gen MN. Sin embargo, todavía está por determinar la función de esa región, así como de los otros elementos reguladores que se encuentran en el promotor 5' de MN propuesto.

Promotor de MN

- 10 El estudio del promotor de MN ha demostrado que carece de TATA y que contiene secuencias reguladoras para AP-1, AP-2, así como dos sitios de unión p53. La secuencia del extremo 5' de la región flanqueante de 3,5 kb aguas arriba del gen MN ha demostrado una extensa homología con LTR de los retrovirus endógenos HERV-K. La actividad de transcripción basal del promotor es muy débil, según se ha demostrado mediante análisis usando CAT y genes testigo 15 neo. Sin embargo, la expresión de los genes testigo aumenta varias veces cuando se dirige desde la región flanqueante de 3,5 kb, lo que indica la implicación de potenciadores putativos.

- 20 La caracterización funcional de la región aguas arriba de 3,5 kb de MN en 5' mediante análisis por delección llevó a la identificación del fragmento [-173, +31] [SEC ID N.º: 21] (también de forma alternativa, pero menos preferiblemente, el fragmento casi idéntico -172, +31 [SEC ID N.º: 91]) como promotor de MN. La obtención de huellas *in vitro* mediante ADNasa I relevó la presencia de cinco regiones protegidas (PR) dentro del promotor de MN. El análisis de delección detallado del promotor identificó PR 1 y 2 (numerados a partir del inicio de la transcripción) como las más críticas para la actividad de transcripción. PR4 [SEC ID N.º: 115] afectó negativamente a la transcripción ya que su delección provocó una mayor actividad del promotor y se confirmó que funcionaba como elemento silenciador independiente del promotor, de la posición y de la orientación. El análisis mutacional indicó que es necesaria la repetición directa AGGGCacAGGGC [SEC ID N.º: 143] para la unión eficaz del represor. Se encontró que dos componentes del complejo represor (35 y 42 kDa) estaban en contacto directo con PR4 mediante reticulación por radiación UV. La mayor densidad celular, que se sabe que induce la expresión de MN, no afectó a los niveles de unión de PR4 en las 25 células HeLa. El nivel del represor significativamente reducido parece ser responsable de la regulación por aumento de MN en el caso de las células CGL3 tumorígenas comparada con los híbridos de HeLa y fibroblastos normales.
- 30

Utilidad del promotor de MN como un promotor específico de tumor para la genoterapia

- 35 Se investiga si el promotor del gen MN puede usarse como promotor específico de tumor para dirigir la expresión de un gen suicida [timidina cinasa (tk) de HSV] y actuar de mediador de la destrucción directa y por efecto de contigüidad (“bystander”) de las células tumorales.

- 40 El gen HSVtk transferido a las células tumorales convierte el análogo nucleosídico ganciclovir (GCV) en trifosfatos tóxicos y actúa de mediador de la destrucción de las células tumorales transducidas y también de las células contiguas. El control de HSVtk mediante el promotor del gen MN permitiría su expresión únicamente en células tumorales, que permiten la biosíntesis de la proteína MN, y la destrucción selectiva de dichas células tumorales, pero no de las células normales en las que la expresión de MN está reprimida.

- 45 Se preparó una construcción de un plásmido en el que se clonó HSVtk aguas debajo de la región del promotor de MN Bd3, que contenía elementos de regulación tanto proximales como a distancia de MN. Ese plásmido pMN-HSVtk se transfeció a células Rat2TK y a células de carcinoma de cuello de útero C33 usando precipitación con fosfato cálcico y lipofección, respectivamente. Las células transfecadas se analizaron para determinar la expresión de HSVtk y la sensibilidad a GVC. El análisis de las células transfecadas ha demostrado el notable efecto citotóxico *in vitro* de GVC incluso a concentraciones bajas (hasta 95% de células destruidas).

- 50 Se ha preparado antisuero de conejo policlonal contra HSVtk, usando la proteína de fusión con GST en pGEX-3X, para inmunodetectar HSVtk sintetizada en células transfecadas. Este sistema modelado está siendo estudiado para estimar el efecto de contigüidad, la inhibición de la eficacia de la clonación y la capacidad invasiva de células transducidas y tratadas con GVC a matrices de colágeno. Debe prepararse un vector retroviral recombinante con HSVtk controlada por el promotor de MN para analizar la eficacia *in vivo* usando un modelo animal (por ejemplo, ratones SCID).

Ánalisis del promotor de MN

- 60 Dado que el promotor de MN es débil, una estrategia clásica para estudiarlo estaría limitada por la eficiencia relativamente baja de las transfecciones transitorias (hasta de un 10%). Por lo tanto, se prepararon líneas celulares clonales estables que expresaban construcciones que contenían el promotor de MN fusionado con el gen CAT. En dichas líneas clonales, el 100% de las células expresan el gen CAT controlado por el promotor de MN, y así, puede detectarse la actividad del promotor más fácilmente que en los experimentos transitorios. También puede analizarse la actividad del promotor repetidamente en las mismas células con condiciones diferentes o tratarse con diferentes factores y fármacos. Esta estrategia permite estudiar los mecanismos que subyacen la regulación de MN a nivel de iniciación de la transcripción.

Diversos tipos de transfecciones con construcciones de promotores ligados a un gen testigo CAT (precipitación con calcio, DEAE dextrano combinado con choque con DMSO y/o cloroquina, así como electroporación), procedimientos diferentes de ensayo de actividad de CAT (procedimiento de centelleo, cromatografía en capa fina) y diversas líneas celulares receptoras que diferían en el nivel de expresión de MN y en la eficiencia de transfección (células HeLa, 5 SiHa, CGL3, KATO III, Rat2TK⁻ y C33). La actividad del promotor de MN se detectó preferiblemente mediante electroporación de las células CGL3 y cromatografía en capa fina. Preferiblemente además, se usaron células C33 cotransfектadas con construcciones de promotor de MN-CAT y pSV2neo.

10 1. Para detectar la actividad basal del promotor de MN y para estimar la posición del promotor central, se analizó la expresión del gen CAT en las construcciones pMN1 a pMN7 tras la transfección a células CGL3. Se transfecaron plásmidos con delecciones progresivas en 5' a células CGL3 y la actividad se analizó mediante ensayo de CAT. [Se usaron 8 µg de ADN para la transfección en todos los casos excepto pBLV-LTR (2 µg).]

15 20 Únicamente se detectó una actividad muy débil de CAT en las células transfectadas con pMN1 y pMN2 (que contienen respectivamente 933 pb y 600 pb de la secuencia del promotor). Las construcciones pMN3, pMN4 y pMN6 exhibieron algo más de actividad (que contienen respectivamente 446 pb, 243 pb y 58 pb del promotor). Se obtuvo un leve pico de actividad con pMN5 (que se iniciaba en la posición -172 con respecto al inicio de la transcripción.) Así, la función del promotor central de MN puede asignarse a una región de aproximadamente 500 pb inmediatamente aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de MN.

25 Curiosamente, la actividad de la amplia región Bd3 (que abarca 3,5 kbp aguas arriba del inicio de la transcripción) era varias veces superior a la actividad del promotor central. Sin embargo, su nivel era todavía muy inferior al que mostraba un control positivo, es decir, BLV-LTR transactivado por Tax, e incluso inferior a la actividad de BLV-LTR sin transactivación. El hecho de que la actividad de Bd3 fuera mayor que la del promotor central sugiere la presencia de algunos elementos reguladores. Muy probablemente dichos elementos están situados en la secuencia entre pMN1 y Bd3 (es decir de -1 kbp a -3,5 kbp) [SEC ID N.º: 58]. Para determinar la localización de los elementos reguladores putativos puede usarse la clonación y transfección de diversas versiones de delección de Bd3 que abarcan la región indicada.

30 35 Se obtuvieron resultados similares por la transfección de células KATO III con Bd3 y pMN4. Las células transfec- tadas expresaban un nivel más bajo de MN que las células CGL3. Por consiguiente, se encontró que la actividad del promotor de MN era menor que en las células CGL3.

40 45 2. En una estrategia paralela para estudiar el promotor de MN, se realizó un análisis basado en la selección de células G418 transfec- tadas por plásmidos que contenían el promotor de interés clonado aguas arriba del gen neo. Esta estrategia es adecuada para estudiar los promotores débiles, dado que su sensibilidad es mucho mayor que la de un ensayo CAT estándar. El principio que subyace el procedimiento es el siguiente: un promotor activo dirige la expresión del gen neo que protege las células transfec- tadas del efecto tóxico de G418, mientras que un promotor inactivo provoca que no se produzca producto neo y que las células transfec- tadas por lo tanto mueran por la acción de G418. Por lo tanto, puede estimarse la actividad del promotor de acuerdo con el número de colonias celulares obtenidas tras dos semanas de selección con G418. Se usaron tres construcciones en los experimentos iniciales - pMN1 neo, pMN4neo y pMN7neo. Dado que pMN7neo contiene únicamente 30 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, se consideró un control negativo. Como control positivo, se usó pSV2neo con un promotor derivado de SV40. Se eligió células Rat2TK como células receptoras, dado que pueden transfec- tarse con una eficiencia elevada mediante el procedimiento de precipitación con calcio.

50 55 Después de la transfección, las células se sometieron a una selección de dos semanas. Después, se eliminó el medio, las células se enjuagaron con PBS, y las colonias se hicieron visibles tiñendo con azul de metileno. Los resultados obtenidos de los tres experimentos corroboraron los datos de los ensayos de CAT. La construcción del promotor pMN4neo mostró una mayor actividad transcripcional que pMN1neo. Sin embargo, la diferencia entre el control positivo y pMN4neo no fue tan notable como en el ensayo de CAT. Eso puede haberse debido tanto a una menor actividad del pSV2neo comparada con la de Tax-pBLV-LTR transactivado como a condiciones diferentes para el crecimiento celular tras la transfección. Desde ese punto de vista, la transfección estable probablemente es más ventajosa para la expresión de MN, dado que las células crecen en colonias con gran contacto entre las células, y el experimento dura mucho más, proporcionando una mejor oportunidad de detectar la actividad del promotor.

60 65 3. Las células transfec- tadas estables que expresan los genes químicos del promotor de MN-CAT se prepararon mediante la cotransfección de plásmidos relevantes con pSV2neo. Como células receptoras, primero se usaron las células HeLa. Sin embargo, no se obtuvieron clones que expresaran construcciones de promotor-CAT. Ese resultado negativo fue provocado probablemente por la recombinación homóloga de la región genómica transfec- tada de MN (por ejemplo el promotor) con la secuencia endógena correspondiente. Basándose en esa experiencia, se usaron células C33 derivadas de un carcinoma de cuello de útero negativo para HPV. Las células C33 no expresan MN, dado que durante el proceso de tumorogénesis, pierden material genético incluida la región cromosómica 9p que contiene el gen MN. En estos experimentos, la ausencia del gen MN puede representar una ventaja ya que se evita la posibilidad de recombinaciones homólogas.

Construcciones de células C33 transfectadas con construcciones de promotor de MN-CAT

Se usaron células C33 que expresan el gen CAT controladas por las regiones Bd3 (-3500/+31) [SEC ID N.º: 90] y MN5 (-172/+31) [SEC ID N.º: 91] del promotor de MN para los experimentos iniciales para analizar la influencia

5 de la densidad celular sobre la actividad transcripcional de promotor de MN. Los resultados indicaron que las señales generadas después de que las células entran en contacto activan la transcripción de la proteína CAT gracias al promotor de MN en proporción a la densidad del cultivo celular. Curiosamente, los datos indicaban que la proteína MN no es necesaria para esta fase de la transducción de señales, dado que ya se ha demostrado claramente la influencia de la densidad en las células C33 negativas para MN. En vez de eso, parece que la proteína MN actúa como una molécula

10 efectora producida en células con mucha densidad para realizar una cierta función biológica (es decir, para perturbar la inhibición por contacto). También curiosamente, la actividad del promotor de MN puede detectarse incluso en cultivos celulares muy dispersos, lo que sugiere que MN se expresa a un nivel muy bajo también en un cultivo muy disperso que no ha alcanzado la confluencia.

15 *Variantes de delección.* Después se prepararon variantes de delección de la construcción de promotor Bd3-CAT. Las construcciones se cotransfectaron con pSV2neo en células de cuello de útero C33. Después de la selección con G418, toda la población de células transfectadas establemente se sometieron a análisis por CAT ELISA. La expresión de las construcciones de delección provocó la síntesis de niveles de proteína CAT similares a los obtenidos con la construcción Bd3-CAT. Basándose en esos datos preliminares, los inventores propusieron que las secuencias que

20 estimulan la transcripción de MN están localizadas entre -3506 y -3375 pb [SEQ ID 5 NO: 92] aguas arriba del inicio de la transcripción. Esa es la secuencia que muestra homología con LTR de HERV-K.

Sin embargo, los estudios de transfección transitoria en células CGL3 revelaron repetidamente que la región LTR no es necesaria para potenciar la actividad del promotor basal de MN. Además, los resultados obtenidos en células

25 CGL3 indican que el elemento activador está localizado en la región de -933 a -2179 [SEC ID N.º: 110] con respecto al sitio de inicio de la transcripción (la posición de la región se ha deducido a partir de las secuencias superpuestas en los mutantes de delección Bd3).

Interacción de las proteínas nucleares con las secuencias promotoras de MN

30 Para identificar los factores de transcripción que se unen al promotor de MN y que potencialmente regulan su actividad, se realizaron una serie de análisis usando un ensayo de desplazamiento por movilidad electroforética (EMSA) y un análisis de huellas mediante ADNasa I (FTP).

EMSA

En el EMSA, se permitió que fragmentos de promotor purificados MN4 (-243/+31) [SEC ID N.º: 93], MN5 (-172/+31) [SEC ID N.º: 91], MN6 (-58/+31) [SEC ID N.º: 94] y pMN7 (-30/+31) [SEC ID N.º: 95], marcados en los extremos 3' con enzima de Klenow, interactuaran con proteínas de extractos nucleares preparados a partir de

40 células CGL1 y CGL3. [Se incubaron 40 µg de proteínas nucleares con fragmentos de ADN marcados en el extremo a 30.000 cpm en presencia de 2 g de poli(dIdC).] Los complejos de ADN y proteína se analizaron mediante PAGE (nativo al 6%), donde los complejos crearon bandas extra que migraron más lentamente que los fragmentos libres de ADN, debido al desplazamiento en la movilidad que depende del resto de la proteína unida.

45 El EMSA de los fragmentos de los promotores MN4 y MN5 reveló varios complejos de ADN y proteína; sin embargo, los patrones de unión obtenidos respectivamente con extractos nucleares de CGL1 y CGL3 no eran idénticos. Existe un único complejo específico de CGL1.

50 El EMSA del fragmento del promotor MN6 provocó la formación de tres complejos idénticos con extractos nucleares tanto de CGL1 como de CGL3, mientras que el fragmento del promotor MN7 no se unió a ninguna proteína nuclear.

55 Los resultados del EMSA indicaron que el extracto nuclear de CGL1 contiene un factor específico, que podría participar en la regulación negativa de la expresión de MN en células CGL1. Dado que el complejo específico entre ADN y proteína se forma con los fragmentos del promotor MN4 (-243/+31) [SEC ID NO.: 93] y MN5 (172/+31) [SEC ID NO.: 91], pero no con MN6 (-58/+31) [SEC ID N.º: 94], parece que el sitio de unión del componente proteínico de ese complejo específico está situado entre -173 y -58 pb [SEC ID NO.: 96] con respecto al inicio de la transcripción.

60 La siguiente etapa fue una serie de análisis EMSA usando oligonucleótidos bicatenarios (ds) diseñados de acuerdo con las regiones protegidas en el análisis por FTP. Un oligonucleótido ds derivado de la región protegida PR2 [que abarca la secuencia de -72 a -56 pb (SEC ID N.º: 111)] del promotor de MN proporcionó la confirmación de la unión del factor de transcripción AP-1 en un EMSA competitivo usando oligonucleótidos ds comerciales que representaban el sitio de unión de AP-1.

65 Los EMSA de los oligonucleótidos ds derivados de las regiones protegidas de PR1 [-46 a -24 pb (SEC ID N.º: 112)], PR2 [72 a -56 pb (SEC ID N.º: 111)], PR3 [102 a -85 (SEC ID N.º: 113)] y PR5 [163 a -144 (SEC ID N.º: 114)] no revelaron ninguna diferencia en el patrón de unión de las proteínas nucleares extraídas de las células CGL1 y CGL3, lo que indica que esas regiones no se unen a factores de transcripción cruciales que controlan la activación del gen MN

ES 2 296 412 T3

en CGL3, o su regulación negativa en CGL1. Sin embargo, el EMSA de los oligonucleótidos ds de la región protegida PR4 [-133 a -108; SEC ID N.º: 115] repetidamente demostraron diferencias cuantitativas notables entre la unión de las proteínas nucleares de CGL1 y de CGL3. Las proteínas nucleares de CGL1 formaron una cantidad sustancialmente mayor de complejos de ADN y proteína, lo que indica que la región PR4 contiene un sitio de unión para factor(es) de transcripción específico(s) que puede(n) representar un regulador negativo del gen transcripción de MN en células CGL1. Ese hecho es acorde a los anteriores datos de EMSA que demostraban que ADN-proteína específicos de CGL-1 formaban complejos con los fragmentos de promotor pMN4 (-243/+31; SEC ID N.º: 93) y pMN5 (-172/+31; SEC ID N.º: 91), pero no con pMN6 (-58/+31; SEC ID N.º: 94).

10 Para identificar la proteína implicada o la formación de un complejo específico con el promotor de MN en la región PR4, se usarán oligonucleótidos ds relevantes unidos covalentemente a perlas magnéticas para purificar el factor de transcripción correspondiente. De forma alternativa, se usará el sistema ONE Hybrid System® [Clontech (Palo Alto, CA (EE. UU.)) para buscar y clonar los factores de transcripción implicados en la regulación de la región promotora analizada. Se usará una adenoteca de ADNc de células HeLa para esa investigación.

15 *FTP*

20 Se usó FTP para determinar la localización precisa de los elementos reguladores en cis que participan en la regulación transcripcional del gen MN. Se dejó interactuar las proteínas de los extractos nucleares preparadas respectivamente a partir de células CGL1 y CGL3 con un fragmento de ADN ds purificado del promotor de MN (MN4, -243/+31) [SEC ID N.º: 93] que se marcó en el extremo 5' de una hebra. [Los fragmentos de MN4 se marcaron o bien en el sitio Xho1 (-243/+ 31*) o en el sitio Xba1 (*-243/+ 31).] El complejo de ADN y proteína se sometió después al ataque con una DNasa I, provocando la ruptura de la cadena de ADN en ciertas bases si no están en contacto con las proteínas. [Un control usó BSA en lugar de DNasa.] El examen del patrón de bandas del ADN desnaturalizado tras la electroforesis en gel [8% de gel desnaturalizante] indica cuáles de las bases de la hebra marcada estaban protegidas por la proteína.

25 El análisis por FTP del fragmento promotor MN4 reveló 5 regiones (I-V) protegidas tanto en la hebra codificante como no codificante, así como dos regiones (VI y VII) protegidas en la hebra codificante pero no en la hebra no codificante. La Figura 6 indica las regiones generales del promotor de MN que estaban protegidas.

30 Las secuencias de las regiones protegidas (PR) identificadas se sometieron a análisis informático usando el programa SIGNALSCAN para ver si correspondían a secuencias de consenso conocidas de factores de transcripción. Los datos obtenidos por el análisis informático son los siguientes:

35 PR I -hebra codificante - AP-2, p53, hebra no codificante GAL4 - JCV-repetido

PR II -hebra codificante - AP-1, 1, hebra no codificante CGN4 - TCF-1, dFRA, CGN4

40 PR III -hebra codificante - ninguna secuencia de consenso conocida, únicamente superposición parcial de la hebra no codificante AP1 - 2 sitios TCF-1

PR IV -hebra codificante - TCF-1, hebra no codificante ADR-1 - CTCF, LF-A1, LBP-1

45 PR V -hebra codificante - ningún motivo de consenso conocido hebra no codificante - JCV repetido

PR VI -hebra codificante - ningún motivo de consenso conocido hebra no codificante - antígeno T de SV 40, GAL4

50 PR VII - hebra codificante - NF-uE4, hebra no codificante U2snARN.2 - AP-2, IgHC.12, MyoD.

55 Al contrario que el EMSA, el análisis por FTP no encontró ninguna diferencia entre los extractos nucleares de CGL1 y CGL3. Sin embargo, la presencia de interacciones específicas entre ADN y proteína detectadas en los extractos nucleares de CGL1 mediante el EMSA podrían haberse producido por la unión de proteína adicional formando un complejo de ADN proteína-proteína. Si esa proteína específica no estaba en contacto directo con la secuencia de ADN, su presencia no podría detectarse mediante FTP.

Análisis de superdesplazamiento por EMSA

60 Los resultados del FTP sugieren que los factores de transcripción AP-1, AP-2 así como la proteína supresora de tumores p53, están potencialmente implicados en la regulación de la expresión de MN. Para confirmar la unión de esas proteínas particulares al promotor de MN, se realizó un análisis de superdesplazamientos usando anticuerpos específicos para esas proteínas. Para este análisis, se permitió la interacción de complejos de ADN y proteína preparados tal como se describe para el EMSA con MAb o anticuerpos polyclonales específicos para las proteínas potencialmente incluidas en el complejo. La unión del anticuerpo a la proteína correspondiente produce un desplazamiento adicional (superdesplazamiento) de la movilidad del complejo de ADN-proteína-anticuerpo que se visualiza en el PAGE en forma de una banda adicional que migra más lentamente.

ES 2 296 412 T3

Mediante este procedimiento, se confirmó la unión de AP-2 al promotor de MN. Sin embargo, este procedimiento no evidenció la unión del factor de transcripción AP-1. Es posible que la proteína MN se una a una proteína relacionada con AP-1, que sea antigenicamente diferente de la AP-1 reconocida por los anticuerpos que se usan en este ensayo.

5 También es de gran interés la posible unión de la proteína supresora de tumores p53 al promotor de MN. Es notorio que wt p53 funciona como un factor de transcripción, que activa la expresión de genes que restringen el crecimiento y modula por disminución, de forma directa o indirecta, la expresión de genes que son necesarios para que prosiga la proliferación celular. Los experimentos de cotransfección transitoria usando la construcción de promotor pMN4-CAT combinada con ADNc de wt p53 y ADNc de mut p53, respectivamente, sugirieron que wt p53, pero no así mut p53, 10 regula negativamente la expresión de MN. Además, uno de los dos sitios de unión del promotor de MN está protegido en el análisis por FTP (Figura 6), lo que indica que se une a la proteína correspondiente. Por lo tanto, el análisis del superdesplazamiento para probar que p53 se une al promotor de MN con dos anticuerpos específicos contra p53, por ejemplo Mab 421 y DO-1 [este último proporcionado amablemente por el Dr. Vojtesek del Masaryk Memorial Cancer Institute en Brno, República Checa] se realizan con extractos nucleares apropiados, por ejemplo de células de 15 carcinoma de mama MCF-7 que expresan wt p53 a un nivel suficiente.

Regulación de la expresión de MN y promotor de MN

20 MN parece ser una proteína reguladora novedosa que está directamente implicada en el control de la proliferación celular y en la transformación celular. En las células HeLa, la densidad celular regula positivamente la expresión de MN. Su nivel aumenta por la infección persistente con LCMV. En las células hibridas de HeLa y fibroblastos normales, la expresión de MN presenta una correlación con la capacidad tumorígena. El hecho de que MN no esté presente en las células hibridas no tumorígenas (CGL1), pero que esté expresado en un segregante tumorígeno que carece del 25 cromosoma 11, indica que un supresor putativo en el cromosoma 11 regulada negativamente a MN.

25 Se encontraron indicios que apoyan el papel regulador de la proteína MN en la generación de células transfectadas estables de células NIH 3T3 que constitutivamente expresan la proteína MN. Como consecuencia de la expresión de MN, las células NIH 3T3 adquirieron características asociadas a un fenotipo transformado: morfología alterada, mayor densidad de saturación, ventaja en la proliferación en medio con suero reducido, mayor síntesis de ADN y capacidad 30 de crecimiento independiente del anclaje. Además, los análisis por citometría de flujo de las poblaciones de células asíncronas indicaron que la expresión de la proteína MN provoca una progresión acelerada de las células hasta la fase G1, una reducción del tamaño celular y la pérdida de capacidad de detener el crecimiento en condiciones inapropiadas. También, las células que expresan MN presentan una menor sensibilidad al fármaco mitomicina C que daña el ADN.

35 También se transfectaron las células humanas no tumorígenas, células CGL1, con el ADNc de longitud completa de MN. Se usó la misma construcción pSG5C-MN combinada con el plásmido pSV2neo tal como se usa para transfectar las células NIH 3T3. De los 15 clones positivos para MN (analizados por SP-RIA y transferencia de Western), se eligieron 3 para el análisis ulterior. Se añadieron dos clones negativos para MN aislados de células CGL1 transfectadas con plásmido como controles. El análisis inicial indica que la morfología y los hábitos de crecimiento de las células 40 CGL1 transfectadas con MN no cambian de forma espectacular, pero aumenta su velocidad de proliferación y su eficacia de plaqueo.

Promotor de MN - construcciones codificantes/no codificantes

45 Cuando la región promotora del clón genómico MN, aislado tal como se describe anteriormente, se ligó a ADNc de MN y se transfectó a células CGL1 hibridas, la expresión de proteína MN pudo detectarse inmediatamente después de la selección. Sin embargo, después cesó gradualmente, indicando así la acción de un regulador por retroalimentación. El elemento regulador putativo parecía actuar mediante el promotor de MN, porque cuando se usó el ADNc de longitud completa (que no contenía promotor) para la transfección, no se observó un efecto similar.

50 Se usó una construcción de ADNc “no codificante” de MN/promotor de MN para transfectar células CGL3. El efecto fue el opuesto que en las células CGL1 transfectadas con la construcción “codificante”. Mientras que las células CGL1 transfectadas formaban colonias varias veces mayores que las CGL1 de control, las células CGL3 transfectadas formaban colonias mucho menores que las células de control CGL3. El mismo resultado se obtuvo mediante la transfección con ADNc de MN no codificante en células SiHa y HeLa.

60 Para esos experimentos, la parte de la región promotora que se ligó al ADNc de MN a través de un sitio BamHI se derivó de un fragmento NcoI - BamHI del clón genómico de MN [Bd3] y representa una región de unos pocos cientos de pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. Después del ligado, el ADN unido se insertó en un vector de expresión pBK-CMV [Stratagene]. La orientación requerida por la secuencia se aseguró mediante clonación direccional y posteriormente se verificó mediante análisis de restricción. El procedimiento de transfección era igual que el que se usó en la transfección de células NIH 3T3, pero la cotransfección con el plásmido pSV2neo no fue necesaria dado que el marcador de la selección neo se había incluido ya en el vector pBK-CMV.

65 Después de dos semanas de selección en un medio que contenía G418, se evidenciaron notables diferencias entre el número y tamaño de las colonias cultivadas tal como se indica anteriormente. Inmediatamente después de la selección y clonación, las células CGL1 y CGL3 transfectadas con MN se analizaron mediante SP-RIA para determinar la expresión y represión de MN, respectivamente. Los clones CGL1 transfectados aislados eran positivos para MN

(aunque el nivel era menor que el obtenido con el ADNc de longitud completa), mientras que la proteína MN estaba casi ausente de los clones CGL3 transfectados. Sin embargo, en pases posteriores, comenzó a disminuir la expresión de MN en las células CGL1 transfectadas, y después se bloqueó evidenciando quizás un mecanismo de control por retroalimentación.

5 Como resultado de una proliferación mucho menor de las células CGL3 transfectadas, resultó difícil expandir la mayoría de las células clonadas (de acuerdo con SP-RIA, las que presentaban niveles menores de MN), y se perdieron en los pases. Sin embargo, algunos clones superaron el problema y expresaron MN de nuevo. Es posible que una vez que esas células alcancaran una mayor cantidad, el nivel de ARNm de MN producido endógenamente aumentara 10 comparado con la cantidad de ARNm no codificante expresado ectópicamente.

Identificación de factores de transcripción específicos implicados en el control de la expresión de MN

15 El control de la expresión de MN a nivel transcripcional implica elementos reguladores del promotor de MN. Esos elementos se unen a factores de transcripción que son responsables de la activación de MN en células tumorales y/o de la represión en células normales. La identificación y aislamiento de los factores de transcripción específicos y la comprensión de cómo regulan la expresión de MN podría conducir a su utilidad terapéutica para modular la expresión de MN.

20 Los experimentos de EMSA indican la existencia de un gen represor de MN. Usando el sistema One Hybrid System® [Clontech (Palo Alto, CA); se realizó un ensayo genético *in vivo* en levaduras para aislar genes que codifican proteínas que se unen a una diana, un elemento regulador que actúa en *cis* o cualquier otra secuencia corta que se une a ADN; Fields y Song, *Nature*, 340: 245 (1989); Wu y cols., *EMBO J.*, 13: 4823 (1994)] y PCR supresiva sustractiva (SSH). La SSH permite la clonación de genes que se expresan diferencialmente en condiciones que se sabe que regulan 25 por aumento o disminución la expresión de MN tal como la densidad comparada con la dispersión de células HeLa, y las células HeLa en suspensión comparadas con las adherentes.

30 En los experimentos con células de cuello de útero HPV inmovilizadas (HCE 16/3), se encontró que la regulación de la expresión de MN difiere de la de las células de carcinoma completamente transformadas. Por ejemplo, las 35 hormonas glucocorticoideas, que activan la transcripción de HPV, regulan negativamente la expresión de MN en HCE, pero estimulan MN en HeLa y SiHa. Además, los factores de crecimiento de los queratinocitos, que regulan por disminución la transcripción de oncogenes de HPV, estimula la expresión de MN en HCE en suspensión pero no en células adherentes.

35 El EGF y la insulina están implicados en la activación de la expresión de MN tanto en células inmortalizadas como de carcinoma. Todos los factores indicados pueden usarse en la búsqueda de factores de transcripción específicos de MN y en la modulación de la expresión de MN con fines terapéuticos.

Secuencia de aminoácidos deducida

40 El ORF del ADNc de MN que se muestra en la Figura 1 tiene capacidad de codificación de una proteína de 459 aminoácidos con un peso molecular calculado de 49,7 kd. La composición de aminoácidos global de la proteína MN/CA IX es bastante ácida y se predice que tiene una pi de 4,3. El análisis de la proteína MN/CA IX nativa de células CGL3 mediante electroforesis bidimensional seguida de inmunotransferencia ha demostrado que, de acuerdo 45 con esta predicción informática, la MN/CA IX es una proteína ácida que existe en diversas formas isoeléctricas con pis que varían en el intervalo de 4,7 a 6,3.

50 Según se evaluó mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos, la estructura primaria deducida de la proteína MN puede dividirse en cuatro regiones diferentes. La región hidrófoba inicial de 37 aminoácidos (aa) corresponde a un péptido de señal. La proteína madura tiene una parte N-terminal o extracelular de 377 aminoácidos [aa 38-414 (SEC ID N.º: 87], un segmento transmembrana hidrófobo de 20 aminoácidos [aa 415-434 (SEC ID N.º: 52)] y una 55 región C-terminal de 25 aminoácidos [aa 435-459 (SEC ID N.º: 53)].

La parte extracelular está compuesta por dos dominios diferentes: (1) un dominio de tipo proteoglicano [aa 53-111 (SEC ID N.º: 50)]; y (2) un dominio de CA, localizado cerca de la membrana plasmática [aa 135-391 (SEC ID N.º: 51)]. [Los números de los aminoácidos siguen la clave de los de la Figura 1.]

60 Un análisis más detallado de la estructura primaria de la proteína MN descubrió la presencia de varias secuencias de consenso.

65 Se encontró un sitio de N-glicosilación potencial en la posición 346 de la Figura 1. Esa característica, junto con una región que atravesaba la membrana prevista son consistentes con los resultados, en los que se demostró que MN era una proteína N-glicosilada localizada en la membrana plasmática. La secuencia de la proteína MN deducida del ADNc también se encontró que contenía siete elementos de la secuencia S/TPXX [SEC ID N.º: 25 y 26] (una de ellas está en el péptido de señal) definidos por Suzuki, J. Mol. Biol., 207: 61-84 (1989) como motivos que frecuentemente se encuentran en las proteínas reguladoras de genes. Sin embargo, únicamente dos de ellas están compuestas por los aminoácidos de consenso sugeridos.

Los experimentos han demostrado que la proteína MN es capaz de unirse a cationes de cinc, tal como se muestra mediante cromatografía por afinidad usando sefarosa quelante cargada con Zn. Se encontró que la proteína MN inmunoprecipitada de las células HeLa mediante el Mab M75 tenía una actividad catalítica débil de CA. El dominio de tipo CA de MN tiene una predisposición estructural a servir de sitio de unión para dominios solubles pequeños. Así, 5 la proteína MN podría actuar como mediadora de algún tipo de transducción de señales.

La proteína MN de las células HeLa infectadas con LCMV se demostró usando cromatografía de ADN por afinidad en celulosa para unirse a ADN de esperma de salmón bicatenario inmovilizado. La actividad de unión requería tanto 10 de la presencia de cationes de cinc como de la ausencia de un agente reductor en el tampón de unión.

10 *Dominio de CA necesario para la independencia del anclaje pero para una mayor proliferación de fibroblastos NIH 3T3 transfectados*

En los fibroblastos NIH 3T3 transfectados, la proteína MN induce una transformación morfológica, proliferación 15 aumentada e independencia del anclaje. Se estudiaron las consecuencias de la expresión constitutiva de dos variantes truncadas de MN en las células NIH 3T3. Se encontró que la región de tipo proteoglicano es suficiente para la alteración morfológica de las células transfectadas y presenta la actividad promotora del crecimiento presumiblemente relacionada a la perturbación de la inhibición por contacto.

20 El dominio de CA es esencial para la inducción de la independencia del anclaje, mientras que el ancla TM y la cola IC son prescindibles para ese efecto biológico. La proteína MN también es capaz de provocar el plegamiento de la membrana plasmática en las células transfectadas y parece participar en su unión al soporte sólido. Los datos indican la implicación de MN en la regulación de la proliferación celular, la adhesión y la comunicación intercelular.

25 *Similitudes entre las secuencias*

El análisis informático del ADNc de la secuencia de MN se realizó usando ADNSIS y PROSIS (paquetes de 30 programas de Pharmacia Software). Se buscó en las bases de datos GenBank, EMBL, Protein Identification Resource y SWISS-PROT para determinar todas las posibles similitudes entre las secuencias. Además, se realizó una búsqueda de proteínas que compartían similitudes entre las secuencias con MN en el banco de datos MIPS con el programa FastA [Pearson y Lipman, PNAS (EE. UU.), 85: 2444 (1988)].

El dominio de tipo proteoglicano [aa 53-111 (SEC ID N.º: 50)], que está entre el péptido de señal y el dominio 35 de CA, muestra una homología significativa (38% de identidad y 44% de positividad) con un dominio de unión de keratan sulfato de un gran aggrecan de proteoglicano agregante [Doege y cols., J. Biol. Chem., 266: 894-902 (1991)].

El dominio de CA [aa 135-391 (SEC ID N.º: 51)] abarca 265 aa y muestra una identidad del 38,9% de los aminoácidos con la isoenzima CA VI humana [Aldred y cols., Biochemistry, 30: 569-575 (1991)]. La homología entre 40 MN/CA IX y otras isoenzimas es la siguiente: 35,2% con CA II en una superposición de 261 aa [Montgomery y cols., Nucl. Acids. Res., 15: 4687 (1987)], 31,8% con CA I en una superposición de 261 aa [Barlow y cols., Nucl. Acids Res., 15: 2386 (1987)], 31,6% con CA IV en una superposición de 266 aa [Okuyama y cols., PNAS (EE. UU.) 89: 1315-1319 (1992)], y 30,5% con CA III en una superposición de 259 (Lloyd y cols., Genes. Dev., 1: 594-602 (1987)].

45 Además del dominio de CA, MN/CA IX ha adquirido extensiones tanto en el extremo N como C que no están relacionadas con las otras isoenzimas CA. La secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal, constituida por el ancla transmembrana y la cola intracitoplasmática, no muestra una homología significativa con ninguna secuencia proteínica conocida.

50 El gen MN se encontró claramente que era una secuencia novedosa derivada del genoma humano. La homología global entre las secuencias de ADNc de MN y las secuencias de ADNc que codifican diferentes isoenzimas CA está en un intervalo de homología de 48-50% que los expertos en la técnica consideran que es baja. Por lo tanto, el ADNc de la secuencia de MN no tiene una relación muy cercana con ninguna de las secuencias de ADNc de CA.

55 Únicamente las secuencias de nt con una relación muy cercana que tengan una homología de al menos 80-90% se hibridarían entre sí en condiciones restrictivas. Una comparación de las secuencias entre la secuencia del ADNc de MN que se muestra en la Figura 1 y una de ADNc correspondiente de la anhidrasa carbónica humana II (CA II) mostró que no existe ningún tramo de identidad entre las dos secuencias que sea lo suficientemente largo como para permitir que un segmento de la secuencia de ADNc de CA II tenga 25 o más nucleótidos para hibridarse en condiciones de 60 hibridación restrictivas al ADNc de MN o viceversa.

Una búsqueda de las secuencias de nt relacionadas con un gen MN en la biblioteca de datos EMBL no reveló 65 ninguna homología específica a excepción de 6 repeticiones de tipo Alu completas y 2 parciales con homología a secuencias de Alu que varían en el intervalo de 69,8% a 91% [Jurka y Milosavljevic, J. Mol. Evol. 32: 105-121 (1991)]. También se muestra que una secuencia proximal al extremo 5' de 222 pb de la región genómica presenta una gran homología con una región de LTR de HERV-K.

En general, las secuencias de nucleótidos que no están en las regiones Alu o de tipo LTR, preferiblemente de 25 bases o más, o todavía más preferiblemente de 50 bases o más, pueden analizarse y cribarse de la forma habitual y se encontraría que se hibridan en condiciones restrictivas únicamente a secuencias de nucleótidos de MN. Además, ninguna de las homologías dentro de las secuencias genómicas de tipo Alu en MN son lo suficientemente similares a las repeticiones Alu como para producir una señal de hibridación en condiciones de hibridación restrictivas. El porcentaje de homología entre las regiones de tipo Alu de MN y una secuencia estándar de Alu-J se indican de la forma siguiente:

10	Región de homología en la secuencia genómica de MN [SEC ID N.º: 5: Figura 2A-F]	SEC ID Nº	% de homología con la secuencia completa de Alu-I
15	921-1212	59	89,1%
20	2370-2631	60	78,6%
25	4587-4880	61	90,1%
30	6463-6738	62	85,4%
35	7651-7939	63	91,0%
	9020-9317	64	69,8%
			% de homología con media secuencia de Alu-I
	8301-8405	65	88,8%
	10040-10122	66	73,2%

40 *Proteínas y/o polipéptidos MN*

La frase “proteínas y/o polipéptidos MN” (proteínas/polipéptidos MN) en el presente documento se define como que significa proteínas y/o polipéptidos codificados por un gen MN o un fragmento del mismo. Una proteína MN ejemplar y preferida de acuerdo con esta invención tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 1. Las proteínas y/o polipéptidos MN preferidos son los que presentan una homología sustancial con la proteína MN que se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, dichas proteínas/polipéptidos MN sustancialmente homólogos son los que reaccionan con los anticuerpos específicos contra MN de esta invención, preferiblemente los Mab M75, MN12, MN9 y MN7 o sus equivalentes.

50 Un “polipéptido” o “péptido” es una cadena de aminoácidos unida covalentemente mediante enlaces peptídicos y en el presente documento se considera que está compuesta por 50 aminoácidos o menos. Una “proteína” en el presente documento se define como que es un polipéptido compuesto por más de 50 aminoácidos. El término polipéptido engloba los términos péptido y oligopeptido.

55 Las proteínas MN muestran diversas características interesantes: localización en la membrana celular, expresión dependiente de la densidad celular en células HeLa, correlación con el fenotipo tumorígeno de los híbridos celulares de fibroblastos somáticos y HeLa, y expresión en diversos carcinomas entre otros tejidos. La proteína MN puede encontrarse directamente en cortes de tejidos tumorales, pero no en los tejidos normales homólogos (con las excepciones que se indican más adelante en los tejidos normales de mucosa gástrica y de vesícula). MN se expresa también algunas veces en los especímenes de áreas de tejido con aspecto morfológico normal que muestran displasia y/o malignidad. Tomadas conjuntamente, estas características sugieren una posible implicación de MN en la regulación de la proliferación, diferenciación y/o transformación celulares.

65 Puede apreciarse que una proteína o polipéptido producidos por una célula neoplásica *in vivo* podría tener una secuencia diferente de la producida por una célula tumoral en cultivo celular o por una célula transformada. Así, las proteínas y/o polipéptidos MN que tienen secuencias variables de aminoácidos incluidas sin limitación, sustituciones, extensiones, delecciones, truncados de los aminoácidos y combinaciones de los mismos, entran dentro del alcance de

ES 2 296 412 T3

esta invención. También puede apreciarse que una proteína existente en los fluidos corporales se somete a procesos degradativos, tales como procesos proteolíticos; así, en los fluidos corporales, tales como el suero, pueden encontrarse proteínas MN que están significativamente truncadas y polipéptidos MN. La frase "antígeno MN" se usa en el presente documento para englobar proteínas y/o polipéptidos MN.

5 Se apreciará además que la secuencia de aminoácidos de proteínas y polipéptidos MN puede modificarse mediante técnicas genéticas. Pueden eliminarse o sustituirse uno o más aminoácidos. Dichos cambios en los aminoácidos pueden no provocar ningún cambio cuantificable en la actividad biológica de la proteína o polipéptido y producir proteínas o polipéptidos que están dentro del alcance de esta invención, así como, muteínas MN.

10 Las proteínas y polipéptidos MN de esta invención pueden prepararse de diversas formas de acuerdo con esta invención, por ejemplo, por recombinación, de forma sintética o sino de otra forma biológica, es decir, escindiendo enzimáticamente y/o químicamente proteínas y polipéptidos más largos. Un procedimiento preferido para preparar proteínas MN es por un medio recombinante. Los procedimientos particularmente preferidos para producir proteínas 15 MN recombinantes se describen más adelante para las proteínas GST-MN, MN 20-19, MN-Fc y MN-PA.

Producción recombinante de proteínas y polipéptidos MN

20 Un procedimiento representativo de preparar las proteínas MN que se muestran en la Figura 1 o un fragmento del mismo sería insertar el ADNc de MN de longitud completa o un fragmento apropiado del mismo en un vector de expresión adecuado tal como se ejemplifica a continuación. En Zavada y cols., documento WO 93/18152, referencia anterior, se describe la producción de una proteína de fusión GEX-MN (actualmente denominada GST-MN) usando el clon parcial 3X-ADNc (descrito anteriormente) en el vector pGEX-3X (Pharmacia). GST-MN no glicosilado (la proteína de fusión de MN, MN glutationa-S-transferasa) de células XL1-Blue.

25 Zavada y cols., documento WO 95/34650 describe la producción recombinante tanto de una proteína MN glicosilada expresada en células de insecto como de una proteína MN no glicosilada expresada en *E. coli* usando el plásmido de expresión pEt-22b [Novagen Inc.; Madison, WI (EE. UU.)]. Los vectores de expresión de baculovirus recombinantes se usaron para infectar células de insecto. La proteína glicosilada MN 20-19 se produjo por recombinación en 30 células sf9 infectadas con MN 20-19 [Clontech; Palo Alto, CA (EE. UU.)]. La proteína MN 20-19 carece del péptido de señal putativo (aas 1-37) de la SEC ID N.º: 6 (Figura 1), tiene añadida una metionina (Met) en el extremo N para la expresión, y un Leu-Glu-His-His-His-His-His [SEC ID N.º: 22] en el extremo C para la purificación.

35 Para insertar la porción de la secuencia de codificación de MN para la proteína de fusión GST-MN en sistemas de expresión alternativos, se diseño un conjunto de cebadores para la PCR. Los cebadores se construyeron para proporcionar sitios de restricción en cada extremo de la secuencia codificante, así como codones de inicio y terminación en marco. A continuación se muestran las secuencias de los cebadores, con indicaciones de los sitios de escisión de las 40 enzimas de restricción y los elementos importantes para la expresión.

Cebador n.º 20: extremo N

Inicio de la traducción

45 **5'GTCGCTAGCTCCATGGGTCATATGCAGAGGTTGCCCGGATGCAG 3'**

NheI

Ncol

NdeI

ADNc de MN n.º 1 (SEC. ID. N.º: 17)

Cebador n.º 19: extremo C

Terminación de la traducción

55 **5'GAAGATCTTACTCGAGCATTCTCAAGATCCAGCCTCTAGG 3'**

BglII

Soy

ADNc de MN (SEC. ID. N.º: 18)

60 Los cebadores de las SEC ID N.º: 17 y 18 se usaron para amplificar la secuencia codificante de MN presente en el vector GEX-3X-MN usando técnicas de PCR estándar. El producto resultante de la PCR (denominado MN 20-19) se sometió a electroforesis en un gel de 0,5% de agarosa/1 X TBE; se escindió la banda de 1,3 kb y se recuperó el ADN usando el Kit Gene Clean II de acuerdo con las instrucciones del fabricante [Bio101; LaJolla, CA (EE. UU.)].

Identificación de complementario(s) de la proteína MN

65 Se inició una búsqueda de proteína(s) que interactuara(n) con MN usando clonación para la expresión de los ADNc(s) correspondientes y una proteína de fusión MN-Fc como sonda. El ADNc de MN-Fc químérico se construyó

en el vector pSG5C mediante sustitución del ADNc de las secuencias de MN que codifican tanto el ancla transmembrana como la cola intracelular de la proteína MN con el ADNc que codifica el fragmento Fc de la IgG de ratón. El ADNc del fragmento Fc se preparó mediante RT-PCR del ADNc de Fc de hibridoma murino que producía el anticuerpo IgG2a.

5 El ADNc de MN-Fc químérico se expresó mediante transfección transitoria en células COS. Se transfecaron células COS usando leptofeción. La proteína MN-Fc recombinante se liberó a medio TC de las células transfectadas (debido a la falta de la región transmembrana), se purificó mediante cromatografía de afinidad sobre Proteína A Sepharose y se usó para experimentos ulteriores.

10 Los extractos de proteína de las células de transfección simulada y las células transfectadas con pSG5C-MN-Fc se analizaron mediante inmunotransferencia usando el MAb M75, SwaM-Px y ECL Detection® [sistema quimioluminiscente potenciado por ECL® para detectar restos de tirosina fosforilados; Amersham; Arlington, Hts., IL (EE. UU.)]. El tamaño de la proteína MN-Fc expresada por el vector MN-Fc corresponde a su peso molecular previsto por ordenador.

15 Se empleó proteína MN-Fc marcada con ³⁵S en un ensayo de unión a la superficie celular. Se encontró que se unía a diversas células de mamífero, por ejemplo, HeLa, Raji, COS, QT35, BL3. En el ensayo de adhesión celular se obtuvieron resultados similares usando proteína MN-Fc en placas de Petri bacterianas. Estos ensayos revelaron que la línea celular de adenocarcinoma de estómago KATO III carece de capacidad de interactuar con la proteína MN-Fc.

20 Este hallazgo permitió a los inventores usar células KATO III para la clonación para la expresión y cribado del ADNc que codificaba la proteína de unión de MN.

25 La colección de la expresión de ADNc en el vector pBK-CMV se preparó a partir de células HeLa densas y se usó para la transfección de células KATO III. Para la primera tanda de cribado, se transfecaron células KATO III mediante electroporación. Después de dos días de incubación, se permitió a las células que expresaban el ligando unirse a la proteína MN-Fc, después a Proteína A conjugada con biotina y finalmente se seleccionaron sedimentando con perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina. El ADN plasmídico se extrajo de las células seleccionadas y transformaron *E. coli*. Se escogieron colonias individuales de *E. coli* y se prepararon mezclas de 8-10 clones.

30 El ADN plasmídico de las mezclas se aisló y se usó en la segunda tanda de cribado.

35 En la segunda tanda de cribado, se transfecaron células KATO III mediante un procedimiento de DEAE dextrano. Para identificar la mezcla que contenía el ADNc de la proteína de unión de MN, se usó un procedimiento de ELISA basado en la unión de MN-Fc a las células transfectadas, y la detección usando Proteína A marcada con peroxidasa. Las mezclas se seleccionan en base a su capacidad de unirse a MN-Fc.

40 En la tercera tanda de cribado, se transfecaron ADN plasmídicos aislados de colonias bacterianas individuales de mezclas seleccionadas a células KATO III. Las células transfectadas se someten a unión con MN-Fc y detección con Proteína A como anteriormente. Es de esperar que este cribado ejemplar identifique un clon que contenga el ADNc que codifica el complementario putativo de la proteína MN. Ese clon después se secuenciaría y se confirmaría que el producto de la expresión se unía a la proteína MN mediante ensayo de adhesión celular. (transferencia Western con proteínas marcadas ("far-Western"), co-precipitación etc.) Después se prepararían hibridomas que producen Mab contra el producto de la expresión que permitirían realizar el análisis de las características biológicas de la proteína complementaria de MN.

45 *Preparación de anticuerpos específicos contra MN*

50 El término "anticuerpos" se define en el presente documento para que incluya no únicamente anticuerpos completos sino también fragmentos biológicamente activos de los anticuerpos, preferiblemente fragmentos que contienen las regiones de unión de antígenos. También se incluyen en la definición de anticuerpos los anticuerpos biespecíficos que son específicos para la proteína MN y otro antígeno específico de tejido.

55 Zavada y cols., documentos WO 93/18152 y WO 95/34650 describen en detalle los procedimientos para producir anticuerpos específicos contra MN, y detallan las etapas para preparar anticuerpos específicos representativos contra MN tales como los anticuerpos monoclonales M75, MN7, MN9, y MN12. Los epítopos antigenicos de MN preferidos comprenden: aa 62-67 (SEC ID N.º: 10); aa 61-66, aa 79-84, aa 85-90 y aa 91-96 (SEC ID N.º: 98); aa 62-65, aa 80-83, aa 86-89 y aa 92-95 (SEC ID N.º: 99); aa 62-66, aa 80-84, aa 86-90 y aa 92-96 (SEC ID N.º: 100); aa 63-68 (SEC ID N.º: 101); aa 62-68 (SEC ID N.º: 102); aa 82-87 y aa 88-93 (SEC ID N.º: 103); aa 55-60 (SEC ID N.º: 11); aa 127-147 (SEC ID N.º: 12); aa 36-51 (SEC ID N.º: 13); aa 68-91 (SEC ID N.º: 14); aa 279-291 (SEC ID N.º: 15); y aa 435-450 (SEC ID N.º: 16). El Ejemplo 2 proporciona una descripción más detallada sobre los epítopos de MN antigenicos preferidos.

60 *Anticuerpos biespecíficos* Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse acoplando químicamente dos anticuerpos de la especificidad deseada. Los MAb biespecíficos preferiblemente pueden desarrollarse mediante hibridación somática de 2 hibridomas. Los MAb biespecíficos dirigidos a una proteína MN y a otro antígeno pueden producirse fusionando un hibridoma que produce MAb específicos contra MN con un hibridoma que produce MAb específicos contra otro antígeno. Por ejemplo, una célula (un cuadroma), formada mediante la fusión de un hibridoma que produce un MAb específico contra MN y un hibridoma que produce un anticuerpo contra una célula citotóxica, producirá

ES 2 296 412 T3

un anticuerpo híbrido que tiene la especificidad de los anticuerpos progenitores. [Véase, por ejemplo, Immunol. Rev. (1979); Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol., 41: 793 (1977); van Dijk y cols., Int. J. Cancer, 43: 344-349 (1989).] Así, un hibridoma que produce un MAb específico de MN puede fusionarse con un hibridoma que produce, por ejemplo, un anticuerpo contra T3 proporcionando un anticuerpo biespecífico contra MN/T3 que puede dirigir 5 linfocitos T citotóxicos contra células tumorales que expresen MN.

Para usos terapéuticos y/o de obtención de imágenes puede preferirse que los anticuerpos sean fragmentos de anticuerpo biológicamente activos, preferiblemente fragmentos diseñados genéticamente, más preferiblemente fragmentos diseñados genéticamente de las regiones VH y/o VL, y todavía más preferiblemente que comprenda las regiones 10 hipervariables de los mismos. Sin embargo, para algunos usos terapéuticos, se preferirían anticuerpos biespecíficos dirigidos a la proteína MN y a las linfocitos citotóxicos.

Epítopos

15 La afinidad de a MAb por péptidos que contienen un epítopo depende del contexto, por ejemplo de si el péptido es una secuencia corta (4-6 aa), o de si dicho péptido corto está flanqueado por secuencias más largas de aa en uno o ambos lados, o de si al realizar pruebas para determinar la presencia de un epítopo, los péptidos están en solución o inmovilizados sobre una superficie. Por lo tanto, los expertos en la técnica esperarían que los epítopos representativos 20 que se describen en el presente documento para los MAb específicos contra MN varíen dependiendo del uso de esos MAb.

El término "correspondiente a un epítopo de una proteína/polipéptido MN" se entenderá que incluye la posibilidad práctica de que, en algunos casos, las variaciones en las secuencias de aminoácidos de una proteína o polipéptido natural pueda ser antigenica y confiera inmunidad protectora contra enfermedad neoplásica y/o efectos anti-tumorigénicos. 25 Las posibles variaciones de las secuencias incluyen, sin limitación, sustituciones, extensiones, delecciones, truncados, interpolaciones de aminoácidos y combinaciones de las mismas. Dichas variaciones entran dentro del alcance de la invención que se contempla con la condición de que la proteína o polipéptido que las contienen sean inmunógenos y que produzcan anticuerpos cuando dicho polipéptido o proteína reaccionan con proteínas y polipéptidos MN naturales 30 en un grado suficiente para proporcionar una inmunidad protectora y/o actividad anti-tumorigena cuando se administra en forma de una vacuna.

Epítopo para MAb M75

Se considera que el epítopo M75 está presente en al menos dos copias dentro de la 6 X repetición en tandem de 6 35 aminoácidos [aa 61-96 (SEC ID N.º: 97)] en el dominio de proteoglicano de la proteína MN. Los péptidos ejemplares que representan ese epítopo dependiendo del contexto pueden incluir los siguientes péptidos de esa repetición en tandem: EEDLPS (SEC ID N.º: 10; aa 62-67); GEEDLP (SEC ID N.º: 98; aa 61-66; aa 79-84; aa 85-90; aa 91-96); EEDL (SEC ID N.º: 99; aa 62-65; aa 80-83; aa 86-89; aa 92-95); EEDLP (SEC ID N.º: 100; aa 62-66; aa 80-84; aa 86-90; aa 92-96); EDLPSE (SEC ID N.º: 101; aa 63-68); EEDLPSE (SEC ID N.º: 102; aa 62-68); y DLPGEE (SEC ID 40 N.º: 103; aa 82-87, aa 88-93).

Se prepararon tres péptidos sintéticos a partir de la secuencia de aa deducida para el dominio EC de la proteína MN que se muestra en la Figura 1. Esos péptidos sintéticos son representados por los aa 51-72 (SEC ID N.º: 104), aa 61-85 (SEC ID N.º: 105) y aa 75-98 (SEC ID N.º: 106). Cada uno de esos péptidos sintéticos contiene el motivo EEDLP 45 (SEC ID N.º: 100) y se demostró que reaccionaban con el MAb M75.

Otros epítopos

50 *Mab MN9.* El anticuerpo monoclonal MN9 (Mab MN9) reacciona con el mismo epítopo que Mab M75, tal como se describe anteriormente. Al igual que Mab M75, Mab MN9 reconoce tanto la proteína de fusión GST-MN como la proteína MN nativa igual de bien.

Los Mab que corresponden a Mab MN9 pueden prepararse de forma reproducible mediante cribado de una serie de 55 mab preparados contra una proteína/polipéptido MN, tal como la proteína de fusión GST-MN, contra los péptidos que representan el epítopo de los Mab M75 y MN9. De forma alternativa, el sistema Novatope [Novagen] o la competición con el Mab M75 depositado podría usarse para seleccionar mab comparables a los Mab M75 y MN9.

50 *Mab MN12.* El anticuerpo monoclonal MN12 (Mab MN12) es producido por el hibridoma linfocítico murino MN 12.2.2 que se depositó con el código ATCC HB 11647. Los anticuerpos que corresponden a Mab MN12 también pueden prepararse, de forma análoga al procedimiento que se describe anteriormente para Mab MN9, mediante cribado de una serie de anticuerpos preparados contra una proteína/polipéptido MN, contra el péptido que representa el epítopo para Mab MN12. Ese péptido es del aa 55 al aa 60 de la Figura 1 [SEC ID N.º: 11]. También podría usarse el sistema Novatope para encontrar anticuerpos específicos para dicho epítopo.

65 *Mab MN7.* El anticuerpo monoclonal MN7 (Mab MN7) se seleccionó a partir de mab preparados contra GST-MN no glicosilada tal como se describe anteriormente. Reconoce el epítopo representado por la secuencia de aminoácidos del aa 127 al aa 147 [SEC ID N.º: 12] de la proteína MN de la Figura 1. De forma análoga a los procedimientos que se describen anteriormente para los Mab MN9 y MN12, los mab que corresponden al Mab MN7 pueden prepararse

seleccionando mab preparados contra una proteína/polipéptido MN que reacciona con el péptido que tiene la SEC ID N.º: 12, o por los medios alternativos mencionados.

5 *Intracuerpos específicos de MN - Destrucción tumoral dirigida mediante la expresión intracelular de anticuerpos específicos contra MN para bloquear el transporte de proteína MN a la superficie celular*

El gen que codifica los anticuerpos puede ser manipulado de forma que el dominio que se une a antígeno pueda expresarse intracelularmente. Dichos “intracuerpos” que se dirigen a la luz del retículo endoplasmático proporcionan un mecanismo simple y eficaz para inhibir el transporte de las proteínas de la membrana plasmática a la superficie 10 celular. [Marasco; W.A., “Review - Intrabodies: turning the humoral immune system outside in or intracellular immunization”, Gene Therapy 4: 11-15 (1997); Chen y cols., “Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy”, Hum. gen Ther., 5; Mhashilkar y cols., J. Virol., 71: 6486-6494 (5): 595-601 (1994); Mhashilkar y cols., EMBO J., 14: 1542-1551 (1995) (1997); Marasco (Ed.), Intrabodies: Basic Research and Clinical 15 Gene Therapy Applications, (Springer Life Sciences 1998; ISBN 3-540-64151-3) (resume estudios preclínicos de los laboratorios de todo el mundo que han usado intracuerpos); Zanetti y Capra (Editores), “Intrabodies: From Antibody Genes to Intracellular Communication”, The Antibodies: Volumen 4. [Harwood Academic Publishers; ISBN 90-5702-559-0 (Dec. 1997)]; Jones y Marasco, Advanced Drug Delivery Reviews, 31 (1-2): 153-170 (1998); Pumphrey y Marasco, Biodrugs, 9(3): 179-185 (1998); Dachs y cols., Oncology 15 Res., 9 (6-7): 313-325 (1997); Rondon y Marasco, Ann. Rev. Microbiol., 51: 257-283 (1997)]; Marasco, W.A., Immunotechnology, 1 (1): 1-19 (1995); y Richardson y 20 Marasco, Trends in Biotechnology. 13(8): 306-310 (1995).]

25 Los intracuerpos específicos de MN pueden evitar la maduración y el transporte de la proteína MN a la superficie celular y así evitar que la proteína MN funcione en un proceso onco-génico. Los anticuerpos dirigidos contra los dominios EC, TM o IC de MN pueden ser de utilidad en este caso. Se considera que la proteína MN actúa de mediador de la transducción de señales transfiriendo señales del dominio EC a la cola IC y después actúa de mediador asociándose con otras proteínas intracelulares en el interior de las células. Los intracuerpos específicos de MN podrían alterar esa asociación y perturbar esa función de MN.

30 La inactivación de la función de la proteína MN podría provocar una inversión de las células tumorales a un fenotipo no transformado. [Marasco y cols. (1997), referencia anterior.] La expresión del ADNc de MN en las células de carcinoma de cuello de útero, según se demuestra en el presente documento, ha demostrado que la pérdida de la proteína MN ha provocado la supresión del crecimiento en las células transfectadas. De forma similar es de esperar que la inhibición del transporte de la proteína MN a la superficie celular tuviera efectos similares. Para confirmar esa esperanza deben estudiarse la clonación y la expresión intracelular de la región variable de MAb M75.

35 40 Preferiblemente, los anticuerpos específicos contra MN producidos intracelularmente son anticuerpos monocatenarios, específicamente fragmentos de la región variable monocatenaria o sFv, en los que los dominios variables de las cadenas pesada y ligera se sintetizan en forma de un único polipéptido y se separan mediante un péptido de enlace flexible, preferiblemente (Gly₄-Ser)₃ [SEC ID N.º: 116].

45 Pueden usarse anticuerpos específicos de MN producidos intracelularmente en terapia para tratar enfermedad pre-neoplásica/neoplásica transfectando las células preneoplásicas/neoplásicas que expresan la proteína MN de forma anormal con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica fragmentos de la región variable de un anticuerpo específico contra MN, ligados operativamente a una secuencia de control de la expresión. Preferiblemente dicha secuencia de control de la expresión comprendería el promotor del gen MN.

Transferencia de genes mediada por anticuerpos usando anticuerpos específicos contra MN o péptidos para dirigirse contra las células tumorales que expresan MN

50 Sería de esperar que un anticuerpo específico contra MN o un péptido ligado covalentemente a polilisina, un polímero capaz de compactar el ADN y neutralizar sus cargas negativas, transportara eficazmente ADN biológicamente activo a una célula tumoral que exprese MN. Si el ADN empaquetado contiene el gen HSVtk controlado por el promotor de MN, el sistema tendría una doble especificidad para el reconocer y expresarse únicamente en las células tumorales que expresan MN. El ADN empaquetado también podría codificar citocinas para inducir la actividad de 55 CTL, o para otras moléculas biológicamente activas. Un anticuerpo específico contra MN ejemplar es MAb M75 (o, por ejemplo, en forma de un anticuerpo monocatenario, o en forma de su región variable).

Los siguientes ejemplos tienen únicamente fin ilustrativo y no se pretende que limiten la invención en modo alguno.

60 Ejemplo 1

Transformación transitoria de células de mamífero mediante proteína MN

Este ejemplo (1) examina las consecuencias biológicas de transfectar células humanas o murinas con ADNc de de 65 MN insertado en vectores de expresión, principalmente desde el punto de vista de la implicación de la proteína MN en la oncogénesis; (2) determina si la proteína MN ejerce actividad de anhidrasa carbónica, y si dicha actividad es relevante para la transformación morfológica de células; y (3) analiza si la proteína MN es una molécula de adhesión celular (CAM).

ES 2 296 412 T3

Sinopsis

Métodos: se insertó ADNc de MN en 3 vectores de expresión y se usó para transfectar células humanas o murinas. La proteína MN se detectó mediante transferencia Western, radioinmunoensayo o tinción de inmunoperoxidasa; en 5 todas las pruebas se usó el anticuerpo monoclonal M75 específico de MN (MAb M75). La actividad de anhidrasa carbónica se determinó por la velocidad de acidificación del tampón carbonato en atmósfera de CO₂.

Resultados: (1) las células (células CGL-1 humanas y NIH3T3 murinas) que se transfectaron con ADNc de MN mostraron transformación morfológica, pero revirtieron a fenotipo normal después de 4-5 semanas. (2) Esta reversión 10 no se debió a la pérdida, silenciamiento ni mutación del inserto de MN. (3) La proteína MN tiene la actividad enzimática de anhidrasa carbónica, que puede inhibirse con acetazolamida; sin embargo, la inhibición de la actividad enzimática de anhidrasa carbónica no afectó a la transformación. (4) La proteína MN es una proteína de adhesión, implicada en los contactos intercelulares.

15 *Antecedentes*

Este ejemplo se refiere a la transformación de células de mamífero mediante ADNc de MN insertado en vectores de expresión derivados de retrovirus. Dichos vectores son adecuados para la integración eficaz y estable en el ADN 20 celular y para la expresión continuada de proteína MN. Las células transfectadas con estas construcciones mostraron transformación morfológica, pero después de algún tiempo, revirtieron al fenotipo normal.

Las sulfonamidas, que incluyen la acetazolamida, son inhibidores muy potentes de las anhidrasas carbónicas conocidas [Maren y Ellison, Mol. Pharmacol., 3: 503-508 (1967)]. La acetazolamida se analizó para determinar si inhibía 25 también la anhidrasa carbónica MN, y si lo hacía, si la inhibición de la enzima afectaba a la transformación celular.

25 Hay razones para pensar que la proteína MN podría estar implicada en las interacciones intercelulares directas: A) observaciones anteriores indicaban una similitud funcional entre la proteína MN y las glicoproteínas superficiales de los virus encapsulados, que actúan de mediadores de la adsorción vírica a los receptores de la superficie celular, y MN participó en la formación de viriones fenotípicamente mixtos del virus de la estomatitis vesicular. B) La capacidad 30 de inducción de la expresión de la proteína MN por las células HeLa en crecimiento en monocapas de gran densidad sugiere que puede estar implicada en las interacciones directas entre las células. C) Finalmente, existe una similitud estructural entre la proteína MN y la tirosina fosfatasa receptora b, que también contiene dominios de proteoglicano y de anhidrasa carbónica; esos dominios actúan de mediadores en el contacto directo entre las células del sistema nervioso en desarrollo [Peles y cols., Cell, 82: 251-260 (1995)]. Por lo tanto, se analizó la proteína MN para ver si se 35 unía a los receptores de la superficie celular; el resultado fue claramente positivo de que se unía.

Materiales y Métodos

Líneas celulares

40 Las células que se usaron en este ejemplo eran: CGL1 y CGL3 - respectivamente híbridos no tumorigen y tumorigen de HeLa x fibroblasto [Stanbridge y cols., Somat. Cell Genet., 7: 699-712 (1981)], línea celular NIH3T3 murina, células HeLa y células Vero de mono. Las células NIH3T3 se sembraron a una densidad muy baja para obtener 45 colonias iniciadas por células únicas. Se seleccionó la colonia de aspecto más normal, denominada subclon 2, para usar en los experimentos que se describen en este ejemplo.

Vectores de expresión

50 El ADNc de longitud completa de MN se obtuvo a partir de un subclon en pBluescript [Pastorek y cols., Oncogen, 9: 2877-2888 (1994)]. Para eliminar las secuencias no codificantes en 5' y 3', que podrían reducir la posterior expresión génica, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El cebador 5' TAGACAGATCTAC GATGGCTCCCTGTGCCAG [SEQ ID N°: 88] engloba un sitio de inicio de la traducción y un sitio de clonación BgIII, y el cebador 3' ATTCCTCTAGACAGTTACCGGCTCCCCCTCAGAT [SEQ ID NO: 89] engloba un codón de terminación y un sitio de clonación XbaI. En la reacción se usó ADNc de MN de longitud completa como 55 plantilla y ADN polimerasa de Pfu [Stratagene; LaJolla, CA (EE. UU.)].

El producto de la PCR se secuenció y se encontró que era idéntico a la plantilla; no portaba mutaciones. El producto de la PCR que albergaba solamente la secuencia codificante de MN se insertó en tres vectores: 1. pMAMneo [Clontech; Palo Alto, CA (EE. UU.)] plásmido que permite la expresión inducible de dexametasona controlada por el promotor de la repetición terminal larga (LTR) MMTV y que contiene un gen neo para la selección de transformantes en medio suplementado con el antibiótico Geneticina (G418). 2. Vector de expresión retroviral pGD [Daley y cols., Science, 247: 824-829 (1990); amablemente proporcionado por el Prof. David Baltimore, Nueva York-Cambridge] que contiene el promotor MLV-LTR y el gen neo para la selección mediante el antibiótico G418. 3. Vector de expresión de virus vaccinia pSC11 [Chakrabarti y cols., Mol. Cell. Biol., 5: 3403-3409 (1985)]. La transfección se realizó mediante 60 una precipitación con fosfato cálcico de acuerdo con Sambrook y cols. (editores.), Molecular Cloning. A laboratory manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

ES 2 296 412 T3

Se usó la cepa Praha clon 13 del virus vaccinia como virus progenitor [Kutinova y cols., Vaccine, 13: 487-493 (1995)]. Se preparó un virus vaccinia recombinante mediante un procedimiento estándar [Perkus y cols., Virology, 152: 285-297 (1986)]. Se seleccionaron los virus recombinantes y se purificaron en placas dos veces en células de rata sin timidina cinasa RAT2 [Topp, W. C., Virology, 113: 408-411 (1981)] en presencia de 5'bromodesoxiuridina (100 μ g/ml). Las placas azules se identificaron cubriendolas con agar que contenía 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida (X-Gal) (200 μ g/ml).

10 *Ensayo de CA*

La actividad de la anhidrasa carbónica se midió mediante un micrométodo [Brion y cols., Anal. Biochem. 175: 289-297 (1988)]. En principio, se mide la velocidad de la reacción $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ en base al tiempo necesario para la acidificación del tampón carbonato, y se detecta con rojo fenol como indicador del pH. Esta reacción se realiza incluso en ausencia de la enzima, con t_0 = tiempo de control (este se fijó en 60 segundos). La anhidrasa carbónica reduce el tiempo de acidificación a t ; una unidad de la actividad enzimática reduce el tiempo a la mitad del tiempo de control: $t/t_0 = 1/2$.

Para el experimento, la proteína MN se inmunoprecipitó con Mab M75 de extracto de células Vero en tampón RIPA (1% de Triton X 100, 0,1% de desoxicolato, fluoruro de fenilmethylsulfonilo 1 mM y 200 unidades inhibidoras de tripsina/ml de Trasitol en PBS, pH 7,2) infectadas con construcción de vaccinia-MN, después las células desarrollaron el efecto citopático, o con vaccinia "vacío" como control. El complejo de MN + anticuerpo posteriormente se adsorbió en Proteína A - células de *Staphylococcus aureus* [Kessler, S. W., J. Immunol., 115: 1617-1624 (1975)] y se enjuagó 2 veces con PBS y 2 veces con tampón carbonato 1 mM, a pH 8,0. El precipitado se resuspendió en el mismo tampón y se añadió a la mezcla de reacción. Se analizó acetazolamida (Sigma) para determinar la inhibición de anhidrasa carbónica [Maren y Ellison, referencia anterior]. En extractos de células infectadas usadas para la inmunoprecipitación, se determinó la concentración de proteínas totales mediante el procedimiento Lowry [Lowry y cols., J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)] y la de la proteína MN mediante un radioinmunoensayo competitivo tal como se describe en Zavada y cols., Int. J. Cancer. 54: 268-274 (1993).

30 *Transferencias Western*

La transferencia Western y el desarrollo de las transferencias usando M75 marcado con ^{125}I y autorradiografía se realizaron como anteriormente [Pastorekova y cols., Virology, 187: 620-626 (1992); y Zavada (1993), referencia anterior].

35 *Ensayo de adhesión*

Para el ensayo de adhesión [Hoffman S., "Assays of cell adhesion," En: Cell-cell Interactions, (Stevenson y cols. editores) páginas 1-30 (IRL Press at Oxford University Press; Oxford, N.Y., Tokio; 1992)], alícuotas de 25 μ l de proteína MN (purificada por afinidad pGEX-3X MN) [Zavada y cols. (1993), referencia anterior] o de proteínas de control se sembraron en gotas en placas de Petri bacteriológicas de 5 cm de diámetro y se permitió que se unieran durante 2 horas a temperatura ambiente. Esto proporcionó áreas circulares recubiertas de proteína de 4-5 mm de diámetro. La proteína MN se diluyó a 10 μ g/ml en tampón de carbonato 50 mM, a pH 9,2. De forma similar se prepararon parches de proteínas adsorbidas de control. Estas incluían colágenos de tipo I y IV, fibronectina, laminina y gelatina (productos de Sigma), diluidos y absorbidos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante; También se incluyeron FCS y BSA. Después de aspirar las gotas, los patos se enjuagaron 2 veces con PBS y se saturaron durante 1 hora con DMEM suplementado con 5% de FCS. Las pacas se sembraron con 5×10^5 células en 5 ml de DMEM + 5% de FCS y se incubaron toda la noche a 37°C. Las placas se enjuagaron con PBS, y las células únicas se fijaron con formaldehído, se posfijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa.

50

Resultados

1. *Transformación y reversión de las células CGL1 transfectadas con ADNc de MN*

55 Dado que la expresión de proteína MN se correlaciona con la capacidad tumorígena de los híbridos de HeLa x fibroblasto [Zavada y cols. (1993), referencia anterior], primero se analizaron las células híbridas CGL1 no tumorígenas. Esas células, transfectadas con la construcción pMAM.MN, después de la selección con Geneticina, formaron colonias con diversos grados de transformación; algunas de ellas tenían aspecto normal. Aunque las células CGL1 normales se inhiben por contacto, creciendo en orientación paralela, las células transformadas formaron colonias muy densas, lo que mostraba la pérdida de la inhibición por contacto. Dichas colonias crecieron más lentamente que las CGL1 originales.

Después de la subclonación, las células aisladas de las colonias transformadas segregaron revertentes. La reversión 65 fue un proceso gradual, por etapas; había colonias con grados diferentes de reversión. Después de 2 pasos, toda la población de células se hizo morfológicamente indistinguible de las CGL1 normales. Esto se debía a la reversión de algunas células y a la ventaja en la selección de las revertentes, que crecieron más rápido que las células transformadas. A pesar de los intentos repetidos, no se obtuvo ni un sólo clon de células transformadas de forma estable. No se

ES 2 296 412 T3

encontraron colonias transformadas en las células CGL1 transfectadas con un plásmido de control pMAM “vacío”. El crecimiento de los revertentes CGL1 + pMAM.MN en medio suplementado con 5 μ g/ml de dexametasona durante 7 días potenció la producción de proteína MN, pero la morfología de las células no volvió a ser la de las transformadas.

5 2. Rescate de MN transformante de las revertentes

La reversión de las células transformadas con MN al fenotipo normal podía tener al menos 4 causas: A) pérdida del inserto de MN; B) silenciación del inserto de MN, por ejemplo, mediante metilación; C) mutación del inserto de MN; D) activación de un gen supresor, que codifique un producto que neutralice la actividad de transformación de la 10 proteína MN; E) pérdida de una proteína de unión de MN. Para decidir entre estas alternativas, se diseñó el siguiente experimento.

Se insertó ADNc de MN en pGD, un vector derivado del virus de la leucemia murino - MLV. Así se diseñó un 15 virus defectuoso, que contenía el gen MN y marcador selectivo neo en lugar de los genes que codificaban las proteínas víricas estructurales. Con esta construcción, se transfectaron células NIH3T3 murinas. En el medio suplementado con Geneticina, las células formaron colonias con fenotipos que variaban entre muy transformadas a aparentemente normales. Todas las colonias transformadas y aproximadamente 50% de las colonias normales expresaban proteína 20 MN. Al contrario que las células NIH3T3 normales, las transformadas también podían formar colonias sobre agar blando, lo que reflejaba la pérdida de la dependencia del anclaje, característica de la transformación celular. Al pasar, las células aisladas de las colonias transformadas revertían a la morfología normal, y al mismo tiempo, perdían la 25 capacidad de formar colonias en agar blando, aunque todavía expresaban la proteína MN. Esta presencia permanente de la proteína MN en las revertentes descartaba las alternativas A) y B) anteriores, es decir, la pérdida o silenciación del gen MN como causa de la reversión.

Para decidir entre las otras 3 alternativas, se superinfectaron las revertentes con MLV vivos con capacidad de 30 replicación. Este virus crece en las células NIH3T3 sin manifestaciones morfológicas, y opera como “cooperador” para la construcción pGD.MN. La progenie vírica de los revertentes infectados con MLV representa un complejo vírico artificial [pGD.MN + MLV]. Este está constituido por 2 tipos de viriones: partículas estándar de tipo MLV y viriones que contienen el genoma de pGD.MN, encapsulado en las proteínas estructurales que proporciona el virus “cooperador”. Este complejo vírico era infeccioso para las células NIH3T3 recientes; de nuevo inducía en ellas la transformación morfológica y la capacidad de formar colonias en agar.

Al contrario que con NIH3T3 transfectadas con pGD.MN, todas las colonias de células infectadas con complejo de [pGD.MN + MLV], que crecían en presencia Geneticina, se transformaron uniformemente y contenían proteínas 35 MN. Los transformantes una vez más revirtieron a fenotipo normal aunque seguían produciendo el complejo infeccioso [pGD.MN + MLV], que indujo la transformación en células NIH3T3 recientes. Este ciclo de infección-transformación-reversión se repitió 3 veces con el mismo resultado. Esto descartaba la alternativa C) - mutación de ADNc de MN como causa de la reversión.

Las células NIH3T3 normales formaban una monocapa inhibida por contacto de células planas, que no se tenía 40 con Mab M75 e inmunoperoxidasa. Las células infectadas con el complejo [pGD.MN + MLV] claramente se habían transformado: crecían con un patrón caótico y mostraban la pérdida de la inhibición por contacto. Algunas de las células mostraban signos de apoptosis. Dos pasos después, la población celular reversionó totalmente al fenotipo original 45 como resultado de la frecuente emergencia de revertentes y de sus ventajas en la selección (crecimiento más rápido y una mayor eficacia de plaqueo). De hecho, las revertentes parecían crecer con una densidad de saturación algo menor que las células NIH3T3 originales, lo que demostraba un mayor grado de inhibición por contacto.

Las células NIH3T3 de control no contenían nada de proteína MN (transferencia Western); mientras que tanto las 50 células transformadas como las revertentes contenían la misma cantidad y la misma proporción de bandas de 54 y 58 kDa de proteína MN. En un gel no reductor, la proteína MN estaba presente en forma de oligómeros de 153 kDa. De forma consistente, por RIA competitivo, se encontraba aproximadamente 40 ng de MN/mg de proteína total tanto en las células transformadas como en las revertentes.

55 3. Actividad de anhidrasa carbónica y su inhibición

Dado que el dominio de anhidrasa carbónica representa una parte considerable de la proteína MN (véase la Figura 8), se realizaron pruebas para determinar si de hecho era enzimáticamente activo. Las células control infectadas con la construcción de control, que contenía más de la proteína MN que otras células que se usan en los presentes experimentos, sirvieron como fuente de la proteína MN. Las células se extrajeron con tampón RIPA, y la proteína MN se 60 concentró y se purificó parcialmente mediante precipitación con MAb M75 y SAC. Se analizó el inmunoprecipitado para determinar la actividad de CA. 78 μ l de precipitado contenían 1 unidad de la enzima. A partir del extracto, se determinó la concentración de las proteínas totales y de la proteína MN; 1 unidad de enzima correspondía a 145 ng de proteína MN o a 0,83 mg de proteína total. El inmunoprecipitado de células Vero infectadas con virus de control no presentaba actividad enzimática. La actividad de anhidrasa carbónica de MN se inhibió mediante acetazolamida; una concentración del fármaco $1,53 \times 10^{-8}$ M redujo la actividad enzimática al 50%.

Las pruebas preliminares mostraron que los cultivos confluentes de células HeLa o NIH3T3 toleraban una concentración de acetazolamida de 10^{-5} - 10^{-3} M durante 3 días sin señales de toxicidad y sin ningún efecto sobre la

ES 2 296 412 T3

5 morfología celular. En cultivos dispersos, acetazolamida 10^{-5} M no inhibió el crecimiento celular, pero 10^{-4} M ya provocaba una inhibición parcial. Así, se añadió acetazolamida 10^{-5} M a células NIH3T3 recién transformadas con el complejo [pGD.MN + MLV]. Después de 4 días de incubación, las colonias se fijaron y se tiñeron. No se observaron diferencias entre las células cultivadas en presencia o ausencia de acetazolamida; ambas no podían diferenciarse de las células NIH3T3 transformadas correctamente. Así, la actividad enzimática de anhidrasa carbónica no es relevante para la actividad de transformación de la proteína MN.

4. Ensayo de adhesión celular

10 Para determinar si una proteína MN es una molécula de adhesión celular (CAM), se realizaron ensayos de adhesión en placas de Petri plásticas bacteriológicas (sin tratamiento para utilizar con cultivo tisular). Las células no se adhieren a las superficies de dichas placas, a no ser que las placas estén recubiertas con una proteína de unión. Las células NIH3T3 se adhirieron, se extendieron y crecieron sobre los parches de proteína MN adsorbida. Únicamente muy pocas células se unieron fuera de las áreas recubiertas con proteína MN.

15 15 Otras variantes del experimento demostraron que las células NIH3T3 se adherían y se extendían sobre parches de colágeno I y IV, fibronectina y laminina adsorbidas. Las células NIH3T3 no se unieron a los puntos de gelatina, FCS o BSA adsorbidas.

20 20 Las células CGL1, HeLa y Vero también se adhirieron a la proteína MN, pero 3 líneas celulares de leucemia no mostraron adherencia. Las células CGL3, que expresaban proteína MN potenteamente se adhirieron menos eficazmente a los puntos de proteína MN dots que CGL1. La presencia de acetazolamida 10^{-4} M en el medio no afectó a la adhesión celular.

25 25 Para confirmar la especificidad de la adhesión, se adsorbió proteína MN con SAC cargadas con MAb M75 (contra MN) o MAb M67, contra un antígeno no relacionado (Pastorekova y cols., referencia anterior), antes de aplicarla a la superficie de placas de Petri. La absorción con el complejo SAC-M75 abrogó totalmente la actividad de unión celular, mientras que la absorción con SAC-M67 no produjo ningún efecto.

30 Resultados adicionales de adhesión celular

35 Una MN acortada, sin los segmentos TM e IC, es segregada al medio a través de células 5ET1 (un híbrido de HeLa X fibroblasto, análogo a las células CGL3 que expresan proteína MN abundantemente) o a través de células Vero infectadas con W que porta ADNc de MN sin las secuencias de TM e IC. La proteína MN segregada se purificó del medio y se analizó en ensayos de adhesión celular. Las células se adhirieron, se extendieron y crecieron sobre los parches de proteína MN completa adsorbida, pero no sobre los puntos que carecían de las regiones TM e IC. También se han descrito resultados análogos para algunas otras moléculas de adhesión. Una variedad de células (NIH3T3, CGL1, CGL3, HeLa, XC) se unieron a los puntos de proteína MN lo que sugiere que el/los receptor(es) de MN son habituales en la superficie de las células de vertebrado.

40 40 También se realizaron pruebas con proteínas de la matriz extracelular o con proteínas de control sembradas en puntos sobre nitrocelulosa. Las transferencias en puntos se trataron con solución de proteína MN. La proteína MN unida se detectó con MAb M75. La proteína MN se adsorbía a los puntos de colágeno I y IV, pero no fibronectina, laminina, gelatina ni BSA.

45 45 *Perspectivas terapéuticas.* Existen muchos principios nuevos de tratamiento del cáncer que emplean oncoproteínas o moléculas que interactúan con ellas como dianas [Mendelsohn y Lippman, "Principles of molecular cell biology of cancer: growth factors," In: DeVita y cols., editores., Cancer: principles and practice of oncology, páginas 114-133 4^a ed., Filadelfia: Lippincott (1993); DeVita y cols., editores, Biologic therapy of cancer, 2^a ed., Filadelfia: Lippincott (1995)]. La proteína MN y al menos algunos de sus ligandos (o receptores) parecen ser particularmente adecuados para esos fines.

Ejemplo 2

55 Identificación del sitio de unión de MN

La proteína MN es una molécula de adhesión celular asociada a tumores (CAM). Para identificar su sitio de unión, se sintetizaron una serie de oligopéptidos superpuestos, que abarcaban el dominio del extremo N de la proteína MN. 60 El dominio N-terminal es homólogo al de los proteoglicanos y contiene una repetición en tandem de seis aminoácidos.

65 La serie de oligopéptidos se analizaron mediante el procedimiento de ensayo del adhesión celular esencialmente tal como se describe anteriormente en el Ejemplo 1. Los oligopéptidos sintéticos se inmovilizaron sobre superficies plásticas hidrófobas para observar si actuaban de mediadores de la unión, extensión y crecimiento de las células. También se investigó si los oligopéptidos o anticuerpos inhibían la unión de las células (NIH3T3, HeLa y CGL1) a proteína MN purificada que recubre dichas superficies plásticas. La proteína MN se purificó por afinidad sobre agarosa ligada covalentemente a sulfonamida, ya que la proteína MN engloba un dominio de CA.

Se encontró que varios de los oligopéptidos eran biológicamente activos: (i) cuando se inmovilizan sobre el plástico, actúan de mediadores de la unión de las células (NIH3T3, HeLa y a CGL1); (ii) cuando se añaden al medio, compiten por la unión a las células con la proteína MN inmovilizada; (iii) estos oligopéptidos, presentes en el medio no inhiben la unión de las células a plástico TC, pero evitan la adhesión intercelular y la formación de contactos intercelulares; (iv) el tratamiento de la proteína MN inmovilizada y de los péptidos activos con MAb M75 abroga su afinidad por las células; y (v) se determinó que el sitio de unión de MN era muy similar o idéntico al epítopo de MAb M75, y al menos dos copias del mismo están localizadas en la repetición en tandem de 6 veces de 6 aminoácidos [aa 61-96 (SEC ID N.º: 97)] en el dominio de tipo proteoglicano de la proteína MN.

10 Se concluyó que la proteína MN expresada ectópicamente con mayor probabilidad participa en la oncogénesis interviniendo en los contactos intercelulares normales. El sitio de unión de MN representa una diana potencial para la que pueden diseñarse agentes terapéuticos.

15 *Materiales y Métodos*

20 *Cromatografía de afinidad de MN/CA IX.* Se purificó MN/CA IX mediante un único ciclo de adsorción - elución sobre sulfonamida-agarosa, tal como se describe para otras CA [Falkbring y cols., FEBS Letters, 24: 229 (1972)]. Los presentes inventores usaron columnas de p-agarosa (Sigma). Las columnas con MN/CA IX adsorbido se lavaron abundantemente con aminoetilbencenosulfonamida-PBS (NaCl 8,0 g/l, KCl 0,2 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,15 g/l, pH = 7,2) y se eluyeron con acetazolamida 0,1 mM (Sigma). Todas las etapas de purificación se realizaron a 0-5°C, a pH 7,2, a una concentración fisiológica de sales. MN/CA IX+ completo se extrajo con 1% de Triton X-100 en PBS a partir de células Vero infectadas con virus vaccinia que contenían un inserto de la región codificante completa de MN/CA IX tal como se describe en Zavada y cols., Int. J. Oncol., 10: 857 (1997). Antes de la cromatografía, el extracto se diluyó 1:6 con PBS y se centrifugó durante 1 h. a 1500 x g. Se produjo MN/CA IX truncada ΔTM ΔIC a partir de una construcción análoga a excepción de que el cebador 3' aguas abajo para la PCR era: 5' CGT CTA GAA GGA ATT CAG CTA GAC TGG CTC AGC A 3' [SEC ID N.º: 117]. Se introdujo MN/CA IX Δ en el medio, del que se purificó después de centrifugar como anteriormente. Todas las etapas de purificación se monitorizaron mediante transferencias en puntos.

30 *Células y medios.* Se usaron las siguientes líneas celulares: HeLa, CGL1 = híbridos HeLa x fibroblasto no tumorígenos, CGL3 = segregado tumorígeno de este híbrido, células NIH3T3 = fibroblastos murinos. El origen de las células y los medios de crecimiento media se describen en Zavada y cols., Int. J. Cancer, 54: 268 (1993) y Zavada y cols., Int. J. Oncol., 10: 857 (1997). Además, los presentes inventores también usaron HT29, una línea celular derivada de carcinoma colorrectal (N.º de ATCC HBT-38).

40 *Ensayo de adhesión celular.* Las condiciones del ensayo son básicamente tal como se describen en el Ejemplo 1. En resumen, 1 g/ml de MN/CA IX purificado en tampón de mono/bicarbonato 50 mM, a pH 9,2, se adsorbió en gotas de 30 µl sobre el fondo de placas de Petri bacteriológicas de 5 cm durante 1,5 horas. Después las gotas se eliminaron mediante aspiración y las placas se enjuagaron 3 veces con PBS y se bloquearon con 50% de FCS en medio de cultivo durante 30 minutos. Había dos variantes de la prueba. En la primera, todo el fondo de la placa de Petri se bloqueó con 50% de FCS, y las placas se sembraron con 5 ml de suspensión celular (10⁵ células/ml). Después de incubar toda la noche, los cultivos se enjuagaron con PBS, se fijaron y se tiñeron. En la otra variante, únicamente se bloqueó el área de MN/CA IX adsorbida y sobre los puntos de MN/CA IX se añadió gotas de 30 µl de suspensión celular en medio de crecimiento, que contenía oligopéptidos añadidos (o control sin péptidos). Después de la incubación, el enjuague y la fijación, los cultivos se tiñeron con 0,5% de azul Triptano en tampón Tris 50 mM a pH 8,5 durante 1 hora, se enjuagó con agua y se secó. Las áreas teñidas de las células unidas se extrajeron con 10% de ácido acético, los extractos se transfirieron a placas de 96 pocillos y la absorbancia se midió a 630 nm en un lector de microplacas.

50 *ELISA.* Se adsorbió GST-MN purificada [Zavada y cols. (1993), referencia anterior] a una concentración de 10 ng/ml en tampón de carbonato a pH 9,2 durante 3 horas sobre tiras Maxisorb (NUNC). Después de lavar y bloquear (1 h) con 0,05% de Tween 20 en PBS, se añadieron 50 µl/pocillo de las mezclas de anticuerpo + antígeno. La dilución del fluido de ascitis con MAb 75 era de 10⁻⁶; la concentración de los péptidos se varió de acuerdo con su afinidad for M75 para permitir determinar el criterio de evaluación del 50%. Estas mezclas se adsorbió durante 1,5 horas, seguido de lavado con Tween-PBS. El anticuerpo unido se detectó mediante conjugado de IgG contra ratón con peroxidasa (SwAM-Px, SEVAC, Praga), diluida 1:1000. En la reacción con color se usó OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina, Sigma) 1 mg/ml en tampón de citrato 0,1 M a pH 5,0. A estos se añadió H₂O₂ a una concentración final de 0,03%. Este sistema está equilibrado de forma que permite ensayar para determinar el antígeno que compite por M75 así como por los péptidos que se unen al epítopo de GST-MN inmovilizada.

60 *Péptidos.* Los péptidos que se usan en este estudio se prepararon mediante el procedimiento en fase sólida [Merrifield y cols., IN: Gutte, Peptides. B. (ed.), Peptides: Synthesis, Strucures and Applications, páginas 93-169 (San Diego; Academic Press; 1995)] usando la estrategia de Boc/Bzl. Los ácidos peptídicos se prepararon sobre resina PAM y las amidas peptídicas sobre resina MeBHA. La desprotección y separación de la resina se realizó mediante fluoruro de hidrógeno líquido. Los péptidos se purificaron mediante C18 RP HPLC y se caracterizaron mediante análisis de aminoácidos y espectroscopía de EM por BAR.

Transferencias Western Los antígenos MN/CA IX de los geles de PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon P, Millipore) y se revelaron con M75, seguido de SwAM-Px (véase más arriba) y diaminobenzidina (Sigma) con H₂O₂. Para las transferencias en puntos los presentes inventores usaron membranas de nitrocelulosa.

- 5 *Presentación en fagos.* Se usó el kit Ph.D.-7 Phage Display Peptide Library para el cribado tal y como recomendaba el fabricante (New England Biolabs). Se recubrió una placa de 96 pocillos con péptido SEC ID N.º: 106. Se realizó una selección por “biopanning” incubando 2x10¹¹ fagos con la placa recubierta con la diana durante 1 hora. Los fagos no unidos se eliminaron lavando con TBST (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,1% de Tween-20) y los fagos unidos específicamente se eluyeron con el anticuerpo M75 (2 µg en 100 µl de TBS/pocillo). Los fagos eluidos 10 se amplificaron y se usaron para ciclos adicionales de unión y amplificación para enriquecer la mezcla en la secuencia de unión. Después de 5 tandas, se escogieron los clones individuales, se amplificaron y se secuenciaron usando el kit de secuenciación T7 (Pharmacia).

Resultados

- 15 *Cromatografía de afinidad de la proteína MN/CA IX.* Para la purificación de la proteína MN/CA IX los presentes inventores decidieron usar una columna de cromatografía de afinidad sobre sulfonamida-agarosa, que se ha descrito anteriormente para otras CA [Falkbring y cols., referencia anterior]. Las ventajas de este procedimiento son la simplicidad y el hecho de que todo el procedimiento se realiza en condiciones no desnaturalizantes. Se empleó un vector de 20 virus vaccinia con un inserto del ADNc completo de MN/CA9, o con ADNc truncado (que carecía de los dominios transmembrana e intracelular) como fuente de la proteína MN/CA IX.

Un único ciclo de adsorción - elución proporcionó proteínas relativamente puras: MN/CA IX+ proporcionó 25 2 bandas de 54 y 58 kDa, MN/CA IXΔ de 54,5 y 56 kDa. Estas proteínas reaccionaban fuertemente con MAb M75 en transferencias Western. En los extractos de HeLa, CGL3 y HT29 la transferencia reveló 2 bandas del mismo tamaño que MN/CA IX+ purificadas de una construcción de virus vaccinia.

30 *Adhesión de células a proteína MN/CA IX.* MN/CA IX inmovilizada sobre plástico hidrófobo permitió la unión, extensión y crecimiento de células. Las concentraciones de MN/CA IX extremadamente bajas, que correspondían 1 µg/ml de proteína purificada en tampón de adsorción fueron suficientes para provocar este efecto, otras moléculas de adhesión celular se usan en concentraciones de 10 a 50 superiores. Únicamente la proteína MN/CA IX completa presentaba actividad en la prueba de adhesión celular, la MN/CA IX truncada no consiguió ninguna adhesión celular o únicamente mostró una actividad de adhesión baja y en algunos casos incluso actuó como “repelente” celular.

35 El tratamiento de los puntos de MN/CA IX inmovilizada con MAb M75 abrogó su capacidad de unir las células, pero el MAb M16 de control, que era irrelevante para MN/CA IX no tuvo ningún efecto. El bloqueo de la unión celular mediante M75 muestra que el epítopo es idéntico o está superpuesto al sitio de unión de MN/CA IX para los receptores celulares.

40 *Identificación del epítopo reconocido por Mab M75.* El mapeo preliminar del epítopo M75 empleando secuencias parciales de partes extracelulares del ADNc de control expresado en vectores bacterianos y analizados en transferencias Western lo situó en la región PG. Para el mapeo exacto, la estrategia de los inventores fue sintetizar oligopéptidos que se solapaban parcialmente de 15-25 aa que abarcaban el dominio PG y analizarlos en un ELISA competitivo con M75. Según los resultados, se continuó con una serie de oligopéptidos de 6-12 aa. Una parte principal del dominio PG 45 está formada por una repetición en tándem de 6 veces de 6 aa (aa 61-96) [SEC ID N.º: 97]; 4 repeticiones son idénticas (GEEDLP) [SEC ID N.º: 98] y 2 contienen 2 aa intercambiados (SEEDSP [SEC ID N.º: 141] y REEDPP [SEC ID N.º: 142]).

50 A continuación están los resultados del ELISA competitivo con MN/CA IX PG y oligopéptidos sintetizados de acuerdo con secuencias parciales de la región PG. MN/CA IX+ y Δ producidas en células de mamífero poseían una mayor actividad serológica que ninguna otra proteína o péptido incluida en este experimento; la proteína de fusión GST-MN sintetizada en bacterias era menos activa. Los siguientes péptidos abarcan la región PG: GGSSGEDDPL GEEDLPSEEDSPC (aa 51-72) [SEC ID N.º: 104]; GEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGE (aa 61-85) [SEC ID N.º: 105]; EDPPGEEDLPGEEDLPPEVC (aa 75-98) [SEC ID N.º: 106]; y EVKPKSEEEGSLKLE (aa 97- 111) 55 [SEC ID N.º: 118]. Las SEC ID N.º: 20 104 y 106 provocaron una inhibición del 50% a 1 ng/ml. Esos 2 oligopéptidos no se superponen entre sí, así el epítopo está repetido en ambos. La SEC ID N.º: 105 era 1000 veces menos activa, probablemente debido a una conformación diferente. La SEC ID N.º: 118 era inactiva; así que no contiene el epítopo M75.

60 La siguiente etapa para identificar el epítopo era sintetizar oligopéptidos que contienen todas las permutaciones circulares del motivo GEEDLP [SEC ID N.º: 98] repetido dos veces. Los 6 dodecapéptidos siguientes [SEC ID N.º: 119-124] eran serológicamente activos (2 más y 4 menos): GEEDLPGEEDLP [SEC ID N.º: 119]; EEDLPGEEDLP [SEC ID N.º: 120]; EDLPGEEDLP [SEC ID N.º: 121]; DLPGEEDLPGE [SEC ID N.º: 122]; LPGEEDLPGEED [SEC ID N.º: 123]; y PGEEDLPGEEDL [SEC ID N.º: 124]. Se analizó la siguiente serie de secuencias de 7 aa, flanqueadas 65 por alanina en ambos extremos: APGEEDLPA [SEC ID N.º: 125]; AGEEDLPGA [SEC ID N.º: 126]; AEEDLPGEA [SEC ID N.º: 127]; AEDLPGEAA [SEC ID N.º: 128]; ADLPGEEDA [SEC ID N.º: 129]; y ALPGEEDLA [SEC ID N.º: 130]. Los resultados demostraron que la secuencia mínima serológicamente activa es el oligopéptido APGEEDLPA [SEC ID N.º: 125]. Las SEC ID N.º: 127-130 dieron negativo en el ensayo competitivo a 100 µg/ml. Además,

ninguno de los oligopéptidos todavía más cortos (6 + 2aa) compitieron en el ELISA por M75: AGEEDLPA [SEC ID N.º: 131]; AEEDLPGA [SEC ID N.º: 132]; AEDLPGEA [SEC ID N.º: 133]; ADLPGEEA [SEC ID N.º: 134]; ALPGEEDA [SEC ID N.º: 135]; y APGEEDLA [SEC ID N.º: 136].

5 En los oligopéptidos de las SEC ID N.º: 104, 105, 106 y 118, el aminoácido C-terminal estaba presente en forma de ácido, mientras que en todos los demás oligopéptidos, el aminoácido C-terminal estaba presente en forma de una amida. Está claro que la afinidad entre estos oligopéptidos y el MAb M75 aumenta muy potentemente con el tamaño de la molécula peptídica.

10 *Intentos de demostrar la adhesión de las células a los oligopéptidos inmovilizados*

El plan inicial de los inventores era seguir el trabajo pionero de Piersbacher y Ruoslahti, PNAS, 81: 5985 (1984) que ligaron oligopéptidos analizados a albúmina de suero bovina mediante un agente de reticulación SPDP (N-succinimidil-3[piridil-hidro]propionato). Esta es la razón por la que los presentes inventores añadieron cisteína al extremo 15 C de los oligopéptidos las SEC ID N.º: 104-106, que permitiría una unión orientada a la albúmina adsorbida. Los presentes inventores demostraron la unión de los péptidos directamente sobre placas de Petri mediante inmunoperoxidasa tiñendo con M75. Por desgracia, las células CGL1 y CGL3 se adherían a la albúmina de control tratada con SPDP y bloqueada con etanolamina (en lugar de los oligopéptidos) con tanta fuerza como a los puntos de BSA con los oligopéptidos enlazados. Los presentes inventores fueron incapaces de abrogar estas adhesión no específica. 20 Los oligopéptidos de las SEC ID N.º: 104-106 se adsorben solo de una forma muy deficiente a las placas de Petri bacteriológicas, no permitiendo así realizar el ensayo de adhesión celular.

De forma alternativa, los presentes inventores analizaron la inhibición de adhesión celular a los puntos de MN/CA IX mediante oligopéptidos añadidos al medio junto con la suspensión celular, tal como describen Piersbacher y Ruoslahti, referencia anterior. Se analizaron todos los péptidos de las SEC ID N.º: 104-106 y 118-136, a concentraciones de 100 y 10 µg/ml. Ninguno de ellos inhibió reproduciblemente la adhesión de las células CGL1.

Oligopéptidos con afinidad por el epítopo M75 que inhiben la adhesión celular a MN/CA IX

30 *MN/CA IX.* Como alternativa a los anticuerpos monoclonales, los presentes inventores emprendieron la selección de oligopéptidos que presentaran afinidad por el epítopo M75 así como por el sitio de unión del receptor MN/CA IX de una colección de moléculas presentadas en fago de heptapéptidos aleatorios- Ph.D.-7. 7. El objetivo de los inventores era seleccionar fagos que contengan los heptapéptidos deseados mediante selección con un péptido inmovilizado de la SEC ID N.º: 106 y posterior elución con M75. El fago eluído se multiplicó en bacterias apropiadas y se sometió 35 4 ciclos más de selección y elución. Se escogieron 10 placas de la población de fagos seleccionada, se amplificaron y se secuenció la región codificante del heptapéptido. Únicamente se representaron 3 heptapéptidos. Los tres heptapéptidos, después de añadir alanina en ambos lados, son los siguientes nonapéptidos: AKKMKRRKA [SEC ID N.º: 137]; AITFNAQYA [SEC ID N.º: 138]; y ASASAPVSA [SEC ID N.º: 139]. El último heptapéptido, sintetizado de nuevo con alaninas terminales añadidas como el nonapéptido AGQTRSPLA [SEC ID N.º: 140], se identificó mediante 40 selección con GST-MN y se eluyó con acetazolamida. Este último péptido presenta afinidad en el sitio activo de la anhidrasa carbónica de MN/CA IX. Los presentes inventores sintetizaron estos péptidos de 7 + 2 aa y los analizaron en un ELISA competitivo y en la inhibición de la adhesión celular. Ambas pruebas proporcionaron resultados esencialmente consistentes: el péptido de la SEC ID N.º: 138 demostró la mayor actividad, el péptido de la SEC ID N.º: 137 era menos activo, el péptido de la SEC ID N.º: 139 era marginalmente positivo únicamente en el ELISA, y el péptido 45 de la SEC ID N.º: 140 era inactivo. En los 4 nonapéptidos, la amida del extremo C estaba presente en forma de una amida.

Descripción

50 La purificación de las proteínas transmembrana tales como MN/CA IX a menudo presentan problemas técnicos debido a que tienden a formar agregados con otras proteínas de la membrana debido a sus segmentos TM hidrófobos. Para evitar esto, los presentes inventores diseñaron MN/CA IX truncada ΔIC ΔTM, que se segregó al medio. De hecho, la MN/CA IX truncada se obtuvo con mayor pureza que MN/CA IX+. Por desgracia, esta proteína no fue muy útil para los fines de los inventores, dado que era inactiva en el ensayo de adhesión celular. Dicha situación ha descrito 55 también para otras moléculas de adhesión celular: su forma segregada y acortada o asume una conformación inactiva, o se absorbe al plástico hidrófobo “al revés”, mientras que las proteínas completas se adsorben mediante segmentos TM hidrófobos en la posición “correcta”.

La proteína MN/CA IX forma oligómeros de 150 kDa, ligados mediante enlaces disulfídicos. Se desconocía si estos 60 eran homo- o hetero-oligómeros, pero los análisis por PAGE y transferencia Western sugieren que estos probablemente son homo-oligómeros, más probablemente trímeros, dado que en el gel teñido con azul Coomassie no aparecía ninguna otra banda de intensidad comparable a las 2 bandas específicas para MN/CA IX. También es improbable que pudiera existir una proteína adicional que migrara a la vez con una de las 2 bandas principales de MN/CA IX, dado que la intensidad de la tinción en el gel y en las transferencias Western es comparable.

65 No puede haber ninguna duda de que especificidad de la unión de la célula a MN/CA IX+ purificada. Se abroga mediante MAb M75 específico, a una dilución de 1:1000 del fluido de ascitis. Esta es una corrección a la reseña anterior de los inventores en Zavada y cols., Int. J. Oncol., 10: 857 (1997) en la que los presentes inventores observaron que

MN/CA IX producida mediante un vector de virus vaccinia y la proteína de fusión GST-MN promueven la adhesión celular, pero los presentes inventores no se dieron cuenta de que el ancla GST contiene en sí otro sitio de unión, que no se bloquea mediante M75.

5 MAb M75 reacciona extracelularmente con MN/CA IX en cualquier circunstancia - con antígeno nativo en la superficie de células vivas, con proteína desnaturalizada en transferencias Western y con antígeno en cortes de parafina de biopsias fijadas con formaldehído, lo que sugiere que el epítopo es pequeño y contiguo. En el ELISA competitivo la secuencia más pequeña que reaccionó con M75 era 7 + 2 aa, pero la afinidad entre M75 y los péptidos analizados dependía potenteamente de su peso molecular.

10 MN/CA IX completa era 100.000 veces más activa que el más pequeño de los péptidos serológicamente activo en términos de concentración de peso/volumen. En términos de concentración molar esta diferencia sería de 150.000.000 x. Los oligopéptidos de tamaño intermedio también mostraron actividades intermedias. Queda por dilucidar si dichas diferencias en la actividad se deben a la conformación que depende del tamaño de la molécula, o al hecho de que la 15 MN/CA IX completa contiene varias copias del epítopo, pero la molécula más pequeña únicamente contiene una.

20 Considerando la posibilidad de que el epítopo sea idéntico a la estructura de adhesión celular de MN/CA IX, los presentes inventores pueden entender porqué no fueron capaces de detectar la inhibición de la adhesión celular por los oligopéptidos. El sitio de unión no es tan simple como un péptido prototípico, RGD [Winter, J., IN Cleland y Craik (editores), Protein Engineering. Principles and Practice, páginas 349-369 (N.Y.; Wiley-Liss; 1996)]. Naturalmente, 25 puede discutirse que el tamaño de MN/CA IX es aproximadamente igual al de la molécula de inmunoglobulina y que la unión de M75 a su epítopo puede impedir estéricamente a una secuencia diferente del sitio de unión celular. Esta objeción se ha vuelto improbable al bloquear tanto el epítopo M75 y el sitio de unión celular mediante los nonapéptidos de 7 + 2 aa. Ese resultado sugiere con fuerza que el epítopo y el sitio de unión son de hecho idénticos.

25 MN/CA IX y su región PG en particular parecen ser una molécula diana potencial por las siguientes razones: (i) está expuesta en la superficie celular; (ii) está presente en un porcentaje elevado en ciertos carcinomas humanos; (iii) normalmente se expresa MN/CA IX en la mucosa del tubo alimentario que no es accesible para los anticuerpos en circulación, al contrario que los tumores; (iv) no se segregá (o sólo en cantidades mínimas) a los fluidos corporales; 30 (v) el motivo GEEDLP [SEC ID N.º: 98] está repetido 18 veces en la superficie de cada molécula MN/CA IX. Para desarrollar nuevos fármacos se están empleando colecciones de presentación de oligopéptidos en las primeras etapas para desarrollar nuevos fármacos [Winter, J., referencia anterior]. Los oligopéptidos seleccionados pueden servir como compuestos directores para el diseño por ordenador de nuevas moléculas, que requieren propiedades adicionales del fármaco [DeCamp y cols., IN Cleland y Craik (editores), referencia anterior en las páginas 467-505].

35

Ejemplo 3

Identificación de péptidos que se unen a proteína MN usando presentación en fagos

40 (a) para identificar los péptidos que reconoce la proteína MN, se cribó una colección de heptapéptido presentados en fagos [Ph.D.®-7 Peptide 7-mer Library Kit (kit de colección de péptidos presentados en fagos); New England Biolabs; Beverly, MA (EE. UU.)]. En el cribado de la colección, se realizó un proceso de selección, es decir, biopanning [Parmley y Smith, Gene, 73: 308 (1988); Noren, C.J., NEB Transcript, 8 (1): 1 (1996)] incubando los fagos que 45 codificaban los péptidos con una placa recubierta con proteína MN, eliminando la fago no unido mediante lavado, eluyendo y amplificando el fago unido específicamente.

50 La proteína MN diana en este proceso era una proteína de fusión de glutationa-S-transferasa (GST) y MN (GST-MN). GST-MN es una proteína de fusión producida de forma recombinante expresada en pGEX-3X-MN que contiene el ADNc de la proteína MN sin el péptido de señal. GST-MN se produjo en bacterias en condiciones de cultivo modificadas (menor densidad óptica, menor temperatura). Dicho cultivo evitó la terminación prematura de la traducción y produjo la síntesis de las moléculas de proteína que en su gran mayoría eran de longitud completa. La proteína GST-MN se usó para recubrir los pocios y para unirse a los fagos relevantes. Los fagos unidos después se eluyeron con acetazolamida, se amplificaron y se usaron para dos tandas adicionales de cribado.

55

Después de la secuenciación de varios clones de fagos independientes obtenidos después de la tercera tanda de cribado, se obtuvieron los siguientes heptapéptidos:

60

- (1) GETRAPL (SEC ID N.º: 107)
- (2) GETREPL (SEC ID N.º: 108)
- (3) GQTRSPL (SEC ID N.º: 109)
- 65 (4) GQTRSPL (")
- (5) GQTRSPL (")

(6) GQTRSPL (")

(7) GQTRSPL (")

5 Los heptapéptidos muestran secuencias muy similares o idénticas, lo que indica que la unión es específica. El hecho de que los fagos que portaban estos heptapéptidos eluyeran mediante acetazolamida, un inhibidor de la actividad de anhidrasa carbónica, indica que los péptidos se unen al dominio de CA de la proteína MN.

10 10 (b) Se realiza un cribado análogo de la colección de heptapéptidos presentados en fagos usando colágeno I, que se ha demostrado que se une a la proteína MN, para eluir los fagos. Se espera identificar los diferente(s) péptido(s) que se une(n) a parte(s) diferente(s) de la molécula de la proteína MN. Después de identificar dichos péptidos que se unen a MN, se analizarán los péptidos sintéticos correspondientes para determinar sus efectos biológicos.

Ejemplo 4

15 *Accesibilidad in vivo de la proteína MN expresada en células tumorales y en el estómago*

20 Se inyectó intraperitonealmente (i.p.) ^{125}I -MAb M75 (2,5 x 106 cpm) a ratas Lewis (384 g) que portaban un tumor subcutáneo BP6 (de aproximadamente 1 cm de diámetro) que expresaban la proteína MN de rata Cinco días después, se pesaron trozos de 0,5-1 g del tumor y de los órganos y se cuantificó su radioactividad mediante un contador gamma.

25 La Tabla 2 resume los resultados. La mayor radioactividad estaba presente en el tumor. En el hígado y el riñón se encontró una radioactividad relativamente alta, que aparentemente refleja el aclaramiento de la IgG de ratón de la sangre. El estómago continuó con un nivel de radioactividad relativamente bajo, lo que indica que el MAb M75 únicamente tenía un acceso limitado a la proteína MN expuesta en la mucosa gástrica.

TABLA 2

Distribución de la radioactividad de ^{125}I -M75 en órganos de rata y en el órgano tumoral

Órgano		cpm/g
Riñón	2153	2184
Bazo	653	555
Hígado	1993	1880
Pulmón	1183	1025
Sangre	1449	
Corazón	568	477
Estómago	1184	1170
Testículos	812	779
Cola	647	
Tumor	3646 4058 3333 8653 3839	

Ejemplo 5

FACS análisis de la expresión de la proteína MN en células CGL3 - Apóptosis

55 Se diseñó una investigación por FACS para determinar las condiciones que influyen la síntesis de la proteína MN y para analizar la distribución del ciclo celular de las células positivas para MN comparado con las células negativas para MN en una población de CGL3 estimulada para la apoptosis. Los análisis previos por transferencia Western han demostrado que las células CGL3 expresan una cantidad relativamente alta de proteína MN en diferentes condiciones de cultivo. Se considera que las células CGL3 son unas productoras constitutivas de proteínas MN. Sin embargo, la transferencia Western no reconoce pequeñas diferencias en el nivel de proteína. Por el contrario el FACS permite detectar células individuales positivas para MN, calcular su porcentaje en la población analizada, estimar el nivel de proteína MN de las células, y determinar la distribución del ciclo celular.

65 Para estudiar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la expresión de individual en células CGL3, las células CGL3 se plaquearon a densidades relativas y concentraciones de suero diferentes. Tres días después de plaquear, se recolectaron las células, se marcaron en la superficie con Mab M75 seguido de IgG contra ratón conjugado con FITC y se analizó inmediatamente mediante FACS.

ES 2 296 412 T3

El análisis demostró que en las células adherentes, la expresión de MN depende de la densidad como en las células HeLa. Sin embargo, los cultivos con baja densidad aún producían cantidades detectables de proteína MN. En los cultivos de baja densidad, la concentración del suero no parece desempeñar ningún papel. En los cultivos de densidad relativamente alta, una concentración de suero decreciente produjo una expresión de MN ligeramente menor, 5 probablemente debido a la menor densidad que las células pudieron alcanzar en el cultivo durante tres días.

El efecto de la densidad celular real es notable, y la expresión de MN (que puede detectarse en el 15-90% de las células) representa un factor de control muy sensible. En todos los experimentos, había aproximadamente un 10 porcentaje 5% superior de células en división en la parte de la población positiva para MN, comparada con la parte negativa para MN. Ese hecho dió lugar al análisis de la distribución del ciclo celular de las células CGL3 positivas para MN en condiciones de crecimiento desfavorables, es decir, tras la inducción de la apoptosis

Apoptosis

15 Se estimuló la muerte por apoptosis de las células CGL3 mediante varios fármacos, que incluían cicloheximida, actimomicina D y dexametasona. El estudio por FACS mostró que el inicio de la apoptosis se retrasa en las células positivas para MN lo que sugiere un papel protector de MN en este proceso. También se observó que la inducción de la apoptosis produjo la regulación por disminución de la expresión de MN de forma dependiente del tiempo. Ese mismo 20 fenómeno se describió para la proteína antiapoptosis Bcl-2 y existe la opinión de que la regulación por disminución de ciertos genes reguladores durante la apoptosis sensibiliza las células para que sufran apoptosis. Para probar el papel de MN en la apoptosis, debe realizarse un estudio similar con las células transfectadas con ADNc de MN.

25 Los resultados preliminares indican la posible implicación de MN en la supresión de la apoptosis. El punto de vista reciente de que los tumores surgen como consecuencia tanto de la mayor proliferación como de la menor muerte celular parece ser consistente con la asociación de la proteína MN con los tumores *in vivo*.

Depósitos en la ATCC

30 Los materiales que se enumeran más adelante se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC) actualmente en 10810 University Blvd., Manassus, Virginia 20110-2209 (EE. UU.). Los depósitos se realizaron según las estipulaciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional de microorganismos depositados a los fines del procedimiento en materia de patentes y regulaciones allí expuestas (Tratado de Budapest). El mantenimiento de un cultivo viable se asegura durante treinta años a partir de la fecha de depósito. Los hibridomas y plásmidos serán puestos a disposición por la ATCC en los términos del Tratado de Budapest, y estarán sujetos a un acuerdo entre los 35 solicitantes y la ATCC que asegure la disponibilidad sin restricciones de los hibridomas y plásmidos depositados al público al ser concedida la patente de la presente solicitud de patente. La disponibilidad de la cepa depositada no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención contraviniendo los derechos concedidos por la autoridad de cualquier Gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

40	Hibridoma	Fecha de depósito	N.º de la ATCC
	Vu-M75	17 de septiembre de 1992	HB 11128
	MN 12.2.2	9 de junio de 1994	HB 11647
45	Plásmido	Fecha de depósito	N.º de la ATCC
	A4a	6 de junio de 1995	97199
	XE1	6 de junio de 1995	97200
	XE3	6 de junio de 1995	97198

50

55

60

65

ES 2 296 412 T3

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido **caracterizado** porque se selecciona a partir de las SEC ID N.º: 137 y 138.
- 5 2. Un polipéptido tal como se reivindica en la reivindicación 1 para usar en medicina.
3. Uso de un polipéptido tal como se reivindica en la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad preneoplásica y/o neoplásica, que se **caracteriza** por la expresión anormal de la proteína MN, mediante la inhibición del crecimiento de células preneoplásicas y/o neoplásicas de vertebrado que expresan la 10 proteína MN de forma anormal.
4. Un complejo peptídico **caracterizado** porque comprende un polipéptido tal como se reivindica en la reivindicación 1 ligado covalentemente a polilisina, a la que está unido un ácido nucleico que codifica una proteína o un polipéptido citotóxicos ligado operativamente al promotor del gen MN, inhibiendo dicho complejo peptídico, cuando 15 se administra a una célula preneoplásica y/o neoplásica de vertebrado que expresa la proteína MN de forma anormal, el crecimiento de dicha célula.
5. Un complejo peptídico tal como se reivindica en la reivindicación 4, en el que dicha proteína citotóxica es timidina cinasa de HSV.
- 20 6. Un complejo peptídico tal como se reivindica en la reivindicación 5, en el que dicho ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica una citocina ligado operativamente a dicho promotor del gen MN.
7. Un procedimiento de identificar una molécula orgánica o inorgánica que se une específicamente a un sitio de 25 una proteína MN, a la que se adhieren las células de vertebrado en un ensayo de adhesión celular, estando constituido dicho sitio por una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir de las SEC ID N.º: 10 y 97-106, estando **caracterizado** el procedimiento porque comprende analizar moléculas orgánicas e inorgánicas en dicho ensayo de adhesión celular e identificar moléculas que inhiben la adhesión de células de vertebrado a dicha proteína MN como que se unen 30 específicamente a dicho sitio, y siendo dicha molécula de utilidad en el tratamiento de enfermedad preneoplásica y/o neoplásica, que se **caracteriza** por la expresión anormal de proteína MN, comprendiendo dicho ensayo de adhesión celular:.
 - (a) permitir que la proteína MN se una a un sustrato al que no se unen dichas células de vertebrado;
 - 35 (b) enjuagar la proteína MN no unida de dicho sustrato;
 - (c) incubar dicha proteína MN unida con dicha molécula y con dichas células de vertebrado;
 - (d) enjuagar dichas las células de vertebrado no unidas de dicha proteína MN; y
 - 40 (e) determinar si dicha molécula inhibe la adhesión de dichas células de vertebrado a dicha proteína MN.
8. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 7, en el que dicha molécula es inorgánica.
- 45 9. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 7, en el que dicha molécula es orgánica.
10. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 9, en el que dicha molécula es una proteína o un polipéptido.
- 50 11. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 10, en el que dicha proteína o polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir de las SEC ID N.º: 137 y 138.
12. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 10, en el que dicho polipéptido se selecciona a partir de las SEC ID N.º: 137 y 138.
- 55 13. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 7, en el que dicha molécula orgánica o inorgánica, cuando está en contacto con una célula preneoplásica y/o neoplásica de vertebrado que expresa la proteína MN de forma anormal, inhibe el crecimiento de dicha célula.
14. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 7, en el que el sitio de la proteína MN a la que dichas células de vertebrado se adhieren en dicho ensayo de adhesión celular está dentro del dominio de tipo proteoglicano de la proteína MN.
- 60 15. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 7, en el que dichas células de vertebrado son células de mamífero.
16. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 7, en el que dichas células de vertebrado son células humanas.

1	ACA	GTC	AGC	CGC	ATG	GCT	CCC	CTG	TGC	CCC	AGC	CCC	TGG	CTC	CCT	CTG	12
13	L	I	P	A	P	A	P	G	I	T	V	Q	L	L	L	S	28
49	TTG	ATC	CCG	GCC	CCT	GCT	CCA	GGC	CTC	ACT	GTG	CAA	CTG	CTG	CTG	TCA	96
29	L	L	L	M	P	V	H	P	Q	R	L	P	R	M	Q	44	
97	CTG	CTG	CTT	CTG	ATG	CCT	GTC	CAT	CCC	CAG	AGG	TIG	CCC	CGG	ATG	CAG	144
45	E	D	S	P	L	G	G	S	S	G	E	D	D	P	L	60	
145	GAG	GAT	TCC	CCC	TTG	GCA	GGA	GGC	TCT	TCT	GGG	GAA	GAT	GAC	CCA	CTG	192
61	G	E	E	D	L	P	S	E	E	D	S	P	R	E	E	D	76
193	GGC	GAG	GAG	GAT	CTG	CCC	AGT	GAA	GAG	GAT	TCA	CCC	AGA	GAG	GAG	GAT	240
77	P	P	G	E	E	D	L	P	G	E	E	D	L	P	G	E	92
241	CCA	CCC	GGA	GAG	GAG	GAT	CTA	CCT	GGA	GAG	GAG	GAT	CTA	CCT	GGA	GAG	288
93	E	D	L	P	E	V	K	P	K	S	E	E	E	G	S	L	108
289	GAG	GAT	CTA	CCT	GAA	GTT	AAG	CCT	AAA	TCA	GAA	GAG	GGC	TCC	CTG	336	
109	K	L	E	D	L	P	T	V	E	A	P	G	D	P	Q	E	124
337	AAG	TTA	GAG	GAT	CTA	CCT	ACT	GTT	GAG	GCT	CCT	GGA	GAT	CCT	CAA	GAA	384
125	P	Q	N	N	A	H	R	D	K	E	G	D	D	Q	S	H	140
385	CCC	CAG	AAT	AAT	GCC	CAC	AGG	GAC	AAA	GAA	GGG	GAT	GAC	CAG	AGT	CAT	432
141	W	R	Y	G	G	D	P	P	W	P	R	V	S	P	A	C	156
433	TGG	CGC	TAT	GGA	GGC	GAC	CCG	CCC	TGG	CCC	CGG	GTG	TCC	CCA	GCC	TGC	480
157	A	G	R	F	Q	S	P	V	D	I	R	P	Q	L	A	A	172
481	GGC	GGC	CGC	TTC	CAG	TCC	CCG	GTG	GAT	ATC	CGC	CCC	CAG	CTC	GCC	GCC	528

F/G.-1A

173	F	C	P	A	L	R	P	L	E	L	L	G	F	Q	L	P	188
529	TTC	TGC	CCG	GCC	CTG	CGC	CCC	CTG	GAA	CTG	CTG	GGC	TTC	CAG	CTC	CCG	576
189	P	L	P	E	L	R	L	R	N	N	G	H	S	V	Q	L	204
577	CCG	CTC	CCA	GAA	CTG	CGC	CTG	CGC	AAC	AAT	GGC	CAC	AGT	GTG	CAA	CTG	624
205	T	L	P	P	G	L	E	M	A	L	G	P	G	R	E	Y	220
625	ACC	CTG	CCT	CCT	GGG	CTA	GAG	ATG	GCT	CTG	GCT	CCC	GGG	GGG	GAG	TAC	672
221	R	A	L	Q	L	H	L	H	W	G	A	A	G	R	P	G	236
673	CGG	GCT	CTG	CAG	CTG	CAT	CTG	CAC	TGG	GGG	GCT	GCA	GGT	CGT	CCG	GGC	720
237	S	E	H	T	V	E	G	H	R	F	P	A	E	I	H	V	252
721	TCG	GAG	CAC	ACT	GTG	GAA	GGC	CAC	CGT	TTC	CCT	GGC	GAG	ATC	CAC	GTG	768
253	V	H	L	S	T	A	F	A	R	V	D	E	A	L	G	R	268
769	GTT	CAC	CTC	AGC	ACC	GCC	TTT	GCC	AGA	GTC	GAC	GAG	GCC	TTG	GGG	GGC	816
269	P	G	G	L	A	V	L	A	A	F	L	E	E	G	P	E	284
817	CCG	GGA	GCC	CTG	GCC	GTG	TTG	GCC	GCC	TTT	CTG	GAG	GAG	GGC	CCG	GAA	864
285	E	N	S	A	Y	E	Q	L	L	S	R	L	E	E	I	A	300
865	GAA	AAC	AGT	GCC	TAT	GAG	CAG	TTG	CTG	TCT	CGC	TTG	GAA	GAA	ATC	GCT	912
301	E	E	G	S	E	T	Q	V	P	G	L	D	I	S	A	L	316
913	GAG	GAA	GGC	TCA	GAG	ACT	CAG	GTC	CCA	GGA	CTG	GAC	ATA	TCT	GCA	CTC	960
317	L	P	S	D	F	S	R	Y	F	Q	Y	E	G	S	L	T	332
961	CTG	CCC	TCT	GAC	TTC	AGC	CGC	TAC	TTC	CAA	TAT	GAG	GGG	TCT	CTG	ACT	1008
333	T	P	P	C	A	Q	G	V	I	W	T	V	F	N	Q	T	348
1009	ACA	CCG	CCC	TGT	GCC	CAG	GGT	GTC	ATC	TGG	ACT	GTG	TTT	AAC	CAG	ACA	1056

FIG._1B

349	V	M	L	S	A	K	Q	L	H	T	L	S	D	T	L	W	364	
1057	G	TG	ATG	CTG	AGT	GCT	AAG	CAG	CTC	CAC	ACC	CTC	TCT	GAC	ACC	CTG	TGG	1104
365	G	P	G	D	S	R	L	Q	L	N	F	R	A	T	Q	P	380	
1105	GGA	CCT	GGT	GAC	TCT	CGG	CTA	CAG	CTG	AAC	TTC	CGA	GCG	ACG	CAG	CCT	1152	
381	L	N	G	R	V	I	E	A	S	F	P	A	G	V	D	S	396	
1153	TG	AAT	GGG	CGA	GTG	ATT	GAG	GCC	TCC	TTC	CCT	GCT	GGA	GTG	GAC	AGC	1200	
397	S	P	R	A	A	E	P	V	Q	L	N	S	C	L	A	A	412	
1201	AGT	CCT	CGG	GCT	GCT	GAG	CCA	GTC	CAG	CTG	AAT	TCC	TGG	CTG	GCT	GCT	1248	
413	G	D	I	L	A	L	V	F	G	L	L	F	A	V	T	S	428	
1249	GGT	GAC	ATC	CTA	GCC	CTG	GTT	TTT	GGC	CTC	CTT	TTT	GCT	GTC	ACC	AGC	1296	
429	V	A	F	L	V	Q	M	R	R	Q	H	R	R	G	T	K	444	
1297	GTC	GCG	TTC	CTT	GTG	CAG	ATG	AGA	AGG	CAG	CAC	AGA	AGG	GGA	ACC	AAA	1344	
445	G	G	V	S	Y	R	P	A	E	V	A	E	T	G	A	*	460	
1345	GGG	GGT	GTG	AGC	TAC	CGC	CCA	GCA	GAG	GTA	GCC	GAG	ACT	GGA	GCC	TAG	1392	
1393	AGG	CTG	GAT	CTT	GGA	GAA	TGT	GAG	AAG	CCA	GCC	AGA	GGC	ATC	TGA	GGG	1440	
1441	GGA	GCC	GGT	AAC	TGT	CCT	GTC	CTG	CTC	ATT	ATG	CCA	CTT	CCT	TTT	AAC	1488	
1489	TGC	CAA	GAA	ATT	TTT	TAA	ATT	AAA	TAT	TTA	TAA	T					1522	

FIG.-1C

FIG.-1A

FIG.-1B

FIG.-1C

FIG. 1

1 ggatccgtt gactcggtac cttacccca accctgtgt ctctgaaaaca tgagctgtgt
 61 ccactcagg ttaaatggat taaggccgtt gcaaggatgtg ctttgttaaa cagatgttg
 121 aaggcaggat gctcggttaag agtcatcacc aatccctaatt ctaaggtaat cagggacaca
 181 aacactcgccgg aaggcccgac ggtctctgtc cttagggaaaac cagagacctt tgttcacctg
 241 ttatctgac cttccctcca ctatgtccca tgaccctgtcc aaatccccctt ctgtgaaaaa
 301 cacccaaaga ttatcaataa aaaaataat ttaaaaaaa aataaaaaaa aaaaaaaaaa
 361 aaaaaaaaaa gacttacgaa tagttatgtg taatgtaaa gctatggta aagccaaagta
 421 aatgatcata ttcaaaaacca gacggccatc atcacagctc aatcacttcatc aagtctacatc
 481 ctttatcatt gtcatctttt ggattcacta gatttagtcat catcctaaa attctcccc
 541 aagttcttaat tacggttccaa acatttaggg gttacatgaa gcttggaaacctt actacccct
 601 ttgcttttga gcacatgaggat gttaggaatgtg tgagtttaca ctttacatgtc tggttggat
 661 tttaaactttt acctctaagt cagttggta gcctttgggtt tattttgtat gctaattttt
 721 tagttatgg atgactgtg aatcttgcata tgatgtttt cttccacact ttgcccactatg
 781 gggttaggtg gtactcgatc ttcaatgtt gtttacccaa gaccctaaagg cctatttctc
 841 ttgtactggc ctttatctgt aatatggca tatttaatc aataaaattt ttggatttt
 901 ttgttttgtt ttttttgtt gacggatctt gcacatgtca tgcccaggct
 961 ggatgtggcgg tggggccatc tcggctcaat gcaaggctcca cttcccgagg tcacggcatt
 1021 ttccctggccctc agcctcccgaa gtagctggaa ctacaggccgc cgcccaaccat
 1081 tttttttgtat tttttgtat gacggggttt caccgttta gccagaatgg tctcgatctc
 1141 ctgacttcgt gatccccgg cctcggccctc ccaaaatctt gggattacag gtgtgaggcca
 1201 ccgcacctgg ccaattttt gaggctttt aagtaaaaat atgtcttgta agctggtaac
 1261 tatggtacat ttccctttat taatgtgggt ctgacgggtca tatagggttctt
 1321 gcatgcatat gctactttt gcagtcctt cattacattt ttctcttttcc atttgaagag
 1381 catgttatat tttttagttt cactggctt aaaaggttt ctcattagcc taacacagt
 1441 tcatgtttgg taccacttgg atcataatgtg gaaaaacagt caagaaatgt
 1501 ctgttttgta agagggatgtt ttcagggtgaa tctgacacta aaaaactccc
 1561 tctgagatcc ctctgacatt gctgtatata ggctttttccct ttgacagccct
 1621 actattttc ttaagcaaga tatgttaaag tttttgtgaccc ttttttccag
 1681 catatctgca tcaagtgaga acatataatgt tctgcatgtt tccatatttc
 1741 gctgtgtttt tagcttttata tagacagg gaaactttt cctcagggtac
 1801 tggaaattttt tattggatat catcaatggcc ccacgccttc tgacccgtt
 1861 ggttcataat ctcaatttcg tcagaatgtg tacaagaat agctgtatg
 1921 ttccactttgg tagaaataa gaatgtgaaa ctcttcgtt
 1921 ggtgtgtgtc ccttgttgcctt ggttttttgc
 FIG._2A

1981 ttggcaatttc cttcttactg tggtaaaaaa aagtatgatc ttggctctgag aggtgaggca
 2041 ttctttaatca tgaatctttaa agatcaataa tataatcctt tcaaggatta tgcctttatt
 2101 ataaataaga taattttgtt ttaacagaat caataataa atccccaaa ggattatatc
 2161 ttgctggcc gcagtggctc acacctgtaa tcccagcact ttggggccc aagggtggaaag
 2221 gatcaaaattt gcctacttctt atattatctt ctaaaggcaga attcatctt ctccccctcaa
 2281 tatgtatgata ttgacagggt ttggccctc acacttagatt gtgagctcctt gctcaggggca
 2341 ggtaggggtt ttgttttttgc ttttttttgc gacagggttctt tgctctgtca
 2401 cccaggcccg agtgcaatgg tacagtctca gctcaactgca gcctcaaccg cctcggctca
 2461 aaccatcatc ccatttcaggc ctctgtggacta gctggacta caggcacatg ccattacacc
 2521 tggctaattt ttgttattt ctagtagaga cagggtttgg ccatgttgcc cgggctggcc
 2581 tcgaaactcctt ggactcaagg aatccacca cctcagccctt ccaaaatgag ggaccgggtgc
 2641 ttattcattt ccattttccctt agtccatagc ccagtgtttgg acctatggta gtactaaata
 2701 aatattttgtt gaatggcaata gtaaatagca tttcaggggag caagaacttag attaacaagg
 2761 gtggtaaaag gtttggagaa aaaataataa gtttaattttg gcttagagtat gagggagagg
 2821 agtaggagac aagatggaaa ggttcttttg gcaagggtttt gaaggaaagg ggaagtcaaga
 2881 agtacacaat gtgcataatcg tggcaggcag tggggagcca atgaaggctt ttgaggcagga
 2941 gagaatgtg ttggaaaaata aatataaggta aacactatca gagcccccctt gacacataca
 3001 ctgtttttc attcagaaggc aagttttgtct cccacatacc cattacttaa ctcaccctcg
 3061 ggctccctta gcagccctggc ctacccctttt acctgtttcc tggtgagtc aggtatgtat
 3121 acatgaggctg cttttccctt cttttttttt cagccaggcag acatgggggg cccaggctcc
 3181 cccttctgtt cttttttttt ggaaggcaggc cagggttagc tgagggtggc tgccaaggcag
 3241 ctgggtggtg ccaggaggag cttgcatagt gccagggtttt gccttgggtt ccaaggcttagt
 3301 ccattggccc gataaacctt tgcctgttca cacactggc cctcaactcca cccccatccct
 3361 agctttggta tggggggagg ggacacaggc cagacaacc tggtagactt tgtagtggg
 3421 tctggaaaaag gggctctgtt gatcaggcc gctcccttcc aggctgtctc tggccatcc
 3481 cagctctcgat ttccaaatgca cgtacagccc gtacacaccg tggtagtggg
 3541 TCAGGCCAT GGCTCCCTG TGCCCCAGCC CCTGGCTCCC TCTGTGATC CGGGCCCC
 3601 CTCAGGGCT CACTGTGCAA CTGCTGCTGT CACTGGCTGCT TCTGGTGCCCT
 3661 AGAGGTTGCC CCGGATGGCAG GAGGATTTCCC CCTTGGAGGG AGGCTCTTCT
 3721 ACCCACTGGG CGAGGGAGAT CTGGCCAGTG AAGGGATTC ACCCAGAGAG
 3781 CCGGAGGGAGG GGTCTACCT GGAGGGAGG ATCTACCTGG AGAGGGAGG
 3841 TAAAGCCTAA ATAGAAGAA GAGGGCTCCC TGAAGGTAGA GGATCTACCT
 3901 CTCCCTGGAGA TCCTCAAGAA CCCAGAATA ATGCCAGACAG GGACAAAGAA

FIG.-2B

3961	catcaatctc	caaatccagg	ttccaggagg	ttcatgactc	ccctccccata	ccccaggccta
4021	ggctctgttc	actcagggaa	ggaggggaga	ctgtactccc	cacagaagcc	cttccagagg
4081	tcccatacca	atatcccat	ccccactctc	ggaggtagaa	agggacagat	gtggagagaa
4141	aataaaagg	gtgcaaaagg	agagagggtga	gtggatgag	atgggagaga	agggggggcc
4201	tggagaagag	aaagggatga	gaactgcaga	tgagaaaaaa	aatgtcaga	cagagggaaaa
4261	aaatagggtg	agaaggagag	tcagagagtt	tgagggaaag	agaaaaggaa	agcttgggag
4321	gtgaaagtggg	taccaggagac	aagcaagaag	agctggtaga	agtggtaga	tcttaggcta
4381	caatggggaa	ttgagaccta	ggaagaagggg	acacaggcgg	tagaaaaacg	tggcttccttg
4441	actccaaagc	caggaatttg	ggggaaagggg	ttggagacca	tacaaggcgg	agggatgaggt
4501	ggggagaaga	aagaagggg	aaaggaaaga	tgggtactc	actcatttgg	gactcaggac
4561	tgaagtggcc	actcaacttt	ttttttttttt	ttttttagac	aaactttcac	ttttgtgtgcc
4621	caggctggag	tgcaatggcg	cgatctcgcc	tcactgcaac	ctccacactcc	cgggttcaag
4681	tgattctccct	gcctcagccct	ctagccaaagt	agctgcgatt	acaggcatgc	gccaccacgc
4741	ccggctaatt	tttgatattt	tagtagagac	gggtttcgcc	catgtttggc	aggctgggtct
4801	cgaaactccgt	atctcagggt	atccaaaccac	cctggctcc	caaagtgtg	ggattattagg
4861	cgtgagccac	agggcctggc	ctgaagcagc	cactcaactt	tacagacccct	aagacaatga
4921	ttgcaaggtgt	gttaggatttgc	tgttggccc	acccagctgc	gtgtttgagt	tgggttgcgg
4981	tctccctgtgc	tttgcacctg	gcccgttaa	ggcattttgtt	accgttaatg	ctcctgttaag
5041	gcatctggcg	ttgtgacatc	gttttggtcg	ccaggaagggg	atggggctc	taagctttag
5101	cggttcatcc	ttttcatat	tacaggggat	GACCAGTC	ATGGGGCTA	TGGAGgttag
5161	acacccaccc	gtgtcacaga	cccaatctgg	gaaccacgtt	ctgttgatct	cccttacagcc
5221	cgtccctgaa	cactggttccc	gggggtccca	ccgcgcggcc	accgtccac	cccttcaccc
5281	tttctacccg	ggttcccta	gttctgtacc	taggcgtcag	acttccctcac	tataactctcc
5341	cacccaggc	GACCCGGCCCT	GGCCCCGGGT	GTCCCCAGCC	TGGGGGGGCC	GCTTTCAGTC
5401	CCCGGGAT	ATCCGGCCC	AGCTGGCCG	CTTCTGGCCG	GCCCTGGGCC	CCCTGGAACT
5461	CCTGGGCTTC	CAGCTCCGG	CGCTCCAGA	ACTGGGCTG	CGCAACAAATG	GCCACAGTGG
5521	tgaggggttc	tccccggca	gacttgggg	tgggggggg	cgcaggggaa	ggaaaccgtcg
5581	cgcagtggct	gcccgggggt	tgggttggcc	ctacccggcc	ggggccggctc	acttgcctct
5641	ccctacggag	TGCAACTGAC	CCTGCCTCCT	GGCTAGAGA	TGGCTCTGGG	TCCCGGGGG
5701	GAGTACGGG	CTCTGGCAGCT	GCATCTGGC	TGGGGGCTG	CAGGTCTGTC	GGGCTCGGGAG
5761	CACACTGTGG	AAGGCCACCG	TTTCCCTGCC	GAGGttagcg	cggactggcc	gagaaggggc
5821	aaaggaggcg	ggccggacggg	ggcccaagac	gtggccctct	cctaccctcg	tgtcccccttc
5881	agATCCACGT	GGTTCACCTC	AGCACCACCT	TTGGCCAGGT	TGACGAGGCC	TTGGGGGGCC

FIG._2C

5941	CGGGAGGGCT	GGCCGTGTTG	GCCGCC'TTTC	TGGAGGtacc	agatccctgg	cacccccctac
6001	tcccccgttt	cccatcccat	gctctcccg	gactctatcg	tggaggccaga	gacccccattcc
6061	cagcaagtc	actcaggccc	ctggctgaca	aactcatatca	cgcaactgttt	gttcattttaa
6121	caccctactgt	gaaccaggca	ccaggccccc	acaaggattc	tgaagctgtt	gttccttgcc
6181	tctaaggagc	ccacagccag	tggggaggcc	tgacatgaca	gacacatagg	aaggacatag
6241	taaagatgg	ggtcacagag	gaggtgacac	ttaaaggctt	cactggtaga	aaagaaaaagg
6301	agggtttcat	tgcagagaa	acagaatgtt	caaagactca	gaatatggcc	tatttaggga
6361	atggctacat	acaccatgt	tagaggaggc	ccagtaagg	gaagggatgg	tgagatggct
6421	gcttaggttc	ctcactcact	tttatttttt	tattttttt	tttgacagtc	tctctgtcg
6481	ccaggcttgg	gtgcagtgg	gtgatcttgg	gtcactgca	tttccggctc	cggggttcaa
6541	gggattctcc	tgctctcagc	tccttagtag	ctgggttac	aggtgtgtgc	caccatggcc
6601	agctaatttt	ttttttgttt	tttagtagac	agggtttcac	catgtttgtc	aggctggct
6661	caaactcctg	gcctcaagt	atccgcctg	ctcaggctac	caaagtgtcg	attacaagtg
6721	ttagccacgg	tgcccagcc	cactactga	ttctttaatg	ccagccacac	aggcacaagt
6781	ttagagaaat	gcctccatca	tagcatgtca	atatgttcat	actcttaggt	tcatgtatgt
6841	cttaaacat	ggttcataag	caaataaga	aaaaaaata	ataaataaaa	gaagtggcat
6901	gtcaggaccc	cacctgaaaa	gccaaacaca	gaatcatgaa	ggtgaatgca	gagggtgacac
6961	caacacaaag	gtgtatata	ggtttcctgt	ggggaggtatg	tacggaggca	gcagggtgatg
7021	agactgcaaa	cgtcagaagg	gcacgggtca	ctgagagcct	agtatccctag	taaagtgggc
7081	tcttccttc	tcttcaggc	ttgttcattg	aaaccagtcc	accaaggctt	ttggttcgca
7141	cagcaagagt	acatagagt	tgaataata	cataggattt	taagagggag	acactgtctc
7201	taaaaaaaaaa	aacaacagca	acaacaaaaa	gcaacaacca	ttacaatttt	atgttccctc
7261	aggattctca	gaggctgagga	atggagggaa	actatggaa	cccccttcat	tttccggccct
7321	tccggcatgg	ccctggatac	atgcactcat	ctgttttaca	atgttattcc	cccaggAGGG
7381	CCCGGAAGAA	AACAGTGCCT	ATGAGCAGTT	GCTGTCCTGC	TGGCAAGAAA	TGGCTGAGGA
7441	AGgtcagttt	gttggtctgg	ccacttaatct	ctgtggctta	gttcataaaag	aatcacccct
7501	tggagctca	ggctctgaggg	tggagatgg	ctccctccag	tgcaggagg	attgaaggcat
7561	gagccaggcg	tcatcttgtat	aataaccatg	aagctgacag	acacagttaac	ccgcaaaacgg
7621	ctggctacag	attgaaaaac	aagcaaaaac	cgccgggcac	ggtggctcac	gcctgttaatc
7681	ccagggacttt	ggggggccaa	ggcagggtgg	tcacgggttc	aagagatcaa	gaccatccctg
7741	gccaaacatgg	tgaaacccca	tctctactaa	aaatacgaaa	aaataggccag	gcgtggggc
7801	gggtgcctgt	aatcccagct	actcggggagg	ctgaggcagg	agaatggcat	gaacccggga
7861	ggcagaagtt	gcagtggac	gagatcgtgc	cactgactc	cagcctggcc	aacagaggca

7921 gactcttgtc tcaaaaaaaa accaaaaaag accaaaaaaat ggttttgg aaaaaaccaa aatgagacaa
 7981 aaaaaacaag gaaactgttta tttttttctga gaaactgttta tttttttctga gtcggctg gatggatctt
 8041 cttttttctga gaaactgttta tttttttctga gaaactgttta tttttttctga gtcggctg gatggatctt
 8101 ttgttggaaa tcgttctttt ctttagtcaactt ctttagtcaactt ctttagtcaactt ctttagtcaactt
 8161 ctagaccttt taggtttctg ctagacttag tagacttag tagacttag tagacttag tagacttag
 8221 gttttgtata gttatcaata ttcatatata ttcatatata ttcatatata ttcatatata ttcatatata
 8281 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 8341 gccaggctgc tctcaaaactc ctggacccctt ctggacccctt ctggacccctt ctggacccctt ctggacccctt
 8401 ggattcatt ttttttttt aatttgcatt ttttttttt aatttgcatt ttttttttt aatttgcatt ttttttttt
 8461 atggtaaaaaa ggttttaaagg ttttagactca gtttagactca gtttagactca gtttagactca gtttagactca
 8521 cttccctttcc cttccacccctt cttccacccctt cttccacccctt cttccacccctt cttccacccctt cttccacccctt
 8581 cggccctttcc ccaagttgctc ctttagtgaag aagtggctc ctttagtgaag aagtggctc aagtggctc
 8641 agggcctgca ctttagtgaag aagtggctc aagtggctc aagtggctc aagtggctc aagtggctc
 8701 gaaactgtat ccctataccc tgaagttta agggggta aatggatga gaccccaaca
 8761 tagatccctt tcacaggctc AGAGACTCAG GTCCAGGAC TGACATATC TGCACTCCTG
 8821 CCCTCTGACT TCAGGCCGCTA CTTCCAAAT GAGGGTCTC TGACTACACC GCCCTGTGCC
 8881 CAGGGTGTCA TCTGGACTGT GTTTAACCG ACAGGTATGC TGAGTGTCAA GCAGGtgggg
 8941 ctggggtgtg tttggacaca gttggggctc ggtggggctc tttggatgc atgttagatg agatgagaaa
 9001 caggagaaga aagaaatcaa tggggggaaa tggggggaaa tggggggaaa tggggggaaa tggggggaaa
 9061 ggagggttga ctgg
 9121 agttgtaccc catcttacc aaaaaaacc caaaaaaacc caaaaaaacc caaaaaaacc
 9181 gtatggccc tagtccagg ctgcaggtag ctatgtccc accactgcctt accatcttta
 9241 gaggttgaga aaaaataatc aagaggctgg atggggata caggagctgg agggtggagg
 9301 attttttat aaaaataatc aagaggctgg atggggata caggagctgg agggtggagg
 9361 ccttgggggc tggtttgttag ctggcctgg acccttgtt cctgtcatgc catgaaccca
 9421 cccacactgt ccactgaccc cccttagctcc ACACCTCTC TGACACCTG TGGGACCTG
 9481 GTGACTCTG GCTACAGCTG AACTTCCGAG CGACGGAGCC TTGAAATGGG CGAGTGATTG
 9541 AGGCCCTCTT CCCTGCTGGA GTGGACAGGA GTCCCTCGGGC TGCCTAGGCC Ggtacagctt
 9601 tttttttttt ccccccaggcc agtagtccct tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 9661 atttttttttt ccccccaggcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 9721 GCCTGGCTGC TGGtgagttt gcccccttttcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 9781 ccattcaggcc ccagggttgc tcaggaccgc ttttttttttcc tttttttttt tttttttttt
 9841 accccaaacc accccaaacc ctttttttttcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt

FIG.-2E

9901 gctaattgtat tagaatgaag cttgagaatat ctcccaagcat ccctctcgca aaagaatccc
 9961 ccccccattt tttaaagata gggtctact ctgtttggcc caggctggg tttgtgtggca
 10021 cgatcatgg tcactgcagg ctcgaactcc taggctcagg caatcccttc acccttagct
 10081 ctcaaaaggac tgggactgtat ggcataggcc actgtgcctg gccccaaacg gcccctttac
 10141 ttggctttat ggaaggaaaa acggtgctta ttttaccct tctgtgtat ccaccctcat
 10201 cccttggctg gcctctttctg gagactgggg cactatgggg ctgcctgaga actcggggca
 10261 ggggtgggg agtgcactgtat ggcagggtttt gaggaaactct gcaagacccct ctcccttccc
 10321 aaaggaggccc tctctgtctt ccatcgagg TGACATCTCA GCACCTGGTT TTGGCCTCC
 10381 TTTGCTGTC ACCAGGGTCG CGTTCCTTGT GCAGATGAGA AGGAGCACA Ggtattacac
 10441 tgacccttc ttcaaggcaca agttttcccc accctttttt ctgcattttt gtttttttca tgcaaaaggcgc
 10501 atgcaaatga gctgctcctg gggcagggtt ctgatattggcc ttccctgtt gttacacaca
 10561 gAAGGGAAC CAAAGGGGGT GTGAGGTACCC GCCCAGCAGA GGTAGCCGAG ACTGGAGCC
 10621 AGAGGGCTGGA TCTTGGAGAA TGTGAGAAGC CAGCCAGAGG CATTCTGAGGG GGAGGCCGTA
 10681 ACTGTCTGT CCTGCTCATTAATGCCACTTC CTTTTAACTG CAAAGAAATT TTTAAATA
 10741 AATATTATA Aaaaaatatg ttactgttac ttgttagtac ctttgtttcc caaatcggaa ggaggattt
 10801 gaatttccat ttactgttac ttactgttac ttgttagtac ctttgtttcc caaatcggaa ggaggattt
 10861 tcggcctccat tccacacatc actccaaatgt ttgtgttac ttgtgttac

FIG._2F

FIG._2A

FIG._2B

FIG._2C

FIG._2D

FIG._2E

FIG._2F

FIG._2

ES 2 296 412 T3

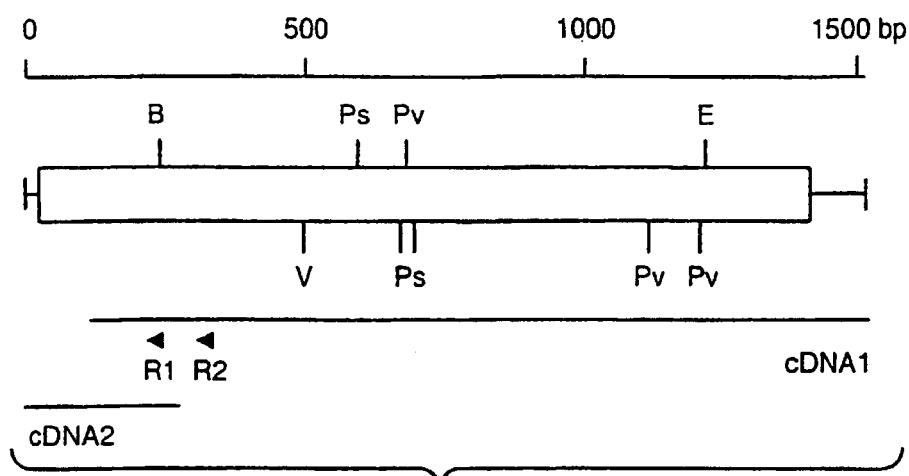


FIG._3

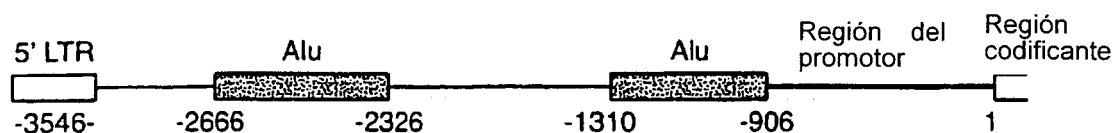


FIG._4

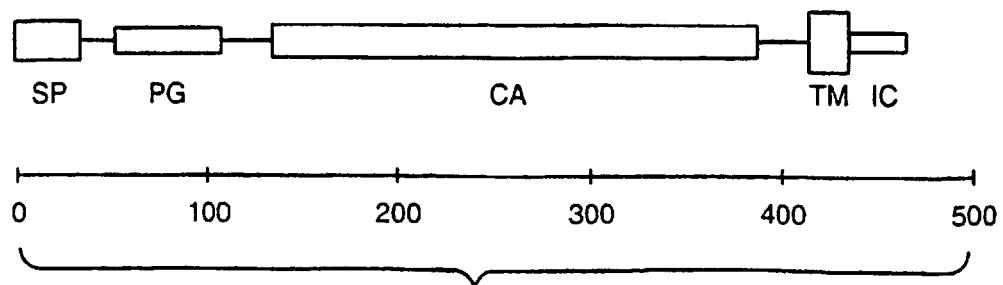


FIG._8

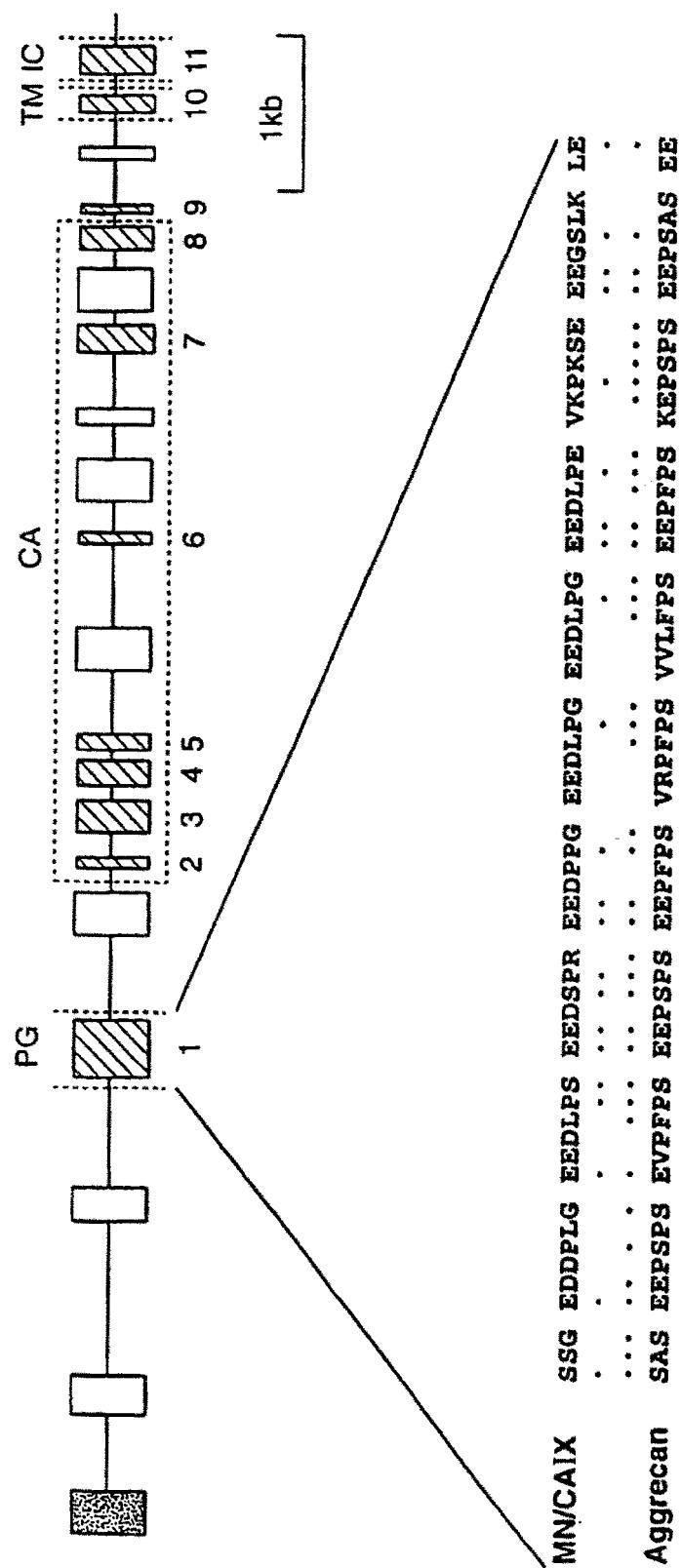


FIG._5

-506 CTTGCTTTTC ATTCAAGCTC AAG^TTGTCT CCCACATACC CATACTTAA CTCACCC^TCG
 -446 GGCTCCCCTA GCAGCCTGCC CTACCTCTT ACCTGCTTCC TGGTGGAGTC AGGGATGTAT
 AP2
 -386 ACATGAGCTG CTTTCCCTCT^T CAGCCAGAGG ACATGGGGG CCCCAGCTCC CCTGCCTTTC
 -326 CCCTTCTGCTG CCTGGAGCTG GAAAGCAGGC CAGGGTTAGC TGAGGCTGCC TGGCAAGCAG
 -266 CTGGGTGGTG CCAGGGAGG CCTGCATAGT GCCAGGTTGGT GCCTTGGTT CCAAGCTAGT
 VII
 p53
 -206 CCATGGCCCC GATAACCTTC TGCCCTGTCACACCCCTGCC CCTCACTCCA CCCCATCC
 VI
 VII
 VII
 V
 -146 AGCTTTGGTA TGGGGAGAG GGCACAGGGC CAGACAAACC TGTGAGACTT TGCTCCATC
 IV
 AP1
 III
 Inr
 -86 TCTGCAAAG GGCCTCTGT GAGTCAGGCC GCTCCCTCC AGGCTTGCTC CTCCCCACC
 II
 AP1
 p53

 I
 AP2
 * * *
 -26 CAGCTCTCGT TTCCAAATGCA CGTACAGCCC GTACACACCG TGTGCTGGGA CACCCACAG

FIG. 6

ES 2 296 412 T3

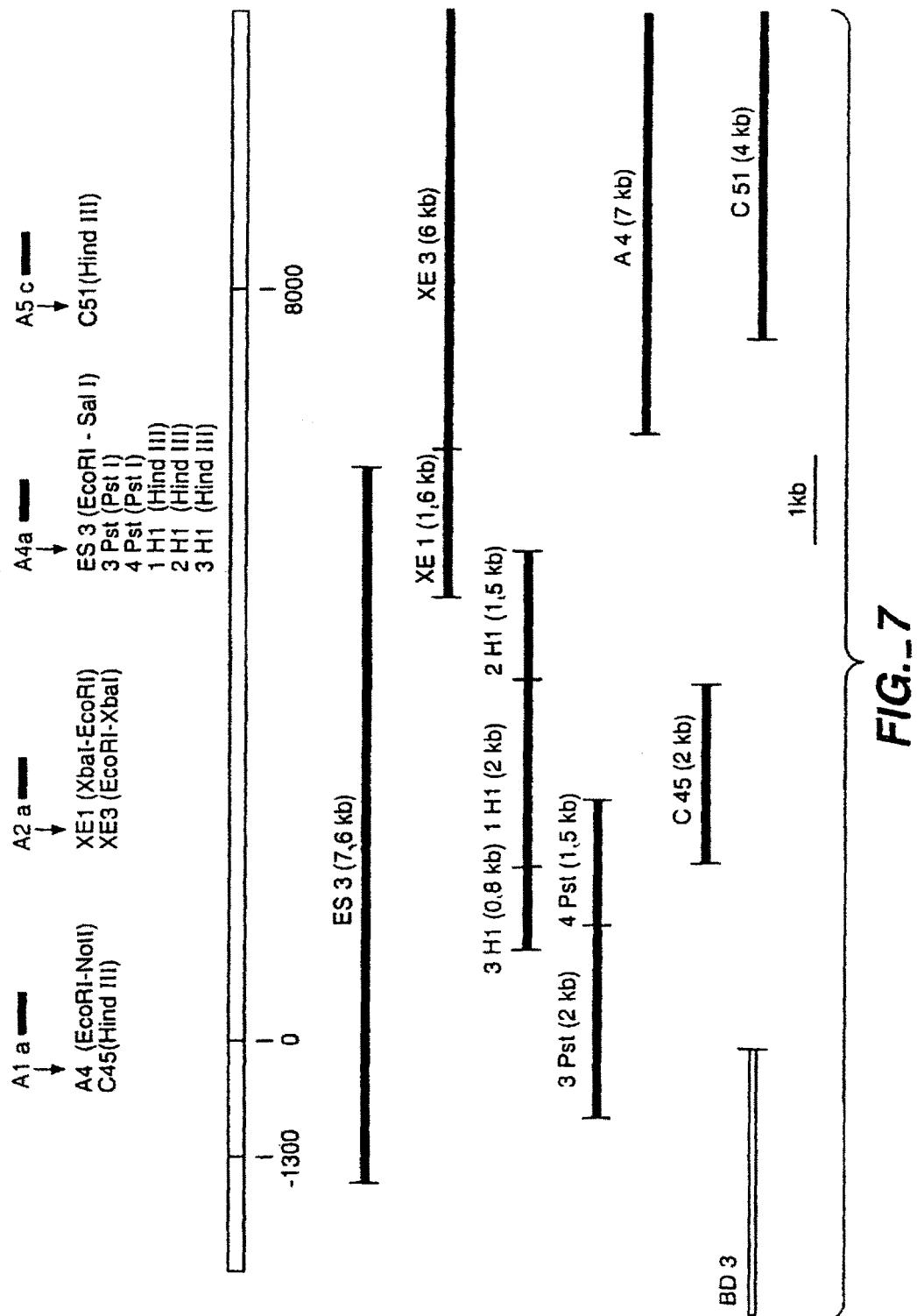


FIG. 7

ES 2 296 412 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Zavada, Jan
Pastorekova, Silvia
Pastorek, Jaromir
10 <120> Gen y Proteína MN
<130> D-0021.5 PCT
15 <140>
<141>
<150> 09/177.776
<151> 23-10-1998
<150> 09/178.115
<151> 23-10-1998
<160> 143
20 <170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 1522
<212> ADN
25 <213> HUMANO
<220>
<221> CDS
30 <222> (13) .. (1389)

<220>
<221> mat peptídico
35 <222> (124) .. (1389)

<400> 1
40 acagtcagcc gc atg gct ccc ctg tgc ccc agc ccc tgg ctc cct ctg ttg 51
Met Ala Pro Leu Cys Pro Ser Pro Trp Leu Pro Leu Leu
-35 -30 -25
45 atc ccy ggc cct gat cca ggc ctc act gtg caa ctg ctg tca ctg 99
Ile Pro Ala Pro Ala Pro Gly Leu Thr Val Gln Leu Leu Leu Ser Leu
-20 -15 -10
50 ctg ctt ctg atg cct gtc cat ccc cag agg ttg ccc cgg atg cag gag 147
Leu Leu Leu Met Pro Val His Pro Gln Arg Leu Pro Arg Met Gln Glu
-5 -1 1 5

ES 2 296 412 T3

gat tcc ccc ttg gga gga ggc tct tct ggg gaa gat gac cca ctg ggc Asp Ser Pro Leu Gly Gly Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly 10	15	20	195
5			
gag gag gat ctg ccc agt gaa gag gat tca ccc aga gag gag gat cca Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro 25	30	35	243
10			
ccc gga gag gag gat cta cct gga gag gag gat cta cct gga gag gag Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu 15	45	50	291
15			
gat cta cct gaa gtt aag cct aaa tca gaa gaa gag ggc tcc ctg aag Asp Leu Pro Glu Val Lys Pro Lys Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys 20	60	65	339
20			
tta gag gat cta cct act gtt gag gct cct gga gat cct caa gaa ccc Leu Glu Asp Leu Pro Thr Val Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Glu Pro 25	75	80	387
25			
cag aat aat gcc cac agg gac aaa gaa ggg gat gac cag agt cat tgg Gln Asn Asn Ala His Arg Asp Lys Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp 30	90	95	435
30			
cgc tat gga ggc gac ccg ccc tgg ccc cgg gtg tcc cca gcc tgc gcg Arg Tyr Gly Gly Asp Pro Pro Trp Pro Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala 35	105	110	483
35			
ggc cgc ttc cag tcc ccg gtg gat atc cgc ccc cag ctc gcc gcc ttc Gly Arg Phe Gln Ser Pro Val Asp Ile Arg Pro Gln Leu Ala Ala Phe 40	125	130	531
40			
tgc ccg gcc ctg cgc ccc ctg gaa ctc ctg ggc ttc cag ctc ccg ccg Cys Pro Ala Leu Arg Pro Leu Glu Leu Leu Gly Phe Gln Leu Pro Pro 45	140	145	579
45			
ctc cca gaa ctg cgc ctg cgc aac aat ggc cac agt gtg caa ctg acc Leu Pro Glu Leu Arg Leu Arg Asn Asn Gly His Ser Val Gln Leu Thr 50	155	160	627
50			
ctg cct cct ggg cta gag atg gct ctg ggt ccc ggg cgg gag tac cgg Leu Pro Pro Gly Leu Glu Met Ala Leu Gly Pro Gly Arg Glu Tyr Arg 55	170	175	675
55			
gct ctg cag ctg cat ctg cac tgg ggg gct gca ggt cgt ccg ggc tcg Ala Leu Gln Leu His Leu His Trp Gly Ala Ala Gly Arg Pro Gly Ser 60	185	190	723
60			
185	195	200	723

ES 2 296 412 T3

gag	cac	act	gtg	gaa	ggc	cac	cgt	ttc	cct	gcc	gag	atc	cac	gtg	gtt	771
Glu	His	Thr	Val	Glu	Gly	His	Arg	Phe	Pro	Ala	Glu	Ile	His	Val	Val	
205									210					215		
5																
cac	ctc	agc	acc	gcc	ttt	gcc	aga	gtt	gac	gag	gcc	ttg	ggg	ccg	ccg	819
His	Leu	Ser	Thr	Ala	Phe	Ala	Arg	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Pro	
220								225					230			
10																
gga	ggc	ctg	gcc	gtg	ttg	gcc	gcc	ttt	ctg	gag	gag	ggc	ccg	gaa	gaa	867
Gly	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Gly	Pro	Glu	Glu	
235								240					245			
15																
aac	agt	gcc	tat	gag	cag	ttg	ctg	tct	cgc	ttg	gaa	gaa	atc	gct	gag	915
Asn	Ser	Ala	Tyr	Glu	Gln	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Glu	Glu	Ile	Ala	Glu	
250								255					260			
20																
gaa	ggc	tca	gag	act	cag	gtc	cca	gga	ctg	gac	ata	tct	gca	ctc	ctg	963
Glu	Gly	Ser	Glu	Thr	Gln	Val	Pro	Gly	Leu	Asp	Ile	Ser	Ala	Leu	Leu	
265								270					275			
25																
ccc	tct	gac	ttc	agc	cgc	tac	ttc	caa	tat	gag	ggg	tct	ctg	act	aca	1011
Pro	Ser	Asp	Phe	Ser	Arg	Tyr	Phe	Gln	Tyr	Glu	Gly	Ser	Leu	Thr	Thr	
285								290					295			
30																
ccg	ccc	tgt	gcc	cag	ggt	gtc	atc	tgg	act	gtg	ttt	aac	cag	aca	gtg	1059
Pro	Pro	Cys	Ala	Gln	Gly	Val	Ile	Trp	Thr	Val	Phe	Asn	Gln	Thr	Val	
300								305					310			
35																
atg	ctg	agt	gct	aag	cag	ctc	cac	acc	ctc	tct	gac	acc	ctg	tgg	gga	1107
Met	Leu	Ser	Ala	Lys	Gln	Leu	His	Thr	Leu	Ser	Asp	Thr	Leu	Trp	Gly	
315								320					325			
40																
cct	ggt	gac	tct	cg	cta	cag	ctg	aac	ttc	cga	g	ac	cg	cag	cct	1155
Pro	Gly	Asp	Ser	Arg	Leu	Gln	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Thr	Gln	Pro	Leu	
330								335					340			
45																
aat	ggg	cga	gtg	att	gag	gcc	tcc	ttc	cct	gct	gga	gtg	gac	agc	agt	1203
Asn	Gly	Arg	Val	Ile	Glu	Ala	Ser	Phe	Pro	Ala	Gly	Val	Asp	Ser	Ser	
345								350					355			
50																
cct	cg	gct	gag	cca	gtc	cag	ctg	aat	tcc	tgc	ctg	gct	gct	ggt	1251	
Pro	Arg	Ala	Ala	Glu	Pro	Val	Gln	Leu	Asn	Ser	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	
365								370					375			
55																
gac	atc	cta	gcc	ctg	gtt	ttt	ggc	ctc	ctt	ttt	gct	gtc	acc	agc	gtc	1299
Asp	Ile	Leu	Ala	Leu	Val	Phe	Gly	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Val	
380								385					390			
60																

ES 2 296 412 T3

gcg ttc ctt gtg cag atg aga agg cag cac aga agg gga acc aaa ggg 1347
 Ala Phe Leu Val Gln Met Arg Arg Gln His Arg Arg Gly Thr Lys Gly
 395 400 405
 5

ggt gtg agc tac cgc cca gca gag gta gcc gag act gga gcc 1389
 Gly Val Ser Tyr Arg Pro Ala Glu Val Ala Glu Thr Gly Ala
 10 410 415 420

tagaggctgg atcttggaga atgtgagaag ccagccagag gcacatctgagg gggagccggt 1449
 15 aactgtctcg tcctgctcat tatgccactt ccttttaact gccaagaaaat tttttaaaat 1509

aaatatttat aat 1522
 20

<210> 2
 <211> 459
 25 <212> PRT
 <213> HUMANO

<400> 2

30 Met Ala Pro Leu Cys Pro Ser Pro Trp Leu Pro Leu Leu Ile Pro Ala
 -35 -30 -25

35 Pro Ala Pro Gly Leu Thr Val Gln Leu Leu Ser Leu Leu Leu
 -20 -15 -10

40 Met Pro Val His Pro Gln Arg Leu Pro Arg Met Gln Glu Asp Ser Pro
 -5 -1 1 5 10

45 Leu Gly Gly Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp
 15 20 25

50 Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu
 30 35 40

55 Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
 45 50 55

60 Glu Val Lys Pro Lys Ser Glu Glu Gly Ser Leu Lys Leu Glu Asp
 60 65 70 75

65 Leu Pro Thr Val Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Glu Pro Gln Asn Asn
 80 85 90

Ala His Arg Asp Lys Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp Arg Tyr Gly
 95. 100 105

ES 2 296 412 T3

	Gly Asp Pro Pro Trp Pro Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala Gly Arg Phe		
	110	115	120
5	Gln Ser Pro Val Asp Ile Arg Pro Gln Leu Ala Ala Phe Cys Pro Ala		
	125	130	135
10	Leu Arg Pro Leu Glu Leu Leu Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Pro Glu		
	140	145	150
	155		
15	Leu Arg Leu Arg Asn Asn Gly His Ser Val Gln Leu Thr Leu Pro Pro		
	160	165	170
	Gly Leu Glu Met Ala Leu Gly Pro Gly Arg Glu Tyr Arg Ala Leu Gln		
	175	180	185
20	Leu His Leu His Trp Gly Ala Ala Gly Arg Pro Gly Ser Glu His Thr		
	190	195	200
25	Val Glu Gly His Arg Phe Pro Ala Glu Ile His Val Val His Leu Ser		
	205	210	215
	Thr Ala Phe Ala Arg Val Asp Glu Ala Leu Gly Arg Pro Gly Gly Leu		
30	220	225	230
	235		
	Ala Val Leu Ala Ala Phe Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu Asn Ser Ala		
	240	245	250
35	Tyr Glu Gln Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu Ile Ala Glu Glu Gly Ser		
	255	260	265
40	Glu Thr Gln Val Pro Gly Leu Asp Ile Ser Ala Leu Leu Pro Ser Asp		
	270	275	280
45	Phe Ser Arg Tyr Phe Gln Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys		
	285	290	295
50	Ala Gln Gly Val Ile Trp Thr Val Phe Asn Gln Thr Val Met Leu Ser		
	300	305	310
	315		
	Ala Lys Gln Leu His Thr Leu Ser Asp Thr Leu Trp Gly Pro Gly Asp		
	320	325	330
55	Ser Arg Leu Gln Leu Asn Phe Arg Ala Thr Gln Pro Leu Asn Gly Arg		
	335	340	345
60	Val Ile Glu Ala Ser Phe Pro Ala Gly Val Asp Ser Ser Pro Arg Ala		
	350	355	360

ES 2 296 412 T3

Ala Glu Pro Val Gln Leu Asn Ser Cys Leu Ala Ala Gly Asp Ile Leu
365 370 375

5 Ala Leu Val Phe Gly Leu Leu Phe Ala Val Thr Ser Val Ala Phe Leu
380 385 390 395

10 Val Gln Met Arg Arg Gln His Arg Arg Gly Thr Lys Gly Gly Val Ser
400 405 410

15 Tyr Arg Pro Ala Glu Val Ala Glu Thr Gly Ala
415 420

20 <210> 3
<211> 29
<212> ADN
<213> HUMANO
25 <400> 3

30 cgcccagtgg gtcatcttcc ccagaagag 29
<210> 4
<211> 19
<212> ADN
35 <213> HUMANO
<400> 4

40 ggaatccctcc tgcatccgg 19
<210> 5
<211> 10898
45 <212> ADN
<213> HUMANO
<220>
50 <221> gen
<222> (1) .. (10898)
<400> 5

55 ggatcctgtt gactcgtgac cttaccccca accctgtgct ctctgaaaca tgagctgtgt 60
ccactcaggg ttatatggat taaggggggt gcaagatgtg ctttgttaaa cagatgcttg 120
60 aaggcagcat gtcgttaag agtcatcacc aatcccta atcagaat cagggacaca 180

ES 2 296 412 T3

aacactgcgg aaggccgcag ggtcctctgc ctagaaaaac cagagacctt tggtaacttg 240
5
tttatctgac ctteccctcca ctattgtcca tgaccctgcc aaatccccct ctgtgagaaa 300
caccgaagaa ttatcaataa aaaaataaaat ttaaaaaaaaaa aatacaaaaaa aaaaaaaaaa 360
10
aaaaaaaaaa gacttacgaa tagttattga taaatgaata gctattggta aagccaagta 420
aatgatcata ttcaaaacca gacggccatc atcacagctc aagtctacct gattgatct 480
15
ctttatcatt gtcattctt ggattcacta gattagtcat catcctcaaa attctcccc 540
aagttctaat tacgttccaa acatttaggg gttacatgaa gcttgaacct actaccttct 600
20
ttgctttga gccatgagtt gtaggaatga tgagtttaca ctttacatgc tgggattaa 660
tttaaacttt acctctaagt cagttggta gcctttggct tattttgtta gctaattttg 720
25
tagttaatgg atgcaactgtg aatcttgcta tgatagttt cttccacact ttgccactag 780
gggttaggtag gtactcagtt ttcagtaatt gcttacctaa gaccctaagc cctatttctc 840
30
ttgtactggc ctttatctgt aatatggca tatttaatac aatataattt ttggagtttt 900
tttggggttt tgtttgggg ttttttgag acggagtctt gcatctgtca tgcccaggct 960
35
ggagtagcag tggtgccatc tcggctact gcaagctcca cctcccgagt tcacgccatt 1020
ttccctgcctc agcctcccgaa gtagctggga ctacaggcgc cggccaccat gcccggctaa 1080
40
ttttttgtat ttttggtaga gacggggttt caccgtgtta gccagaatgg tctcgatctc 1140
ctgacttcgt gatccaccccg cctcggccctc ccaaagttct gggattacag gtgtgagcca 1200
45
ccgacacgg ccaattttttt gagttttta aagttttttt atgtcttgta agctggtaac 1260
tatggtacat tccctttat taatgtggtg ctgacggtca tataaggttct tttgagtttg 1320
50
gcatgcataat gctactttttt gcagtccttt cattacattt ttctctcttc atttgaagag 1380
catgttatat cttttagctt cacttggctt aaaaggttct ctcattagcc taacacagt 1440
55
tcattgttgg taccacttgg atcataagt gaaaaacagt caagaaattt cacagtaata 1500
cttggggta agagggatga ttcaggtgaa tctgacacta agaaaactccc ctacctgagg 1560
60
tctgagattc ctctgacatt gctgtatata ggctttctt ttgacagct gtgactgccc 1620

ES 2 296 412 T3

actatTTTtc ttaagcaaga tatgctaaag ttttgtgagc ctTTTccag agagaggtct 1680
5 catatctgca tcaagtgaga acatataatg tctgcattttc tccatatttc aggaatgttt 1740
gcttgtgttt tatgtttta tatagacagg gaaacttggc cctcagtgc ccaaaagagg 1800
10 tggaattgt tattggatat catcattggc ccacgcttc tgaccttggc aacaattaag 1860
ggtcataat ctcaattctg tcagaattgg tacaagaaat agctgctatg tttcttgaca 1920
15 ttccacttgg taggaataa gaatgtgaaa ctcttcagtt ggtgtgtgc cctngtttt 1980
ttgcaatttc cttcttactg tgtaaaaaa aagtatgatc ttgcctgtgc aggtgaggca 2040
20 ttcttaatca tgatcttaa agatcaataa tataatcctt tcaaggatta tgtctttatt 2100
ataataaaga taatttgct ttaacagaat caataatata atcccttaaa ggattatatc 2160
25 ttgctggc gcagtggtc acacctgtaa tcccagcact ttgggtggcc aaggtggaag 2220
gatcaaattt gcctacttct atattatctt ctaaagcaga attcatctt cttccctcaa 2280
30 tatgatgata ttgacagggc ttgccttcac tcactagatt gtgagctctt gtcaggggca 2340
ggtagcgttt ttgtttttt tttttgtttt tcttttttga gacagggctt tgctctgtca 2400
cccaggccag agtgcaatgg tacagtctca gtcactgca gcctcaaccg ctcggctca 2460
40 aaccatcatc ccatttcagc ctcttgagta gctggacta caggcacatg ccattacacc 2520
tggctaattt ttgttattt ctagtagaga cagggtttgg ccatgttgc cgggctggc 2580
tcgaactcct ggactcaagc aatccaccca ctcagcctc ccaaaatgag ggaccgtgtc 2640
45 ttattcattt ccatgtccct agtccatagc ccagtgttgg acctatggta gtactaaata 2700
aatatttgtt gaatgcaata gtaaatagca ttccagggag caagaactag attaacaag 2760
50 gtggtaaaag gtttggagaa aaaaataata gtttaatttgc tagaggtat gagggagagt 2820
agttaggagac aagatggaaa ggtcttttgg gcaaggtttt gaaggaagtt ggaagtcaga 2880
55 agtacacaat gtgcataatcg tggcaggcag tggggagcca atgaaggctt ttgagcagga 2940
gagtaatgtt ttgaaaaata aatataaggaa aacctatca gagccctct gacacataca 3000
60 cttgcttttc attcaagctc aagtttgc tccacatacc cattactaa ctcaccctcg 3060

ES 2 296 412 T3

5 ggctccccata gcagccctgcc ctacctcttt acctgcttcc tggggagtc agggatgtat 3120
acatgagctg cttccctct cagccagagg acatgggggg ccccaagctcc cctgcctttc 3180
cccttcgtg cctggagctg ggaaggcaggc cagggtttgc tgagggctggc tggcaagcag 3240
10 ctgggtggtg ccagggagag cctgcatagt gccaggtggt gccttgggtt ccaagctagt 3300
ccatggcccc gataaccttc tgcctgtca cacacctgcc cctcactcca ccccccattc 3360
15 agctttggta tgggggagag ggcacaggc cagacaaacc tgtgagactt tggctccatc 3420
tctgaaaaag ggccgtctgt gagtcagcct gctccctccagg cttttgttc ctccccacc 3480
20 cagctctcggt ttccaaatgca cgtacagccc gtacacacccg tgtgctggga caccacacag 3540
tcagccgcat ggctccccctg tgccccagcc cctggctccc tctgttgcac ccggccctg 3600
25 ctccaggccct cactgtgcaa ctgctgtgt cactgctgt tctggtgcct gtccatcccc 3660
agaggttgcc ccggatgcag gaggatccc cttgggagg aggctttctt gggaaagatg 3720
30 acccactggg cgaggaggat ctgcccagtg aagaggattc acccagagag gaggatccac 3780
ccggagagga ggatctaccc ggagaggagg atctacctgg agaggaggat ctacctgaag 3840
35 ttaagcctaa atcagaagaa gagggctccc tgaagttaga ggatctaccc actgttgagg 3900
ctcctggaga tcctcaagaa ccccagaata atgcccacag ggacaaagaa ggttaagtgg 3960
40 catcaatctc caaatccagg ttccaggagg ttcatgactc ccctccata ccccaagccta 4020
ggctctgttc actcagggaa ggaggggaga ctgtactccc cacagaagcc cttccagagg 4080
45 tcccataccca atatccccat ccccaactctc ggaggttagaa agggacacat gtggagagaa 4140
aataaaaagg gtgaaaaagg agagaggtga gctggatgag atgggagaga agggggaggc 4200
50 tggagaagag aaaggatgaa gaactgcaga tgagagaaaa aatgtgcaga cagagaaaa 4260
aaataggtgg agaaggagag tcagagagtt tgaggggaag agaaaaggaa agcttggag 4320
55 gtgaagtggg taccagagac aagcaagaag agctggtaga agtcatctca tcttaggcta 4380
caatgagggaa ttgagaccta ggaagaaggg acacagcagg tagagaaacy tggcttctt 4440
60 actcccaagc caggaatttg gggaaagggg ttggagacca tacaaggcag agggatgagt 4500

ES 2 296 412 T3

5 ggggagaaga aagaagggag aaaggaaaga tggtgtactc actcatttgg gactcaggac 4560
 tgaagtgccc actcactttt tttttttttt tttttgagac aaactttcac ttttggc 4620
 caggctggag tgcaatggcg cgatcteggc tcactgcac acacccctcc cgggttcaag 4680
 10 tgattctcct gcctcagdct ctagccaagt agctgcgatt acaggcatgc gccaccacgc 4740
 cggcttaatt tttgtattt tagtagagac ggggtttcgc catgttggc aggctggtct 4800
 15 cgaactcctg atctcaggtg atccaaaccac cctggcctcc caaagtgcgt ggattatagg 4860
 cgtgagccac agcgcctggc ctgaagcagc cactcactt tacagacccct aagacaatga 4920
 20 ttgcaagctg gtaggattgc tgtttggccc acccagctgc ggtgttgagt ttgggtgcgg 4980
 tctcctgtgc tttgcacctg gcccgttaa ggcatttgtt acccgtaatg ctcctgtaaag 5040
 25 gcatctgcgt ttgtgacatc gttttggcgc ccaggaaggg attggggctc taagctttag 5100
 cggttcatcc tttcattta tacagggat gaccagagtc attggcgcta tggaggtgag 5160
 30 acacccaccc gctgcacaga cccaaatctgg gaacccagct ctgtggatct cccctacagc 5220
 cgtccctgaa cactggtccc gggcgtecca cccggggccc accgtcccac cccctcacct 5280
 35 tttctacccg gtttccctaa gtccctgacc taggcgtcag acttcctcac tatactctcc 5340
 caccccaagc gacccggccct ggcccccgggt gtcccccagcc tgcgcgggac gcttccagtc 5400
 40 cccgggtggat atccggcccccc agetcgccgc cttctgccccg gccctgcgc cccctggaaact 5460
 cctgggcttc cagctccccgc cgctcccaga actgcgcctg cgcaacaatg gccacagtgg 5520
 45 tgagggggtc tccccggcga gacttggggta tgggggggggg cgcaggaaag ggaaccgtcg 5580
 cgcagtgcct gccccgggggt tgggtggcc ctaccggcg gggccggctc acttgcctct 5640
 50 ccctacgcag tgcaactgac cctgcctccct gggctagaga tggctctggg tccccggggcgg 5700
 gagtacccggg ctctgcagct gcatctgcac tggggggctg caggtcggtcc gggctcggag 5760
 55 cacactgtgg aaggccacccg tttccctgcc gagggtgagcg cggactggcc gagaaggggc 5820
 aaaggagcgg ggcggacggg ggcacagagac gtggccctct cctaccctcg tgccttttc 5880
 60 agatccacgt ggtcacctc agcaccgcct ttgcccagat tgacgaggcc ttggggcgcc 5940

ES 2 296 412 T3

cgggaggcct ggccgtgttgc cccgccttc tggaggtacc agatcctgga cacccttac 6000
tccccgttt cccatccccat gtcctcccg gactctatcg tggagccaga gaccccatcc 6060
5 cagcaagctc actcaggccc ctggctgaca aactcattca cgcactgttt gttcattaa 6120
cacccactgt gaaccaggca ccagecccca acaaggattc tgaagctgta ggtccttgcc 6180
10 tctaaggagc ccacagccag tgggggaggc tgacatgaca gacacatagg aaggacatag 6240
taaagatggt ggtcacagag gaggtgacac ttaaagcctt cactggtaga aaagaaaagg 6300
15 aggtgttcat tgcagagga acagaatgtg caaagactca gaatatggcc tatttaggga 6360
atggctacat acaccatgat tagaggagc ccagtaaagg gaagggatgg tgagatgcct 6420
20 gctaggttca ctcactcact tttattttt tttttttttt tttgacagtc tctctgtgc 6480
ccaggetgga gtgcagtgggt gtgatcttgg gtcactgcaa cttccgcctc cccgggttcaa 6540
25 gggatttcc tgcctcagct tcctgagtag ctggggttac aggtgtgtgc caccatgecc 6600
agctaattttt tttttgtatt ttttagtagac agggtttac catgttggtc aggctggct 6660
30 ccaaactctg gcctcaagtg atccgcctga ctcagcctac caaagtgttg attacaagtg 6720
tgagccacccg tgcccagcca cactcactga ttcttaatg ccagccacac agcacaaaagt 6780
35 tcaagagaaat gcctccatca tagcatgtca atatgttcat actcttaggt tcatgtatgtt 6840
cttaacatta gttcataag caaaataaga aaaaagaata ataaataaaa gaagtggcat 6900
40 gtcaggaccc cacctgaaaaa gccaaacaca gaatcattgaa ggtgaatgca gaggtgacac 6960
caacacaaaag gtgtatataat gtttccctgt ggggagtatg tacggaggca gcagtgagtg 7020
45 agactgcaaa cgtcagaagg gcacgggtca ctgagagcct agtacccatg taaagtgggc 7080
tctctccctc tctctccagc ttgtcattga aaaccagtcc accaagcttg ttggttcgca 7140
50 cagcaagagt acatagagtt taaaataata cataggattt taagagggag acactgtctc 7200
55 taaaaaaaaa aacaacagca acaacaaaaa gcaacaacca ttacaattttt atgttccctc 7260

60

65

ES 2 296 412 T3

ccccgaagaa aacagtgcct atgagcagtt gctgtctcgc ttggaagaaa tcgctgagga 7440
aggtcagttt gttggctctgg ccactaatct ctgtggccta gttcataaag aatcaccctt 7500
5 tggagcttca ggtctgaggc tggagatggg ctccctccag tgcaggaggg attgaagcat 7560
gagccagcgc tcatcttgat aataaccatg aagctgarag acacagttac ccgcaaacgg 7620
10 ctgcctacag attgaaaaacc aagcaaaaac cgccgggcac ggtggctac gcctgtaatc 7680
ccagcacttt gggaggccaa ggcaggtgga tcacgaggc aagagatcaa gaccatctg 7740
15 gccaacatgg taaaaacccca tctctactaa aaatacgaaa aaatagccag gcgtgggtggc 7800
gggtgcctgt aatcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatggcat gaacccggga 7860
ggcagaagtt gcagtgagcc gagatcgtgc cactgcactc cagcctggc aacagagcga 7920
20 gactcttgc tcaaaaaaaaaaaaaaaa gaaaaccaag caaaaaaccaa aatgagacaa 7980
aaaaaacaag accaaaaaaat ggtgtttgga aattgtcaag gtcaagtctg gagagctaaa 8040
25 ctttttctga gaactgttta tcttaataa gcatcaaata ttttaacttt gtaaaatactt 8100
ttgttgaaa tcgttctctt cttagtcact cttgggtcat tttaaatctc acttactctt 8160
30 ctagaccttt taggtttctg ctagactagg tagaactctg ctttgcatt tcttgtgtct 8220
gttttgata gttatcaata ttcatatata tttacaagtt attcagatca ttttttcttt 8280
35 tctttttttt tttttttttt ttttttacat ctttagtaga gacagggttt caccatattg 8340
gcccaggctgc tctcaaactc ctgaccttgc gatccaccag cctcggcctc ccaaagtgt 8400
40 gggattcatt tttttttttt aatttgcctt gggcttaaac ttgtggccca gcaactttatg 8460
atggtagacaca gagttaaagag tggtagactca gacgggtttt cttctttctt tctcttcctt 8520
45 cttcccttcc ctccccaccc ttcccttcttc ctccctttttt ttctttcttc cttgtttctt 8580
caggccctttt ccagttgctc caaagccctg tactttttt tgagttaaacg tcttatggga 8640
50 agggccctgca ctttagtgaag aagtggcttc agagttgagt taccttggct tctggggaggt 8700
gaaaactgtat ccctataaccc tgaagcttta agggggtgca atgttagatga gaccccaaca 8760
55 tagatccctt tcaacaggctc agagactcag gtccccaggac tggacatatc tgcactctg 8820
60
65

ES 2 296 412 T3

ccctctgact tcagccgcta cttccaatat gaggggtctc tgactacacc gccctgtgcc 8880
cagggtgtca tctggactgt gtttaaccag acagtgatgc tgagtgtcaa gcaggtggc 8940
5 ctggggtgtg tggtggacaca gtgggtgcgg gggaaagagg atgttaagatg agatgagaaa 9000
caggagaaga aagaaatcaa ggctgggctc tgtggcttac gcctataatc ccaccacgtt 9060
10 gggaggctga ggtgggagaa tggtttgagc ccaggagttc aagacaaggc gggcaacat 9120
agtgtgaccc catctctacc aaaaaaacc aacaaaacc aaaaatagcc gggcatggt 9180
15 gtatgeggcc tagtcccagc tactcaagga ggctgaggtg ggaagatgec ttgatccag 9240
gagtttgaga ctgcagtgag ctatgatccc accactgcct accatctta ggatacattt 9300
20 atttatttat aaaagaaaatc aagaggctgg atggggata caggagctgg agggtggagc 9360
cctgaggtgc tgggttgag ctggcctggg acccttgtt cctgtcatgc catgaaccca 9420
25 cccacactgt ccactgaccc ccctagetcc acaccccttc tgacaccctg tggggacctg 9480
gtgactctcg gctacagctg aacttccgag cgacgcagcc tttgaatggg cgagtgattg 9540
30 aggcctcctt ccctgctgga gtggacagca gtcctcgggc tgctgagcca ggtacagctt 9600
tgtctggttt ccccccagcc agtagtccct tattctccca tgtgtgtgcc agtgtctgtc 9660
35 attgggtggtc acagccccgc tctcacatct ccttttctc tccagtcag ctgaattcct 9720
gcctggctgc tggtgagtct gcccccttc ttggcctga tgccaggaga ctcctcagca 9780
40 ccattcagcc ccagggctgc tcaggacgc ctctgctccc tctcctttc tgcagaacag 9840
accccaaccc caatattaga gaggcagatc atggtgggaa ttccccatt gtccccagag 9900
45 gctaattgat tagaatgaag cttgagaaat ctccccagcat ccctctcgca aaagaatccc 9960
cccccctttt tttaaagata gggtctcact ctgtttgccc caggctgggg tgttgtggca 10020
50 cgatcatagc tcactgcagc ctcgaactcc taggctcagg caatccttcc accttagctt 10080
ctcaaagcac tgggactgta ggcattgagcc actgtgcctg gccccaaacg gccctttac 10140
55 ttggctttta ggaagcaaaa acggtgctt aatcctccct tctcgtgtat ccaccctcat 10200
60 cccttggctg ccctctctg gagactgagg cactatgggg ctgcctgaga actcggggca 10260

ES 2 296 412 T3

gggggtggtgg agtgcactga ggcaggtgtt gaggaactct gcagacccct cttccttccc 10320

5 aaagcagccc tctctgctct ccatcgagg tgacatccta gcccctggttt ttggcctcct 10380

tttgctgtc accagcgtcg cgttccttgcg gcagatgaga aggcagcaca gtttacac 10440

10 tgacccttc ttcaggcaca agcttcccc acccttgcg agtcacttca tgcaaagcgc 10500

atgcaaatga gctgctcctg ggccagtttt ctgattagcc tttcctgttg tgtacacaca 10560

15 gaaggggaac caaaggggggt gtgagctacc gcccagcaga ggtagccgag actggagcct 10620

agaggctgga tcttggagaa tgtgagaagc cagccagagg catctgaggg ggagccggta 10680

20 actgtcctgt cctgctcatt atgcacttc cttttactg ccaagaaatt ttttaaaata 10740

aatatttata ataaaatatg tgtagtcac ctttgcctcc caaatcagaa ggaggtattt 10800

25 gaatttccta ttactgttat tagcaccaat ttagtggtaa tgcatttatt ctattacagt 10860

30 tcggcctcct tccacacatc actccaatgt gttgctcc 10898

<210> 6

<211> 37

35 <212> PRT

<213> HUMANO

<400> 6

40 Met Ala Pro Leu Cys Pro Ser Pro Trp Leu Pro Leu Leu Ile Pro Ala
1 5 10 15

45 Pro Ala Pro Gly Leu Thr Val Gln Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu
20 25 30

Met Pro Val His Pro

35

50 <210> 7

<211> 25

<212> ADN

55 <213> HUMANO

<400> 7

60 tggggtttctt gaggatctcc aggag 25

<210> 8

<211> 26

<212> ADN

65 <213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<400> 8
 ctcttaacttc agggagccct cttctt 26
 5 <210> 9
 <211> 48
 <212> ADN
 10 <213> HUMANO
 <220>
 <221> cebador_unión
 15 <222> (1) .. (48)
 <400> 9
 20 cuacuacuac uaggccacgc gtcgactagt acgggnnggg nnggnng 48
 <210> 10
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> HUMANO
 <400> 10
 30 Glu Glu Asp Leu Pro Ser
 1 5
 35 <210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> HUMANO
 40 <400> 11
 45 Gly Glu Asp Asp Pro Leu
 1 5
 <210> 12
 <211> 21
 50 <212> PRT
 <213> HUMANO
 <400> 12
 55 Asn Asn Ala His Arg Asp Lys Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp Arg
 1 5 10 15
 60 Tyr Gly Gly Asp Pro
 20
 <210> 13
 <211> 16
 65 <212> PRT
 <213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<400> 13

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

5 <210> 14

<211> 24

<212> PRT

10 <213> HUMANO

<400> 14

15 Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu
1 5 10 15

Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly
20 20

<210> 15

<211> 13

25 <212> PRT

<213> HUMANO

<400> 15

30 Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu Asn Ser Ala Tyr Glu Gln
1 5 10

<210> 16

35 <211> 16

<212> PRT

<213> HUMANO

40 <400> 16

Met Arg Arg Gln His Arg Arg Gly Thr Lys Gly Gly Val Ser Tyr Arg
1 5 10 15

45 <210> 17

<211> 45

<212> ADN

<213> HUMANO

50

<400> 17

gtcgctagct ccatgggtca tatgcagagg ttgccccgga tgca

45

55

<210> 18

<211> 43

<212> ADN

60 <213> HUMANO

<400> 18

65 gaagatct tactcgagca ttctccaaga tccagcctct agg

43

<210> 19

ES 2 296 412 T3

<211> 10
 <212> ADN
 <213> HUMANO
 5
 <400> 19
 ctccatctct
 10
 <210> 20
 <211> 10
 <212> ADN
 15 <213> HUMANO
 <400> 20
 ccaccccat
 20
 <210> 21
 <211> 205
 25 <212> ADN
 <213> HUMANO
 <400> 21
 30 acctggccct cactccaccc ccatccttagc tttggtatgg gggagagggc acagggccag 60
 acaaacctgt gagactttgg ctccatctct gcaaaaagggc gctctgtgag tcagcctgct 120
 35 cccctccagg cttgctcctc ccccacccag ctctcgtttc caatgcacgt acagcccgta 180
 40 cacaccgtgt gctgggacac cccac
 205
 <210> 22
 45 <211> 8
 <212> PRT
 <213> HUMANO
 50 <400> 22
 Leu Gly His His His His His
 1 5
 55 <210> 23
 <211> 10
 <212> ADN
 60 <213> HUMANO
 <220>
 <221> Característica misc
 <222> (1) .. (10)
 65

ES 2 296 412 T3

<400> 23

 yyyccayyyyyy 10

5 <210> 24
 <211> 10
 <212> ADN
10 <213> HUMANO
 <300>
 <301> Locker y Buzard.,
 <303> Secuenciación y mapeo de ADN
15 <304> 1
 <306> 3-11
 <307> 1990
20 <400> 24

 tgtgagactt 10

25 <210> 25
 <211> 4
 <212> PRT
30 <213> HUMANO
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1).. (4)
35 <400> 25

 Thr Pro Xaa Xaa
 1

40 <210> 26
 <211> 4
 <212> PRT
45 <213> HUMANO
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1).. (4)
50 <400> 26

 Thr Pro Xaa Xaa
 1

55 <210> 27
 <211> 540
 <212> ADN
60 <213> HUMANO
 <220>
 <221> promotor
 <222> (1).. (540)

ES 2 296 412 T3

<400> 27

```

cttgcttttc attcaagctc aagtttgtct cccacatacc cattactaa ctcaccctcg 60
5      ggctccctta gcagecctgcc ctacctcttt acctgcttcc tggtgagtc agggatgtat 120
      acatgagctg cttccctct cagccagagg acatgggggg ccccagetcc cctgccttcc 180
10     cccttctgtg cctggagctg ggaagcaggc cagggtagc tgaggctggc tggcaagcag 240
      ctgggtggtg ccagggagag cctgcatagt gccaggtggt gccttgggtt ccaagctagt 300
15     ccatggcccc gataaccttc tgcctgtgca cacacctgcc cctcaactcca cccccatcct 360
      agctttggta tggggagag ggcacaggc cagacaaacc tgtgagactt tggctccatc 420
20     tctgcaaaag ggcgctctgt gagtcagcct gctccctcc aggcttgcct ctcffffacc 480
      cagctctcgt ttccaatgca cgtacagccc gtacacacccg tgtgctggga cacccacac 540
25

```

<210> 28

<211> 445

<212> ADN

30 <213> HUMANO

<220>

<221> exón

35 <222> (1).

<223> 1^{er} exón de MN

<400> 28

```

40      gcccgtacac acctgtgtct gggacacccc acagtcagcc gcatggctcc      50
      cctgtgcccc agcccttggc tccctctgtt gatccccggcc cctgctccag      100
      gactcaactgt gcaactatgtt ctgtcaactgtc tgcattatgggt gactgtccat      150
      ccccaaggtt tgcggggat gcaggaggat tcccccggg gaggaggctc      200
50      ttctggggaa gatgacccac tgggcgagga ggtatctgccc agtgaagagg      250
      attcacccag agaggaggat ccacccggag aggaggatct acctggagag      300
55      gaggatctac ctggagagga ggtatctaccc gaagttaagc ctaaatcaga      350
      agaagagggc tccctgaagt tagaggatct acctactgtt gaggctcctg      400
60      gagatcctca agaacccca agaataatgccc acagggacaa agaag      445

```

<210> 29

65 <211> 30

<212> ADN

<213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<220>
 <221> exón
 <222> (1).
 5 <223> 2º exón de MN

 <400> 29

 10 gggatgacca gagtcattgg cgctatggag 30

 <210> 30
 <211> 171
 15 <212> ADN
 <213> HUMANO
 <220>
 20 <221> exón
 <222> (1).
 <223> 3º exón de MN

 25 <400> 30
 gcgacccgccc ctggcccccgg gtgtccccag cctgcgcgggg cccgttccag 50

 tccccgggtgg atatccgcccc ccagctcgcc gcattctgcc cggccctgccc 100
 30 cccctggaa ctccctgggtt tccagatccc gccgcctccca gaatggcc 150

 tgcgcacaa tggccacagt g 171
 35 <210> 31
 <211> 143
 <212> ADN
 40 <213> HUMANO
 <220>
 <221> exón
 <222> (1).
 45 <223> 4º exón de MN

 <400> 31
 tgcaactgac cctgcctctt gggctagaga tggctctygg tcccccgggg 50

 gagtacccggg ctctgcagct gcatctgcac tggggggctg caggtcgtcc 100

 55 gggctcggag cacactgtgg aaggccacccg tttccctgcc gag 143
 <210> 32
 <211> 93
 <212> ADN
 60 <213> HUMANO
 <220>
 <221> exón
 <222> (1).
 65 <223> 5º exón de MN

ES 2 296 412 T3

<400> 32
 atccacgtgg ttcacacctag caccgccttt gccagagttg acgaggcctt 50
 5 gggggccccg ggaggcctgg cctgtttggc cgcctttctg gag 93
 <210> 33
 <211> 67
 10 <212> ADN
 <213> HUMANO
 <220>
 15 <221> exón
 <222> (1).
 <223> 6º exón de MN
 20 <400> 33
 gaggggccccgg aagaaaaacag tgcctatgag cagttgtgt ctgcgttgg 50
 agaaaatcgct gaggaag 67
 25 <210> 34
 <211> 158
 <212> ADN
 30 <213> HUMANO
 <220>
 <221> exón
 35 <222> (1).
 <223> 7º exón de MN
 <400> 34
 40 gtcagagac tcaggcccggactggaca tatctgcact cctgcctct 50
 gacttcagcc gctacttcca atatgagggg tctctgacta caccgcctg 100
 45 tgcccagggt gtcatctggc ctgtgtttaa ccagacagtg atgctgagtg ctaagcag 158
 <210> 35
 <211> 145
 50 <212> ADN
 <213> HUMANO
 <220>
 <221> exón
 55 <222> (1).
 <223> 8º exón de MN
 <400> 35
 60 ctccacaccc tctctgacac cctgtggggc cctgggtact ctcggctaca 50
 gctgaacttc cgagcgacgc agccttggaa tggggcagtg attgaggcct 100
 65 cttccctgc tggagtgac agcagtcctc gggctgctga gccag 145
 <210> 36

ES 2 296 412 T3

<211> 27
 <212> ADN
 <213> HUMANO
 5 <220>
 <221> exón
 <222> (1).
 10 <223> 9º exón de MN
 <400> 36

15 tccagctgaa ttccctgcctg gctgctg 27

<210> 37
 <211> 82
 20 <212> ADN
 <213> HUMANO
 <220>
 <221> exón
 25 <222> (1).
 <223> 10º exón de MN
 <400> 37

30 **gtgacatcct agccctggtt ttggcctcc ttttgcgtt caccagcgtc** 50

50 **gcgtttcccttgc tgcaatgag aaggcagcac ag** 82

35 <210> 38
 <211> 191
 <212> ADN
 <213> HUMANO
 40 <220>
 <221> exón
 <222> (1).
 45 <223> 11º exón de MN
 <400> 38

50 **aaggggaaacc aaagggggtg tgagctaccg cccagcagag gtagccgaga** 50

55 **ctggagccta gaggctggat cttggagaat gtgagaagcc agccagaggc** 100

55 **atctgagggg gagecggtaa ctgtccgtc ctgtctatata tgccacttcc** 150

55 **tttttaactgc caagaaattt tttaataaa atatttataa t** 191

60 <210> 39
 <211> 1174
 <212> ADN
 <213> HUMANO
 65 <220>
 <221> intrón

ES 2 296 412 T3

<222> (1) .. (1174)
 <223> 1^{er} intrón de MN
 5 <400> 39

```

  gtaagtggtc atcaatctcc aaatccaggt tccaggaggt tcatgactcc cctcccatac 60
  10 cccagcttag gctctgttca ctcagggaaag gagggggagac tggactcccc acagaagccc 120
    ttcagaggt cccatccaa tatccccatc cccactctcg gaggttagaaas gggacagatg 180
    15 tggagagaaa ataaaaaggg tgcaaaagga gagaggtgag ctggatgaga tgggagagaa 240
      gggggaggct ggagaagaga aagggatgag aactgcagat gagagaaaaa atgtgcagac 300
    20 agagggaaaaa aataggtgga gaaggagagt cagagagttt gaggggaaga gaaaaggaaa 360
      gcttgggagg tgaagtgggt accagagaca agcaagaaga gctggtagaa gtcatctcat 420
    25 cttaggctac aatgaggaat tgagacctag gaagaaggga cacagcaggt agagaacgt 480
      ggcttcttga ctcceazgcc aggaatttgg ggaaagggt tggagaccat acaaggcaga 540
    30 gggatgagtg gggagaagaa agaagggaga aaggaaagat ggtgtactca ctcatttggg 600
      actcaggact gaagtgcaca ctcactttt tttttttt tttttagaca aacttcaact 660
    35 tttgttgcgg aggctggagt gcaatggcgc gatcteggt cactgcaacc tccacccccc 720

  40 gggttcaagt gattctcctg ctcagccctc tagccaaagta gctgcgattt caggcatgcg 780
    ccaccacgccc cggctaattt ttgttattttt agtagagacg gggtttgcct atgttggtca 840
    45 ggctggcttc gaactcctga ttcaggtga tccaaaccacc ctggccccc aaagtgcgtgg 900
      gattataggc gtgagccaca gcgcctggcc tgaagcagcc actcactttt acagacccta 960
    50 agacaatgtat tgcaagctgg taggattgtt gtttggccca cccagctgcg gtgtttagtt 1020
      tgggtgcggc ctcctgtgtt ttgcacccgg cccgcattttt gcatggatcc cccgtaatgc 1080
    55 tcctgtttagg catctgcgtt tttgttgcgc caggaaggga ttggggctct 1140
      aagcttggac ggttcatctt tttcattttt acatg
  
```

1174

60 <210> 40
 <211> 193
 <212> ADN
 <213> HUMANO
 65 <220>
 <221> intrón

ES 2 296 412 T3

<222> (1) .. (193)

<223> 2º intrón de MN

5 <400> 40

gtgagacacc cacccgctgc acagacccaa tctggaaacc cagctctgtg gatctccct 60

10 acagccgtcc ctgaacactg gtcccggcg tcccacccgc cgcccacccgt cccacccct 120

15 cacctttctt acccggttc cctaagttcc tgacctaggc gtcagacttc ctcactatac 180

193
15 tctcccaccc cag

<210> 41

<211> 131

20 <212> ADN

<213> HUMANO

<220>

<221> intrón

25 <222> (1) .. (131)

<223> 3º intrón de MN

<400> 41

30 gtgagggggt ctccccggcg agacttgggg atggggcggg ggcgcaggaa gggaaaccgtc 60

gcccgcgtgcc tgcccggggg ttgggctggc cttaccgggc gggggccggct cacttgcctc 120

35 tccctacgca g

131

<210> 42

40 <211> 89

<212> ADN

<213> HUMANO

<220>

45 <221> intrón

<222> (1) .. (89)

<223> 4º intrón de MN

50 <400> 42

gtgagcgccgg actggccgag aaggggcaaa ggagcgccggc ggacgggggc cagagacgtg 60

55 gccccctctacc accctctgtgt ccttttcag

89

<210> 43

<211> 1400

60 <212> ADN

<213> HUMANO

<220>

65 <221> intrón

<222> (1) .. (1400)

<223> 5º intrón de MN

ES 2 296 412 T3

<400> 43
 gtaccagatc ctggacaccc cctactcccc gttttccat cccatgtcc tcccgactc 60
 5 tatacgtaggag ccagagaccc cttccacggca agctcaactca ggccctggc tgacaaactc 120
 attcacgcac tttttgttca tttaacaccc actgtgaacc aggccaccage ccccaacaag 180
 10 gattctgaag ctgttaggtcc ttgcctctaa ggagcccaca gccagtgccc gaggctgaca 240
 tgacagacac attaggaagga catagtaaag atgggtgtca cagaggaggt gacacttaaa 300
 15 gccttcactg gtagaaaaga aaaggaggtg ttcattgcag aggaaacaga atgtgcaaag 360
 actcagaata tgccctatTTT agggaatggc tacatacacc atgatttagag gagggccagt 420
 20 aaagggaaagg gatggtgaga tgcctgttag gttcaactcac tcactttat ttatTTT 480
 atTTTTTGA cagtctctct gtcgcccagg ctggagtgca gtgggtgtat cttgggtcac 540
 25 tgcaacttcc gctcccccggg ttcaagggat ttctttgtt cagtttcctg agtagctggg 600
 gttacaggtg tggccacca tgcccagctt atTTTTTTT gtatTTTtag tagacagggt 660
 30 ttcaccatgt tggtcaggct ggtctcaaac tcctggcctc aagtgtatcc cctgactcag 720
 cctacccaaag tgctgattac aagtgtgagc caccgtgccc agccacactc actgattctt 780
 35 taatgccage cacacagcac aaagttcaga gaaatgcctc catcatagca tgtcaatatg 840
 ttcatactct tagttcatg atgttcttaa cattaggttc ataagcaaaa taagaaaaaa 900
 40 gaataataaa taaaagaagt ggcatgtcag gacctcacct gaaaagccaa acacagaatc 960
 atgaagggtga atgcagaggt gacaccaaca caaagggtgtatataatggggat 1020
 45 gtatgtacgg aggcagcagt gaggtagact gcaaacgtca gaaggccacg ggtcaactgag 1080
 agcctagtat cctagtaaag tgggtctctt ccctctctct ccagctgttc attgaaaaacc 1140
 agtccaccaa gcttgggtt tcgcacagca agagtacata gagtttggaa taatacatag 1200
 50 gattttaaaga gggagacact gtctctaaaa aaaaaaaacaa cagcaacaac aaaaagcaac 1260
 aaccattaca attttatgtt ccctcagcat tctcagagct gaggaatggg agaggactat 1320
 60 ggaaacccccc ttcatgttcc ggccttcagc catggccctg gatacatgca ctcatctgtc 1380
 ttacaatgtc attccccccag 1400
 65 <210> 44
 <211> 1334
 <212> ADN

ES 2 296 412 T3

<213> HUMANO

<220>

<221> intrón

5 <222> (1) .. (1334)

<223> 6º intrón de MN

10 <400> 44

10

gtcagtttgt tggctctggcc actaatctct gtggcctagt tcataaagaa tcaccctttg 60

15

gacccttcagg tctgaggctg gagatgggct cccctccagtg caggagggat tgaagcatga 120

gcacgcgctc atcttgatca taaccatgaa gctgacagac acagtttaccc gcaaaacggct 180

20

gcctacagat tgaaaaccaa gcaaaaacccg cccggcacgg tggctcacgc ctgtaatccc 240

agcactttgg gaggccaagg caggtggatc acgaggtcaa gagatcaaga ccattcctggc 300

25

caacatggtg aaaccccatc tctactaaaa atacgaaaaa atagccaggc gtggtggccgg 360

gtgectgtaa tcccaagctac tcgggaggct gaggcaggag aatggcatga acccgggagg 420

30

cagaagttgc agtgagccga gatcggtccca ctgcactcca gcctggcaa cagagcgaga 480

ctcttgcctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaccaagca aaaaccaaaa tgagacaaaa 540

35

aaaacaagac caaaaaatgg tgtttggaaa ttgtcaaggt caagtctgga gagctaaact 600

ttttctgaga actgtttatc tttataaagc atcaaataatt ttaactttgt aaataactttt 660

40

gttggaaatc gttctcttct tagtcaactct tgggtcattt taaatctcac ttactctact 720

agacctttta gtttctgct agacttaggtt gaactctgcc tttgcatttc ttgtgtctgt 780

45

tttgtatagt tatcaatatt catattttt tacaagttat tcagatcatt ttttcttttc 840

tttttttttt ttttacatct ttagtagaga cagggtttca ccatattggc 900

50

caggctgctc tcaaactcct gaccttgtga tccaccagcc tcggccctcc aagtgctgg 960

gattcatttt ttcttttaa ttgtctctgg gcttaaactt gtggcccagc actttatgtat 1020

55

ggtagacacaga gttaaagagtg tagactcaga cggtctttct tctttcttc tcttccttc 1080

tccctccct cccacccctcc ctctctctt tctttttttt ctccctctct tgccttcata 1140

60

ggcctcttcc agttgtccca aagccctgtta cttttttttg agttaacgtc ttatggaaag 1200

ggcctgcact tagtgaagaa gtggctctcg agttgagttt ccttggcttc tgggaggtga 1260

aactgtatcc ctataccctg aagcttttaag ggggtgcaat ttagatgaga ccccaacata 1320

65

gatectcttc acag 1334

ES 2 296 412 T3

ES 2 296 412 T3

<400> 49

caaacttca cttttgttgc ccaggctgga gtgcaatggc gcgatctcg 60
5 cctccaccc cgggttcaa gtgattctcc tgcctcagcc tctagccaa tagctgcgt 120
10 tacaggcatg cgccaccacg cccggctaat ttttgtatcc ttagtagaga cggggtttgc 180
15 ccatgttggt caggctggc tcgaactcct gatctcaggat gatccaaacca ccctggcctc 240
20 ccaaagtgt gggattatacg gcgtgagcca cagcgctgg cctgaagcag ccactcaatt 300
25 ttacagaccc taagacaatg attgcaagct ggtaggattt ctgtttggcc caccagctg 360
30 cggtgtttag tttgggtgcg gtctcctgtg ctttgcaccc ggcccgctt aggcatgtt 420
35 taccgttaat gtcctgtaa ggcattctgcg tttgtacat cgttttggtc gccaggaagg 480
40 gatggggct ctaagcttga ggggttcatc ctttccattt atacagggga tgaccagagt 540
45 cattggcgct atggaggtga gacacccacc cgctgcacag acccaatctg ggaacccage 600
50 tctgtggatc tcccttacag ccgtccctga acactggtcc cgggcgtccc accccggcc 660
55 cacggtecca ccccttcacc ttttctaccc gggttccata agttcctgac cttaggcgtca 720
60 gaettctca ctatactctc ccacccagg cgacccggcc tggccccggg tgtccccagc 780
65 ctgcgcgggc cgcttccagt ccccggtgga tatccggccc cagctcgccg ctttctgccc 840
70 ggccctgcgc cccctggaaac tctgggctt ccagttcccg ccgttcccg aactgcgtt 900
75 gcgcaacaat ggccacagtg gtgaggggtt ctcccgccg agacttgggg atggggcg 960
80 ggcagggaa gggAACCGTC GCGCAGTGC TGCCCGGGGG TTGGGCTGGC CCTACCGGGC 1020
85 gggccggct cacttgcctc tccctacgca gtgcaactga ccctgcctcc tgggttagag 1080
90 atggctctgg gtcccgcccg ggagtacccgg gctctgcage tgcatctgca ctgggggct 1140
95 gcaggctcgcc ggggtcgga gcaacactgtg gaaggccacc gtttccctgc cgaggtgagc 1200
100 gcgactggc cgagaagggg caaaggagcg gggcggacgg gggccagaga cgtggccctc 1260
105 tccctaccc tcgtgtttt cagatccacg tggttccatc cagcacccgc tttgccagag 1320
110 ttgacgaggc cttggggcgc ccgggaggcc tggccgtttt ggccgcctt ctggaggtac 1380
115 cagatctgg acacccctca c 1401

ES 2 296 412 T3

<210> 50

<211> 59

<212> PRT

5 <213> HUMANO

<400> 50

10 Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu
 1 5 10 15

15 Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
 20 25 30

20 Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Glu Val Lys Pro
 35 40 45

25 Lys Ser Glu Glu Gly Ser Leu Lys Leu Glu
 50 55

25 <210> 51

<211> 257

<212> PRT

30 <213> HUMANO

<400> 51

35 Gly Asp Asp Gln Ser His Trp Arg Tyr Gly Gly Asp Pro Pro Trp Pro
 1 5 10 15

40 Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala Gly Arg Phe Gln Ser Pro Val Asp Ile
 20 25 30

45 Arg Pro Gln Leu Ala Ala Phe Cys Pro Ala Leu Arg Pro Leu Glu Leu
 35 40 45

45 Leu Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Pro Glu Leu Arg Leu Arg Asn Asn
 50 55 60

50 Gly His Ser Val Gln Leu Thr Leu Pro Pro Gly Leu Glu Met Ala Leu
 65 70 75 80

55 Gly Pro Gly Arg Glu Tyr Arg Ala Leu Gln Leu His Leu His Trp Gly
 85 90 95

60

65

ES 2 296 412 T3

	Ala Ala Gly Arg Pro Gly Ser Glu His Thr Val Glu Gly His Arg Phe			
5	100	105	110	
	Pro Ala Glu Ile His Val Val His Leu Ser Thr Ala Phe Ala Arg Val			
10	115	120	125	
	Asp Glu Ala Leu Gly Arg Pro Gly Gly Leu Ala Val Leu Ala Ala Phe			
15	130	135	140	
	Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu Asn Ser Ala Tyr Glu Gln Leu Leu Ser			
20	145	150	155	160
	Arg Leu Glu Glu Ile Ala Glu Glu Gly Ser Glu Thr Gln Val Pro Gly			
	165	170	175	
25	Leu Asp Ile Ser Ala Leu Leu Pro Ser Asp Phe Ser Arg Tyr Phe Gln			
	180	185	190	
30	Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Ala Gln Gly Val Ile Trp			
	195	200	205	
35	Thr Val Phe Asn Gln Thr Val Met Leu Ser Ala Lys Gln Leu His Thr			
	210	215	220	
40	Leu Ser Asp Thr Leu Trp Gly Pro Gly Asp Ser Arg Leu Gln Leu Asn			
	225	230	235	240
45	Phe Arg Ala Thr Gln Pro Leu Asn Gly Arg Val Ile Glu Ala Ser Phe			
	245	250	255	
50	Pro			
	<210> 52			
	<211> 20			
55	<212> PRT			
	<213> HUMANO			
	<400> 52			
60	Ile Leu Ala Leu Val Phe Gly Leu Leu Phe Ala Val Thr Ser Val Ala			
	1	5	10	15
65	Phe Leu Val Gln			
	20			

ES 2 296 412 T3

ES 2 296 412 T3

<210> 56
<211> 292
<212> ADN
5 <213> HUMANO

<400> 56

10 gttttttga gacggagtc tgcatctgtc atgcccaggc tggagtagca gtggtgccat 60
 ctcggtcac tgcaagcttc acctccccgag ttcacgcccattttctgcct cagccctcccg 120
 agttagctggg actacagggcg cccgcccacca tgcccggtca atttttgtat tttttggtag 180
 agacggggtt tcaccgtttt agccagaatg gtctcgatct cctgacttcg tgatccaccc 240
 gcctcggcct cccaaagttc tgggattaca ggtgtgagcc acggcacctg gc 292

<210> 57
<211> 262
25 <212> ADN
<213> HUMANO

<400> 57

30 ttttttttt gagacagggc ttgtcttgtt cacccaggcc agagtgcattt ggtacagtt 60
 cagctcaactg cagcctcaac cgcctcggtt caaaccatca tcccatatca gcctcctgag 120
 tagctggac tacaggcaca tgccattaca cctggctaat tttttgtat ttcttagtaga 180
 gacagggttt ggccatgttg ccggggatgg tctcgactt ctggactcaa gcaatccacc 240
40 cacctcagcc tcccaaaatg ag 262

<210> 58
45 <211> 2501
<212> ADN
<213> HUMANO
50 <220>
<221> característica misc
<222> (1) .. (2501)

55

60
65

ES 2 296 412 T3

<400> 58

ES 2 296 412 T3

atatcttta gcttcacttg gcttaaaagg ttcttcatt agcctaacac agtgtcattg 1440
5 ttggtaccac ttggatcata agtggaaaaa cagtcaagaa attgcacagt aataacttgtt 1500
tgtaagaggg atgattcagg tgaatctgac actaagaaac tcccctacct gaggtctgag 1560
10 attcctctga cattgctgta tataaggctt tcctttgaca gcctgtgact gcggactatt 1620
tttcttaagc aagatatgct aaagtttgt gagectttt ccagagagag gtctcatatc 1680
15 tgcatcaagt gagaacatata aatgtctgca tgtttccata tttcaggaat gtttgcttgt 1740
gttttatgct ttatataaga cagggaaact tgttcctcag tgacccaaaa gaggtggaa 1800
20 ttgttattgg atatcatcat tggcccacgc ttctgacct tggaaacaat taagggttca 1860
taatctcaat tctgtcagaa ttggtaacaag aaatagctgc tatgtttctt gacatccac 1920
25 ttggtagaa ataagaatgt gaaactcttc agttggtgtg tgcctctngt tttttgcaa 1980
tttccttctt actgtgttaa aaaaaagtat gatcttgctc tgagaggtga ggcattctta 2040
30 atcatgatct taaaagatca ataataataat ccttcaagg attatgtctt tattataata 2100
aagataattt gtcttaaca gaatcaataa tataatccc taaaggatta tatctttgct 2160
35 gggcgtagt gctcacaccc gtaatcccag cactttgggt ggccaaggtg gaaggatcaa 2220
atttgcctac ttctatatta tcttctaaag cagaattcat ctctctccc tcaatatgtat 2280
40 gatattgaca gggtttgcct tcactcacta gattgtgagg tcctgctcag ggcaggtgc 2340
gtttttgtt ttgtttttt tttttttttt ttgagacagg gtcttgctct gtcacccagg 2400
45 ccagagtgc atggtagtacagt ctcagctcact tgcagccctca accgcctcgg ctcaaaccat 2460
cateccatcc cagcctcctg agtagctggg actacaggca c 2501
50
<210> 59
<211> 292
55 <212> ADN
<213> HUMANO
<220>
<221> característica misc
60 <222> (1)

ES 2 296 412 T3

<400> 59

ttttttttag acggagttt gcatctgtca tgcccaggct ggagtagcag tggtgccatc 60

5

tcggctcaact gcaagctcca ctcctcgagt tccagccatt ttcctgcata agccctccca 120

10 gtagctggga ctacagggcgc cggccaccat gcccggctaa tttttgtat ttttggtaga 180

gacggggttt cacegtgtta gccagaatgg tctcgatctc ctgacttcgt gatccacccg 240

15

cctcggttc ccaaaggttt gggattacag gtgtgagcca cgcacactgg cc 292

20 <210> 60

<211> 262

<212> ADN

<213> HUMANO

25

<400> 60

tttttttttg agacagggtc ttgtctgtc acccaggcca gagtgcaatg gtacagtctc 60

30

agctcaactgc agcctcaacc gcctcggttc aaaccatcat cccatttcag ctcctgtagt 120

agctgggact acaggcacat gccattacac ctggcttaatt tttttgtatt tctagtagag 180

35

acagggtttg gccatgttgc ccgggctggc ctcgaactcc tggactcaag caatccaccc 240

acctcagect cccaaaatga gg 262

40

<210> 61

<211> 294

<212> ADN

<213> HUMANO

45

<400> 61

tttttttttg agacaaactt tcactttgt tgcccaggct ggagtgcaat ggccgcgtctc 60

50

cggttcactg caacctccac ctcccggytt caagtgttcc ttcctgcata gctctatggcc 120

aagtagctgc gattacaggc atgcgcacc acgcccggct aattttgtt ttttttagtag 180

55

agacggggtt tcggccatgtt ggtcaggctg gtctcgaaact cctgatctca ggtgatccaa 240

ccaccctggc ctccccaaagt gctgggatata taggcgttag ccacagcgcc tggc 294

60

<210> 62

<211> 276

65

<212> ADN

<213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<400> 62

5 tgacagtc tctgtcgccc aggctggagt gcagtggtgt gatctgggt cactgcaact 60
10 tccgcctccc gggttcaagg gattctcctg cctcagcttc ctgagtagct ggggttacag 120
15 gtgtgtgcca ccatgcccag ctaattttt ttgttatttt tagtagacag gtttccacca 180
20 tgttggtcag gctggtctca aactcctggc ctcaagtgtat ccgcctgact cagcctacca 240
25 aagtgtgtat tacaagtgtg agccaccgtg cccagc 276

15 <210> 63
<211> 289
<212> ADN
20 <213> HUMANO

<400> 63

25 cgccgggcac ggtggctcac gcctgtataat ccagcacttt gggaggccaa ggcaggtgga 60
30 tcacgaggc aagagatcaa gaccatcctg gccaacatgg taaaacccca tctctactaa 120
35 aaatacgaaa aaatagccag gcgtggtggc gggtgctgt aatcccagct actcgggagg 180
40 ctgaggcagg agaatggcat gaaccggga ggcagaagtt gcagtgagcc gagatcgtgc 240
45 cactgcactc cagcctgggc aacagagcga gactcttgc tcaaaaaaaa 289

45 <210> 64
<211> 298
50 <212> ADN
<213> HUMANO

<400> 64

50 aggctggct ctgtggctta cgccataat cccaccacgt tgggaggctg aggtgggaga 60
55 atggttttag cccaggaggta caagacaagg cggggcaaca tagtgtgacc ccattcttac 120
60 caaaaaaaaaacc ccaacaaaaac caaaaataggc cggggatggt ggtatgggc ctatccccag 180
65 ctactcaagg aggctgagggt gggaaagatcg ctgttccca ggagttttagt actgcagtga 240
70 gtatgtatcc caccactgcc taccatctt aggatacatt tatttattta taaaagaa 298

60 <210> 65
<211> 105
<212> ADN
65 <213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<210> 71
<211> 11
<212> ADN
5 <213> HUMANO

<400> 71

10 tg~~gg~~agg~~t~~acc a 11

<210> 72
<211> 11
15 <212> ADN
<213> HUMANO

<400> 72
20 ggaagg~~t~~cag t 11

<210> 73
25 <211> 11
<212> ADN
<213> HUMANO

30 <400> 73

agcagg~~gg~~ttggg c 11

35 <210> 74
<211> 11
<212> ADN
40 <213> HUMANO

<400> 74

45 gccagg~~t~~aca g 11

<210> 75
<211> 11
50 <212> ADN
<213> HUMANO

<400> 75

55 tgctgg~~t~~gag t 11

<210> 76
60 <211> 11
<212> ADN
<213> HUMANO

65 <400> 76

cacagg~~t~~t a 11

ES 2 296 412 T3

<210> 77
<211> 11
<212> ADN
5 <213> HUMANO

<400> 77

10 atacagggga t 11

<210> 78
<211> 11
15 <212> ADN
<213> HUMANO

<400> 78
20 ccccaggcga c 11

<210> 79
25 <211> 11
<212> ADN
<213> HUMANO

30 <400> 79

acgcagtgca a 11

35 <210> 80
<211> 11
<212> ADN
40 <213> HUMANO

<400> 80

45 tttcagatcc a 11

<210> 81
<211> 11
50 <212> ADN
<213> HUMANO

<400> 81

55 ccccaggagg g 11

<210> 82
60 <211> 11
<212> ADN
<213> HUMANO

65 <400> 82

tcacaggctc a 11

ES 2 296 412 T3

<210> 83
<211> 11
<212> ADN
5 <213> HUMANO

<400> 83

10 ccctagctcc a 11

<210> 84
<211> 11
15 <212> ADN
<213> HUMANO

<400> 84

20 ctccagtcga g 11

<210> 85
25 <211> 12
<212> ADN
<213> HUMANO

30 <400> 85

tcgcaggta ca 12

35 <210> 86
<211> 11
<212> ADN
40 <213> HUMANO

<400> 86

45 acacagaagg g 11

<210> 87
<211> 377
50 <212> PRT
<213> HUMANO

55

60

65

ES 2 296 412 T3

<400> 87

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

10 Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu
20 25 30

15 Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu Asp Leu Pro Gly
35 40 45

20 Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Glu Val Lys Pro Lys
50 55 60

25 Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys Leu Glu Asp Leu Pro Thr Val Glu
65 70 75 80

30 Ala Pro Gly Asp Pro Gln Glu Pro Gln Asn Asn Ala His Arg Asp Lys
85 90 95

35 Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp Arg Tyr Gly Gly Asp Pro Pro Trp
100 105 110

40 Pro Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala Gly Arg Phe Gln Ser Pro Val Asp
115 120 125

45 Ile Arg Pro Gln Leu Ala Ala Phe Cys Pro Ala Leu Arg Pro Leu Glu
130 135 140

50 Leu Leu Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Pro Glu Leu Arg Leu Arg Asn
145 150 155 160

55

60

65

ES 2 296 412 T3

Asn	Gly	His	Ser	Val	Gln	Leu	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Leu	Glu	Met	Ala	
				165				170				175				
5																
	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Glu	Tyr	Arg	Ala	Leu	Gln	Leu	His	Leu	His	Trp
				180				185				190				
10																
	Gly	Ala	Ala	Gly	Arg	Pro	Gly	Ser	Glu	His	Thr	Val	Glu	Gly	His	Arg
				195				200				205				
15																
	Phe	Pro	Ala	Glu	Ile	His	Val	Val	His	Leu	Ser	Thr	Ala	Phe	Ala	Arg
				210				215				220				
20																
	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Pro	Gly	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ala
				225				230			235			240		
25																
	Phe	Leu	Glu	Glu	Gly	Pro	Glu	Glu	Asn	Ser	Ala	Tyr	Glu	Gln	Leu	Leu
				245				250				255				
30																
	Ser	Arg	Leu	Glu	Glu	Ile	Ala	Glu	Glu	Gly	Ser	Glu	Thr	Gln	Val	Pro
				260				265				270				
35																
	Gly	Leu	Asp	Ile	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Ser	Arg	Tyr	Phe
				275				280			285					
40																
	Gln	Tyr	Glu	Gly	Ser	Leu	Thr	Thr	Pro	Pro	Cys	Ala	Gln	Gly	Val	Ile
				290				295			300					
45																
	Trp	Thr	Val	Phe	Asn	Gln	Thr	Val	Met	Leu	Ser	Ala	Lys	Gln	Leu	His
				305				310			315			320		
50																
	Thr	Leu	Ser	Asp	Thr	Leu	Trp	Gly	Pro	Gly	Asp	Ser	Arg	Leu	Gln	Leu
				325				330			335					
55																
	Asn	Phe	Arg	Ala	Thr	Gln	Pro	Leu	Asn	Gly	Arg	Val	Ile	Glu	Ala	Ser
				340				345			350					
60																
	Phe	Pro	Ala	Gly	Val	Asp	Ser	Ser	Pro	Arg	Ala	Ala	Glu	Pro	Val	Gln
				355				360			365					
65																
	Leu	Asn	Ser	Cys	Leu	Ala	Ala	Gly	Asp							
				370				375								
70																
	<210>	88														
	<211>	34														
	<212>	ADN														
	<213>	HUMANO														

ES 2 296 412 T3

<400> 88

tagacagatc tacgatggct cccctgtgcc ccag

34

5 <210> 89

<211> 34

<212> ADN

10 <213> HUMANO

<400> 89

15 attcctctag acagttaccg gctccccc agat

34

<210> 90

<211> 3532

20 <212> ADN

<213> HUMANO

<220>

25 <221> Característica misc

<222> (1) .. (3532)

<400> 90

30 **tgttactcg tgaccttacc cccaaacctg tgctctctga aacatgagct gtgtccactc** 60

agggttaaat ggattaaggg cggtgcaaga tgtgctttgt taaacagatg cttgaaggca 120

35 **gcatgtctgt taagagtcat caccatccc taatctcaag taatcaggga cacaacact** 180

gcggaaaggcc gcagggtcct ctgccttagga aaaccagaga cctttgttca cttgtttatc 240

40 **tgaccttccc tccactattg tccatgaccc tgccaaatcc ccctctgtga gaaacaccca** 300

agaattatca ataaaaaaat aaattttaaa aaaaaataca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360

45 **aaaagactta cgaatagtta ttgataaatg aatagctatt ggtaaagcca agtaaatgtat** 420

catattcaaa accagacggc catcatcaca gctcaagtct acctgatttg atctctttat 480

50 **cattgtcatt ctggattc actagattag tcatcatctt caaaattctc ccccaagttc** 540

taattacgtt ccaaacatcc aggggttaca tgaagcttga acctactacc ttctttgttt 600

55 **ttgagccatg agttgttagga atgatgagtt tacaccttac atgctggggta ttaattttaaa** 660

ctttacctct aagtcagttt ggttagcctt ggcttatttt ttagctaat ttgttagttt 720

60 **atggatgcac tgtgaatctt gctatgatag tttccctcca cactttgcca ctaggggttag** 780

65

ES 2 296 412 T3

gtaggtactc agttttcagt aattgottac ctaagaccct aagccctatt tctcttgac 840
5 tggcctttat ctgtaatatg ggcataattta atacaatata atttttggag tttttttgtt 900
tggttgttttgc ttgttttttt tgagacggag tctgcacatc gtcatgcaca ggctggagta 960
10 gcagtggtgc catctcggtc cactgcaagc tccacctccc gagttcacgc cattttctg 1020
cctcagcetc ccgagtagct gggactacag gcgcggcaca ccatgcccgg ctaatttttt 1080
15 gtatttttgg tagagacggg gtttccacgt gttagccaga atggtctcga tctcctgact 1140
tcgtgatcca cccgcctcgg cctcccaaag ttctggatt acaggtgtga gccacccgac 1200
20 ctggccaaatt ttttgagtct tttaaagtaa aaatatgtct tgtaagctgg taactatggt 1260
acattttctt ttattaatgt ggtgctgacg gtcataatagg ttctttttag tttggcatgc 1320
25 atatgcact ttttgcagtc ctttcattac atttttctct cttcatttga agagcatgtt 1380
atatctttta gtttcaatttgc gtttaaaagg ttctctcatt agccataacac agtgcatttgc 1440
30 ttggtaccac ttggatcata agtggaaaaaa cagtcaagaa attgcacagt aataactgtt 1500
tgtaagaggg atgattcagg tgaatctgac actaagaaaac tccccctacct gaggtctgag 1560
35 attcctctga cattgctgta tataggcttt tccttgaca gcctgtgact gcggactatt 1620
tttcttaagc aagatatgct aaagttttgt gagcctttt ccagagagag gtctcatatc 1680
40 tgcataatgtt gagaacatata aatgtctgca tgtttccata tttcaggaat gtttgcattgt 1740
gttttatgct ttatataaga cagggaaact tgttcctcag tgacccaaaa gaggtggaa 1800
45 ttgttattgg atatcatcat tggcccacgc ttctgaccc tggaaacaat taagggttca 1860
taatctcaat tctgtcagaa ttggtaacaag aaatagctgc tatgtttctt gacattccac 1920
50 ttggtaggaa ataagaatgt gaaactcttc agttgggttg tgcctctngt tttttgcaa 1980
tttccttctt actgtgttaa aaaaaagtat gatcttgcgc tgagaggtga ggcatttta 2040
atcatgatct ttaaagatca ataataat ccttcaagg attatgtctt tattataata 2100
60 aagataatccgtttaaca gaatcaataa tataatccct taaaggatata tatctttgtt 2160
gggcgcagtg gtcacacact gtaatcccaag cactttgggt ggccaaagggtg gaaggatcaa 2220

ES 2 296 412 T3

<400> 100

5 Glu Glu Asp Leu Pro
1 5

5 <210> 101

<211> 6

<212> PRT

10 <213> HUMANO

<400> 101

15 Glu Asp Leu Pro Ser Glu
1 5

<210> 102

<211> 7

20 <212> PRT

<213> HUMANO

<400> 102

25 Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu
1 5

<210> 103

30 <211> 6

<212> PRT

<213> HUMANO

35 <400> 103

Asp Leu Pro Gly Glu Glu
1 5

40 <210> 104

<211> 22

<212> PRT

45 <213> HUMANO

<400> 104

50 **Gly Gly Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp Leu Pro**
1 5 10 15

55 **Ser Glu Glu Asp Ser Pro**
 20

<210> 105

60 <211> 25

<212> PRT

<213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<400> 105

Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp
1 5 10 15

5

Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly
20 25

10 <210> 106

<211> 24

<212> PRT

<213> HUMANO

15

<400> 106

Glu Asp Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
1 5 10 15

20

Gly Glu Glu Asp Leu Pro Glu Val
20

25 <210> 107

<211> 7

<212> PRT

30 <213> HUMANO

<400> 107

35 Gly Glu Thr Arg Ala Pro Leu
1 5

<210> 108

<211> 7

40 <212> PRT

<213> HUMANO

45 <400> 108

Gly Glu Thr Arg Pro Leu
1 5

50 <210> 109

<211> 7

<212> PRT

55 <213> HUMANO

<400> 109

60 Gly Gln Thr Arg Ser Pro Leu
1 5

<210> 110

<211> 1247

65 <212> ADN

<213> HUMANO

<220>

ES 2 296 412 T3

65 <210> 111
 <211> 17
 <212> AD

ES 2 296 412 T3

<213> HUMANO	
<400> 111	
5 ctctgtgagt cagcctg	17
<210> 112	
10 <211> 23	
<212> ADN	
<213> HUMANO	
15 <400> 112	
aggcttgctc ctccccacc cag	23
20 <210> 113	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> HUMANO	
25 <400> 113	
agactttggc tccatctc	18
30 <210> 114	
<211> 20	
<212> ADN	
35 <213> HUMANO	
<400> 114	
40 cactccaccc ccatcttagc	20
<210> 115	
<211> 26	
45 <212> ADN	
<213> HUMANO	
<400> 115	
50 gggagagggc acagggccag acaaac	26
<210> 116	
55 <211> 15	
<212> PRT	
<213> HUMAN	
60 <400> 116	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	
1 5 10 15	
65 <210> 117	
<211> 34	
<212> ADN	

ES 2 296 412 T3

<213> HUMANO
<400> 117
5 cgtctagaag gaattcagct agactggctc agca
<210> 118
10 <211> 15
<212> PRT
<213> HUMANO
15 <400> 118
Glu Val Lys Pro Lys Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys Leu Glu
1 5 10 15
20 <210> 119
<211> 12
<212> PRT
25 <213> HUMANO
<400> 119
Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
30 1 5 10
35 <210> 120
<211> 12
<212> PRT
<213> HUMANO
40 <400> 120
Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly
1 5 10
45 <210> 121
<211> 10
<212> PRT
<213> HUMANO
50 <400> 121
Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
55 1 5 10
55 <210> 122
<211> 12
60 <212> PRT
<213> HUMANO
<400> 122
65 Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu
1 5 10
94 34

ES 2 296 412 T3

<210> 123
<211> 12
<212> PRT
5 <213> HUMANO

<400> 123

10 Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp
1 5 10

<210> 124
15 <211> 12
<212> PRT
<213> HUMANO

20 <400> 124

Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu
1 5 10

25 <210> 125
<211> 9
<212> PRT
30 <213> HUMANO

<400> 125

35 Ala Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ala
1 5

<210> 126
40 <211> 9
<212> PRT
<213> HUMANO

45 <400> 126

Ala Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Ala
1 5

50 <210> 127
<211> 9
<212> PRT
55 <213> HUMANO

<400> 127

60 Ala Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 128
65 <211> 9
<212> PRT
<213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<400> 128

5 Ala Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Ala
1 5

<210> 129
<211> 9
10 <212> PRT
<213> HUMANO

<400> 129

15 Ala Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Ala
1 5

<210> 130
20 <211> 9
<212> PRT
<213> HUMANO

25 <400> 130

30 Ala Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Ala
1 5

<210> 131
<211> 8
35 <212> PRT
<213> HUMANO

<400> 131

40 Ala Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ala
1 5

<210> 132
45 <211> 8
<212> PRT
<213> HUMANO

50 <400> 132

55 Ala Glu Glu Asp Leu Pro Gly Ala
1 5

<210> 133
<211> 8
60 <212> PRT
<213> HUMANO

<400> 133

65 Ala Glu Asp Leu Pro Gly Glu Ala
1 5

ES 2 296 412 T3

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
5 <213> HUMANO

<400> 134

10 Ala Asp Leu Pro Gly Glu Glu Ala
1 5

<210> 135
15 <211> 8
<212> PRT
<213> HUMANO

20 <400> 135

Ala Leu Pro Gly Glu Glu Asp Ala
1 5

25 <210> 136
<211> 8
<212> PRT
30 <213> HUMANO

<400> 136

35 Ala Pro Gly Glu Glu Asp Leu Ala
1 5

<210> 137
40 <211> 9
<212> PRT
<213> HUMANO

45 <400> 137

Ala Lys Lys Met Lys Arg Arg Lys Ala
1 5

50 <210> 138
<211> 9
<212> PRT
55 <213> HUMANO

<400> 138

60 Ala Ile Thr Phe Asn Ala Gln Tyr Ala
1 5

<210> 139
65 <211> 9
<212> PRT
<213> HUMANO
<400> 139

ES 2 296 412 T3

Ala Ser Ala Ser Ala Pro Val Ser Ala
1 5

5 <210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> HUMANO

10

<400> 140

Ala Gly Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala
1 5

15

<210> 141

<211> 6

20

<212> PRT

<213> HUMANO

<400> 141

25

Ser Glu Glu Asp Ser Pro
1 5

30

<210> 142

<211> 6

<212> PRT

<213> HUMANO

35

<400> 142

Arg Glu Glu Asp Pro Pro
1 5

40

<210> 143

<211> 12

45

<212> ADN

<213> HUMANO

<400> 143

50

agggcacagg gc

12

55

60

65