



19



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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

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

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

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

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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.

Antecedentes de la invención

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 tumorigénica.

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 humanos y algunos otros tejidos normales del tracto alimentario. 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.

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.

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 tumorigénica 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.

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 Manassus, 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.

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).

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).]

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 distribuidas en diferentes organismos vivos.

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.]

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 secretorios (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)].

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)].

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 tumorigénico 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); Cotc, Women’s Health Weekly: News Section, página 7 (30 de marzo de 1998); Liao y cols., Cancer Res., 57: 2827 (1997); Vermlyen 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].

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

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.

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.

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.

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.

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:

(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;

(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.

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.

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.

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

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 epítipo 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.

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 interacción entre la proteína MN y su(s) complementario(s), provoque un descenso en el crecimiento tumoral.

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 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 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.

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.

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 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 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 segrega 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 segrega 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.

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.

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.

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 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.

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.

Abreviaturas

En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas:

aa	- aminoácido
ATCC	- American Type Culture Collection
pb	- pares de bases
BLV	- virus de la leucemia bovino
BSA	- albúmina de suero bovina
BRL	- Bethesda Research Laboratories
CA	- anhidrasa carbónica
CAM	- molécula de adhesión celular
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
	°C	- grados centígrados
10	DEAE	- dietilaminoetilo
	DMEM	- Medio de Eagle modificado por Dulbecco
15	ds	- bicatenario
	EDTA	- tetraacetato de etilendiamina
	EGF	- factor de crecimiento epidérmico
20	EIA	- inmunoensayo enzimático
	ELISA	- ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
25	EMSA	- ensayo de desplazamiento por movilidad electroforética
	F	- fibroblastos
	FACS	- estudio citofluorométrico
30	FCS	- suero de ternero fetal
	FITC	- isotiocianato de fluoresceína
35	FTP	- Análisis de obtención de huellas mediante DNasa 1
	GST-MN	- proteína de fusion de MN glutational S-transferasa
	GVC	- ganciclovir
40	H	- células HeLa
	H-E	- hematoxilina-eosina
45	HEF	- fibroblastos de embrión humano
	HeLa K	- células HeLa de tipo standard
	HeLa S	- HeLa mutantes de Stanbridge D98/AH.2
50	H/F-T	- células híbridas de HeLa y fibroblastos que son tumorigénicas; derivadas de HeLa D98/AH.2
	H/F-T	- células híbridas de HeLa y fibroblastos que son tumorigénicas; derivadas de HeLa D98/AH.2
55	HPV	- virus del papiloma humano
	HRP	- peroxidasa de rábano
	HSV	- virus herpes simplex
60	IC	- intracelular
	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)
	mg	- miligramo
30	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
	pI	- punto isoeléctrico

ES 2 296 412 T3

	PMA	- 12-miristato 13-acetato de forbol
	POS	- positivo
5	Py	- pirimidina
	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
	RT-PCT	- reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa
20	SAC	- células de <i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>S. aureus</i>	- <i>Staphylococcus 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 ajuste 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	- membrana
	TMB	- tetrametilbenzidina
60	Tris	- tris (hidroximetil)aminometano
	μCi	- microcurie
65	μg	- microgramo
	μl	- microlitro

ES 2 296 412 T3

μM	- 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)];

25 COS - línea celular simia [Gluzman, Y., Cell, 23: 175 (1981)];

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)];

55 XC - células derivadas de un rhabdomyosarcoma 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, Czechoslovak Academy of Sciences; Praga, República Checa]; y

CGL1 - células híbridas de H/F-N (derivadas de HeLa D98/AH.2);

60 CGL2 - células híbridas de H/F-N (derivadas de HeLa D98/AH.2);

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);

65

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:

5	<u>Símbolo de la base</u>	<u>Significado</u>
	A	adenina
	C	citosa
10	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
	K	G o T/U
30	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:

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

Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Desconocido u otro		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 agregan 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 suprrayados. 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.

Descripción detallada

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

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].

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 postraduccional. En el presente documento, la frase “proteína gemela” indica p54/58N.

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.

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

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.

(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.

(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 quimérico 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.

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.

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 provocarían la reversión de las células preneoplásicas/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 revertientes (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 deleciones 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 epítipo para MAb M75, que está localizado en al menos 2 copias dentro de la repetición en tándem de 6 veces de 6 aminoácidos [aa 61-96 (SEC ID N.º: 97)] del dominio de tipo proteoglicano de la proteína MN. Pueden prepararse variantes de deleción 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 atómicos 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 antígenos 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.

45

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.

50

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 (4ª 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 sulfonamidas (inhibidores competitivos del ácido para-aminobenzoico, un precursor del ácido fólico). También, algunos citostáticos son inhibidores competitivos (por ejemplo, pirimidinas halogenadas, entre otros).

60

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 preneoplásicos/neoplásicos y normales, que están separados por una barrera anatómica.

65

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 epítomos 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. J. 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'-CTCTAACTTCAGGGAGCCCTCTTCTT-3') [SEC ID N.º: 8] y un cebador de anclaje que se hibrida con la cola homopolimérica (5'-CUACUACUACUAGGC CACGCGTCGAC TAGTACGGGI IGGGIIGGGIIG-3') [SEC ID N.º: 9]. El producto amplificado se digirió con las enzimas de restricción BamHI y SalI 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' CGCCAGTGGGTCATCTTCCC 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 97199, 97200, y 97198.

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

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 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)].

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 gtatta	76
11	191	10562-10752	38	ATAAT Fin	

Intrón	Tamaño	Posición genómica**	SEC ID N.º	ayuste 5'	SEC ID N.º	
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 CGI.3 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 transcrito 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 utiliza 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 PyPyPyCAPyPyPyPyPy [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 1º intrón al final del 5º exón.

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. 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

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 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.

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 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.

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

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.

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.

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 transfirió a células Rat2TK y a células de carcinoma de cuello de útero C33 usando precipitación con fosfato cálcico y lipofección, respectivamente. Las células transfectadas se analizaron para determinar la expresión de HSVtk y la sensibilidad a GVC. El análisis de las células transfectadas ha demostrado el notable efecto citotóxico *in vitro* de GVC incluso a concentraciones bajas (hasta 95% de células destruidas).

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 transfectadas. 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).

Análisis del promotor de MN

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, 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 cotransfectadas con construcciones de promotor de MN-CAT y pSV2neo.

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 transfectaron 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).]

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.

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.

Se obtuvieron resultados similares por la transfección de células KATO III con Bd3 y pMN4. Las células transfectadas 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.

2. En una estrategia paralela para estudiar el promotor de MN, se realizó un análisis basado en la selección de células G418 transfectadas 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 el siguiente: un promotor activo dirige la expresión del gen neo que protege las células transfectadas del efecto tóxico de G418, mientras que un promotor inactivo provoca que no se produzca producto neo y que las células transfectadas 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 transfectarse con una eficiencia elevada mediante el procedimiento de precipitación con calcio.

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.

3. Las células transfectadas estables que expresan los genes quiméricos 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 transfectada 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 tumorigénesis, 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 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 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.

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 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 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

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 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.

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.

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.

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.

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.

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

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).

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.

FTP

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 XhoI (-243/+ 31*) o en el sitio XbaI (*-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 desnaturizado tras la electroforesis en gel [8% de gel desnaturizante] indica cuales de las bases de la hebra marcada estaban protegidas por la proteína.

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.

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:

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

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

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

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

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

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 policlonales 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.

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 antigénicamente diferente de la AP-1 reconocida por los anticuerpos que se usan en este ensayo.

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, 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 carcinoma de mama MCF-7 que expresan wt p53 a un nivel suficiente.

Regulación de la expresión de MN y promotor de MN

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 híbridas de HeLa y fibroblastos normales, la expresión de MN presenta una correlación con la capacidad tumorigénica. El hecho de que MN no esté presente en las células híbridas no tumorigénicas (CGL1), pero que esté expresado en un segregante tumorigénico que carece del cromosoma 11, indica que un supresor putativo en el cromosoma 11 regulada negativamente a MN.

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 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.

También se transfectaron las células humanas no tumorigénicas, 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 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

Cuando la región promotora del clon genómico MN, aislado tal como se describe anteriormente, se ligó a ADNc de MN y se transfectó a células CGL1 híbridas, 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.

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.

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 clon 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.

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.

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 alcanzaran una mayor cantidad, el nivel de ARNm de MN producido endógenamente aumentara 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

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.

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 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.

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 hormonas glucocorticoides, 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.

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

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 con esta predicción informática, la MN/CA IX es una proteína ácida que existe en diversas formas isoeléctricas con *pI*s que varían en el intervalo de 4,7 a 6,3.

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 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.]

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

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 sefarsa 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, 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 de la presencia de cationes de cinc como de la ausencia de un agente reductor en el tampón de unión.

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 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.

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.

Similitudes entre las secuencias

El análisis informático del ADNc de la secuencia de MN se realizó usando ADNSIS y PROSIS (paquetes de 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 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 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)].

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.

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.

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 larga como para permitir que un segmento de la secuencia de ADNc de CA II tenga 25 o más nucleótidos para hibridarse en condiciones de 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 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:

Región de homología en la secuencia genómica de MN [SEC ID N.º: 5: Figura 2A-F]	SEC ID N°	% de homología con la secuencia completa de Alu-I
921-1212	59	89,1%
2370-2631	60	78,6%
4587-4880	61	90,1%
6463-6738	62	85,4%
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%

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.

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 oligopéptido.

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 tumorigeno 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.

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, deleciones, truncados de los aminoácidos y combinaciones de los mismos, entran dentro del alcance de

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.

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.

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 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

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 glutatona-S-transferasa) de células XL1-Blue.

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 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.

Para insertar la porción de la secuencia de codificación de MN para la proteína de fusión GST-MN en sistemas de expresión alternativos, se diseñó 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 enzimas de restricción y los elementos importantes para la expresión.

Cebador n.º 20: extremo N

Inicio de la traducción

5'GTCGCTAGCTCCATGGGTCATATGCAGAGGTTGCCCCGGATGCAG 3'

NheI

NcoI

NdeI ADNc de MN n.º 1 (SEC. ID. N.º: 17)

Cebador n.º 19: extremo C

Terminación de la traducción

5'GAAGATCCTTACTCGAGCATTCTCCAAGATCCAGCCTCTAGG 3'

BglII

Soy

ADNc de MN (SEC. ID. N.º: 18)

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

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 quimérico 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.

El ADNc de MN-Fc quimérico se expresó mediante transfección transitoria en células COS. Se transfectaron células COS usando leptofección. 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.

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.

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. 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.

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 transfectaron 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.

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

En la segunda tanda de cribado, se transfectaron 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.

En la tercera tanda de cribado, se transfectaron 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.

Preparación de anticuerpos específicos contra MN

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.

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 epítomos antigénicos 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 epítomos de MN antigénicos preferidos.

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

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 hipervariables de los mismos. Sin embargo, para algunos usos terapéuticos, se preferirían anticuerpos biespecíficos dirigidos a la proteína MN y a las linfocitos citotóxicos.
10

Epítomos

La afinidad de a MAb por péptidos que contienen un epítipo 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 epítipo, los péptidos están en solución o inmovilizados sobre una superficie. Por lo tanto, los expertos en la técnica esperarían que los epítomos representativos que se describen en el presente documento para los MAb específicos contra MN varían dependiendo del uso de esos
20 MAb.

El término “correspondiente a un epítipo 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 antigénica y confiera inmunidad protectora contra enfermedad neoplásica y/o efectos anti-tumorigénicos. Las posibles variaciones de la secuencia 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 produzca anticuerpos cuando dicho polipéptido o proteína reaccionan con proteínas y polipéptidos MN naturales en un grado suficiente para proporcionar una inmunidad protectora y/o actividad anti-tumorigénica cuando se administra
30 en forma de una vacuna.

Epítipo para MAb M75

Se considera que el epítipo M75 está presente en al menos dos copias dentro de la 6 X repetición en tándem de 6 aminoácidos [aa 61-96 (SEC ID N.º: 97)] en el dominio de proteoglicano de la proteína MN. Los péptidos ejemplares que representan ese epítipo dependiendo del contexto pueden incluir los siguientes péptidos de esa repetición en tándem: 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 (SEC ID N.º: 100) y se demostró que reaccionaban con el MAb M75.
45

Otros epítomos

Mab MN9. El anticuerpo monoclonal MN9 (Mab MN9) reacciona con el mismo epítipo 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.
50

Los Mab que corresponden a Mab MN9 pueden prepararse de forma reproducible mediante cribado de una serie de mab preparados contra una proteína/polipéptido MN, tal como la proteína de fusión GST-MN, contra los péptidos que representan el epítipo 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.
55

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 epítipo 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 epítipo.
60

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 epítipo 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
65

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.

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 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; Mhashikar y cols., *J. Virol.*, 71: 6486-6494 (5): 595-601 (1994); Mhashikar y cols., *EMBO J.*, 14: 1542-1551 (1995) (1997); Marasco (Ed.), *Intrabodies: Basic Research and Clinical 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 Marasco, *Trends in Biotechnology*, 13(8): 306-310 (1995).]

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 oncógeno. 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.

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.

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].

Pueden usarse anticuerpos específicos de MN producidos intracelularmente en terapia para tratar enfermedad preneoplásica/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

Sería de esperar que un anticuerpo específico contra MN o un péptido ligado covalentemente a polilisina, un polícatión 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 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.

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 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).

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 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 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.

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 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 también la anhidrasa carbónica MN, y si lo hacía, si la inhibición de la enzima afectaba a la transformación celular.

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 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 unía a los receptores de la superficie celular; el resultado fue claramente positivo de que se unía.

Materiales y Métodos

Líneas celulares

Las células que se usaron en este ejemplo eran: CGL1 y CGL3 - respectivamente híbridos no tumorigénicos y tumorigénicos 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 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

El ADNc de longitud completa de MN se obtuvo a partir de un subclon en pBluescript [Pastorek y cols., *Oncogene*, 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 GATGGCTCCCCTGTGCCCCAG [SEC ID N.º: 88] engloba un sitio de inicio de la traducción y un sitio de clonación BglIII, 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 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 una precipitación con fosfato cálcico de acuerdo con Sambrook y cols. (editores.), *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

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 µg/ml). Las placas azules se identificaron cubriéndolas con agar que contenía 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida (X-Gal) (200 µg/ml).

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 fenilmetilsulfonilo 1 mM y 200 unidades inhibitoras de tripsina/ml de Trasilol 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).

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].

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 µl 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 µg/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 platos 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.

Resultados

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

Dado que la expresión de proteína MN se correlaciona con la capacidad tumorigénica de los híbridos de HeLa x fibroblasto [Zavada y cols. (1993), referencia anterior], primero se analizaron las células híbridas CGL1 no tumorigénicas. 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 revertientes. La reversión fue un proceso gradual, por etapas; había colonias con grados diferentes de reversión. Después de 2 pases, 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 revertientes, 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

encontraron colonias transformadas en las células CGL1 transfectadas con un plásmido de control pMAM “vacío”. El crecimiento de los revertientes CGL1 + pMAM.MN en medio suplementado con 5 $\mu\text{g/ml}$ 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.

2. *Rescate de MN transformante de las revertientes*

La reversión de las células transformadas con MN al fenotipo normal podía tener al menos 4 causas: A) pérdida del inserto de MN; B) silenciamiento 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 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 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 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 capacidad de formar colonias en agar blando, aunque todavía expresaban la proteína MN. Esta presencia permanente de la proteína MN en las revertientes descartaba las alternativas A) y B) anteriores, es decir, la pérdida o silenciamiento del gen MN como causa de la reversión.

Para decidir entre las otras 3 alternativas, se superinfectaron las revertientes con MLV vivos con capacidad de 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 revertientes 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 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 teñía 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 pases después, la población celular revertió totalmente al fenotipo original como resultado de la frecuente emergencia de revertientes y de sus ventajas en la selección (crecimiento más rápido y una mayor eficacia de plaqueo). De hecho, las revertientes 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 células transformadas como las revertientes 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 revertientes.

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 concentró y se purificó parcialmente mediante precipitación con Mab M75 y SAC. Se analizó el inmunoprecipitado para determinar la actividad de CA. 78 μl 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

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

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.

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.

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 potentemente 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.

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.

Resultados adicionales de adhesión celular

Una MN acortada, sin los segmentos TM e IC, es segregada al medio a través de células SET1 (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.

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.

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 4ª ed., Filadelfia: Lippincott (1993); DeVita y cols., editores, Biologic therapy of cancer, 2ª 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

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. El dominio N-terminal es homólogo al de los proteoglicanos y contiene una repetición en tándem de seis aminoácidos.

La serie de oligopéptidos se analizaron mediante el procedimiento de ensayo de 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 aboga su afinidad por las células; y (v) se determinó que el sitio de unión de MN era muy similar o idéntico al epítipo de MAb M75, y al menos dos copias del mismo están localizadas en la repetición en tándem de 6 veces de 6 aminoácidos [aa 61-96 (SEC ID N.º: 97)] en el dominio de tipo proteoglicano de la proteína MN.

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*

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 Δ TM Δ IC 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.

Células y medios. Se usaron las siguientes líneas celulares: HeLa, CGL1 = híbridos HeLa x fibroblasto no tumorigenos, CGL3 = segregado tumorigeno 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).

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 μ l 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 μ l 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.

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 μ l/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 adsorbieron 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 epítipo de GST-MN inmovilizada.

Péptidos. Los péptidos que se usan en este estudio se prepararon mediante el procedimiento en fase sólida [Merri-field y cols., IN: Gutte, Peptides. B. (ed.), Peptides: Synthesis, Structures 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 espectroscopia 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.

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 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

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 desnaturizantes. Se empleó un vector de 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 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.

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.

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 epítipo es idéntico o está superpuesto al sitio de unión de MN/CA IX para los receptores celulares.

Identificación del epítipo reconocido por Mab M75. El mapeo preliminar del epítipo 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 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]).

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]; GEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEED (aa 61-85) [SEC ID N.º: 105]; EDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPGEEDLP (aa 75-98) [SEC ID N.º: 106]; y EVKPKSEEEGSLKLE (aa 97-111) [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 epítipo 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 epítipo M75.

La siguiente etapa para identificar el epítipo 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]; DLPGEEDLP [SEC ID N.º: 122]; LPGEEDLP [SEC ID N.º: 123]; y PGEEDLP [SEC ID N.º: 124]. Se analizó la siguiente serie de secuencias de 7 aa, flanqueadas 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]; ADLPGEA [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 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 esta adhesión no específica. 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 epítipo 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 epítipo 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 eluido 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 segrega 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.

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 epítipo 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 potentemente de su peso molecular.

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 MN/CA IX completa contiene varias copias del epítipo, pero la molécula más pequeña únicamente contiene una.

Considerando la posibilidad de que el epítipo 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 prototipo, RGD [Winter, J., IN Cleland y Craik (editores), Protein Engineering. Principles and Practice, páginas 349-369 (N.Y.; Wiley-Liss; 1996)]. Naturalmente, 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 epítipo puede impedir estéricamente a una secuencia diferente del sitio de unión celular. Esta objeción se ha vuelto improbable al bloquear tanto el epítipo M75 y el sitio de unión celular mediante los nonapéptidos de 7 + 2 aa. Ese resultado sugiere con fuerza que el epítipo y el sitio de unión son de hecho idénticos.

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 segrega (o sólo en cantidades mínimas) a los fluidos corporales; (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].

Ejemplo 3

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

(a) para identificar los péptidos que reconoce la proteína MN, se cribó una colección de heptapéptidos 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 codificaban los péptidos con una placa recubierta con proteína MN, eliminando la fago no unido mediante lavado, eluyendo y amplificando el fago unido específicamente.

La proteína MN diana en este proceso era una proteína de fusión de glutatona-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 pocillos 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.

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

(1) GETRAPL (SEC ID N.º: 107)

(2) GETREPL (SEC ID N.º: 108)

(3) GQTRSPL (SEC ID N.º: 109)

(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 (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*

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.

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, 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 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

Se estimuló la muerte por apoptosis de las células CGL3 mediante varios fármacos, que incluían cicloheximida, actinomicina 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 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.

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

Los materiales que se enumeran más adelante se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC) actualmente en 10810 University Blvd., Manassas, 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 sometidos a un acuerdo entre los 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.

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido **caracterizado** porque se selecciona a partir de las SEC ID N.º: 137 y 138.

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 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 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.

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 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 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;

(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

(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.

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.

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.

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.

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	L	P	L	12
1																		48
13	L	I	P	A	P	A	P	G	L	T	V	Q	L	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	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	TTG	CCC	CGG	ATG	CAG	144	
45	E	D	S	P	L	G	G	G	S	S	G	E	D	D	P	L	60	
145	GAG	GAT	TCC	CCC	TTG	GGA	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	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	GCG	GGC	CGC	TTC	CAG	TCC	CCG	GTG	GAT	ATC	CGC	CCC	CAG	CTC	GCC	GCC	528	

FIG. 1A

```

173 F C P A L R P L L E L L L G F Q L P 188
529 TTC TGC CCG GCC CTG CGC CCC CTG GAA CTC CTC GGC TTC CAG CTC CCG 576

189 P L P E L R L R CGC CTG CGC AAC AAT GGC CAC AGT GTG CAA CTG 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 GGT CCC GGG CGG 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 GCC 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 GTT GAC GAG GCC TTG GGG CGC 816

269 P G G L A V L A A F L E E G P E 284
817 CCG GGA GGC CTG GCC GTG TTG 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 CTC TCT 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 GTG 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 TTG 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 CCA GTC CAG CTG AAT TCC TGC 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 GTC 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 AAT AAA TAT TTA TAA T 1522

FIG._1C

FIG._1A

FIG._1B

FIG._1C

FIG._1

1 ggatcctgtt gactcgtgac ctaccacca accctgtgct ctctgaaaca tgagctgtgt
 61 ccactcaggg ttaaatggat taaggcggt gcaagatgtg cttgttaaa cagatgcttg
 121 aaggcagcat gctcgttaag agtcatcacc aatccctaata ctaagtaat caggacaca
 181 aacactgcgg aaggccgcag ggtcctctgc ctaggaaaac cagagacctt tgtcaccttg
 241 ttatctgac ctccctcca ctattgtcca tgaacctgcc aaatccccct ctgtgagaaa
 301 caccacaaga ttatcaataa aaaaataaat taaaaaaa taaacaaaaa aaaaaaaa
 361 aaaaaaaa gacttacgaa tagttattga taaatgaata gctattggtg aagccaagta
 421 aatgatcata tcaaaaacca gacggccatc atcacagctc aagtcacctt gatttgatct
 481 ctttatcatt gtcatctttt ggattcacta gattagtcac catcctcaaa attctcccc
 541 aagttctaat tacgttccaa acatttaggg ttacatgaa gcttgaacct actaccttct
 601 ttgcttttga gccatgagtt gtaggaatga tgagtttaca gcctttggct tatttttcta gctaaattttg
 661 tttaaaactt accctaaagt cagttgggtg aatcttgcta tgatagtttt cctccacact ttgccactag
 721 tagttaatgg atgcactgtg ttactcagtt ttactgaatt gcttacctaa gacctaaag cctattttctc
 781 ggtaggtag gtactcagtt aatatgggca tattaatac acatataatt ttggagtttt
 841 ttgtactggc ctttatctgt tttttttgag acggagtctt gcaagctcca cctcccgagt tcacggccatt
 901 tttgtttgtt tgtttgtttg tttttttgag acggagtctt gcaagctcca cctcccgagt tcacggccatt
 961 ggagtagcag tgggtgccatc tcggctcact gtagctgga gacgggtttt caccgtgta gccagaatgg tctcgatctc
 1021 ttcctgcctc agcctccga gacgggtttt caccgtgta gacgggtttt caccgtgta gccagaatgg tctcgatctc
 1081 ttttttgtat ttttggtaga gatccaccg cctcgccctc gagtctttta aagtaaaaaa ctgacggtca tataggttct
 1141 ctgacttcgt ccaattttt ttactttt taatgtgtg gcagtcctt cacttggtt caataaagtg gaaaaacagt
 1201 ccgacactgg ttcctttt gactttt gactttt gactttt gactttt gactttt gactttt gactttt
 1261 tatggtacat ttcctttt gactttt gactttt gactttt gactttt gactttt gactttt gactttt
 1321 gcatgcata gctactttt gactttt gactttt gactttt gactttt gactttt gactttt gactttt
 1381 catgttata ctttttagct taccacttgg agaggatga ttcagggtgaa tctgacacta agaaactccc
 1441 tcatgtttgg taccacttgg agaggatga ttcagggtgaa tctgacacta agaaactccc
 1501 cttgttttga agaggatga ttcagggtgaa tctgacacta agaaactccc
 1561 tctgagattc ctctgacatt gctgtatata ggcttttctt tttgtgagc ctttttccag agagaggtct
 1621 actattttt ttaagcaaga acatataatg gaaacttgtt tccatatatt cctcagtgac ccaaaagagg
 1681 catatctgca tcaagtga acatataatg gaaacttgtt tccatatatt cctcagtgac ccaaaagagg
 1741 gcttgtgttt tatgtttt tatagacagg ccacgttctt tacaagaaat agctgctatg tttcttgaca
 1801 tgggaattgt tatgtttt tatagacagg ccacgttctt tacaagaaat agctgctatg tttcttgaca
 1861 ggttcataat ctcaattctg tcagaattgg taagaattgg taagaattgg taagaattgg taagaattgg
 1921 tccacttgg taggaaataa gaatgtgaaa cctttcagtt ggtgtgtgtc cct?gttttt

FIG._2A

1981 ttgcaatttc cttcttactg tgtaaaaaa aagtatgac ttgctctgag aggtgaggca
 2041 ttcttaataca tgatctttaa agatcaataa tataatcctt tcaaggatta tgtctttatt
 2101 ataataaaga taatttgtct ttaacagaat caataatata atcccttaaa ggattatatac
 2161 ttgtctgggc gcagtggctc acacctgtaa tcccagcact ttgggtggcc aaggtggaag
 2221 gatcaaattht gcctacttct atattatctt cttaagcaga attcatctct ctccctcaa
 2281 tatgatgata ttgacagggt ttgtgttttg tctttttga gacagggtct tgcctcgtca
 2341 ggtagcgtht ttgtgttttg ttgtgttttg gctcactgca gctcaaccg cctcggctca
 2401 ccaggccag agtgcaatgg tccagtctca gctgggacta caggcacatg ccattacacc
 2461 aaccatcatc ccatttcagc ctcttgagta gctgggacta caggcacatg ccattacacc
 2521 tggctaattt tttygtattt ctagttaga cagggttttg ccatgttggc cgggctggc
 2581 tcgaactcct ggactcaagc aatccaccca cctcagcctc ccaaatgag ggaccgtgtc
 2641 ttattcattht ccattgtcctt agtccatagc ttccaggttg gtttaatttg gactaaata
 2701 aatatttgtt gaatgcaata gtaaatagca ttccaggttg caagaactag attaacaaga
 2761 gtggtaaaag gtttggagaa aaaaataata gtttaatttg gctagagtat gagggagagt
 2821 agtaggagac aagatggaaa ggtctcttgg tggcaggcag tggggagcca atgaaggctt ggaagtcaga
 2881 agtacacaat gtgcataatc ttgaaaaata aatataggtt aaacctatca gagccctctt gacacataca
 2941 gagtaatgtg ttgaaaaata attcaagctc ctacctctt acctgcttcc tgggtggagt agggatgtat
 3001 ctgcttcttc gtagcctgct ctttccctct cagccagagg acatggggggg cccagctcc cctgcttctt
 3061 ggctccctca gtagcctgct ctttccctct cagccagagg acatggggggg cccagctcc cctgcttctt
 3121 acatgagctg ctttccctct cagccagagg ggaagcaggc caggggttagc tgggctggc tggcaagcag
 3181 ccttctctgt cctggagctg ccaggagagc cctgcatagt gccaggtggc gccttgggtt ccaagctagt
 3241 ctgggtgggt ccaggagagc gataaccttc tgcctgtgca cacacctgac cctcactcca ccccatcct
 3301 ccatggcccc gataaccttc tgcctgtgca ggcacagggc cagacaaacc gctccccctc aggttggctc cccccacc
 3361 agcttctggt tgggggagag ggcgctctgt ggtcagcct gtacacaccg gtgctggga caccaccacag
 3421 tctgcaaaaag ggcgctctgt tccaatgca cgtacagccc cctggctccc tctgttgatc cccggccctg
 3481 cagctctcgt tccaatgca cgtacagccc cctggctccc tctgttgatc tctgttgatc cccggccctg
 3541 TCAGCCGCAT GGCTCCCCCT CACTGTGCA CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC
 3601 CTCCAGGCCT CACTGTGCA CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC
 3661 AGAGGTTGCC CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC
 3721 ACCACTGGG CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC CAGGATGCC
 3781 CCGGAGAGGA GGATCTACCT GGAGAGGAGG ATGACGTTAG GATCTACCT GGATCTACCT GGATCTACCT
 3841 TTAAGCCTAA ATCAGAAAGAA GAGGGCTCCC TGAAGTTAGA GGATCTACCT GGATCTACCT GGATCTACCT
 3901 CTCCTGGAGA TCCTCAAGAA CCCCAGAATA ATGCCACAG GGACAAAGAA Ggtaagtggc

FIG.-2B

3961 catcaaatctc caaatccagg ttccaggagg ttcatgactc ccctcccata cccagccta
 4021 ggctctgttc actcaggga gagggggaga ctgtactccc cacagaagcc ctccagagg
 4081 tcccatacca atatcccat cccactctc ggaggtagaa agggacagat gtggagagaa
 4141 aataaaaaag gtgcaaaaag agagaggtga gctggatgag atgggagaga agggggaggc
 4201 tggagaagag aaaggatga gaactgcaga tgagagaaaa aatgtgcaga cagaggaaaa
 4261 aatataggtg agaaggagag tcaagagagt tgaagggaag agaaaaggaa agcttgggag
 4321 gtgaagtggg taccagagac aagcaagaag agctggtaga agtcatctca tcttaggcta
 4381 caatgaggaa ttgagacctt ggaagaaggg acacagcagg tagagaaacg tggcttcttg
 4441 actcccaagc caggaatttg gggaaagggg ttggagacca tacaaggcag agggatgagt
 4501 ggggagaaga aagaagggag aaaggaaaga tgggtgactc actcatcttg gactcaggac
 4561 tgaagtggcc actcactttt tttttttttt cgatctcggc tcactgcaac ctccacctcc cgggttcaaag
 4621 caggctggag tgcaatggcg gcctcagcct ctagccaagt agctgcgatt acaggcatgc gccaccacgc
 4681 tgattctcct ttgtatttt atctcaggtg atccaaccac cctggcctcc cactcacttt tacagaccct aagacaaatga
 4741 cgggctaatt ttgtatttt ttgtacatc gttttggtcg ccaggaaagg attggggctc catgttggtc aggtggtctt
 4801 cgaactcctg atctcaggtg atccaaccac cctggcctcc cactcacttt tacagaccct caaagtgcg ggattatagg
 4861 cgtgagccac agcgctggc ctgaagcagc cactcacttt acccagctgc gggttgagt ttgggtgcgg
 4921 ttgcaagctg taggatttg tgtttggccc gcccgcttaa ggcatttgtt accgtaatg ctccgtgaag
 4981 tctcctgtgc ttgacactg gttttggtcg ccaggaaagg gacccagagtc attggcgcta ttggcgctgag
 5041 gcatctgcgt ttgtgacatc ttttcattta tacaggggat gaaccagct ctgtggatct cccctacagc
 5101 cggttcatcc ttttcattta tacaggggat gaaccagct ctgtggatct cccctacagc
 5161 acaccaccc gctgcacaga ccaatctgg gggcgctcca cccgcccgc accgtcccac cccctcacct
 5221 cgtccctgaa cactgggtcc cactgggtcc gggcgctcca cccgcccgc accgtcccac cccctcacct
 5281 ttctaccg ggttccctaa gttcctgacc gttcctgacc taggcgtcag acttcctcac tatactctcc
 5341 caccaccaag GACCCGCCCT GACCCGCCCT GACCCGCCCT GTCCCCAGCC TGCGCGGGCC GCTTCCAGTC
 5401 CCGGTGGAT ATCCGCCCCC AGCTCGCCCG CTCTGCCCCG GCTTGCCTG CCGCTGCGCC CCTTGGAACT
 5461 CCTGGGCTTC CAGCTCCCCG CAGCTCCCCG CAGCTCCCCG ACTGCGCCTG CGCAACAATG GCCACAGTGg
 5521 tgagggggtc tcccgcgga gacttgggga tggggcgggg cgcaggggaag ggaaccgtcg
 5581 cgcagtgctt gcccggggt tgggctggcc ctaccgggag gggcgggctc acttgctctt
 5641 cctacgcag TGCAACTGAC CCTGCCTCCT TGGCTCTGGG TGGCTCTGGG TCCCGGGCGG
 5701 GAGTACCGGG CTCTGCAGCT GCATCTGCAC TGGGGGGCTG CAGGTCTGCC GGGCTCGGAG
 5761 CACACTGTGG AAGGCCACCG TTTCCTCTGCC GAGgtgagcg cggactggcc gagaaagggc
 5821 aaaggagcgg ggcggacggg ggcggcctct ttggccctct cctaccctcg tgtccttttc
 5881 agATCCACGT GGTTCACCTC AGCACCGCCT TTGCCAGAGT TGACGAGGCC TTGGGGCGCC

FIG.-2C

5941 CGGGAGGCCT GGCCGTGTGTG GCGCCTTTC TGGAGgtacc agatcctggga caccctctac
6001 tcccgccttt cccatcccat gctcctccc gactctatcg tggagccaga gaccccatcc
6061 cagcaagctc actcaggccc ctggctgaca aactcattca cgcactgttt gtctatttaa
6121 caccactgt gaaccaggca ccagccccc tgaagctgta gacacatagg aggccttgcc
6181 tctaaggagc ccacagccag tgggggaggg tgacatgaca gacacatagg aaggacatag
6241 taaagatggg ggtcacagag gagggtgacac ttaaagcctt cactggtaga aaagaaaaag
6301 aggtgttcat tgcagaggaa acagaatgtg caaagactca gaatatggcc tatttaggga
6361 atggctacat acaccatgat tagaggaggc ccagtaaaag gaagggatgg tgagatgcct
6421 gctagggttca ctcaactcact ttattttatt tattttattt ttgacagtc tctctgtcgc
6481 ccaggctgga gtgcagtggg gtgactcttg gtcactgcaa ctccgcctc ccgggttcaa
6541 gggattctcc tgcctcagct tcctgagtag ctgggggttac aggtgtgtgc caccatgccc
6601 agctaatttt tttttgtatt tttagtagac aggttttcac catgttggc aggtgtgtct
6661 caaactcctg gcctcaagtg atccgcctga ctcaagctac caaagtgtg attacaagtg
6721 tgagccaccg tgcccagcca cactcactga ttctttaatg ccagccacac agcacaaagt
6781 tcagagaaat gcctccatca tagcatgtca atatgttcat actcttaggt tcatgatgtt
6841 cttaacattt ggttcataag caaataaga aaaaagaata ataaataaaa gaagtggcat
6901 gtcaggacct cacctgaaaa cactgaaaa gaatcatgaa ggtgaatgca gaggtgacac
6961 caacacaaag gtgtatatat ggtttcctgt ggggagtagg tacggaggca gcagtgaagt
7021 agactgcaaa cgtcagaagg gcacgggtca ctgagagcct agtatcctag taaagtggc
7081 tctctccctc tctctccagc ttgtcattga aaaccagtcc accaagcttg ttggttcgca
7141 cagcaagagt acatagagtt tgaataata cataggattt taagaggagg acactgtctc
7201 taaaaaaaaa aacaacagca acaaaaaa gcaacaacca ttacaattt atgttccctc
7261 agcatcttca gagctgagga atgggagagg actatgggaa ccccttcat gttccggcct
7321 tcagccatgg ccctggatc atgcactcat ctgtcttaca atgtcatctc ccagGAGG
7381 CCCGGAAGAA AACAGTGCCT ATGAGCAGTT GCTGCTCGC TTGGAAGAAA TCGCTGAGGA
7441 AGgtcagttt gttggtctgg ccactaatct ctgtggccta gttcataaag aatcacctt
7501 tggagcttca ggtctgaggc tggagatggg ctccctccag tgcaggaggg attgaagcat
7561 gagccagcgc tcatcttgat aataaccatg aagcaaaaac cgcggggcac gcctgtaac
7621 ctgacctacag attgaaaaac ggcaggtgga tcacgaggtc aagagatcaa gaccatcctg
7681 ccagcacttt gggaggccaa ggcaggtgga tctctactaa aaatacgaaa aaatagccag gcgtgtgtggc
7741 gccaacatgg tgaaccccca tctctactaa actcgggagg ctgaggcagg agaattggcat gaacccggga
7801 ggggtgcctgt aatcccgact actcgggagg ctgaggcagg cagcctgggc aacagagcga
7861 ggcagaagt gcaagtggcc gagatcgtgc cactgcactc

FIG.-2D

7921 gactcttgtc tcaaaaaaa aaaaaaaa gaaaccacag caaaaaccaa aatgagacaa
 7981 aaaaaacaag accaaaaaat ggtgtttgga aattgtcaag gtcaagtctg gagagctaaa
 8041 ctttttctga gaactgttta tctttaataa gcatcaataa ttttaacttt gtaataactt
 8101 ttgttggaat tcgttctctt cttagtcact cttaggtcat tttaaatctc acttactcta
 8161 ctgaccttt taggtttctg ctgactagg tagaactctg cctttgcat tcttgtgtct
 8221 gttttgtata gttatcaata ttattttttt tttttttacat cttagtaga gacagggttt caccatattg
 8281 tctttttttt tttttttttt tttttttacat ctgacctgt gatccaccag cctcggcctc ccaaaagtct
 8341 gccaggctgc tctcaaac tttttttttt aatttgctct gggcttaaac ttgtggccca gcactttatg
 8401 gggattcat ttttctttt tttagactca gacggctctt ctcttttctt tctcttctt
 8461 atggtacaca ggttaagag cctccacctt caaagccctg tactttttt ttgttaacg tcttatggga
 8521 cctcccttcc cagttgctc cttagtgaag aagtggctc agagttagt taccttggct tctgggaggt
 8581 caggcctctt cttagtgaag aagtggctc agagttagt taccttggct tctgggaggt
 8641 agggcctgca cctatacc cctatacc tgaagcttta aggggtgca atgtatga gacccaaca
 8701 gaaactgtat cctatacc cctatacc tgaagcttta aggggtgca atgtatga gacccaaca
 8761 tagatcctct tcacagGCTC AGAGACTCAG GTCCAGGAC TGGACATATC TGACATCCTG
 8821 CCTCTGACT TCAGCCGCTA CTTCATATAT GAGGGTCTC TGACTACACC GCCCTGTGCC
 8881 CAGGGTGTCA TCTGGACTGT GTTTAACCCAG ACAGTGATGC TGAGTGCTAA GCAGgtggc
 8941 ctgggggtgtg tttggacaca tttgggtgctg gggaaagag atgtaagatg agatgagaaa
 9001 caggagaaaga agaaatcaa ggtgggtgctc tttgggttac gctataatc ccaccacgtt
 9061 gggaggctga catctctacc ttttttgagc caaagagttc aagacaaggc ggggcaacat
 9121 agtgtgacct tagtccagc tactcaagg ggtgaggtg ggaagatcgc ttgattccag
 9181 gtatgaggcc ctgacctg ctgacctg ctgacctg ctgacctg accatcttta ggtatacat
 9241 agttttgaga ctgacctg ctgacctg ctgacctg ctgacctg accatcttta ggtatacat
 9301 atttatttat aaagaaatc agaggctgg atggggaata caggagctgg aggtggagc
 9361 cctgaggctg ccactgacct cctgacctg cctgacctg cctgacctg cctgacctg catgaacca
 9421 ccacactgt ggttggctg ggttggctg ggttggctg ggttggctg ggttggctg TGAGACCTG
 9481 GTGACTCTCG GCTACAGCTG AACTTCCGAG CGACGACGCC TTTGAATGGG CGAGTGATTG
 9541 AGGCTCCTT CCTGCTGGA GTGGACAGCA GTCTCGGGC TGCTGAGCCA Ggtacagctt
 9601 tgtctggttt ccccccagcc agtagtctt tttttttt tttttttt tttttttt agtgtctgtc
 9661 attggtggtc acagccgccc tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt CTGAATTCCT
 9721 GCCTGGCTGC TGgtgagctt gcccctctt ttggtcttga tggcaggaga ctcctcagca
 9781 ccattcagcc ccagggtgct cagggacctc cctggtctcc tttttttt tttttttt tgcagaacag
 9841 accccaacc caataataga gaggcagatc atggtgggga tttttttt tttttttt gtccccagag

FIG. 2E

9901 gctaattgat tagaatgaag cttgagaaat ctcccagcat ccctctcgca aaagaatccc
 9961 cccccctttt tttaaagata gggctctcact ctgtttgccc caggctgggg tgttgtggca
 10021 cgatcatagc tcaactgcagc ctcgaactcc taggctcagg caatccttc accttagctt
 10081 ctcaaagcac tgggactgta ggcatgagcc actgtgcctg gcccctttac gcccctttac
 10141 ttggctttta ggaagcaaaa acggtgctta tcttaccctt tctcgtgtat ccaccctcat
 10201 cccttggctg gcctcttctg gagactgagg cactatgggg ctgcctgaga actcggggca
 10261 ggggtggtgg agtgactga ggcaggtgtt gaggaactct gcagaccctt ctccctccc
 10321 aaagcagccc tctctgctct ccatcgcagg TGACATCCTA GCCCTGGTTT TTGGCCTCCT
 10381 TTTTGCTGTC ACCAGCGTCG CGTTCCTTGT GCAGATGAGA AGGCAGCACA Ggtattacac
 10441 tgacccttct ttcaggcaca agcttcccc acccttgtgg agtcacttca tgcaaaagcg
 10501 atgcaaatga gctgctcctg ggcagtttt ctgattagcc ttctctgttg tgtacacaca
 10561 gAAGGGGAAC CAAAGGGGGT GTGAGCTACC GCCCAGCAGA GGTAGCCGAG ACTGGAGCCT
 10621 AGAGGCTGGA TCTTGGAGAA TGTGAGAAGC CAGCCAGAGG CATCTGAGGG GGAGCCGGTA
 10681 ACTGTCCTGT CCTGCTCATT ATGCCACTTC CTTTAACTG CCAAGAAATT TTTTAAATA
 10741 AATATTATA ATaaaatatg tgtagtcac ctttgttccc caaatcagaa ggaggtattt
 10801 gaatttccta ttactgttat tagcaccaat ttagtggtaa tgcattttatt ctattacagt
 10861 tcggcctcct tccacacatc actccaatgt gttgctcc

FIG._2F

FIG._2A

FIG._2B

FIG._2C

FIG._2D

FIG._2E

FIG._2F

FIG._2

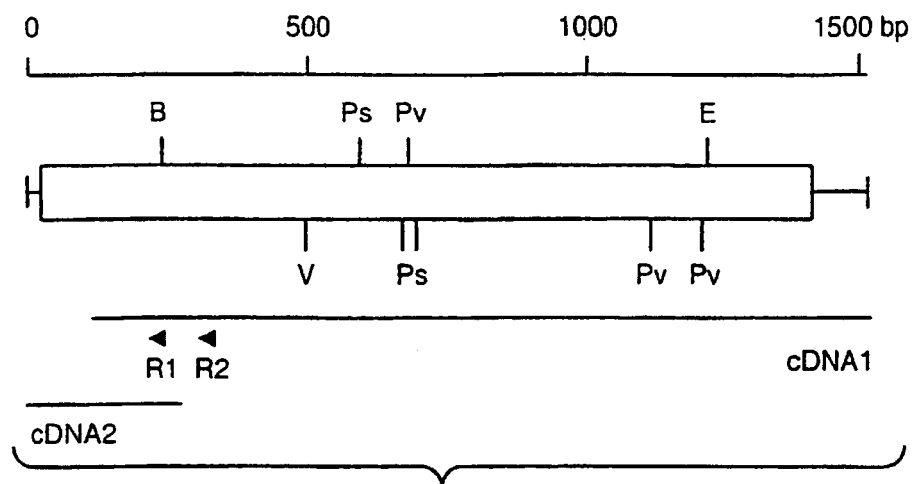


FIG._3

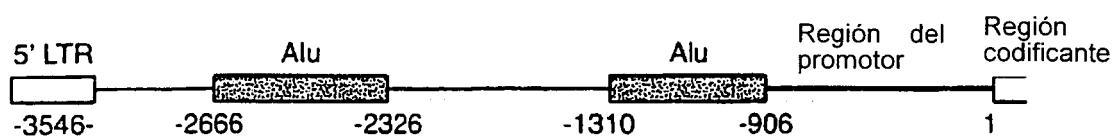


FIG._4

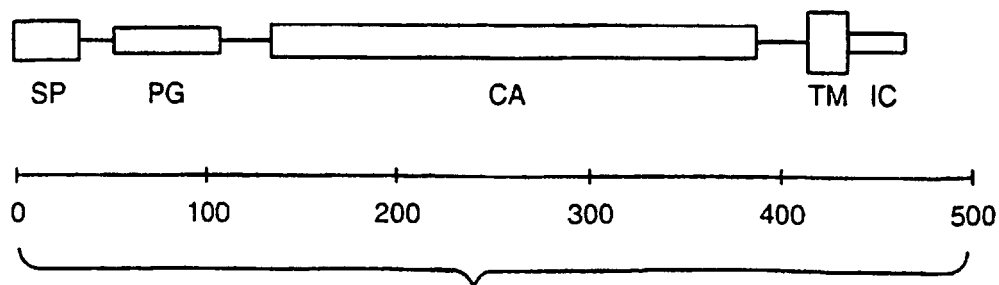


FIG._8

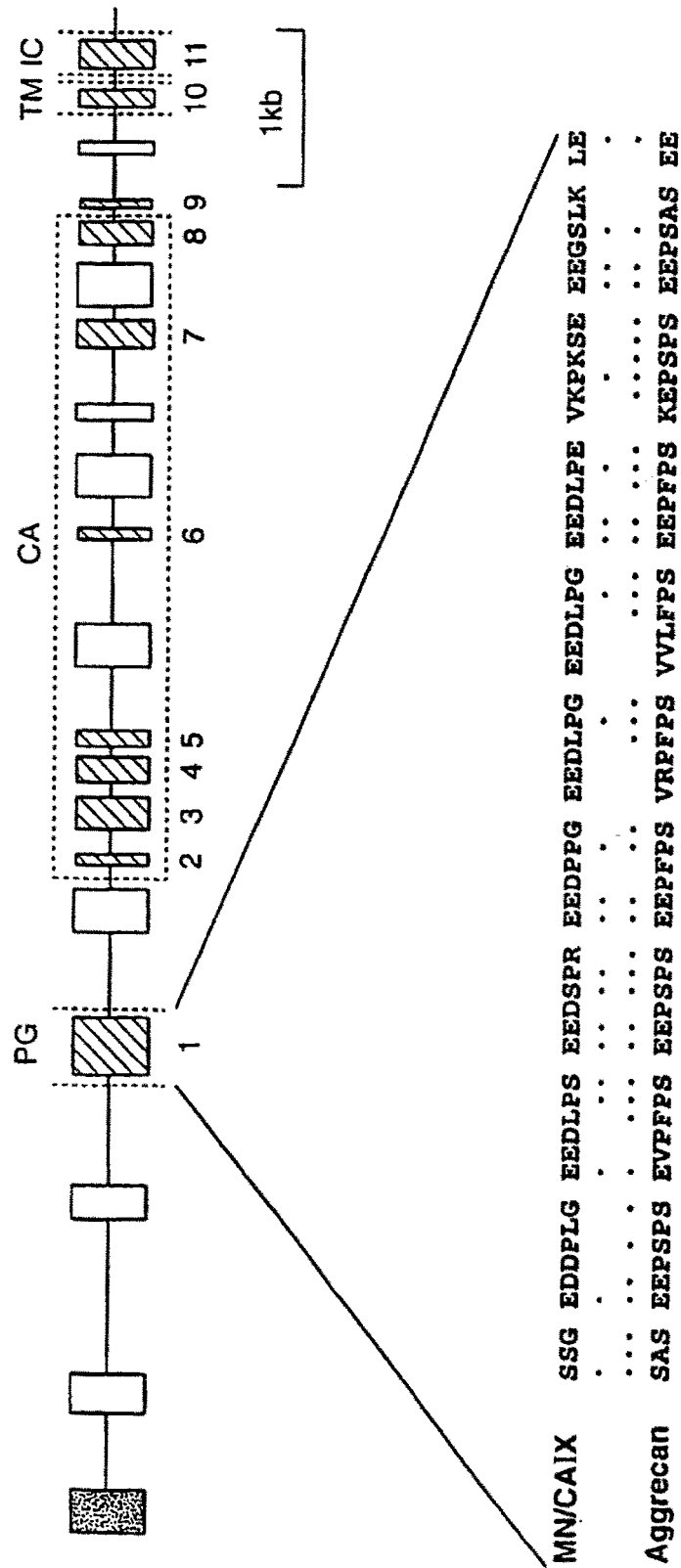


FIG._5

```

-506  CTTGCTTTTC ATTCAAGCTC AAGTTTGTCT CCCACATACC CATTA-CTTAA CTCACCCCTCG

-446  GGCTCCCCTA GCAGCCTGCC CTACCTCTTT ACCTGCTTCC TGGTGGAGTC AGGGATGTAT
      AP2

-386  ACATGAGCTG CTTTCCCTCT CAGCCAGAGG ACATGGGGGG CCCAGCTCC CCTGCCCTTTC

-326  CCCTTCTGTG CCTGGAGCTG GGAAGCAGGC CAGGGTTAGC TGAGGCTGGC TGGCAAGCAG

-266  CTGGGTGGTG CCAGGGAGAG CCTGCATAGT GCCAGGTGGT GCCTTGGGTT CCAAGCTAGT
      VII p53

-206  CCATGGCCCC GATAACCTTC TGCCTGTGCA CACACCTGCC CCTCACTCCA CCCCATCCT
      VI Inr V

-146  AGCTTTGGTA TGGGGGAGAG GGCACAGGGC CAGACAAACC TGTGAGACTT TGGCTCCATC
      IV AP1 III Inr

-86  TCTGCAAAAG GGCCTCTGT GAGTCAGCCT GCTCCCCCTCC AGGCTTGCTC CTCCCCCACC
      II AP1 p53 I AP2

-26  CAGCTCTCGT TTCCAATGCA CGTACAGCCC GTACACACCG TGTGCTGGGA CACCCACAG
      ***

```

FIG.-6

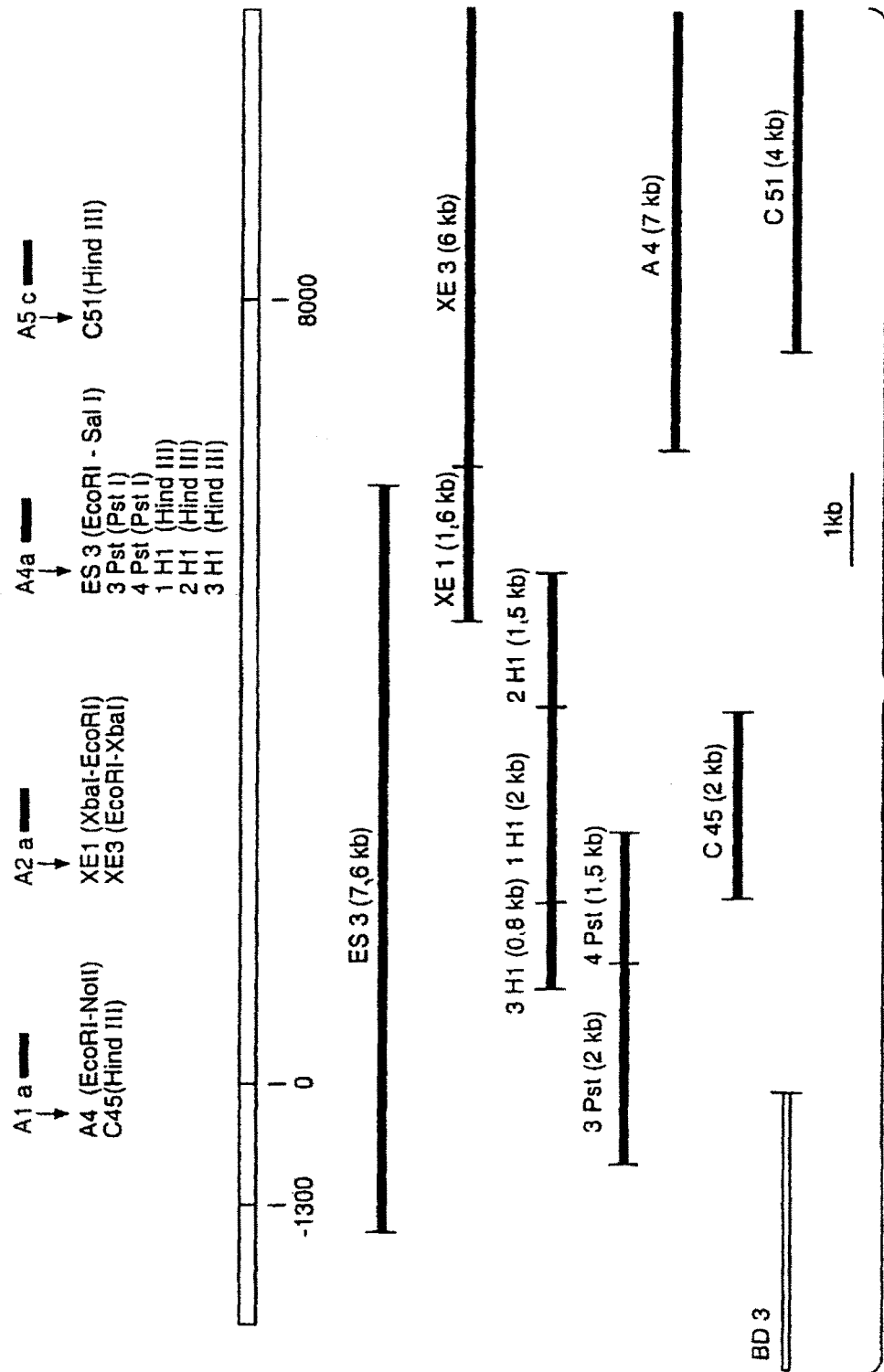


FIG. 7

ES 2 296 412 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Zavada, Jan
 Pastorekova, Silvia
 Pastorek, Jaromir
 <120> Gen y Proteína MN
 <130> D-0021.5 PCT
 <140>
 <141>
 <150> 09/177.776
 <151> 23-10-1998
 <150> 09/178.115
 <151> 23-10-1998
 <160> 143
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 1522
 <212> ADN
 <213> HUMANO
 <220>
 <221> CDS
 <222> (13) .. (1389)
 <220>
 <221> mat peptídico
 <222> (124) .. (1389)
 <400> 1
 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
 atc ccg gcc cct gat cca ggc ctc aat gtg caa ctg ctg ctg tca ctg 99
 Ile Pro Ala Pro Ala Pro Gly Leu Thr Val Gln Leu Leu Leu Ser Leu
 -20 -15 -10
 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 195
 Asp Ser Pro Leu Gly Gly Gly Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly
 10 15 20

gag gag gat ctg ccc agt gaa gag gat tca ccc aga gag gag gat cca 243
 Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro
 25 30 35 40

ccc gga gag gag gat cta cct gga gag gag gat cta cct gga gag gag 291
 Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu
 45 50 55

gat cta cct gaa gtt aag cct aaa tca gaa gaa gag ggc tcc ctg aag 339
 Asp Leu Pro Glu Val Lys Pro Lys Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys
 60 65 70

tta gag gat cta cct act gtt gag gct cct gga gat cct caa gaa ccc 387
 Leu Glu Asp Leu Pro Thr Val Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Glu Pro
 75 80 85

cag aat aat gcc cac agg gac aaa gaa ggg gat gac cag agt cat tgg 435
 Gln Asn Asn Ala His Arg Asp Lys Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp
 90 95 100

cgc tat gga ggc gac ccg ccc tgg ccc cgg gtg tcc cca gcc tgc gcg 483
 Arg Tyr Gly Gly Asp Pro Pro Trp Pro Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala
 105 110 115 120

ggc cgc ttc cag tcc ccg gtg gat atc cgc ccc cag ctc gcc gcc ttc 531
 Gly Arg Phe Gln Ser Pro Val Asp Ile Arg Pro Gln Leu Ala Ala Phe
 125 130 135

tgc ccg gcc ctg cgc ccc ctg gaa ctc ctg ggc ttc cag ctc ccg ccg 579
 Cys Pro Ala Leu Arg Pro Leu Glu Leu Leu Gly Phe Gln Leu Pro Pro
 140 145 150

ctc cca gaa ctg cgc ctg cgc aac aat ggc cac agt gtg caa ctg acc 627
 Leu Pro Glu Leu Arg Leu Arg Asn Asn Gly His Ser Val Gln Leu Thr
 155 160 165

ctg cct cct ggg cta gag atg gct ctg ggt ccc ggg cgg gag tac cgg 675
 Leu Pro Pro Gly Leu Glu Met Ala Leu Gly Pro Gly Arg Glu Tyr Arg
 170 175 180

gct ctg cag ctg cat ctg cac tgg ggg gct gca ggt cgt ccg ggc tcg 723
 Ala Leu Gln Leu His Leu His Trp Gly Ala Ala Gly Arg Pro Gly Ser
 185 190 195 200

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 cgc 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	
	265 270 275 280	
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 cgg cta cag ctg aac ttc cga gcg acg cag cct ttg	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	
	345 350 355 360	
50		
	cct cgg gct 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		
65		

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

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
410 415 420

tagaggctgg atcttgaga atgtgagaag ccagccagag gcattctgagg gggagccggt 1449

aactgtcctg tcctgtcat tatgccactt ccttttaact gccagaat tttttaaat 1509

aaatatttat aat 1522

<210> 2

<211> 459

<212> PRT

<213> HUMANO

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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
30	Thr Ala Phe Ala Arg Val Asp Glu Ala Leu Gly Arg Pro Gly Gly Leu	
		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
	Ala Gln Gly Val Ile Trp Thr Val Phe Asn Gln Thr Val Met Leu Ser	
		300 305 310 315
50	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
 cgcccagtg gtcatttcc ccagaagag 29

30 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 35 <213> HUMANO
 <400> 4

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

55 ggatcctgtt gactcgtgac cttaccccca accctgtgct ctctgaaaca tgagctgtgt 60
 ccactcaggg ttaaattgat taagggcggg gcaagatgtg ctttggttaa cagatgcttg 120
 60 aaggcagcat gctcgttaag agtcattacc aatccctaatt ctcaagtaat cagggacaca 180

65

ES 2 296 412 T3

aacactgctg aagggccgcag ggtcctctgc ctaggaaaac cagagacctt tgttcacttg 240
 tttatctgac ctccctcca ctattgtcca tgacctgcc aaatccccct ctgtgagaaa 300
 5 caccgaagaa ttatcaataa aaaaataaat ttaaaaaaaaaa aatcacaaaa aaaaaaaaaa 360
 aaaaaaaaaa gacttacgaa tagttattga taaatgaata gctattggta aagccaagta 420
 10 aatgatcata ttcaaaacca gacggccatc atcacagctc aagtctacct gatttgatct 480
 ctttatcatt gtcattcttt ggattcacta gattagtcac catcctcaaa attctcccc 540
 15 aagttctaata tacgttccaa acatttaggg gttacatgaa gcttgaacct actaccttct 600
 ttgcttttga gccatgagtt gtaggaatga tgagtttaca ccttacatgc tggggattaa 660
 20 tttaaacttt acctctaagt cagttgggta gcctttggct tatttttgta gctaattttg 720
 tagttaatgg atgcactgtg aatcttgcta tgatagtttt cctccacact ttgccactag 780
 25 gggtaggtag gtactcagtt ttcagtaatt gcttacctaa gaccctaagc cctatttctc 840
 ttgtactggc ctttatctgt aatatgggca tatttaatac aatataattt ttggagtttt 900
 30 tttgtttgtt tgtttgttt ttttttgag acggagtctt gcctctgtca tgcccaggct 960
 ggagtagcag tggtgccatc tcggtcact gcaagctcca cctcccaggt tcacgccatt 1020
 35 ttctgcctc agcctccga gtagctggga ctacaggcgc ccgccaccat gccgggctaa 1080
 40 ttttttgat ttttggtaga gacggggtt caccgtgta gccagaatgg tctcgatctc 1140
 ctgacttcgt gatccaccgc cctcggcctc ccaaagttct gggattacag gtgtgagcca 1200
 45 ccgcacctgg ccaatttttt gagtctttta aagtaaaaat atgtcttgta agctggtaac 1260
 tatggtacat ttccttttat taatgtggtg ctgacggtca tataggttct tttgagtttg 1320
 50 gcctgcataat gctacttttt gcagtccttt cattacattt ttctctcttc atttgaagag 1380
 catgttatat cttttagctt cacttggctt aaaaggttct ctcatagcc taacacagtg 1440
 55 tcattgttgg taccacttgg atcataagt gaaaaacagt caagaaattg cacagtaata 1500
 cttgtttgta agagggatga ttcaggtgaa tctgacacta agaaactccc ctacctgagg 1560
 60 tctgagattc ctctgacatt gctgtatata ggcttttctt ttgacagcct gtgactgcgg 1620
 65

ES 2 296 412 T3

actatattttc ttaagcaaga tatgctaaag ttttgtgagc ctttttccag agagaggtct 1680

catatctgca tcaagtgaga acatataatg tctgcatggt tccatatttc aggaatgttt 1740

gcttgtgttt tatgctttta tatagacagg gaaacttggt cctcagtgac ccaaaagagg 1800

tggaattgt tattggatat catcattggc ccacgcttc tgaccttga aacaattaag 1860

ggttcataat ctcaattctg tcagaattgg tacaagaaat agctgctatg tttcttgaca 1920

ttccacttgg taggaaataa gaatgtgaaa ctcttcagtt ggtgtgtgtc cctngttttt 1980

ttgcaatttc cttcttactg tgttaaaaaa aagtatgatc ttgctctgag aggtgaggca 2040

ttcttaataca tgatctttaa agatcaataa tataatcctt tcaaggatta tgtctttatt 2100

ataataaaga taatttgtct ttaacagaat caataatata atcccttaaa ggattatatt 2160

tttgcgtggc gcagtggtc acacctgtaa tcccagcact ttgggtggcc aaggtggaag 2220

gatcaaatct gctacttct atattatctt ctaaagcaga attcatctct cttccctcaa 2280

tatgatgata ttgacagggt ttgccctcac tctactagatt gtgagctcct gctcagggca 2340

ggtagcgttt tttgtttttg tttttgtttt tcttttttga gacagggtct tgctctgtca 2400

cccaggccag agtgcaatgg tacagtctca gctcactgca gcctcaaccg cctcggtctca 2460

aaccatcatc ccatttcagc ctctgagta gctgggacta caggcacatg ccattacacc 2520

tggttaattt ttttgtattt ctagtagaga cagggtttgg ccatgttgcc cgggctggtc 2580

tcgaactcct ggactcaagc aatccacca cctcagcctc ccaaaatgag ggaccgtgtc 2640

ttattcattt ccatgtccct agtccatagc ccagtgtctg acctatggta gtactaaata 2700

aatatttggt gaatgcaata gttaaataga tttcaggggag caagaactag attaacaaag 2760

gtggtaaaag gtttgagaa aaaaataata gtttaatttg gctagagtat gagggagagt 2820

agtaggagac aagatggaaa ggtctcttgg gcaagggttt gaaggaagtt ggaagtcaga 2880

agtacacaat gtgcatatcg tggcaggcag tggggagcca atgaaggctt ttgagcagga 2940

gagtaatgtg ttgaaaaata aatatagggt aaacctatca gagccctct gacacatata 3000

cttgcttttc attcaagctc aagtttgtct cccacatacc cattacttaa ctcacctcg 3060

ES 2 296 412 T3

ggctccccta gcagcctgcc ctacctcttt acctgcttcc tgggtggagtc agggatgtat 3120
 5
 acatgagctg ctttccctct cagccagagg acatgggggg cccagctcc cctgcctttc 3180
 ccttctctgt cctggagctg ggaagcaggg cagggttagc tgaggctggc tggcaagcag 3240
 10
 ctgggtgggt ccaggagag cctgcatagt gccagggtgg gccttgggtt ccaagctagt 3300
 ccatggcccc gataaccttc tgctgtgca cacacctgcc cctcactcca cccccatcct 3360
 15
 agctttggta tgggggagag ggcacagggc cagacaaacc tgtgagactt tggctccatc 3420
 tctgcaaaag ggcgctctgt gagtcaacct gctcccctcc aggttctctc ctccccacc 3480
 20
 cagctctcgt ttccaatgca cgtacagccc gtacacaccg tgtgctggga caccacacag 3540
 tcagccgcat ggctcccctg tgccccagcc cctggctccc tctgttgatc cggccccctg 3600
 25
 ctccaggcct cactgtgcaa ctgctgctgt cactgctgct tctggtgctt gtccatcccc 3660
 agaggttgcc cgggatgcag gaggattccc ccttgggagg aggtcttctt ggggaagatg 3720
 30
 acccactggg cgaggaggat ctgccagtg aagaggattc acccagagag gaggatccac 3780
 cgggagagga ggatctacct ggagaggagg atctacctgg agaggaggat ctacctgaag 3840
 35
 ttaagcctaa atcagaagaa gagggtccc tgaagttaga ggatctacct actgttgagg 3900
 ctcttgagaa tcctcaagaa cccagaata atgcccacag ggacaaagaa ggtaagtggg 3960
 40
 catcaatctc caaatccagg ttccaggagg ttcatgactc ccctcccata cccagccta 4020
 ggctctgttc actcaggga ggaggggaga ctgtactccc cacagaagcc cttccagagg 4080
 45
 tcccatacca atatccccat cccactctc ggaggtagaa agggacagat gtggagagaa 4140
 aataaaaagg gtgcaaaagg agagaggtga gctggatgag atgggagaga agggggaggc 4200
 50
 tggagaagag aaagggatga gaactgcaga tgagagaaaa aatgtgcaga cagaggaaaa 4260
 aaatagggtg agaaggagag tcagagagtt tgagggaag agaaaaggaa agcttgggag 4320
 55
 gtgaagtggg taccagagac aagcaagaag agctggtaga agtcatctca tcttaggcta 4380
 caatgaggaa ttgagaccta ggaagaaggg acacagcagg tagagaaacy tggcttcttg 4440
 60
 actcccaagc caggaatttg gggaaagggg ttggagacca tacaaggcag agggatgagt 4500
 65

ES 2 296 412 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ggggagaaga aagaagggag aaaggaaaga tgggtgtactc actcattttgg gactcaggac 4560
 tgaagtgtccc actcactttt tttttttttt tttttgagac aaactttcac ttttgttgcc 4620
 caggctggag tgcaatggcg cgatctcggc tcaactgcac ctecacctcc cgggttcaag 4680
 tgattctcct gcctcagcct ctageccaagt agctgcgatt acaggcatgc gccaccacgc 4740
 ccggctaatt tttgtatttt tagtagagac ggggtttcgc catgttggtc aggctggtct 4800
 cgaactcctg atctcagggt atccaaccac cctggcctcc caaagtgtg ggattatagg 4860
 cgtgagccac agcgccctggc ctgaagcagc cactcacttt tacagaccct aagacaatga 4920
 ttgcaagctg gtaggattgc tgtttggccc acccagctgc ggtgttgagt ttgggtgcgg 4980
 tctcctgtgc tttgcacctg gcccgcttaa ggcatttgtt acccgtaatg ctctgttaag 5040
 gcatctgcgt ttgtgacatc gttttggctc ccaggaaggg attggggctc taagcttgag 5100
 cggttcatcc ttttcattta tacaggggat gaccagagtc attggcgcta tggaggtgag 5160
 acaccacccc gctgcacaga cccaatctgg gaaccagct ctgtggatct cccctacagc 5220
 cgtccctgaa cactggctcc gggcgtecca cccgcgccc accgtcccac cccctcacct 5280
 tttctacccg ggttccctaa gttcctgacc taggcgtcag acttccctac tatactctcc 5340
 caccacaggc gaccgcctt gggcccggtt gtcccagcc tgcgcgggct gcttccagtc 5400
 cccggtggat atccgcccc agctcgccgc cttctgccc gccctgcgc ccttggaact 5460
 cctgggcttc cagctcccgc cgctcccaga actgcgcctg cgcaacaatg gccacagtgg 5520
 tgagggggtc tccccgccga gacttgggga tggggcgggg cgcagggaag ggaaccgtcg 5580
 cgcagtgcct gcccggggtt tgggttgccc ctaccggcg gggcggctc acttgcctct 5640
 cctacgcag tgcaactgac cctgcctcct gggctagaga tggctctggg tcccgggcgg 5700
 gagtaccggg ctctgcagct gcattgcac tggggggctg caggctcgtc gggctcggag 5760
 cacactgtgg aaggccaccg tttccctgcc gaggtgagcg cggactggcc gagaaggggc 5820
 aaaggagcgg ggcggacggg ggccagagac gtggccctct cctaccctcg tgccttttc 5880
 agatccacgt ggttcacctc agcaccgcct ttgccagagt tgacgaggcc ttggggcgcc 5940

ES 2 296 412 T3

cgggaggcct ggccgtgttg gccgcctttc tggagggtacc agatcctgga caccacctac 6000
 tccccgcttt cccatcccat gctcctcccg gactctatcg tggagccaga gaccccatcc 6060
 5 cagcaagctc actcaggccc ctggctgaca aactcattca cgcactgttt gttcatttaa 6120
 caccactgt gaaccaggca ccagccccc acaaggattc tgaagctgta ggtccttgcc 6180
 10 tctaaggagc ccacagccag tgggggaggc tgacatgaca gacacatagg aaggacatag 6240
 taaagatggt ggtcacagag gaggtgacac ttaaagcctt cactggtaga aaagaaaagg 6300
 15 aggtgttcat tgcagaggaa acagaatgtg caaagactca gaatatggcc tatttaggga 6360
 atggctacat acaccatgat tagaggaggc ccagtaaagg gaagggatgg tgagatgcct 6420
 20 gctaggttca ctcaactcact tttattttatt tattttattt tttgacagtc tctctgtcgc 6480
 ccaggctgga gtgcagtggg gtgatcttgg gtcactgcaa cttccgcctc ccgggttcaa 6540
 25 gggattctcc tgcctcagct tcctgagtag ctggggttac aggtgtgtgc caccatgccc 6600
 agctaatttt tttttgtatt tttagtagac agggtttcac catgttggtc aggtcggctc 6660
 30 caaactcctg gcctcaagtg atccgcctga ctcagcctac caaagtgtg attacaagtg 6720
 tgagccaccg tgcccagcca cactcactga ttctttaatg ccagccacac agcacaaagt 6780
 35 tcagagaaat gcctccatca tagcatgtca atatgttcat actcttaggt tcatgatgtt 6840
 cttaacatta ggttcataag caaaataaga aaaaagaata ataaataaaa gaagtggcat 6900
 gtcaggacct cacctgaaaa gccaaacaca gaatcatgaa ggtgaatgca gaggtgacac 6960
 45 caacacaaag gtgtatatat ggtttcctgt ggggagtatg tacggaggca gcagtgagt 7020
 agactgcaaa cgtcagaagg gcacgggtca ctgagagcct agtatcctag taaagtgggc 7080
 50 tctctccctc tctctccagc ttgtcattga aaaccagtcc accaagcttg ttggttcgca 7140
 cagcaagagt acatagagtt tgaaataata cataggattt taagaggag acactgtctc 7200
 55 taaaaaaaa aacaacagca acaacaaaaa gcaacaacca ttacaatttt atgttccctc 7260

ES 2 296 412 T3

cccggaagaa aacagtgcct atgagcagtt gctgtctcgc ttggaagaaa tcgctgagga 7440
 aggtcagttt gttggtcttg ccactaatct ctgtggccta gttcataaag aatcacctt 7500
 5 tggagcttca ggtctgaggc tggagatggg ctccctccag tgcaggaggg attgaagcat 7560
 gagccagcgc tcctcttgat aataaccatg aagctgarag acacagttac ccgcaaacgg 7620
 10 ctgcctacag attgaaaacc aagcaaaaac cgccgggcac ggtggctcac gcctgtaate 7680
 ccagcacttt gggaggccaa ggcaggtgga tcacgaggtc aagagatcaa gaccatcctg 7740
 15 gccaacatgg tgaaaccca tctctactaa aaatacgaaa aaatagccag gcgtgggtggc 7800
 gggtgctgt aatcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatggcat gaaccggga 7860
 20 ggcagaagtt gcagtgagcc gagatcgtgc cactgcactc cagcctgggc aacagagcga 7920
 gactcttgtc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaaccaag caaaaaccaa aatgagacaa 7980
 25 aaaaaacaag accaaaaaat ggtgtttgga aattgtcaag gtcaagtctg gagagctaaa 8040
 cttttctga gaactgttta tctttaataa gcatcaaata ttttaacttt gtaaatactt 8100
 30 ttgttgaaa tcgttctctt cttagtcact cttgggtcat tttaaatctc acttactcta 8160
 ctagaccttt taggtttctg ctagactagg tagaactctg ctttgcatt tcttgtgtct 8220
 35 gttttgtata gttatcaata ttcataattha tttacaagtt attcagatca ttttttcttt 8280
 tctttttttt tttttttttt ttttttacat ctttagtaga gacagggttt caccatattg 8340
 gccaggtgc tctcaaaactc ctgacctgt gatccaccag cctcggcctc ccaaagtget 8400
 40 gggattcatt ttttcttttt aatttgctct gggcttaaac ttgtggccca gcactttatg 8460
 atggtacaca gagttaagag tgtagactca gacggctctt cttctttcct tctcttcctt 8520
 45 cctcccttcc ctccacctt ccttctctc cttcctttct ttcttctct cttgcttctt 8580
 caggcctctt ccagttgctc caaagccctg tacttttttt tgagttaacy tcttatggga 8640
 50 agggcctgca cttagtgaag aagtggctc agagttgagt taccttggt tctgggaggt 8700
 gaaactgtat ccctataccc tgaagcttta aggggggtgca atgtagatga gacccaaca 8760
 60 tagatcctct tcacaggctc agagactcag gtcccaggac tggacatctc tgcactcctg 8820
 65

ES 2 296 412 T3

cccctctgact tcagccgcta cttccaatat gaggggtctc tgactacacc gccctgtgcc 8880
 cagggtgtca tctggactgt gtttaaccag acagtgatgc tgagtgctaa gcagggtgggc 8940
 5 ctggggtgtg tgtggacaca gtgggtgcgg gggaaagagg atgtaagatg agatgagaaa 9000
 caggagaaga aagaaatcaa ggctgggctc tgtggcttac gcctataatc ccaccacgtt 9060
 10 gggaggctga ggtgggagaa tggtttgagc ccaggagttc aagacaaggc ggggcaacat 9120
 agtgtgaccc catctctacc aaaaaaaccc caacaaaacc aaaaatagcc gggcatggtg 9180
 15 gtatgcggcc tagtcccagc tactcaagga ggctgaggtg ggaagatcgc ttgattccag 9240
 gagtttgaga ctgcagtgag ctatgatccc accactgcct accatcttta ggatacattt 9300
 atttatttat aaaagaaatc aagaggctgg atggggaata caggagctgg aggggtggagc 9360
 cctgaggtgc tggttgtgag ctggcctggg acccttgttt cctgtcatgc catgaacca 9420
 25 cccacactgt ccactgacct ccctagctcc acaccctctc tgacaccctg tggggacctg 9480
 gtgactctcg gctacagctg aacttccgag cgacgcagcc tttgaatggg cgagtgattg 9540
 30 aggcctcctt ccctgctgga gtggacagca gtccctgggc tgctgagcca ggtacagctt 9600
 tgtctggttt cccccagcc agtagtcctt tatectcca tgtgtgtgcc agtgtctgtc 9660
 attggtggtc acagcccgcc tctcacatct cctttttctc tccagtcag ctgaattcct 9720
 gcctggctgc tggtagagtct gcccctctc ttggtcctga tgccaggaga ctctcagca 9780
 40 ccattcagcc ccagggtgc tcaggaccgc ctctgctccc tctccttttc tgcagaacag 9840
 accccaaccc caatattaga gaggcagatc atggtgggga tccccccatt gtccccagag 9900
 gctaattgat tagaatgaag cttgagaaat ctcccagcat ccctctcgca aaagaatccc 9960
 50 cccccctttt tttaaagata gggctctcact ctgtttgccc caggctgggg tgttgtggca 10020
 cgatcatagc tcactgcagc ctcgaaactc taggctcagg caatcctttc accttagctt 10080
 55 ctcaaagcac tgggactgta ggcattgagc actgtgcctg gcccacaaag gcccttttac 10140
 ttggctttta ggaagcaaaa acggtgctta tcttaccct tctcgtgtat ccaccctcat 10200
 60 cccttggtg gcctcttctg gagactgagg cactatgggg ctgcctgaga actcggggca 10260

65

ES 2 296 412 T3

```

gggggtgggtgg agtgactga ggcaggtgtt gaggaactct gcagacccct cttccttccc 10320
aaagcagccc tctctgctct ccatcgagg tgacatecta gccctgggtt ttggcctcct 10380
5 ttttgcgtgc accagcgtcg cgttccttgt gcagatgaga aggcagcaca ggtattacac 10440
tgaccctttc ttcaggcaca agcttcccc acccttggtg agtcacttca tgcaaagcgc 10500
10 atgcaaata gctgctcctg ggccagtttt ctgattagcc tttcctgttg tgtacacaca 10560
gaaggggaac caaagggggt gtgagctacc gccagcaga ggtagccgag actggagcct 10620
15 agaggttga tcttgagaa tgtgagaagc cagccagagg catctgagg ggagccggt 10680
actgtcctgt cctgctcatt atgccacttc cttttaactg ccaagaaatt ttttaaaata 10740
20 aatatttata ataaaatatg tgtagtcac ctttggtccc caaatcagaa ggaggtattt 10800
25 gaatttccta ttactgttat tagcaccaat ttagtggtaa tgcatttatt ctattacagt 10860
tcggcctcct tccacacatc actccaatgt gttgctcc 10898

```

<210> 6

<211> 37

<212> PRT

<213> HUMANO

<400> 6

```

Met Ala Pro Leu Cys Pro Ser Pro Trp Leu Pro Leu Leu Ile Pro Ala
1 5 10 15
Pro Ala Pro Gly Leu Thr Val Gln Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu
20 25 30
Met Pro Val His Pro
35

```

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> HUMANO

<400> 7

tggggttctt gaggatctcc aggag

<210> 8

<211> 26

<212> ADN

<213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<400> 8

ctctaacttc agggagccct ctctt 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 nngggngg 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

Gly Glu Asp Asp Pro Leu
 1 5

45 <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

Tyr Gly Gly Asp Pro
20

60 <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

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> HUMANO

<400> 14

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

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> HUMANO

<400> 15

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

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> HUMANO

<400> 16

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

<210> 17

<211> 45

<212> ADN

<213> HUMANO

<400> 17

gtcgctagct ccatgggtca tatgcagagg ttgccccgga tgcag

45

<210> 18

<211> 43

<212> ADN

<213> HUMANO

<400> 18

gaagatctct tactcgagca ttctccaaga tccagcctct agg

43

<210> 19

ES 2 296 412 T3

<211> 10
<212> ADN
<213> HUMANO
5 <400> 19
ctccatctct 10
10 <210> 20
<211> 10
<212> ADN
15 <213> HUMANO
<400> 20
20 ccaccccat 10
<210> 21
<211> 205
25 <212> ADN
<213> HUMANO
<400> 21
30 acetgcccct cactccaccc ccatactagc ttgggtatgg gggagagggc acagggccag 60
acaaacctgt gagactttgg ctccatctct gcaaaagggc 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
65 <222> (1) .. (10)

ES 2 296 412 T3

<400> 23

yyycayyyyy

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

65

<222> (1).. (540)

ES 2 296 412 T3

<400> 27

cttgccttttc attcaagctc aagtttgtct cccacatacc cattacttaa ctcaccctcg 60
 5 ggctccccta gcagcctgcc ctacctcttt acctgcctcc tgggtggagtc agggatgtat 120
 acatgagctg ctttccctct cagccagagg acatgggggg cccagctcc cctgcctttc 180
 10 cccttctgtg cctggagctg ggaagcaggc cagggttagc tgaggctggc tggcaagcag 240
 ctgggtgggtg ccagggagag cctgcatagt gccaggtggt gccttgggtt ccaagctagt 300
 15 ccatggcccc gataaccttc tgctgtgca cacacctgcc cctcactcca cccccactc 360
 agctttggta tgggggagag ggcacaggc cagacaaacc tgtgagactt tggctccatc 420
 20 tctgcaaaag ggcgtctgt gagtcagcct gctccctcc aggcctgtct cccccacc 480
 cagctctcgt ttccaatgca cgtacagccc gtacacaccg tgtgctggga caccacacag 540

<210> 28

<211> 445

<212> ADN

<213> HUMANO

<220>

<221> exón

<222> (1).

<223> 1^{er} exón de MN

<400> 28

gcccgtacac accgtgtgct gggacacccc acagtcagcc gcatggctcc 50
 cctgtgcccc agccctggc tccctctgtt gatcccgcc cctgctccag 100
 45 gctcactgt gaaactgctg ctgacactgc tgcctctggg gcctgtccat 150
 ccccagaggt tgccccggat gcaggaggat tcccccttg gaggaggctc 200
 50 ttctggggaa gatgaccac tgggcgagga ggatctgcc agtgaagagg 250
 attcaccag agaggaggat ccaccggag aggaggatct acctggagag 300
 55 gaggatctac ctggagagga ggatctacct gaagttaagc ctaaatacaga 350
 agaagagggc tccctgaagt tagaggatct acctactgtt gaggtcctg 400
 60 gagatcctca agaaccacag aataatgccc acagggacaa agaag 445

<210> 29

<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> 3 ^{er} exón de MN	
25	<400> 30	
	gcgacccgcc ctggccccgg gtgtccccag cctgcgcggg ccgcttccag	50
	tccccgggtgg atatccgccc ccagctcgcc gccttctgcc cggccctgcc	100
30	ccccctggaa ctctctgggt tccagctccc gccgctcccc gaantggccc	150
	tgcgcaacaa 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	
50	tgcaactgac cctgcctcct gggctagaga tggctctygg tcccggggcg	50
	gagtaccggg ctctgcagct gcatctgcac tggggggctg caggtcgtcc	100
55	gggctcggag cacactgtgg aaggccaccg ttccctgcc gag	143
	<210> 32	
	<211> 93	
	<212> ADN	
60	<213> HUMANO	
	<220>	
	<221> exón	
65	<222> (1).	
	<223> 5º exón de MN	

ES 2 296 412 T3

<400> 32		
	atccacgtgg ttcacctcag caccgccttt gccagagttg acgaggcctt	50
5	ggggcgcccc ggaggcctgg ccgtgttggc cgccctttctg gag	93
<210> 33		
<211> 67		
10	<212> ADN	
<213> HUMANO		
<220>		
<221> exón		
15	<222> (1).	
<223> 6º exón de MN		
<400> 33		
20	gagggccccg aagaaaacag tgccctatgag cagttgctgt ctcgcttgga	50
	agaaatcgct gaggaag	67
25	<210> 34	
<211> 158		
<212> ADN		
30	<213> HUMANO	
<220>		
<221> exón		
<222> (1).		
35	<223> 7º exón de MN	
<400> 34		
40	gctcagagac tcaggtecca ggactggaca tatctgcact cctgccctct	50
	gacttcagcc gctacttcca atatgagggg tctctgacta caccgccctg	100
45	tgcccagggt gtcactctgga ctgtgttttaa 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 cctgtgggga cctggtgact ctcggctaca	50
	gctgaacttc cgagcgacgc agcctttgaa tgggcgagtg attgaggcct	100
65	ccttcctctgc tggagtggac 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 ttctgcctg 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	gtgacatacct agccctgggtt tttaggcctcc tttttgctgt caccagcgtc	50
	gcgttccttg tgcagatgag 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	aaggggaacc aaaggggggtg tgagctaccg cccagcagag gtagccgaga	50
	ctggagccta gaggctggat cttggagaat gtgagaagcc agccagaggc	100
55	atctgagggg gagecggtaa ctgtcctgtc ctgctcatta tgccacttcc	150
	ttttaactgc caagaaattt cttaauataa atatctataa 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
cccagcctag gctctgttca ctcaggggaag gaggggagac tgtactcccc acagaagccc 120
ttccagaggt cccataccaa tatccccatc cccaactctcg gaggtagaaa gggacagatg 180
tggagagaaa ataaaaaggg tgcaaaagga gagagggtgag ctggatgaga tgggagagaa 240
gggggaggct ggagaagaga aagggatgag aactgcagat gagagaaaaa atgtgcagac 300
agaggaaaaa aataggtgga gaaggagagt cagagagttt gaggggaaga gaaaaggaaa 360
gcttgggagg tgaagtgggt accagagaca agcaagaaga gctggtagaa gtcattctcat 420
cttaggctac aatgaggaat tgagacctag gaagaaggga cacagcaggt agagaaacgt 480
ggcttcttga ctcccaagcc aggaatttgg ggaagggggt tggagaccat acaaggcaga 540
gggatgagtg gggagaagaa agaagggaga aaggaaagat ggtgtactca ctcatttggg 600
actcaggact gaagtgccca ctcacttttt tttttttttt ttttgagaca aactttcact 660
tttgttgccc aggctggagt gcaatggcgc gatctcggt cactgcaacc tccacctccc 720

gggttcaagt gattctcctg cctcagcctc tagccaagta gctgcgatta caggcatgcg 780
ccaccacgcc cggctaattt ttgtattttt agtagagacg gggtttcgcc atgttggtca 840
ggctgggtct gaactcctga tctcaggtga tccaaccacc ctggcctccc aaagtgcctgg 900
gattataggc gtgagccaca gcgcctggcc tgaagcagcc actcactttt acagacccta 960
agacaatgat tgcaagctgg taggattgct gtttggccca cccagctgcg gtgttgagtt 1020
tgggtgcggt ctctgtgct ttgcacctgg cccgcttaag gcatttgta cccgtaatgc 1080
tcctgtaagg catctgcgtt tgtgacatcg ttttggtcgc caggaaggga ttggggctct 1140
aagcttgagc gggttcacct tttcatttat acag 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 caccgctgc acagacccaa tctgggaacc cagctctgtg gatctccct 60
acagccgtcc ctgaacactg gtcccgggcg tcccaccgc cgccaccgt cccacccct 120
10 **cacctttctt acccggttc cctaagttcc tgacctaggc gtcagacttc ctactatac 180**
tctccacccc cag 193

<210> 41

<211> 131

<212> ADN

20 <213> HUMANO

<220>

<221> intrón

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

<223> 3^{er} intrón de MN

<400> 41

30 **gtgagggggt ctcccgcgcg agacttgggg atggggcggg gcgcagggaa gggaaaccgtc 60**
gcgcagtgcc tgcccggggg ttgggctggc cctaccgggc ggggcgggt cacttgctc 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

gtgagcgcg actggccgag aaggggcaaa ggagcggggc ggacgggggc cagagacgtg 60
55 **gccctctcct accctcgtgt 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 gctttcccat cccatgctcc tcccggactc 60
5   tategtggag ccagagaccc catcccagca agctcactca ggccctggc tgacaaactc 120
    attcacgcac tgtttgttca tttaacaccc actgtgaacc aggcaccagc ccccaacaag 180
10  gattctgaag ctgtaggtcc ttgcctctaa ggagcccaca gccagtggg gaggctgaca 240
    tgacagacac ataggaagga catagtaaag atggtgggtca cagaggaggt gacacttaaa 300
15  gccttcactg gtagaaaaga aaaggagggtg ttcattgcag aggaaacaga atgtgcaaag 360
    actcagaata tggcctattt agggaatggc tacatacacc atgattagag gaggccaggt 420
20  aaaggaagg gatggtgaga tgcctgctag gttcactcac tcacttttat ttattttatt 480
    atttttttga cagtctctct gtcgccagg ctggagtgc gtggtgtgat cttgggtcac 540
25  tgcaacttcc gcctcccggt tccaagggt tctctgctt cagcttcttg agtagctggg 600
    gttacagggt tgtgccacca tgcccagcta attttttttt gtatttttag tagacagggt 660
30  ttcaccatgt tggtcaggct ggtctcaaac tcttgacctc aagtgatccg cctgactcag 720
    cctaccaaaag tgctgattac aagtgtgagc caccgtgcc agccacactc actgattctt 780
35  taatgccagc cacacagcac aaagttcaga gaaatgcctc catcatagca tgtcaatatg 840
    ttcatactct taggttcatg atgttcttaa cattagggtc ataagcaaaa taagaaaaaa 900
40  gaataataaa taaaagaagt ggcattgtcag gacctcacct gaaaagccaa acacagaatc 960
    atgaagggtga atgcagaggt gacaccaaca caaagggtga tatatgggtt cctgtgggga 1020
45  gtatgtacgg aggcagcagt gagtgagact gcaaacgtca gaagggcacg ggtcactgag 1080
    agcctagtat cctagttaaag tgggtctctt cctctctctt ccagcttggtc attgaaaacc 1140
50  agtccaccaa gcttggtggt tcgcacagca agagtacata ggtttgaaa taatacatag 1200
    gattttaaga gggagacact gtctctaaaa aaaaaaaca cagcaacaac aaaaagcaac 1260
55  aaccattaca attttatgtt cctcagcat tctcagagct gaggaatggg agaggactat 1320
    gggaaacccc ttcattgttc ggccttcagc catggccctg gatacatgca ctcattgttc 1380
60  ttacaatgtc attccccag
                                     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

<400> 44

10

```

gacagtttgt tggctctggcc actaatctct gtggcctagt tcataaagaa tcaccctttg 60
gaccttcagg tctgaggtct gagatgggct cctccagtg caggagggat tgaagcatga 120
gccagcgctc atcttgataa taacctgaa gctgacagac acagttaccc gcaaacggct 180
gcctacagat tgaaaaccaa gcaaaaaccg ccgggcacgg tggctcagc ctgtaatccc 240
agcacttttg gaggccaagg caggtggatc acgaggtcaa gagatcaaga ccattcctggc 300
caacatggtg aaaccccatc tctactaaaa atacgaaaa atagccaggc gtggtggcgg 360
gtgcctgtaa tcccagctac tcgggaggtt gaggcaggag aatggcatga acccgggagg 420
cagaagtgtc agtgagccga gatcgtgcc ctgcactcca gctggggcaa cagagcgaga 480
ctcttgcttc aaaaaaaaa aaaaaaaga aaaccaagca aaaacaaaa tgagacaaaa 540
aaaacaagac caaaaaatgg tgtttggaaa ttgtcaaggc caagtctgga gagctaaact 600
ttttctgaga actgtttatc ttttaataagc atcaaatatt ttaactttgt aaatactttt 660
gttggaatc gttctcttct tagtcactct tgggtcattt taatctcac ttactctact 720
agacctttta gggtttctgt agactaggta gaactctgcc ttgcatttc ttgtgtctgt 780
tttgtatagt tatcaatatt catatttatt tacaagttat tcagatcatt ttttcttttc 840
tttttttttt tttttttttt ttttacatct ttagtagaga cagggtttca ccatattggc 900
caggctgtct tcaaaactct gacctgtga tccaccagc tcggcctccc aaagtgtctg 960
gattcatttt tcttttttaa ttgtctctgg gcttaaactt gtggcccagc actttatgat 1020
ggtacacaga gttaagagtg tagactcaga cggctcttct tcttctcttc tcttctcttc 1080
tcccttccct cccaccttcc cttctctctc tcttttcttt cttctctctc tcttctctca 1140
ggctctcttc agttgtctca aagccctgta cttttttttg agttaacgtc ttatgggaag 1200
ggcctgcact tagtgaagaa gtggctctag agttgagtta ccttggtctc tgggaggtga 1260
aactgtatcc ctataccctg aagctttaag ggggtgcaat gtagatgaga ccccaacata 1320
gatectcttc acag
1554

```

65

ES 2 296 412 T3

<210> 45
 <211> 512
 <212> ADN
 5 <213> HUMANO
 <220>
 <221> intrón
 10 <222> (1).. (512)
 <223> 7º intrón de MN

 <400> 45
 15 **gtgggcctgg ggtgtgtgtg gacacagtgg gtgcggggga aagaggatgt aagatgagat 60**
gagaaacagg agaagaaaga aatcaaggct gggctctgtg gcttacgcct ataatccac 120
 20 **cacgttggga ggctgagggt ggagaatggt ttgagcccag gagttcaaga caaggcgggg 180**
caacatagtg tgaccccatc tctacaaaa aaacccaac aaaacaaaa atagccgggc 240
 25 **atgggtggtat ggggcctagt cccagctact caaggaggct gaggtgggaa gatcgcttga 300**
ttccaggagt ttgagactgc agtgagctat gatccacca ctgcctacca tctttaggat 360
 30 **acatttattt atttataaaa gaaatcaaga ggctggatgg ggaatacagg agctggaggg 420**
tggagccctg aggtgctggt tgtgagctgg cctgggacc ttgtttcctg tcatgccatg 480
 35 **aaccaccca cactgtccac tgacctccct ag 512**

 <210> 46
 40 <211> 114
 <212> ADN
 <213> HUMANO
 <220>
 45 <221> intrón
 <222> (1) .. (114)
 <223> 8º intrón de MN

 50 <400> 46
gtacagcttt gtctggttcc ccccagcca gtagtcctt atcctcccat gtgtgtgcca 60
 55 **gtgtctgtca ttggtggtca cagccgcct ctcacatctc ctttttctct ccag 114**

 <210> 47
 <211> 617
 60 <212> ADN
 <213> HUMANO
 <220>
 65 <221> intrón
 <222> (1).. (617).
 <223> 9º intrón de MN

ES 2 296 412 T3

<400> 47

```

5      gtgagtctgc cctcctcttt ggtcctgatg ccaggagact cctcagcacc attcagcccc 60
      agggetgctc aggaccgcct ctgctccctc tccttttctg cagaacagac cccaacccca 120
10     atattagaga ggcagatcat ggtgggggatt ccccatctgt cccagagggc taattgatta 180
      gaatgaagct tgagaaatct ccagcatcc ctctcgaaa agaatcccc cccctttttt 240
15     taaagatagg gtctcactct gtttgcctca ggctgggggtg ttgtggcagc atcatagctc 300
      actgcagcct cgaactccta ggctcaggca atcctttcac cttagcttct caaagcactg 360
20     ggactgtagg catgagccac tgtgcctggc cccaaacggc ccttttactt ggcttttagg 420
      aagcaaaaac ggtgcttata ttacccttct tcgtgtatcc accctcatcc cttggctggc 480
25     ctcttctgga gactgaggca ctatggggct gcttgagaac tcggggcagg ggtggtggag 540
      tgcactgagg caggtgttga ggaactctgc agaccctct tccttcccaa agcagccctc 600
30     tctgctctcc atcgag                                     617

```

```

35     <210> 48
      <211> 130
      <212> ADN
40     <213> HUMANO
      <220>
      <221> intrón
      <222> (1) .. (130)
45     <223> 10º intrón de MN
      <400> 48

```

```

50     gtattacact gaccctttct tcaggcaca gcttcccca cccttggtga gtcacttcat 60
      gcaaagcgca tgcaaatgag ctgctcctgg gccagtttct tgattagcct ttcctgttgt 120
55     gtacacacag                                     130

```

```

60     <210> 49
      <211> 1401
      <212> ADN
      <213> HUMANO
65

```

ES 2 296 412 T3

<400> 49

```

    caaactttca cttttgttgc ccaggctgga gtgcaatggc gcgatctcgg ctactgcaa 60
5    cctccacctc ccgggttcaa gtgattctcc tgcctcagcc tctagccaag tagctgcat 120
    tacaggaatg cgcaccacg cccggtaaat tttgtatatt ttagtagaga cggggtttgg 180
10   ccatgttggt caggctggtc tcgaactcct gatctcaggt gatccaacca ccctggcctc 240
    ccaaagtgct gggattatag gcgtgagcca cagcgcctgg cctgaagcag ccactcactt 300
15   ttacagacct taagacaatg attgcaagct ggtaggattg ctgtttggtc caccagctg 360
    cgggtgttag tttgggtgcg gtctcctgtg ctttgacact ggcccgctta aggcatttgt 420
20   taccgtaat gctcctgtaa ggcactctgg tttgtgacat cgttttggtc gccaggaagg 480
    gattggggct ctaagcttga gcgggttcac cttttcattt atacagggga tgaccagagt 540
25   cattggcgct atggagggtg gacaccaccc cgctgcacag acccaatctg ggaaccacgc 600
    tctgtggatc tccctacag ccgtccctga acactggctc cgggcgtccc accgcgcgc 660
30   caccgtccca cccctcacc ttttctacc gggttcccta agttcctgac ctaggctca 720
    gaattcctca ctatactctc ccaccccagg cgaccgccc tggccccggg tgtccccagc 780
35   ctgcgcgggc cgcttccagt ccccggtgga tatecgcgcc cagctcgccg ctttctgccc 840
    ggccctgcgc cccctggaac tcctgggctt ccagctcccg ccgctcccag aactgcgect 900
40   gcgcaacaat ggccacagtg gtgagggggg ctccccgcgc agacttgggg atggggcggg 960
    gcgcagggaa gggaaccgtc gcgcagtgcc tgcccggggg ttgggctggc cctaccgggc 1020
50   ggggcgggct cacttgcttc tccctacgca gtgcaactga ccctgcctcc tgggctagag 1080
    atggctctgg gtcccgggcg ggagtaccgg gctctgcagc tgcattctga ctggggggct 1140
55   gcaggctgct cgggctcgga gcacactgtg gaaggccacc gtttccctgc cgagggtgagc 1200
    gcggactggc cgagaagggg caaaggagcg gggcgagcgg gggccagaga cgtggccctc 1260
60   tccctaccctc gtgtcctttt cagatccacg tgggtccact cagcaccgcc tttgccagag 1320
    ttgacgaggc cttggggcgc cggggaggcc tggcctgtgt ggcgccttt ctggaggtag 1380
65   cagatcctgg acacccctc 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 Gln
        1              5              10              15

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

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

20      Lys Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys Leu Glu
        50              55

```

<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

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

      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

5 Ala Ala Gly Arg Pro Gly Ser Glu His Thr Val Glu Gly His Arg Phe
 100 105 110

 10 Pro Ala Glu Ile His Val Val His Leu Ser Thr Ala Phe Ala Arg Val
 115 120 125

 15 Asp Glu Ala Leu Gly Arg Pro Gly Gly Leu Ala Val Leu Ala Ala Phe
 130 135 140

 20 Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu Asn Ser Ala Tyr Glu Gln Leu Leu Ser
 145 150 155 160

 25 Arg Leu Glu Glu Ile Ala Glu Glu Gly Ser Glu Thr Gln Val Pro Gly
 165 170 175

 30 Leu Asp Ile Ser Ala Leu Leu Pro Ser Asp Phe Ser Arg Tyr Phe Gln
 180 185 190

 35 Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Ala Gln Gly Val Ile Trp
 195 200 205

 40 Thr Val Phe Asn Gln Thr Val Met Leu Ser Ala Lys Gln Leu His Thr
 210 215 220

 45 Leu Ser Asp Thr Leu Trp Gly Pro Gly Asp Ser Arg Leu Gln Leu Asn
 225 230 235 240

 50 Phe Arg Ala Thr Gln Pro Leu Asn Gly Arg Val Ile Glu Ala Ser Phe
 245 250 255

 55 Pro

 60 <210> 52
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> HUMANO

 65 <400> 52

 70 Ile Leu Ala Leu Val Phe Gly Leu Leu Phe Ala Val Thr Ser Val Ala
 1 5 10 15

 75 Phe Leu Val Gln
 20

ES 2 296 412 T3

<210> 53

<211> 25

<212> PRT

5 <213> HUMANO

<400> 53

```

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

      Pro Ala Glu Val Ala Glu Thr Gly Ala
15              20             25

```

<210> 54

<211> 59

<212> PRT

20 <213> HUMANO

<400> 54

```

25      Ser Ala Ser Glu Glu Pro Ser Pro Ser Glu Val Pro Phe Pro Ser Glu
        1             5             10             15

      Glu Pro Ser Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Val Arg Pro Phe Pro
30              20             25             30

      Ser Val Val Leu Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Lys Glu Pro
        35             40             45

35      Ser Pro Ser Glu Glu Pro Ser Ala Ser Glu Glu
        50             55

```

<210> 55

40 <211> 470

<212> ARN

<213> HUMANO

45 <400> 55

```

      cauggccccc auaaccuucu gccugugcac acaccugccc cucacuccac ccccauccua 60

50      gcuuugguau gggggagagg gcacagggcc agacaaaccu gugagacuuu ggcuccaucu 120

      cugcaaaaagg gcgcucugug agucagccug cccccucca ggcucugucc uccccaccc 180

55      agcucucguu uccaauccac guacagcccg uacacaccgu gucuggggac accccacagu 240

      cagccgcaug gcuccccugu gcccagccc cuggucccu cuguugaucc cggccccuge 300

60      uccagggcuc acugugcaac ugcugcuguc acugcugcuu cuggugccug uccaucccca 360

      gagguugccc cggaugcagg aggaucccc cuugggagga ggcucuucug gggaagauga 420

65      cccacugggc gaggaggauc ugcccaguga agaggauuca cccagagagg          470

```

ES 2 296 412 T3

<210> 56

<211> 292

<212> ADN

5 <213> HUMANO

<400> 56

```

10      gtttttttga gacggagtct tgcattctgtc atgccagggc tggagtagca gtggtgccat 60
      ctcggctcac tgcaagctcc acctcccgag ttcacgccat tttcctgcct cagcctcccg 120
15      agtagctggg actacaggcg cccgccacca tgcccggtta attttttgta tttttggtag 180
      agacgggggtt tcaccgtgtt agccagaatg gtctcgatct cctgacttcg tgatccacc 240
20      gcctcggcct cccaaagtcc tgggattaca ggtgtgagcc accgcacctg gc          292

```

<210> 57

<211> 262

25 <212> ADN

<213> HUMANO

<400> 57

```

30      tttttttttt gagacagggt cttgctctgt caccaggcc agagtgaat ggtacagtct 60
      cagctcactg cagcctcaac cgctctgggt caaaccatca tccatttca gcctcctgag 120
35      tagctgggac tacaggcaca tgccattaca cctggctaat ttttttgat ttctagtaga 180
      gacaggggtt ggccatgttg cccgggctgg tctggaactc ctggactcaa gcaatccacc 240
40      cacctcagcc tcccaaatg ag          262

```

<210> 58

45 <211> 2501

<212> ADN

<213> HUMANO

<220>

50 <221> característica misc

<222> (1) .. (2501)

55

60

65

ES 2 296 412 T3

<400> 58

```

tgttgactcg tgaccttacc cccaaccctg tgctctctga aacatgagct gtgtccactc 60
5 aggggttaa at ggattaaggg cgggtgcaaga tgtgctttgt taaacagatg cttgaaggca 120
gactgctcgt taagagtc at caccaatccc taatctcaag taatcaggga cacaaacact 180
10 gcggaaggcc gcagggtcct ctgcctagga aaaccagaga cctttgttca cttgtttatc 240
tgaccttccc tccactattg tccatgaccc tgccaaatcc cctctgtga gaaacaccca 300
15 agaattatca ataaaaaa at aaatttaaaa aaaaaatata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
aaaagactta cgaatagtta ttgataaatg aatagctatt ggtaaagcca agtaa atgat 420
20 catattcaaa accagacggc catcatcaca gctcaagtct acctgatttg atctctttat 480
cattgtcatt ctttggattc actagattag tcatcatcct caaaattctc cccaagttc 540
25 taattacgtt ccaaacattt aggggttaca tgaagcttga acctactacc ttctttgctt 600
ttgagccatg agttgtagga atgatgagtt tacaccttac atgctgggga ttaatttaaa 660
30 ctttacctct aagtcagttg ggtagccttt ggcttatttt tgtagcta at tttgtagtta 720
atggatgcac tgtgaatctt gctatgatag ttttcctcca cactttgcca ctaggggtag 780
35 gtaggtactc agttttcagt aattgcttac ctaagacctt aagccctatt tctctgttac 840
tggcctttat ctgtaatatg ggcataattta atacaatata atttttggag tttttttgtt 900
40 tgtttgtttg tttgtttttt tgagacggag tcttgcattc gtcattgcca ggctggagta 960
gcagtgggtgc catctcggtt cactgcaagc tccacctccc gagttcagc cattttcctg 1020
45 cctcagcctc ccgagtagct gggactacag gcgcccgcga ccatgcccg gctaatttttt 1080
gtattttttg tagagacggg gtttcaccgt gttagccaga atgggtctga tctctgact 1140
50 tcgtgatcca cccgcctcgg cctcccaaag ttctgggatt acaggtgtga gccaccgcac 1200
ctggccaatt ttttgagtct tttaaagtaa aaatatgtct tgtaagctgg taactatggt 1260
55 acatttcctt ttattaatgt ggtgctgacg gtcatatagg ttcttttgag tttggcatgc 1320
60 atatgctaet ttttgagtc ctttcattac atttttctct cttcatttga agagcatgtt 1380

```

65

ES 2 296 412 T3

5 **atatctttta gcttcacttg gcttaaaagg ttctctcatt agcctaacac agtgtcattg 1440**
ttggtaccac ttggatcata agtggaaaaa cagtcaagaa attgcacagt aatacttgtt 1500
tgtaagaggg atgattcagg tgaatctgac actaagaaac tccctacct gaggtctgag 1560
 10 **attcctctga cattgctgta tataggcttt tcttttgaca gcctgtgact gcggactatt 1620**
tttcttaagc aagatatgct aaagttttgt gagccttttt ccagagagag gtctcatatc 1680
 15 **tgcacaaagt gagaacatat aatgtctgca tgtttccata tttcaggaat gtttgcttgt 1740**
gttttatgct tttatataga cagggaaact tgttcctcag tgacccaaaa gaggtgggaa 1800
 20 **ttggtatttg atactcatcat tggcccacgc tttctgacct tggaaacaat taagggttca 1860**
taatctcaat tctgtcagaa ttggtacaag aaatagctgc tatgtttctt gacattccac 1920
 25 **ttggtaggaa ataagaatgt gaaactcttc agttggtgtg tgtccctngt ttttttgcaa 1980**
tttcttctt actgtgttaa aaaaaagtat gatcttgctc tgagaggtga ggcattctta 2040
 30 **atcatgatct ttaaagatca ataataaat cctttcaagg attatgtctt tattataata 2100**
aagataattt gtctttaaca gaatcaataa tataatccct taaaggatta tatctttgct 2160
 35 **gggcgcagtg gctcacacct gtaatcccag cactttgggt ggccaagggt gaaggatcaa 2220**
atthgcctac ttctatatta tcttctaaag cagaattcat ctctcttccc tcaatatgat 2280
 40 **gatattgaca gggtttgccc tcaactacta gattgtgagc tctgtctcag ggcaggtagc 2340**
gttttttgtt ttgttttttg tttttctttt ttgagacagg gtcttgctct gtcacccagg 2400
 45 **ccagagtgca atggtacagt ctcagctcac tgcagctca accgcctcgg ctcaaaccat 2460**
 50 **catcccatth cagcctcctg agtagctggg actacaggca c 2501**

<210> 59

<211> 292

55 <212> ADN

<213> HUMANO

<220>

<221> característica misc

60 <222> (1)

65

ES 2 296 412 T3

<400> 59

```

5      tttttttgag acggagtctt gcattctgtca tgcccaggct ggagtagcag tggtgccatc 60
      tcggtctact gcaagctcca cctcccgagt tcacgcsatt ttcttgcttc agcctccaga 120
10     gtagctggga ctacaggegc ccgccaccat gcccggttaa ttttttgtat ttttggtaga 180
      gacgggggtt caccgtgtta gccagaatgg tctcgatrtc ctgacttcgt gatccaccg 240
15     cctcggcctc ccaaagtctt gggattacag gtgtgagcca ccgcacctgg cc          292

```

<210> 60

20 <211> 262

<212> ADN

<213> HUMANO

25 <400> 60

```

      ttcttttttg agacagggtc ttgctctgtc acccaggcca gagtgcaatg gtacagtctc 60
30     agctcactgc agcctcaacc gcctcggctc aaaccatcat cccatttcag cctcctgagt 120
      agctgggact acaggcacat gccattacac ctggctaatt tttttgtatt tctagtagag 180
35     acaggggttg gccatgttgc ccgggctggt ctcgaaactc tggactcaag caatccacc 240
      acctcagcct cccaaaatga gg          262

```

<210> 61

40 <211> 294

<212> ADN

<213> HUMANO

45 <400> 61

```

      ttttttttg agacaaactt tcaattttgt tgcccaggct ggagtgcaat ggcgcatct 60
50     cggctcactg caacctccac ctcccgggtt caagtgatc tcttgctca gctctagcc 120
      aagtagctgc gattacaggc atgcgccacc acgcccggct aatttttgta ttttagtag 180
55     agacgggggt tcgccatgtt ggtcaggctg gtctcgaact cctgatctca ggtgatccaa 240
      ccacctggc ctcccaaagt gctgsgatta taggcgtgag ccacagcgc tggc          294

```

60

<210> 62

<211> 276

65 <212> ADN

<213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<400> 62

```

tgacagtctc tctgtcgccc aggctggagt gcagtgggt gatcttgggt cactgcaact 60
tccgcctccc gggttcaagg gattctcctg cctcagcttc ctgagtagct ggggttacag 120
gtgtgtgccca ccatgcccag ctaatttttt tttgtatttt tagtagacag ggtttcacca 180
tgttggtcag gctggctcct aactcctggc ctcaagtgat ccgcctgact cagcctacca 240
aagtctgat tacaagtgtg agccaccgtg cccagc 276

```

<210> 63

<211> 289

<212> ADN

<213> HUMANO

<400> 63

```

cgccggggcac ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccaa ggcaggtgga 60
tcacgaggtc aagagatcaa gaccatcctg gccaacatgg tgaaacccca tctctactaa 120
aaatacgaaa aaatagccag gcgtgggtggc gggcgctgt aatcccagct actcgggagg 180
ctgaggcagg agaatggcat gaaccggga ggcagaagtt gcagtgagcc gagatcgtgc 240
cactgcactc cagcctgggc aacagagcga gactcttgtc tcaaaaaaa 289

```

<210> 64

<211> 298

<212> ADN

<213> HUMANO

<400> 64

```

aggctgggct ctgtggctta cgcctataat cccaccangt tgggaggctg aggtgggaga 60
atggtttgag cccaggagtt caagacaagg cggggcaaca tagtgtgacc ccatctctac 120
caaaaaaaaa ccaacaaaac caaaaatagc cgggcatggt ggtatgcggc ctagtcccag 180
ctactcaagg aggctgaggt gggaagatcg cttgattcca ggagtttgag actgcagtga 240
gtatgatcc caccactgcc taccatcttt aggatacatt tattttattta taaaagaa 298

```

<210> 65

<211> 105

<212> ADN

<213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<400> 65

ttttttacat ctttagtaga gacagggttt caccatattg gccaggctgc tctcaaactc 60

5

ctgaccttgt gatccaccag cctcggcctc ccaaagtget gggat 105

<210> 66

10

<211> 83

<212> ADN

<213> HUMANO

15

<400> 66

cctegaactc ctaggetcag gcaatccttt cacccttagct tctcaaagca ctgggactgt 60

20

aggeatgagc caetgtgcct ggc 83

<210> 67

25

<211> 11

<212> ADN

<213> HUMANO

30

<400> 67

agaaggtgag t

11

35

<210> 68

<211> 11

<212> ADN

40

<213> HUMANO

<400> 68

tggaggtgag a

11

45

<210> 69

<211> 11

50

<212> ADN

<213> HUMANO

<400> 69

55

cagtcgtgag g

11

<210> 70

<211> 11

60

<212> ADN

<213> HUMANO

<400> 70

65

ccgaggtgag c

11

ES 2 296 412 T3

	<210> 71	
	<211> 11	
	<212> ADN	
5	<213> HUMANO	
	<400> 71	
10	tggaggtacc a	11
	<210> 72	
	<211> 11	
15	<212> ADN	
	<213> HUMANO	
	<400> 72	
20	ggaaggtcag t	11
	<210> 73	
25	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> HUMANO	
30	<400> 73	
	agcaggtggg c	11
35	<210> 74	
	<211> 11	
	<212> ADN	
40	<213> HUMANO	
	<400> 74	
45	gccaggtaca g	11
	<210> 75	
	<211> 11	
50	<212> ADN	
	<213> HUMANO	
	<400> 75	
55	tgctggtgag t	11
	<210> 76	
60	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> HUMANO	
65	<400> 76	
	cacaggtatt 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	
	acgcagtgc 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	ctccagtcca g	11
	<210> 85	
25	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> HUMANO	
30	<400> 85	
	tcgcaggtga 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 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 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

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

<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 gctccccctc agat

34

<210> 90

<211> 3532

20 <212> ADN

<213> HUMANO

<220>

<221> Característica misc

25 <222> (1) .. (3532)

<400> 90

30 **tgttgactcg tgaccttacc cccaaccctg tgcctctctga aacatgagct gtgtccactc 60**
agggttaaat ggattaaggc cgggtgcaaga tgtgctttgt taaacagatg cttgaaggca 120
35 **gcattgctcgt taagagtcac cccaatccc taattctcaag taatcaggga cacaacacac 180**
gcggaaggcc gcagggtcct ctgcctagga aaaccagaga cctttgttca cttgtttatc 240
40 **tgaccttccc tccactattg tccatgacct tgccaaatcc cctctctgtga gaaacaccca 300**
agaattatca ataaaaaat aaatttataa aaaaaatata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
45 **aaaagactta cgaatagtta ttgataaatg aatagctatt ggtaaagcca agtaaatgat 420**
catattcaaa accagacggc catcatcaca gctcaagtct acctgatttg atctctttat 480
50 **cattgtcatt ctttggattc actagattag tcatcatcct caaaattctc cccaagttc 540**
taattacgtt ccaaacattt aggggttaca tgaagcttga acctactacc ttctttgctt 600
55 **ttgagccatg agttgtagga atgatgagtt tacaccttac atgctgggga ttaatttata 660**
ctttacctct aagtcagttg ggtagccttt ggcttatatt tgtagctaat tttgtagtta 720
60 **atggatgcac tgtgaatctt gctatgatag ttttctcca cactttgcca ctaggggtag 780**

65

ES 2 296 412 T3

gtaggtactc agttttcagt aattgcttac ctaagaccct aagccctatt tctcttgtac 840
 5 tggcctttat ctgtaatatg ggcatattta atacaatata atttttggag tttttttgtt 900
 tgtttgttg ttgtttttt tgagacggag tcttgcatct gtcatscccc ggcctggagta 960
 10 gcagtgggtgc catctcggt cactgcaagc tccacctccc gagttcacgc cattttcctg 1020
 cctcagcctc ccgagtagct gggactacag gcgcccccca ccatgccccg ctaatttttt 1080
 15 gtatttttgg tagagacggg gtttcaccgt gttagccaga atggtctcga tctcctgact 1140
 tcgtgatcca cccgcctcgg cctcccaaag ttctgggatt acagggtgtga gccaccgcac 1200
 20 ctggccaatt ttttgagtct tttaaagtaa aaatatgtct tgtaagctgg taactatggt 1260
 acatttcctt ttattaatgt ggtgctgacg gtcatatagg ttcttttgag tttggcatgc 1320
 25 atatgctact ttttgacgc ctttcattac atttttctct cttcatttga agagcatgtt 1380
 atatctttta gcttcacttg gcttaaaagg ttctctcatt agcctaacac agtgtcattg 1440
 30 ttggtaccac ttggatcata agtggaaaaa cagtcaagaa attgcacagt aatacttggt 1500
 tgtaagaggg atgattcagg tgaatctgac actaagaaac tcccctacct gaggtctgag 1560
 35 attcctctga cattgctgta tataggcttt tcctttgaca gcctgtgact gcggactatt 1620
 tttcttaagc aagatatgct aaagttttgt gagccttttt ccagagagag gtctcatatc 1680
 40 tgcacaaagt gagaacatat aatgtctgca tgtttccata tttcaggaat gtttgcttgt 1740
 gttttatgct tttatataga cagggaaact tgttcctcag tgacccaaaa gaggtgggaa 1800
 45 ttgttattgg atatcatcat tggcccacgc tttctgacct tggaacaat taagggttca 1860
 taatctcaat tctgtcagaa ttggtacaag aaatagctgc tatgtttctt gacattccac 1920
 50 ttggtaggaa ataagaatgt gaaactcttc agttggtgtg tgtccctngt ttttttcaa 1980
 tttccttctt actgtgttaa aaaaaagtat gatcttgctc tgagaggtga ggcattctta 2040
 atcatgatct ttaaagatca ataataaat cctttcaagg attatgtctt tattataata 2100
 60 aagataattt gtctttaaca gaatcaataa tataatccct taaaggatta tatctttgct 2160
 gggcgcagtg gctcacacct gtaatcccag cactttgggt ggccaagggt gaaggatcaa 2220
 65

ES 2 296 412 T3

atttgectac ttctatatta tcttctaaag cagaattcat ctctcttccc tcaatatgat 2280
 5 gatattgaca gggtttgccc tcactcacta gattgtgagc tectgtcag ggcaggtagc 2340
 gttctctgtc ttgttttttg cctctcttct ctgagacagg gtctgtctct gtcacccagg 2400
 10 ccagagtga atggtacagt ctacgtcac tgcagcctca accgctcgg ctcaaaccat 2460
 catcccattt cagcctcctg agtagctggg actacaggca catgccatta cacctggcta 2520
 15 atttttttgt atttctagta gagacagggt ttggccatgt tgcccgggct ggtctcgaac 2580
 tcctggactc aagcaatcca cccacctcag cctcccaaaa tgagggaccg tgtcttattc 2640
 20 atttccatgt cctagtcaca tagcccatg ctggacctat ggtagtacta aataaatatt 2700
 tgttgaatgc aatagtaaat agcatttcag ggagcaagaa ctagattaac aaaggtggta 2760
 25 aaaggtttgg agaaaaaaat aatagtttaa ttggctaga gtatgagggg gagtagtagg 2820
 agacaagatg gaaaggctc ttgggcaagg ttttgaagga agttggaagt cagaagtaca 2880
 30 caatgtgcat atcgtggcag gcagtgggga gccaatgaag gcttttgagc aggagagtaa 2940
 tgtgttgaaa aataaatata ggtaaacct atcagagccc ctctgacaca tacacttgct 3000
 tttcattcaa gctcaagttt gtctcccaca taccattac ttaactcacc ctcgggctcc 3060
 35 cctagcagcc tgccctacct ctttacctgc ttcttggtgg agtcagggat gtatacatga 3120
 gctgctttcc ctctcagcca gaggacatgg ggggccccag ctccccctgc ttcccccttc 3180
 40 tgtgectgga gctgggaagc aggccagggt tagctgaggc tggtgggcaa gcagctgggt 3240
 ggtgacaggg agagcctgca tagtgccagg tggtgccctg ggttccaagc tagtccatgg 3300
 45 ccccgataac cttctgectg tgcacacacc tgccccctac tccaccccca tcttagcttt 3360
 ggtatggggg agagggcaca gggccagaca aacctgtgag actttggctc catctctgca 3420
 50 aaagggcgct ctgtgagtca gcctgctccc cccaggctt gctctctccc caccagctc 3480
 tegtttcaa tgcacgtaca gcccgtaaac accgtgtgct gggacacccc ac 3532
 60

<210> 91

<211> 204

<212> ADN

<213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<400> 91

cctgccctc actccaccc cctcctagct ttggtatgg ggagagggc caggccaga 60

5 caaacctgtg agactttggc tccatctctg caaaagggcg ctctgtgagt cagcctgctc 120

ccctccaggc ttgctcctcc cccaccacgc tctcgtttcc aatgcacgta cagcccgtag 180

10 acaccgtgtg ctgggacacc ccac 204

<210> 92

<211> 132

15 <212> ADN

<213> HUMANO

20 <400> 92

ggatccctgtt gactcgtgac cttaccccca accctgtgct ctctgaaaca tgagctgtgt 60

25 ccactcaggg ttaaattggat taagggcggg gcaagatgtg ctttggtaaa cagatgcttg 120

aaggcagcat gc 132

<210> 93

<211> 275

30 <212> ADN

<213> HUMANO

35 <400> 93

gcatagtgcc aggtggtgcc ttgggttcca agctagtcca tggccccgat aaccttctgc 60

40 ctgtgcacac acctgcccc cactccaccc ccatcctagc ttggtatgg ggagagggc 120

acagggccag acaaacctgt gagactttgg ctccatctct gcaaaagggc gctctgtgag 180

45 tcagcctgct cccctccagg cttgctcctc ccccaccag ctctcgtttc caatgcacgt 240

acagcccgta cacaccgtgt gctgggacac cccac 275

<210> 94

50 <211> 89

<212> ADN

<213> HUMANO

55 <400> 94

ctgctccctt ccaggcttgc tctccccc cccagctctc gtttccaatg caggtacagc 60

ccgtacacac cgtgtgctgg gacacccca 89

60 <210> 95

<211> 61

<212> ADN

65 <213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

<400> 95

cacccagetc tcgtttccaa tgcacgtaca gcccgtagac accgtgtgct gggacacccc 60

5

a

61

<210> 96

<211> 116

10 <212> ADN

<213> HUMANO

<400> 96

15

acctgcccc cactccaccc ccatactagc tttggtatgg gggagagggc acagggccag 60

acaaacctgt gagactttgg ctccatctct gcaaaagggc gctctgtgag tcagcc 116

20

<210> 97

<211> 36

<212> PRT

<213> HUMANO

25

<400> 97

Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp

1

5

10

15

30

Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu

20

25

30

35

Glu Asp Leu Pro

35

<210> 98

40

<211> 6

<212> PRT

<213> HUMANO

45

<400> 98

Gly Glu Glu Asp Leu Pro

1

5

50

<210> 99

<211> 4

<212> PRT

55

<213> HUMANO

<400> 99

60

Glu Glu Asp Leu

1

<210> 100

65

<211> 5

<212> PRT

<213> HUMANO

ES 2 296 412 T3

```

<400> 100
      Glu Glu Asp Leu Pro
      1          5
5  <210> 101
    <211> 6
    <212> PRT
10 <213> HUMANO

    <400> 101
      Glu Asp Leu Pro Ser Glu
      1          5
15 <210> 102
    <211> 7
    <212> PRT
20 <213> HUMANO

    <400> 102
      Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu
      1          5
25 <210> 103
    <211> 6
    <212> PRT
30 <213> HUMANO

    <400> 103
      Asp Leu Pro Gly Glu Glu
      1          5
35 <210> 104
    <211> 22
    <212> PRT
40 <213> HUMANO

    <400> 104
      Gly Gly Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp Leu Pro
      1          5          10          15
50
      Ser Glu Glu Asp Ser Pro
      20
55

    <210> 105
    <211> 25
    <212> PRT
60 <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

<213> HUMANO

30

<400> 107

Gly Glu Thr Arg Ala Pro Leu
1 5

35

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> HUMANO

40

<400> 108

45

Gly Glu Thr Arg Pro Leu
1 5

50 <210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> HUMANO

55

<400> 109

Gly Gln Thr Arg Ser Pro Leu
1 5

60

<210> 110

<211> 1247

<212> ADN

<213> HUMANO

65

<220>

ES 2 296 412 T3

<221> característica misc

<222> (1) .. (1247)

5 <400> 110

```

    tatgetaactt tttgcagtc tttcattaca tttttctctc ttcatttgaa gagcatgtta 60
    tatcttttag cttcacttgg cttaaaaggt tctctcatta gcctaacaca gtgtcattgt 120
10    tgggtaccact tggatcataa gtggaaaaac agtcaagaaa ttgcacagta atacttgttt 180
    gtaagaggga tgattcaggt gaatctgaca ctaagaaact cccctacctg aggtctgaga 240
15    ttcctctgac attgctgtat ataggctttt cctttgacag cctgtgactg cggactattt 300
    ttcttaagca agatatgcta aagttttgtg agcctttttc cagagagagg tctcatatct 360
    gcatcaagtg agaacatata atgtctgcat gtttccatat ttcaggaatg tttgcttggtg 420
25    tttatgctt tttatagac agggaaact gtctctcagt gacccaagg aggtgggaat 480
    tgttatgtga tatcatcatt ggcccaagct ttctgacctt ggaaacaatt aagggttcat 540
30    aatctcaatt ctgtcagaat tgggtacaaga aatagctgct atgtttcttg acattccact 600
    tggtaggaaa taagaatgtg aaactcttca gttggtgtgt gtccctngtt tttttgcaat 660
35    ttccttttta ctgtgttaaa aaaaagtatg atcttgcctt gagagggtgag gcattcttaa 720
    tcatgatctt taaagatcaa taatataatc ctttcaagga ttatgtcttt attataataa 780
    agataatttg tctttaacag aatcaataat ataatccctt aaaggattat atctttgctg 840
45    ggcgcagtggt ctcacacctg taatcccagc actttgggtg gcccaagggtg aaggatcaaa 900
    tttgcctact tctatattat cttctaaagc agaattcacc tctcttccct caatatgatg 960
50    atattgacag ggttttgccct cactcactag attgtgagct cctgctcagg gcaggtagcg 1020
    ttttttgttt ttgtttttgt ttttcttttt tgagacaggg tcttgcctctg tcaccagge 1080
55    cagagtgcga tgggtacagtc tcagctcact gcagcctcaa ccgcctcggc tcaaaccatc 1140
    atcccatttc agcctcctga gtagctggga ctacaggeac atgccattac acctggctaa 1200
60    tttttttgta tttctagtag agacaggggtt tggccatggt gcccggtg 1247

```

<210> 111

65 <211> 17

<212> ADN

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	
	aggettgtc 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 ccactctagc	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 Gly Ser Gly 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 34

<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		

<210> 120

35 <211> 12
<212> PRT
<213> HUMANO

<400> 120

40

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

45 <210> 121
<211> 10
<212> PRT

50 <213> HUMANO

<400> 121

	Glu	Asp	Leu	Pro	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Pro
55	1				5					10

<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		

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
 Ala Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ala
 1 5

 35 <210> 126
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> HUMANO

 <400> 126
 45 Ala Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Ala
 1 5

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

 <400> 127
 Ala Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Ala
 1 5
 60

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

ES 2 296 412 T3

<400> 128
 Ala Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Ala
 1 5
 5
 <210> 129
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <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
 Ala Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Ala
 1 5
 30
 <210> 131
 <211> 8
 <212> PRT
 35 <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
 Ala Glu Glu Asp Leu Pro Gly Ala
 1 5
 55
 <210> 133
 <211> 8
 <212> PRT
 60 <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
 Ala Pro Gly Glu Glu Asp Leu Ala
 1 5

 35 <210> 137
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> HUMANO

 <400> 137
 45 Ala Lys Lys Met Lys Arg Arg Lys Ala
 1 5

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

 <400> 138
 Ala Ile Thr Phe Asn Ala Gln Tyr Ala
 1 5
 60

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

20 <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
<212> ADN
<213> HUMANO

45 <400> 143

50 agggcacagg gc

55

60

65