

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 361 044**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.1998 E 98903409 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **25.06.2014 EP 0972024**

54 Título: **Un supresor de tumor designado TS10q23.3**

30 Prioridad:

30.01.1997 US 791115

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
01.10.2014

73 Titular/es:

**THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM (100.0%)
201 WEST 7TH STREET
AUSTIN, TEXAS 78701, US**

72 Inventor/es:

**STECK, PETER;
PERSHOUSE, MARK A.;
JASSER, SAMAR A.;
YUNG, W. K. ALFRED y
TAVTIGIAN, SEAN V.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 361 044 T5

DESCRIPCIÓN

Un supresor de tumor designado TS10q23.3

Antecedentes de la Invención

I. Campo de la Invención

- 5 La presente invención se refiere a los campos de la oncología, genética y biología molecular. Más concreto la invención se refiere a la identificación, en el cromosoma 10 humano, de un gen supresor de tumor. Los defectos en este gen están asociados con el desarrollo de cánceres, tales como gliomas.

II. Técnica relacionada

- 10 La oncogénesis fue descrita por Foulds (1958) como un proceso biológico multietapas, el cual actualmente se sabe que ocurre mediante la acumulación de daño genético. A un nivel molecular, el proceso multietapas de la tumorigénesis implica la interrupción de los efectores reguladores tanto positivos como negativos (Weinberg, 1989). Se ha presupuesto que la base molecular para los carcinomas de colon humano, por Vogelstein y colaboradores (1990), implica un número de oncogenes, genes supresores de tumor y genes de reparación. Igualmente, los defectos que llevan al desarrollo del retinoblastoma se han relacionado con otro gen supresor de tumor (Lee et al., 15 1987). Aún se han identificado otros oncogenes y supresores de tumor en una diversidad de otras enfermedades. Desafortunadamente, queda un número insuficiente de cánceres tratables, y los efectos del cáncer son catastróficos (más de medio millón de muertes por año solamente en los Estados Unidos).

- Un ejemplo de la devastadora naturaleza del cáncer implica que tumores que surgen de células del linaje astrocítico son los tumores primarios más comunes del sistema nervioso central (Russell & Rubinstein, 1989). La mayoría de 20 estos tumores ocurren en la población adulta. Los tumores cerebrales primarios también explican el cáncer sólido más común en la población paciente pediátrica y la segunda causa importante de muertes por cáncer en niños menores de 15 años de edad. En 1994 se diagnosticaron unos estimados 18.500 nuevos casos de tumores cerebrales primarios (Boring et al., 1994). Los estudios epidemiológicos muestran que la incidencia de tumores cerebrales está aumentando y representa la tercera causa más común de muerte por cáncer entre pacientes de 18 a 25 35 años de edad. Debido a su localización dentro del cerebro y a la infiltración típica de las células tumorales dentro de los tejidos de alrededor, con frecuencia la intervención terapéutica con éxito para tumores cerebrales primarios está limitada. Desafortunadamente, aproximadamente dos terceras partes de estos individuos afectados sucumbirán a la enfermedad en dos años. Los tumores intracraneales más comunes en adultos surgen de células del linaje glial y ocurre aproximadamente en una frecuencia de 48% de glioblastoma multiforme (GBM), 21% de astrocitomas (A) 30 (anaplásica (AA) y de bajo grado) y 9% de ependimomas y oligodendrogliomas (Levin et al., 1993).

- Los estudios genéticos han implicado diversos genes, y sus correspondientes productos proteicos, en la oncogénesis de los tumores cerebrales primarios. Entre las diversas alteraciones informadas están: amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico y uno de sus ligandos, transformación del factor alfa de crecimiento, *N-myc*; *gli*, maduración por corte y empalme y expresión de los receptores del factor de crecimiento de fibroblasto alterado, y pérdida de función de *p53*, *p16*, *Rb*, genes 1 y 2 de neurofibromatosis, *DCC* y genes supresores de tumor 35 putativos en los cromosomas 4, 10, 17 (no *p53*), 19, 22 y X (Wong et al., 1987; El-Azouzi et al., 1989; Nishi et al., 1991; James et al., 1988; Kamb et al., 1994; Henson et al., 1994; Yamaguchi et al., 1994; Bianchi et al., 1994; Ransom et al., 1992; Rasheed et al., 1992; Scheck y Coons, 1993; Von Demling et al., 1994; Rubio et al., 1994; Ritland et al., 1995).

- 40 Las alteraciones más frecuentes incluyen la amplificación del receptor de EGF (≈40%), pérdida de función de *p53* (≈50%), *p16* (≈50%), *Rb* (≈30%) y deleciones en el cromosoma 10 (>90%). Además, el grado y nivel de malignidad histológica de los tumores astrocíticos guarda correlación con la acumulación aumentada del daño genético similar al carcinoma de colon. Además, algunos cambios parecen ser relativamente específicos a linaje o grado. Por ejemplo, pérdidas en el cromosoma 19q ocurren predominantemente en oligodendrogliomas, mientras las 45 deleciones en el cromosoma 10 y la amplificación y mutación del receptor de EGF ocurren principalmente en GBMs. La deleción de una copia entera o segmentos del cromosoma 10 está fuertemente indicada como el suceso genético más común asociado con la forma más común de tumores cerebrales primarios, GBMs.

- La citogenética y estudios de deleción alélica en GBMs posteriores claramente han demostrado alteraciones genéticas moleculares frecuentes y extensas asociadas con el cromosoma 10 (Binger et al., 1988; Ransom et al., 50 1992; Rasheed et al., 1992; James et al., 1988; Fujimoto et al., 1989; Fults et al., 1990, 1993; Karlom et al., 1993; Rasheed et al., 1995; Sonoda et al., 1996; Albarosa et al., 1996). Los análisis citogenéticos han mostrado claramente la alteración del cromosoma 10 como una ocurrencia común en GBMs, con el 60% de tumores que presentan alteración. Los estudios de deleción alélica de GBMs también han revelado desequilibrios alélicos muy frecuentes asociados con el cromosoma 10 (90%). Sin embargo, las pérdidas son tan extensas y frecuentes que 55 mediante estos análisis se podría definir inequívocamente la no sublocalización cromosómica de una pérdida constante.

Varios estudios recientes han implicado la región 10q25-26, específicamente una región de 17 cM desde D10S190 a D10S216. Una región telomérica desde D10S587 a D10S216 estaba implicada mediante análisis de delección alélica usando una serie de gliomas de grado bajo y alto que presentan solamente una pérdida parcial de cromosoma 10 (Rasheed et al., 1995). Esta región (≈ 1 cM) estaba perdida o era no informativa en 11 GBMs, 4 AAs, 1 A y 1 oligodendroglioma, sugiriendo la localización de una región candidata. Este estudio también ilustró que las delecciones en el cromosoma 10 ocurren en gliomas grado inferior. Albarosa et al. (1996) sugieren una región candidata centromérica basada en una pequeña delección alélica en un tumor cerebral pediátrico de los marcadores D10S221 a D10S209. Saya et al., usando una serie de GBMs, han sugerido dos regiones comunes de delecciones, 10q26 y 10q24 (D10S192).

El brazo corto del cromosoma 10 también ha estado implicado en contener otro gen supresor de tumor. Los estudios primero proporcionaron evidencia funcional de un gen supresor de tumor en 10p en glioma (Steck et al., 1995) lo cual más tarde se mostró para próstata (Sánchez et al., 1995; Murakami et al., 1996). El último estudio ha implicado una región de 11 cM entre D10S1172 y D10S527. Los estudios de delección alélica de gliomas han mostrado delección extensa en 10p, pero de nuevo, no se ha alcanzado una localización firme (Karlsson et al., 1993; Kimmelman et al., 1996; estas regiones del cromosoma 10 se muestran en la Fig. 1, más adelante). Además, también se ha mostrado que la amplificación del receptor de EGF ocurre casi exclusivamente en tumores que tenían delecciones en el cromosoma 10, sugiriendo una posible relación entre estas alteraciones genéticas (Von Deimling et al., 1992).

También se han informado de delecciones en el brazo largo, de particularmente 10q24, para carcinomas de próstata, renales, uterinos, de pulmón de célula pequeña, endometriales, meningioma y leucemias graves de célula T (Carter et al., 1990; Morita et al., 1991; Herbst et al., 1984; Jones et al., 1994; Rempel et al., 1993; Peiffen et al., 1995; Petersen et al., 1997). Recientemente, estudios detallados sobre el carcinoma de próstata han demostrado que (1) el brazo corto y largo del cromosoma 10 parece totalmente contener genes supresores de tumor y (2) la localización del gen supresor del brazo largo se mapea en el límite 10q23-24 (Gray et al., 1995; Ittmann, 1996; Trybus et al., 1996). La región de la delección común identificada por estos tres grupos se centra alrededor de D10S215 y se extiende aproximadamente 10 cM (Fig. 1). La región se solapa con nuestra región candidata, sin embargo, se informó de no localización adicional dentro de la región para el carcinoma de próstata. Las pérdidas alélicas asociadas con el carcinoma de próstata también parecen ocurrir en solamente el aproximadamente 30-40% de los tumores examinados. Además, las delecciones se observaron en tumores de fases más avanzadas, similares a GBMs, y se pueden relacionar con la capacidad de producir metástasis (Nihei et al., 1995; Komiya et al., 1996). La combinación de estos resultados sugiere que los cánceres humanos múltiples implican la región 10q23-24.

Las diferencias en las localizaciones de las regiones candidatas sugieren diversas posibilidades. Primero, es posible la presencia de dos o más genes supresores de tumor en 10q. Segundo, no todas las delecciones pueden efectuarse en el locus del gen supresor de tumor. Estas alternativas no son mutuamente exclusivas. A favor de la última posibilidad, se sugirió que un centrómero latente potencial ocurre en 10q25 el cual puede dar lugar a las alteraciones genéticas, particularmente rotura (Vouillaire et al., 1993).

A pesar de toda esta información, se mantuvo difícil de localizar la identidad del gen (o genes) implicado con la supresión del tumor relacionado con 10q23-24. Sin identificación de un gen específico y deducción de la proteína para la cual codifica, es imposible comenzar el desarrollo de una terapia eficaz de direccionamiento ("targeting") de este producto. Por tanto, es un objetivo importante aislar el(los) supresor(es) de tumor localizado(s) en esta región y determinar su estructura y función.

Compendio de la Invención

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un supresor de tumor, designado TS10q23.3. También es un objetivo proporcionar ADNs que representen todo o parte de un gen que codifica TS10q23.3. También es un objetivo proporcionar métodos para usar estas composiciones.

De acuerdo con los anteriores objetivos, se ha proporcionado, en una realización, un supresor de tumor designado TS10q23.3. El polipéptido tiene, en un ejemplo, la secuencia de aminoácidos como la expuesta en la Fig. 7 o Fig. 9 o en la SEC. ID. N°: 1. También se ha descrito un péptido aislado que tiene 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400 o más residuos consecutivos de un supresor de tumor designado TS10q23.3. El péptido también puede estar conjugado con una molécula vehículo, por ejemplo, KLH o BSA.

En otra realización, se ha proporcionado un anticuerpo monoclonal que se une inmunológicamente a un supresor de tumor designado TS10q23.3. El anticuerpo puede ser reactivo no cruzado con otros polipéptidos humanos, o puede unirse a TS10q23.3 no humano, pero no a TS10q23.3 humano. Además el anticuerpo puede comprender un marcaje detectable, tal como un marcaje fluorescente, un marcaje quimioluminiscente, un radiomarcaje o una enzima. También abarca las células de hibridoma y las líneas celulares que producen tales anticuerpos.

En otra realización, se incluyen antisueros policlonales, los anticuerpos de los cuales se unen inmunológicamente a un supresor de tumor designado TS10q23.3. Los antisueros pueden derivarse de cualquier animal, pero preferentemente es de además de humano, de ratón o perro.

- 5 En aún otra realización, se ha proporcionado un ácido nucleico aislado que comprende una región, o el complemento de la misma, que codifica un supresor de tumor designado TS10q23.3 o una variante alélica, de la misma. La región que codifica el supresor de tumor puede derivarse de cualquier mamífero pero, en realizaciones particulares, está seleccionada entre secuencias de murine, caninas y humanas. Las mutaciones del ácido nucleico pueden ser mutantes de delección, mutantes de inserción, mutantes de desplazamiento de la pauta de lectura, mutantes sin sentido, mutantes de sentido erróneo ("missense") o mutantes de maduración por corte y empalme.
- 10 En una realización particular, el supresor de tumor tiene la secuencia de aminoácidos de la Fig. 9. El ácido nucleico puede ser ADN genómico, ADN complementario o ARN.

Están descritos los ácidos nucleicos que comprenden un ADN complementario y comprende además un promotor enlazado de manera operable a la región o al complemento del mismo, que codifica el supresor de tumor. Elementos adicionales incluyen una señal de poliadenilación y un origen de replicación.

- 15 También se pueden emplear vectores vitales tales como retrovirus, adenovirus, herpesvirus, virus vaccinia y virus adenoasociados. El vector puede ser "desnudo" o estar empaquetado en una partícula de virus. Alternativamente, el ácido nucleico puede comprender un vector de expresión empaquetado en un liposoma.

- 20 Se describen diversos tamaños de ácidos nucleicos, pero no son limitantes: aproximadamente 1.212 bases, aproximadamente 1.500 bases, aproximadamente 2.000 bases, aproximadamente 3.500 bases, aproximadamente 5.000 bases, aproximadamente 10.000 bases, aproximadamente 15.000 bases, aproximadamente 20.000 bases, aproximadamente 25.000 bases, aproximadamente 30.000 bases, aproximadamente 35.000 bases, aproximadamente 40.000 bases, aproximadamente 45.000 bases, aproximadamente 50.000 bases, aproximadamente 75.000 bases y aproximadamente 100.000 bases.

- 25 En aún otra realización más, se ha proporcionado un oligonucleótido aislado de entre 10 y 50 bases consecutivas de un ácido nucleico, o complementario al mismo, que codifica un supresor de tumor designado TS10q23.3 en el que dicho ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos del exón E. El oligonucleótido puede ser de 15 bases de longitud, 17 bases de longitud, 20 bases de longitud, 25 bases de longitud o 50 bases de longitud.

- 30 En aún otra realización más, se ha proporcionado un método de diagnóstico de un cáncer o ascenso del desarrollo de cáncer o metástasis en un sujeto humano que comprende la determinación en una muestra de dicho sujeto si hay una mutación, delección o inserción puntual en una secuencia de nucleótidos de TS10q23.3 de dicho sujeto en comparación con la región codificadora de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 2, siendo dicha mutación, delección o inserción puntual indicativa de cáncer o ascenso del desarrollo de cáncer o metástasis. El cáncer puede ser de cerebro, pulmón, hígado, bazo, riñón, ganglio linfático, intestino delgado, páncreas, células sanguíneas, colon, estómago, pecho, endometrio, próstata, testículo, ovario, piel, cabeza y cuello, esófago, médula ósea, glioblastoma, meduloblastoma, astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma. En realizaciones preferidas, el
- 35 cáncer es un cáncer de próstata o cáncer de pecho. En otra realización preferida, el cáncer es cáncer de cerebro, por ejemplo, un glioma. La muestra es una muestra de tejido o fluido.

- 40 En un formato, el método implica ensayar un ácido nucleico de la muestra. El método puede comprender además someter la muestra a condiciones adecuadas para amplificar el ácido nucleico. Alternativamente, el método puede comprender poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une inmunológicamente a un TS10q23.3, por ejemplo, en un método ELISA. La comparación, a pesar del formato, puede incluir comparar la expresión de TS10q23.3 con la expresión de TS10q23.3 en muestras de no cáncer. La comparación puede considerar niveles de expresión de TS10q23.3. Alternativamente, la comparación puede implicar la evaluación de la estructura del gen de TS10q23.3, proteína o transcrito. Tales formatos pueden incluir secuenciación, hibridación de oligonucleótido de tipo
- 45 natural, hibridación de oligonucleótido mutante, SSCP, PCR y protección de ARNasa. Las realizaciones particulares incluyen la evaluación de la hibridación del oligonucleótido mutante o de tipo natural donde el oligonucleótido está configurado en una matriz, chip o lámina.

- 50 También se ha descrito un método para alterar el fenotipo de una célula tumoral que comprende la etapa de poner en contacto la célula con un supresor de tumor designado TS10q23.3 bajo condiciones que permitan la absorción del supresor de tumor por la célula tumoral. La célula tumoral puede derivarse de un tejido tal como tejido de cerebro, pulmón, hígado, bazo, riñón, ganglio linfático, intestino delgado, células sanguíneas, páncreas, colon, estómago, pecho, endometrio, próstata, testículo, ovario, piel, cabeza y cuello, esófago, médula ósea y tejido sanguíneo. El fenotipo se puede seleccionar entre proliferación, migración, inhibición por contacto, crecimiento en agar blando o ciclo celular. El supresor de tumor puede estar encapsulado en un liposoma o estar libre.

- 55 Además se ha descrito un método para alterar el fenotipo de una célula tumoral que comprende la etapa de poner en contacto la célula con un ácido nucleico (i) que codifica un supresor de tumor designado TS10q23.3 y (ii) un promotor activo en la célula tumoral, en la que el promotor se enlaza de manera operable a la región que codifica el supresor de tumor, bajo condiciones que permitan la absorción del ácido nucleico por la célula tumoral. El fenotipo

puede ser proliferación, migración, inhibición por contacto, crecimiento en agar blando o ciclo celular. El ácido nucleico puede estar encapsulado en un liposoma. Si el ácido nucleico es un vector vírico tal como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus vaccinia y herpesvirus, puede estar encapsulado en una partícula vírica.

5 En una realización adicional, se ha proporcionado un polipéptido supresor de tumor tal como se ha definido en las reivindicaciones para usarse en el tratamiento de cáncer.

En aún una realización adicional, se ha proporcionado un ácido nucleico tal como se ha definido en las reivindicaciones para usarse en el tratamiento de cáncer, en el que dicho ácido nucleico es capaz de expresar el polipéptido supresor de tumor tal como se ha definido en las reivindicaciones en las células tumorales asociadas con dicho cáncer.

10 En más aún una realización adicional, se ha proporcionado un mamífero no humano transgénico en el cual ambas copias de gen codificador de TS10q23.3 están interrumpidas o reemplazadas con otro gen.

Se ha descrito un método de determinación de la fase de cáncer que comprende las etapas de (i) obtener una muestra de un sujeto; y (ii) determinar la expresión de un supresor de tumor TS10q23.3 funcional en células de la muestra. El cáncer puede ser un cáncer cerebral y la fase se distingue entre grado bajo y glioma. La determinación
15 puede comprender ensayar un ácido nucleico o polipéptido TS10q23.3 en la muestra.

También se ha descrito un método que predice la metástasis tumoral que comprende las etapas de (i) obtener una muestra de un sujeto; y (ii) determinar la expresión de un supresor de tumor TS10q23.3 en células de la muestra. El cáncer se puede distinguir como metástasis y no metástasis. La determinación puede comprender ensayar un ácido nucleico o polipéptido TS10q23.3 en la muestra.

20 Se ha descrito un método de investigación de una sustancia candidata para la actividad antitumoral que comprende las etapas de (i) proporcionar una célula que carezca de polipéptido TS10q23.3 funcional; (ii) poner en contacto la célula con la sustancia candidata; y (iii) determinar el efecto de la sustancia candidata sobre la célula. La célula puede ser una célula tumoral, por ejemplo, una célula tumoral que tenga una mutación en la región codificadora de TS10q23.3.7. La mutación puede ser un mutante de delección, un mutante de inserción, un mutante de desplazamiento de la pauta de lectura, un mutante sin sentido, un mutante de sentido erróneo o un mutante de maduración por corte y empalme. La determinación puede comprender la comparación de una o más características de la célula en presencia de la sustancia candidata con características de una célula en ausencia de la sustancia candidata. La característica puede ser: expresión de TS10q23.3, actividad de fosfatasa, proliferación, metástasis, inhibición por contacto, crecimiento en agar blando, regulación del ciclo celular, formación tumoral, progresión tumoral e invasión de tejido. La sustancia candidata puede ser un agente quimioterapéutico o radioterapéutico o ser seleccionada entre una pequeña biblioteca molecular. La molécula puede estar en contacto *in vitro* o *in vivo*.
25
30

Además se ha descrito un método de investigación de una sustancia candidata para la actividad anti-quinasa que comprende las etapas de (i) proporcionar un polipéptido TS10q23.3 que comprenda al menos un sitio de tirosin quinasa; (ii) poner en contacto la célula con la sustancia candidata; y (iii) determinar el efecto de la sustancia candidata sobre la fosforilación del sitio. La determinación puede comprender la comparación de una o más características de la célula en presencia de la sustancia candidata con características de una célula en ausencia de la sustancia candidata. La característica puede ser el estatus de fosforilación de TS10q23.3, expresión de TS10q23.3, actividad fosfatasa, proliferación, metástasis, inhibición por contacto, crecimiento en agar blando, regulación del ciclo celular, formación tumoral, progresión tumoral e invasión de tejido. La sustancia candidata puede ser un agente quimioterapéutico o radioterapéutico o ser seleccionada entre una pequeña biblioteca molecular. La célula puede estar en contacto *in vitro* o *in vivo*.
35
40

Breve Descripción de los Dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria y se incluyen para demostrar más ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor en referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en la presente memoria:
45

Fig. 1-Localización del Loci del Supresor de Tumor Candidato en el Cromosoma 10 Humano. Diversos loci en el cromosoma 10 humano han estado implicados como posibles sitios para la actividad supresora de tumor. Se representan estas localizaciones, y el grupo informante.

Fig. 2-Ilustración de Delecciones Homocigotas en Líneas Celulares de Glioma. Se investigaron en diversas líneas celulares de glioma la presencia de delecciones en ambas copias de loci en el cromosoma 10. Los loci están indicados en el eje vertical y las líneas celulares están enumeradas a través del eje horizontal. La pérdida homocigota está indicada por un óvalo oscurecido.
50

Fig. 3-Ilustración de Regiones del Cromosoma 10: Presencia o Ausencia de Marcadores Microsatélites de ADN en el Clon Híbrido. Se ilustran las regiones de presencia (círculo cerrado) o ausencia (círculo abierto) en el cromosoma 10 del ADN correspondiente a marcadores microsatélites específicos al cromosoma 10 de once subclones del clon híbrido U251.N10.7 de la célula somática que se transfirieron en células A9 de ratón. Los híbridos de células
55

somáticas U251.N10.6 y U251.N10.8 son clones completamente suprimidos, que presentan no crecimiento o pequeño en agarosa blanda, y los subclones U251.10.5A y C están parcialmente suprimidos (Steck et al., 1995). La diferencia entre los clones completamente suprimidos y los clones parcialmente suprimidos proporciona una localización funcional del gen del supresor de tumor. Las posibles regiones que contienen el gen supresor de tumor están indicadas por los recuadros tramados. El recuadro tramado en 10q23.3 se solapa con las deleciones homocigotas y la región implicada por el análisis de delección alélica (véase Fig. 2 y Fig. 4).

Fig. 4-Mapa de Delección del Cromosoma 10 en Gliomas Humanos. La región unida por los marcadores D10S551 a D10S583 está localizada en una región de 10 cM. Se muestra que los microsatélites son los más probablemente enlazados y se mapean en su localización cromosómica aproximada en base al mapa de híbrido de tal radiación como lo descrito por Gyapay et al., 1994. La región del cromosoma 101 que no está implicada en astrocitomas anaplásicos y un glioma se muestra en las regiones recuadradas del tumor. La región crítica definida a partir del análisis de delección homocigota y no excluida se muestra mediante este análisis por la barra sólida en el lado derecho.

Fig. 5-Mapeado de BAC 106d16. Se ilustra el mapeado de BAC designado 106d16, y la demostración de la delección homocigota mediante transferencia Southern. Se representa el mapa parcial de la restricción de 106d16. La ilustración de la transferencia muestra la delección homocigótica de la banda nº 14 de Eco (Mr aprox. 11 kb) en células EFC-2

Fig. 6-Secuencia codificadora y regiones flanqueadoras 5' y 3' de TS10q23.3. La región codificadora está en negrita como la primera en el codón de terminación de marco.

Fig. 7-Secuencia de Aminoácidos Pronosticada del Producto TS10q23.3. Las abreviaciones son: A, alanina; C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptófano; Y, tirosina. El sitio consenso de fosfatasa está en negrita; los sitios de fosforilación de tirosina están en cursiva y subrayados.

Fig. 8-Análisis de Delección de 10q23.3. Se volvió a analizar la presencia del gen de TS10q23.3 en la línea de glioma inicialmente indicada como que tiene deleciones homocigóticas en 10q23.3. El óvulo en oscuro indica que la región del gen está presente; el óvulo abierto indica una delección homocigótica en la región del gen. *- indica exones atrapados.

Fig. 9-Comparación de Homología de TS10q23.3 Humano con Homólogos de Ratón y Perro. El codón ATG de iniciación y el aminoácido de metionina están designados en la posición de comienzo (1). El codón de terminación es TGA (1.210). Las alteraciones entre las secuencias humanas y de ratón o perro en el nivel genómico o de aminoácidos están designadas por una estrella en la secuencia comparada. Sin embargo, no se observaron cambios en la secuencia de aminoácidos.

Fig. 10-Secuencia de Exones y Regiones Intrónicas de Alrededor de TS10q23.3. Los exones están indicados con letras mayúsculas comenzando en la posición uno y los intrones están designados con letras minúsculas; excepto para el primer exón donde el codón de iniciación comienza en la posición uno y el límite exón/intrón 3' está en la posición 79 y 80, respectivamente. La designación con letra minúscula (Tabla 4) corresponde a la numeración de la secuencia presentada en esta figura, excepto para el primer exón. Las mutaciones para U87 y U138 están en el primer residuo de intrón G [G+1>T] después del exón (G y H, respectivamente). Para T98G y KE, las mutaciones puntuales están en las posiciones 46 y 28 del exón B, respectivamente. Para las células LnCap, la mutación es una delección de las bases 16 y 17 en el primer intrón.

Figs. 11A-G-Análisis de las Estructuras Secundarias en TS10q23.3. Fig. 11A: Gráfico de hidrofiliidad; Fig. 11B: Gráfico de probabilidad superficial; Fig. 11C: Gráfico de flexibilidad; Fig. 11D: Gráfico de índice antigénico; Fig. 11E: Gráfico de hélice anfifílica; Fig. 11F: Gráfico de lámina anfifílica; Fig. 11G: Gráfico de estructura secundaria.

Figs. 12A-1-Comparación de las Características Pronosticadas en TS10q23.3 y Mutantes Puntuales T98G y KE. Fig. 12A: Gráfico de hidrofiliidad de los residuos 1-60 del polipéptido de tipo natural; Fig. 12B: Gráfico de probabilidad superficial de los residuos 1-60 del polipéptido de tipo natural; Fig. 12C: Gráfico de estructura secundaria de los residuos 1-60 del polipéptido de tipo natural; Fig. 12D: Gráfico de hidrofiliidad de los residuos 1-60 del mutante KE; Fig. 12E: Gráfico de probabilidad superficial de los residuos 1-60 del mutante KE; Fig. 12F: Gráfico de estructura secundaria de los residuos 1-60 del mutante KE; Fig. 12 G: Gráfico de hidrofiliidad de los residuos 1-60 del mutante T98G; Fig. 12H: Gráfico de probabilidad superficial de los residuos 1-60 del mutante T98G; Fig. 12I: Gráfico de estructura secundaria de los residuos 1-60 del mutante T98G. La mutación T98G (Leu→Arg) en el residuo 42 da como resultado la pérdida de la estructura secundaria en hélice propuesta de TS10q23.3. La mutación en KE en el residuo 36 (Gly→Glu) aumentaría de manera significativa la longitud de la estructura helicoidal propuesta en la región. Ambas mutaciones afectarían a la misma estructura helicoidal. También, surgen cambios menores en la hidrofiliidad y en la probabilidad superficial.

Compendio de las Secuencia

SEC. ID. N°: 1=secuencia pronosticada para TS10q23.3; SEC. ID. N°: 2=secuencia de gen humano; SEC. ID. N°: 3=secuencia de gen de ratón; SEC. ID. N°: 4=secuencia de gen de perro; SEC. ID. N°: 5=secuencia peptídica humana; SEC. ID. N°: 6=secuencia peptídica de ratón; SEC. ID. N°: 7=secuencia peptídica de perro; SEC. ID. N°: 8=exón a; SEC. ID. N°: 9=exón b; SEC. ID. N°: 10=exón c; SEC. ID. N°: 11=exón d; SEC. ID. N°: 12=exón e; SEC. ID. N°: 13=exón f; SEC. ID. N°: 14=exón g; SEC. ID. N°: 15=exón h; SEC. ID. N°: 16=exón i; SEC. ID. N°: 17=un motivo de los residuos 88 a 98; SEC. ID. N°: 18=dominio catalítico conservado de una protein tirosin fosfatasa (Denu et al., 1996); SEC. ID. N°: 19=residuos 1-60 del polipéptido de tipo natural TS10q23.3; SEC. ID. N°: 20=residuos 1-60 del polipéptido TS10q23.3 del mutante T98G; SEC. ID. N°:21=residuos 1-60 del polipéptido TS10q23.3 del mutante KE.

10 Descripción Detallada de las Realizaciones Preferidas

I. La presente Invención

Tal como se ha planteado anteriormente, un número de diferentes grupos han mostrado evidencia de una actividad supresora de tumor asociada con la región 10q del cromosoma humano 10. A pesar de esta considerable cantidad de trabajo, no se ha determinado la identidad del gen o genes responsables para esta actividad. Los anteriores usaron un enfoque funcional que implica la transferencia de los cromosomas o fragmentos cromosómicos que se sospecha que albergan el(los) gen(es) supresor(es) de tumor dentro de las células de glioma tumorígeno. Estos esfuerzos permitieron la definición de la actividad biológica de el(los) gen(es) supresor(es) de tumor putativo(s) y ayudan en la localización de tales. Los cromosomas 2 y 10 se transfirieron en las células de glioma U251 y los cromosomas 2 y 10 dentro de las células LG-11. Se mostró que dentro de las células LG-11 tenían copias no intactas del cromosoma 10 y posteriormente se encontró que el punto de rotura ocurría en 10q24. La transferencia del cromosoma 10 dio como resultado células híbridas que exponían un fenotipo suprimido, presentando una pérdida de tumorigenicidad (no formación de tumor) y pérdida de la capacidad de crecer en agarosa blanda (disminuido 50x a 1000x; Pershouse et al., 1993). El índice de crecimiento exponencial del híbrido era similar a la célula parental, aunque la densidad de saturación de la célula híbrida era de manera significativa (10x a 20x) menor que las células parentales. La transferencia del cromosoma 2 dio como resultado células híbridas que actuaban similarmente a las células parentales.

Un objetivo de estos estudios era localizar el gen supresor del cromosoma 10 mediante fragmentación del cromosoma 10 etiquetado con neomicina y, posteriormente, transferir el cromosoma fragmentado dentro de las células de glioma. Sin embargo, los inventores observaron que algunas de las células híbridas tenían reorganizaciones cromosómicas experimentadas espontáneamente para producir células híbridas que retenían solamente diversas regiones del cromosoma 10 insertado (Pershouse et al., 1993). A continuación, los inventores subclonaron los híbridos y los analizaron, además de iniciar estudios de fragmentación (Steck et al., 1995). Se siguió la pista de la retención del cromosoma 10 insertado o sus fragmentos mediante marcadores RFLP informativos y análisis FISH. Interesantemente, se sometió a reorganización solamente el cromosoma insertado. La inserción de una copia entera del cromosoma 10 dio como resultado la propiedad transformada de la célula híbrida para proliferar en agarosa blanda y formar tumores en ratones desnudos.

Estos dos fenotipos parecen ahora ser parcialmente separables mediante el presente análisis. Algunos subclones (U251.N10.5a-j), los cuales revelaron una pérdida de una porción muy importante del brazo largo del cromosoma 10, crecieron en agarosa blanda pero fallaron en formar tumores en ratones nude, indicando así que un locus supresor de tumor reside en la porción restante del cromosoma (10pter a 10q11). Por lo contrario, los clones que retenían una región distal del brazo largo, 10q24 a 10q26, fallaron en proliferar tanto en agarosa blanda como en ratones nude (véase Fig. 4). Esto sugiere otra región supresora fenotípica que reside en la región distal del cromosoma. La carencia de material asociado a 10 adicional sugeriría además que el material del cromosoma 10 restante es responsable del fenotipo biológico alterado. Estos resultados implican la presencia de dos regiones supresoras fenotípicamente independientes en el cromosoma 10 implicado en la progresión del glioma (Steck et al., 1995).

De acuerdo con la presente invención, los inventores han usado en la actualidad diversas estrategias independientes para localizar un gen supresor de tumor, designado TS10q23.3, que está implicado en gliomas, cáncer de pecho, cáncer de próstata y otros cánceres. Estos enfoques, descritos en mayor detalle en los siguientes Ejemplos, incluían (i) la identificación de deleciones homocigóticas en una serie de líneas celulares de glioma humanos; (ii) determinación de una(s) región(es) consistente(s) de retención en clones suprimidos para la tumorigenicidad; y (iii) estudios de deleción alélica sobre diversos grados de glioma y muestras normales correspondientes. Con el gen en mano, ahora llega a ser posible explotar la información codificada por el gen para desarrollar enfoques novedosos de diagnóstico y terapéuticos relacionados con el cáncer humano.

II. El Supresor de Tumor 10q23.3

De acuerdo con la presente invención, se ha identificado un supresor de tumor, codificado por un gen en el locus 10q23.3, y designado en la presente memoria como TS10q23.3. Esta molécula es capaz de suprimir fenotipos tumorales en diversas células. El término supresor de tumor es bien conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos de otros supresores de tumor son p53, Rb y p16, por nombrar unos pocos. Mientras que estas moléculas son estructuralmente distintas, forman grupo de moléculas funcionalmente relacionadas, del cual TS10q23.3 es un

miembro. Los usos para los cuales estos otros supresores de tumor están siendo explotados en la actualidad son igualmente aplicables en la presente memoria.

Además de la molécula TS10q23.3 entera, la presente invención también se refiere a fragmentos del polipéptido que tiene función fosfatasa o fragmentos adecuados como antígeno tal como el definido en las reivindicaciones.

5 Los fragmentos que incluyen el terminal N de la molécula se puede generar por ingeniería genética de sitios de terminación de traducción dentro de la región codificadora (discutido a continuación). Alternativamente, el tratamiento de la molécula TS10q23.3 con enzimas proteolíticas, conocidas como proteasas, pueden producir una diversidad de fragmentos N-terminal, C-terminal e internos. Los ejemplos de los fragmentos pueden incluir residuos contiguos de la secuencia de TS10q23.3 dados en la Fig. 7 y Fig. 9, de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400 o más aminoácidos de longitud. Estos fragmentos se pueden purificar de acuerdo con métodos conocidos, tales como precipitación (por ejemplo, sulfato de amonio), HPLC, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad (incluyendo cromatografía de inmutafinidad) o diversas separaciones por tamaño (sedimentación, electroforesis en gel, filtración en gel).

15 A. Características estructurales del Polipéptido

El gen para TS10q23.3 codifica un polipéptido de 403 aminoácidos. El peso molecular pronosticado de esta molécula es de 47.122 con un pI resultante de 5,86. Por tanto, como mínimo, esta molécula se puede usar como un patrón en el ensayo donde se están examinando el peso molecular y el pI.

20 Un sitio consenso de fosfatasa localizado en los residuos 122-131, que se corresponde perfectamente a la secuencia consenso de tirosin fosfatasa (PTP): [I/V]HCxAGxxR[S/T]G. Fuera de los dominios activos, las secuencias difieren enormemente. Las PTPs continúan a través de intermediarios de fosfoenzima. La reacción enzimática implica la formación del intermediarios fosforil-cisteína después del ataque nucleófilo del átomo de fósforo del sustrato mediante el anión tiolato de cisteína. La reacción se puede representar como un proceso químico en dos etapas: la transferencia del fosforil a la enzima acompañado por liberación rápida del producto desfosforilado; y la hidrólisis del intermediario tiol-fosfato concomitante con liberación rápida del fosfato. Para formar el complejo 25 componente catalítico, la enzima se une y reacciona con el dianión del sustrato que contiene fosfato. Sobre la enzima, un ácido aspártico debe estar protonado y la cisteína nucleófila debe no estar protonada (anión de tiolato) para la fosforil transferencia a la enzima. También hay que fijarse en los sitios de fosforilación de tirosina potenciales localizados en los residuos 233-240 y 308-315 y en los sitios de fosforilación de cAMP localizados en los 30 residuos 128, 164, 223 y 335. Se sabe que las fosfatasas tienen sitios de quinasa, y la actividad fosfatasa de estas enzimas se pueden modular mediante fosforilación en estos sitios. Generalmente las fosfatasas de proteína están divididas en dos categorías: fosfatasas de serina/treonina y fosfatasas de tirosina. Ciertas fosfatasas de tirosina también tienen actividad frente a la fosfoserina y fosfotreonina.

35 La interacción entre quinasas y fosfatasa, y los diversos estados de fosforilación de los polipéptidos se han demostrado como rasgos importantes en la fisiología celular. A través de una diversidad de diferentes mecanismos, quinasas y fosfatasas actúan en diferentes rutas dentro de las células que están implicadas en la señalización, almacenaje de energía y regulación celular. Puesto que se ha demostrado que la identificación de una función tirosin quinasa intrínseca en la proteína transformada de src (Collett & Erickson, 1978), el papel de la fosforilación, particularmente sobre los residuos de tirosina, juega un papel crítico en el control de la proliferación celular y la 40 inducción del cáncer (Hunter, 1991; Bishop, 1991). Los papeles que juegan las fosfatasas de proteína en la regulación del crecimiento, así como en muchas otras actividades biológicas y bioquímicas, se han correlacionado con el estado de fosforilación de las moléculas biológicamente importantes (Cohen, 1994).

También se debería mencionar que los más o menos 60 aminoácidos del terminal N de la molécula muestra alguna homología con la tensina, una proteína citoesquelética implicada en placas de adhesión. Esto sugiere que 45 TS10q23.3 puede estar implicado en fenómenos de superficie celular tales como inhibición por contacto, invasión, migración o señalización célula-célula. Las mutaciones puntuales de TS10q23.3 identificadas en ciertas líneas celulares tumorales afectan a las estructuras secundarias propuestas en esta región.

B. Aspectos Funcionales

50 Cuando la presente solicitud se refiere a la función de TS10q23.3 o actividad de "tipo natural", significa que la molécula en cuestión tiene la capacidad de inhibir la transformación de la célula desde un estado normalmente regulado de proliferación a estado maligno, es decir, se asocia con cualquier tipo de regulación anormal del crecimiento, o de inhibir la transformación de una célula desde un estado anormal a un estado altamente maligno, por ejemplo, para prevenir metástasis o crecimiento tumoral invasivo. Otros fenotipos que se pueden considerar para ser regulados por el producto de gen de TS10q23.3 normal son angiogénesis, adhesión, migración, señalización 55 célula-célula, crecimiento celular, proliferación celular, crecimiento dependiente de densidad, crecimiento dependiente de anclaje y otros. La determinación de qué moléculas poseen esta actividad se puede determinar usando ensayos familiares para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la transferencia de genes que codifican TS10q23.3, o variantes de los mismos, dentro de las células que no tienen un producto TS10q23.3 funcional, y por lo

tanto presentan control de crecimiento dañado, identificará, en virtud de la supresión del crecimiento, aquellas moléculas que tienen función de TS10q23.3.

Tal como se ha planteado anteriormente, hay una indicación de que TS10q23.3 es una fosfatasa. La porción de la proteína localizada en los residuos 88 a 98 es una correspondencia perfecta para el dominio catalítico conservado de la proteína tirosin fosfatasa. También, las diana de quinasa putativa están localizadas en la molécula, lo cual es otra característica de las fosfatasas. Debido a que otros supresores de tumor se han identificado con este tipo de actividad, será deseable determinar la función fosfatasa en el papel de supresión de tumor de TS10q23.3. Esto también puede ser un enfoque fructífero para desarrollar ensayos de investigación de la ausencia de función de TS10q23.3 o en el desarrollo de terapias de cáncer, por ejemplo, en direccionamiento de la función de la fosfatasa de TS10q23.3, direccionamiento del sustrato sobre el cual actúa TS10q23.3 y/o direccionamiento de la quinasa o quinasas que actúan sobre TS10q23.3.

C. Variantes de TS10q23.3

Las variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido pueden ser variantes sustitucionales, insercionales o de delección. Las variantes de delección carecen de uno o más residuos de la proteína nativa los cuales no son esenciales para la función o actividad inmunógena y se ilustran por las variantes que carecen de una secuencia transmembrana descrita anteriormente. Otro tipo común de variante de delección es una que carece de secuencias señal secretora o secuencias señal que dirigen una proteína a unirse a una parte particular de una célula. Los mutantes insercionales típicamente implican la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un epitopo inmunoreactivo o simplemente un residuo único. Las adiciones terminales, denominadas proteínas de fusión, se discuten a continuación.

Las variantes sustitucionales típicamente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y se pueden diseñar para modular una o más propiedades del polipéptido, tal como la estabilidad frente a la escisión proteolítica, sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones de esta clase preferentemente son conservadoras, es decir, un aminoácido está reemplazado con uno de forma y carga similar. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina o histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina o glutamina; isoleucina por leucina o valina; leucina por valina o isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina o isoleucina; fenilalanina por tirosina, leucina o metionina; serina por treonina; treonina por serina; triptófano por tirosina; tirosina por triptófano o fenilalanina; y valina por isoleucina o leucina.

Lo siguiente es una discusión basada en el cambio de los aminoácidos de una proteína para crear un equivalente, o incluso una molécula de segunda generación mejorada. Por ejemplo, ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión sobre moléculas de sustrato. Puesto que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define esa actividad funcional biológica de la proteína, se pueden hacer ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína, y su secuencia codificadora de ADN subyacente, y no obstante obtener una proteína con propiedades similares. Se pueden hacer diversos cambios en las secuencias de ADN de genes sin pérdida apreciable de su utilidad biológica o actividad, tal como se discute a continuación. La Tabla 1 muestra los codones que codifican aminoácidos particulares.

En la realización de tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir función biológica interactiva en una proteína generalmente se entiende en la técnica (Kyte & Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, la cual por turnos define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos de ADN, antígenos y similares.

Se ha asignado a cada aminoácido un índice hidropático en base a sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte & Doolittle, 1982), estas son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9) y arginina (4,5).

En la técnica se sabe que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen un índice o resultado hidropático similar y todavía dan como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, todavía obtienen una proteína funcionalmente equivalente biológica. En la realización de tales cambios, es preferida la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , particularmente se prefieren aquellas que están dentro de ± 1 , e incluso son más particularmente preferidas aquellos dentro de $\pm 0,5$.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede hacer eficazmente en base a la hidrofiliidad. El documento de Patente U.S. 4.554.101 plantea que la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, como la regida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad

biológica de la proteína. Tal como se detalla en el documento de Patente U.S. 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0±1); glutamato (+3,0±1); serina (+3,0); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5±1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

Se entiende que un aminoácido puede ser sustituido por otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y todavía obtienen una proteína biológicamente equivalente e inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , particularmente se prefieren aquellos que están dentro de ± 1 , e incluso son más particularmente preferidos aquellos dentro de $\pm 0,5$.

Tal como se ha esbozado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Sustituciones ilustrativas que toman diversas de las características anteriormente mencionadas en consideración son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Los polipéptidos también se pueden preparar mediante el uso de miméticos de péptidos. Los miméticos son moléculas que contienen péptidos que mimetizan elementos de la estructura secundaria de la proteína. Véase, por ejemplo, Johnson et al., "Peptide Turn Mimetics" in BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY, Pezzuto et al., Eds., Chapman and Hall, Nueva York (1993). Las razones subyacentes detrás del uso de los miméticos del péptido es que la cadena principal del péptido de las proteínas existe sobre todo para orientar las cadenas laterales de aminoácidos de tal modo que facilite las interacciones moleculares, tal como aquellas del anticuerpo y antígeno. Se espera que un mimético de péptido permita las interacciones moleculares similares a la molécula natural. Estos principios se pueden usar, junto con los principios anteriormente esbozados, para producir por ingeniería moléculas de segunda generación que tengan muchas de las propiedades naturales de TS10q23.3, pero con características alteradas e incluso mejoradas.

D. Conmutación de Dominio

Tal como se describe en los ejemplos, los presentes inventores han identificado homólogos putativos de murine y caninos del gen humano de TS10q23.3. Además, se han identificado mutaciones en TS10q23.3 las cuales se cree que alteran su función. Estos estudios son importantes por al menos dos razones. En primer lugar, proporcionan una expectación razonable de que puedan existir todavía otros homólogos, variantes alélicas y mutantes de este gen en especies relacionadas, tales como rata, conejo, mono, gibón, chimpancé, simio, babuino, vaca, cerdo, caballo, oveja y gato. Sobre el aislamiento de estos homólogos, variantes y mutantes, y junto con otros análisis, se pueden identificar ciertos dominios activos y funcionales. En segundo lugar, esto proporcionará un punto de partida para análisis mutacionales adicionales de la molécula. Una forma en la cual se puede explotar esta información es en "conmutación de dominio".

La conmutación de dominio implica la generación de moléculas quiméricas usando diferentes pero, en este caso, polipéptidos relacionados. Al comparar las secuencias de ratón, perro y humanas para TS10q23.3 con el TS10q23.3 de otras especies, y con mutantes y variantes alélicas de estos polipéptidos, se pueden hacer predicciones para las regiones funcionalmente significativas de estas moléculas. A continuación, es posible conmutar dominios relacionados de estas moléculas en un esfuerzo para determinar la capacidad crítica de estas regiones para la función de TS10q23.3. Estas moléculas pueden tener valor adicional en el sentido de que estas "quimeras" se pueden distinguir de las moléculas naturales, mientras que posiblemente proporcionan la misma función.

En base a la identidad de secuencia, al nivel de aminoácidos, de las secuencias de ratón, perro y humano, se puede deducir que incluso pequeños cambios en la secuencia primaria de la molécula afectarán a la función. Análisis adicionales de mutaciones y su efecto pronosticado sobre la estructura secundaria ampliará este entendimiento.

Otro aspecto estructural de TS10q23.3 que proporciona sustrato fértil para los experimentos de conmutación de dominio es el dominio similar a fosfatasa de tirosina y los sitios putativos de fosforilación de tirosina. Este dominio puede estar sustituido por otros dominios de fosfatasa para alterar la especificidad de esta función. Mediante esta observación se garantiza una investigación adicional de la homología entre TS10q23.3 y otras fosfatasas.

E. Proteínas de Fusión

Una clase especializada de variante insercional es la proteína de fusión. Esta molécula generalmente tiene toda o una porción sustancial de la molécula nativa, enlazada al terminal N o C, a todo o una porción de un segundo polipéptido. Por ejemplo, las fusiones típicamente emplean secuencias líder de otras especies para permitir la expresión recombinante de una proteína en un hospedante heterólogo. Otra fusión útil incluye la adición de un dominio inmunológicamente activo, tal como un epítipo de anticuerpo, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. La inclusión de un sitio de escisión en o cerca de la junta de fusión facilitará la separación del polipéptido extraño después de la purificación. Otras fusiones útiles incluyen el enlace de los dominios funcionales, tal como los sitios activos de las enzimas, dominios de glicosilación, señales diana celulares o regiones de membrana. Una fusión particular de interés incluiría una construcción de delección que carezca del sitio de fosfatasa de TS10q23.3.

pero conteniendo otras regiones que podrían unirse a la molécula sustrato. La fusión a un polipéptido que se puede usar para la purificación del complejo sustrato- TS10q23.3 serviría para aislar el sustrato para la identificación y el análisis.

F. Purificación de Proteínas

- 5 Será deseable purificar TS10q23.3 o variantes del mismo. Las técnicas de purificación de proteína son bien conocidas por los expertos en la técnica. Estas técnicas implican, en un nivel, la fraccionación en bruto del entorno celular a fracciones de polipéptidos y no polipéptidos. Al haber separado el polipéptido a partir de otras proteínas, el polipéptido de interés se puede purificar más usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para alcanzar la purificación parcial o completa (o purificación a homogeneidad). Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión; electroforesis en gel de poliacrilamida; enfoque isoelectrico. Un método particularmente eficiente de purificación de péptidos es la cromatografía líquida de proteína rápida o incluso la HPLC.

- 15 Ciertos aspectos de la presente invención conciernen a la purificación, y a la purificación sustancial, de una proteína o péptido codificado. El término "proteína o péptido purificado" tal como se usa en la presente memoria, pretende referirse a una composición, capaz de aislarse de otros componentes, en la que la proteína o el péptido están purificados a cualquier nivel relativo a su estado obtenible de manera natural. Por lo tanto, una proteína o péptido purificado también se refiere a una proteína o péptido, libre del ambiente en el cual puede ocurrir de manera natural.

- 20 Generalmente, "purificado" se referirá a una composición de proteína o péptido que se ha sometido a fraccionación para separar otros diversos componentes, y dicha composición sustancialmente retiene su actividad biológica expresada. Cuando se usa el término "sustancialmente purificado", esta designación se referirá a una composición en la cual la proteína o péptido forman el componente principal de la composición, de modo que constituya aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o más de las proteínas en la composición.

- 25 Diversos métodos para cuantificar el nivel de purificación de la proteína o péptido serán conocidos por los expertos en la técnica teniendo en cuenta la presente descripción. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa, o valorar la cantidad de polipéptidos dentro de una fracción mediante análisis SDS/PAGE. Un método preferido para valorar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, para compararlo con la actividad específica del extracto inicial, y así calcular el nivel de pureza, valorado en la presente memoria mediante un "número de veces la purificación". La unidades actuales usadas para representar la cantidad de actividad dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular elegida para seguir la purificación y si el péptido o la proteína expresados presentan o no una actividad detectable.

- 35 Diversas técnicas adecuadas para usar en la purificación de proteína serán bien conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares o mediante desnaturalización por calor, seguido de centrifugación; etapas de cromatografía tales como intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, cromatografía de hidroxilapatita y de afinidad; enfoque isoelectrico; electroforesis en gel; y combinaciones de dichas y otras técnicas. Tal como generalmente se conoce en la técnica, se cree que se puede cambiar el orden de conducción de las diversas etapas de purificación, o que se pueden omitir ciertas etapas, y todavía dar como resultado un método adecuado para la precipitación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

- 40 No hay un requerimiento general de que la proteína o péptido siempre sean proporcionados en su estado más purificado. En efecto, se contempla que productos menos sustancialmente purificados tendrán utilidad en ciertas realizaciones. La purificación parcial se puede conseguir usando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC generalmente dará como resultado una purificación "unas veces" mayor que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que presentan un grado inferior de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto proteico, o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

- 50 Se sabe que la migración de un polipéptido puede variar, algunas veces de manera significativa, con diferentes condiciones de SDS/PAGE (Capaldi et al., 1977). Por lo tanto, se apreciará que bajo diferentes condiciones de electroforesis, pueden variar los pesos moleculares aparentes de productos de expresión purificados o parcialmente purificados.

- 55 La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, del Inglés "High Performance Liquid Chromatography") se caracteriza por una separación muy rápida con extraordinaria resolución de los picos. Esto se alcanza mediante el uso de partículas muy finas y alta presión para mantener un caudal adecuado. La separación se puede conseguir en cuestión de minutos, o como mucho en una hora. Además, se necesita solamente un volumen muy pequeño de la muestra porque las partículas son tan pequeñas y cerradamente empaquetadas que el volumen en vacío es una fracción muy pequeña del volumen del lecho. Además, la concentración de la muestra no necesita ser muy grande porque las bandas son tan estrechas que hay muy poca dilución de la muestra.

La cromatografía en gel, o cromatografía de criba molecular, es un tipo especial de cromatografía de partición que se basa en el peso molecular. La teoría detrás de la cromatografía en gel es que la columna, la cual se prepara con diminutas partículas de una sustancia inerte que contiene poros pequeños, separa las moléculas más grandes de las moléculas más pequeñas a medida que pasan a través de o alrededor de los poros, dependiendo de su tamaño. Mientras el material del cual están hechas las partículas no absorban las moléculas, el único factor que determina el caudal es el tamaño. Por lo tanto, las moléculas se eluyen de la columna en tamaño descendente, siempre que la forma sea relativamente constante. La cromatografía en gel es insuperable para separar moléculas de diferente tamaño porque la separación es independiente de todos los otros factores tales como pH, fuerza iónica, temperatura, etc. Prácticamente tampoco hay absorción, hay menos difusión de zona y el volumen de elución está relacionado con una simple cuestión con el peso molecular.

La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que depende de la afinidad específica entre una sustancia a aislar y una molécula a la que se puede unir específicamente. Esto es una interacción de tipo ligando-receptor. El material de columna está sintetizado mediante acoplamiento covalente de uno de las parejas de la unión a una matriz insoluble. Entonces el material de la columna es capaz de absorber específicamente la sustancia de la disolución. La elución ocurre cambiando las condiciones por aquellas en las que no ocurrirá la unión (modificar pH, fuerza iónica, temperatura, etc.)

Un tipo particular de cromatografía de afinidad útil en la purificación del carbohidrato que contiene compuestos es la cromatografía de afinidad de lectina. Las lectinas son una clase de sustancias que se unen a una diversidad de polisacáridos y glicoproteínas. Las lectinas normalmente se acoplan a agarosa mediante bromuro de cianógeno. La conconavalina A acoplada a Sefarosa fue el primer material de este tipo en usarse y se ha usado mucho en el aislamiento de polisacáridos y glicoproteínas. Otras lectinas que se han incluido lectina de lenteja, aglutinina de germen de trigo las cuales han sido útiles en la purificación de residuos de N-acetil glucosaminil y lectina de *Helix pomatia*. Las propias lectinas son purificadas usando cromatografía de afinidad con ligandos de carbohidrato. La lactosa se ha usado para purificar lectinas a partir de semilla de ricino y cacahuetes; la maltosa ha sido útil en la extracción de lectinas de lentejas y judía blanca ("jack bean"); la N-acetil-D galactosamina se usa para purificar lectinas de soja; la N-acetil glucosaminil se une a lectinas de germen de trigo; la D-galactosamina se ha usado en la obtención de lectinas de almejas y la L-fucosa se unirá a lectinas de loto.

La matriz debería ser una sustancia que por sí misma no absorba moléculas a cualquier extensión significativa y que tenga un amplio intervalo de estabilidad química, física y térmica. El ligando se debería acoplarse de tal forma que no afecte a sus propiedades de unión. El ligando también debería proporcionar unión relativamente ajustada. Y debería ser posible eluir la sustancia sin destruir la muestra o el ligando. Una de las formas más comunes de cromatografía de afinidad es la cromatografía de inmunoafinidad. A continuación se discute la generación de anticuerpos que serían adecuados para usarse de acuerdo con la presente invención.

G. Péptidos Sintéticos

La presente divulgación también describe péptidos relacionados con TS10q23.3 más pequeños para usar en diversas realizaciones de la presente invención. A causa de su tamaño relativamente pequeño, los péptidos también se pueden sintetizar en disolución o sobre un soporte sólido de acuerdo con las técnicas convencionales. Diversos sintetizadores automáticos están comercialmente disponibles y se pueden usar de acuerdo con los protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young, (1984); Tam et al., (1983); Marrifield, (1986); y Barany y Merufield (1979).

Secuencias cortas de péptido, o bibliotecas de péptidos que se solapan, normalmente desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 35 a 50 aminoácidos, los cuales corresponden a las regiones seleccionadas descritas en la presente memoria, pueden ser sintetizadas y a continuación investigadas en ensayos de investigación diseñados para identificar péptidos reactivos. Alternativamente, se puede emplear tecnología de ADN recombinante en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de la invención se inserta dentro de un vector de expresión, se transforma o se somete a transfección dentro de una célula hospedante apropiada y cultivada bajo condiciones adecuadas para la expresión.

H. Composiciones de antígeno

La presente invención también proporciona el uso de proteínas de TS10q23.3 o fragmentos de polipéptido que tienen función fosfatasa, como antígenos para la inmunización de animales en relación con la producción de los anticuerpos. Se prevé que o bien TS10q23.3 o porciones del mismo se acoplarán, adherirán, unirán, conjugarán o se enlazarán químicamente a uno o más agentes vía enlaces ("linkers"), polienlaces ("polylinkers") o aminoácidos derivatizados. Esto se puede realizar de modo que se produce una composición biespecífica o multivalente o de vacuna. Se prevé además que los métodos usados en la preparación de estas composiciones serán familiares para los expertos en la técnica y deberían ser adecuados para la administración a animales, es decir, farmacéuticamente aceptables. Agentes preferidos son los vehículos Hemocianina de Lapa (KLH, del Inglés "Keyhole Limpet Hemoncyannin") o albúmina de suero bovina (BSA, del Inglés "Bovine Serum Albumin").

III. Ácidos Nucleicos

La presente invención también proporciona, en otra realización, genes que codifican TS10q23.3. Se han identificado los genes para la molécula TS10q23.3 humana, canina y de murine. Uno de los expertos normales en la técnica podría, usando estos dos ácidos nucleicos, fácilmente identificar homólogos relacionados en diversas otras especies (por ejemplo, rata, conejo, mono, gibbon, chimpancé, simio, babuino, vaca, cerdo, caballo, oveja, gato y otras especies). El encuentro de homólogos de ratón y perro para este gen hace probable que otras especies más estrechamente relacionadas con los humanos tendrán, de hecho, también un homólogo.

Además, debería estar claro que la presente invención no está limitada a los ácidos nucleicos específicos descritos en la presente memoria. Tal como se discute a continuación, “un gen de TS10q23.3” puede contener una diversidad de bases diferentes y más aún producir un correspondiente polipéptido que es funcionalmente indistinguible, y en algunos casos estructuralmente, de los genes humanos y de ratón descritos en la presente memoria.

Igualmente, cualquier referencia a un ácido nucleico debería leerse como que abarca una célula hospedante que contiene ese ácido nucleico y, en algunos casos, capaz de expresar el producto de ese ácido nucleico. Además de las consideraciones terapéuticas, las células que expresan los ácidos nucleicos de la presente invención pueden probar ser útiles en el contexto de la investigación para agentes que inducen, reprimen, inhiben, aumentan, interfieren con, bloquean, derogan, estimulan o mejoran la función de TS10q23.3.

A. Ácidos Nucleicos que Codifican 10q23.3

El gen humano descrito en las Figs. 6 y 9, y el gen de murine descrito en la Fig. 9 son genes de TS10q23.3 de la presente invención. Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden codificar un gen de TS10q23.3 entero, o cualquier fragmento de la secuencia de TS10q23.3 que tenga función fosfatasa, presentada en la presente memoria. El ácido nucleico puede ser derivado del ADN genómico, es decir, clonado directamente del genoma de un organismo particular. El ácido nucleico puede comprender complementariedad.

ADN (ADNc). También se ha descrito un ADNc más un intrón natural o un intrón derivado de otro gen; tales moléculas producidas por ingeniería algunas veces se refieren como “mini-genes”. Como mínimo, estos y otros ácidos nucleicos de la presente invención se pueden usar como patrones de peso molecular en, por ejemplo, electroforesis en gel.

El término “ADNc” intenta referirse a ADN preparado usando ARN mensajero (ARNm) como platilla. La ventaja de usar un ADNc, a diferencia de ADN genómico o ADN polimerizado a partir de una plantilla de ARN genómico, no o parcialmente procesada, es que el ADNc principalmente contiene secuencias codificadoras de la proteína correspondiente. Puede haber veces en las que se prefiera la secuencia genómica completa o parcial, tal como donde se requieren las regiones no codificadoras para la expresión óptima o donde las regiones no codificadoras tales como intrones son para ser sometidos a direccionamiento en una estrategia antisentido.

También se describe que un TS10q23.3 dado de unas especies dadas se puede representar mediante variantes naturales que tienen secuencias de ácido nucleico algo diferentes pero, no obstante, codifican la misma proteína (véase la Tabla 1 de a continuación).

Tal como se usa en esta solicitud, el término “un ácido nucleico que codifica un TS10q23.3” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha aislado libre del ácido nucleico celular total. En realizaciones preferidas, la invención concierne a una secuencia de ácido nucleico esencialmente como la expuesta en las Figs. 6 y 9. El término “como la expuesta en la Fig. 6 ó 9” quiere decir que la secuencia de ácidos nucleicos sustancialmente corresponde a una porción de la Fig. 6 ó 9. El término “codón funcionalmente equivalente” se usa en la presente memoria para referirse a los codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los seis codones para arginina o serina (Tabla 1, de a continuación), y también se refiere a los codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes, tal como se discute en las siguientes páginas.

Tabla 1

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido Aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido Glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	Hys	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU

Aminoácidos			Codones
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

Teniendo en cuenta la degeneración del código genético, las secuencias que tienen al menos aproximadamente 50%, normalmente al menos aproximadamente 60%, más normalmente aproximadamente 70%, lo más normalmente aproximadamente 80%, preferentemente al menos aproximadamente 90% y los más preferentemente aproximadamente 95% de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos de la Fig. 9 serán secuencias que son
5 “como la expuesta en la Fig. 9”. Secuencias que son esencialmente la misma que las expuestas en la Fig. 9 también se pueden definir funcionalmente como secuencias que son capaces de hibridar con un segmento de ácido nucleico que contiene el complemento de la Fig. 9 bajo condiciones estándar.

Los segmentos de ADN pueden ser aquellos que codifican péptidos y proteínas de TS10q23.3 equivalentes biológicamente funcionales, tal como se ha descrito anteriormente. Tales secuencias pueden surgir como una
10 consecuencia de la redundancia de codón y la equivalencia funcional de los aminoácidos que se sabe que ocurren de manera natural dentro de las secuencias de ácido nucleicos y las proteínas así codificadas. Alternativamente, se puede crear proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes vía la aplicación de la tecnología de ADN recombinante, en la cual los cambios en la estructura de la proteína se pueden realizar por ingeniería, basada en consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se intercambian. Los cambios diseñados por el hombre
15 se pueden introducir a través de la aplicación de las técnicas de mutagénesis dirigidas a sitio o se pueden introducir al azar e investigar más tarde para la función deseada, tal como se describe a continuación.

B. Sondas y Cebadores de Oligonucleótidos

Naturalmente, la presente invención también abarca segmentos de ADN que son complementarios, o esencialmente complementarios, a la secuencia expuesta en las Figs. 6 y 9. Las secuencias de ácido nucleico que son
20 “complementarias” a aquellas que son capaces de emparejarse a las base de acuerdo con las reglas de complementariedad estándar de Watson-Crick. Tal como se usa en la presente memoria, el término “secuencias complementarias” quiere decir secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente complementarias, ya que se pueden valorar mediante la misma comparación de nucleótido anteriormente expuesto, o tan definido como ser capaz de hibridar con el segmento de ácido nucleico de las Figs. 6 y 9 bajo condiciones relativamente estrictas tales
25 como las descritas en la presente memoria.

Alternativamente, los segmentos de hibridación pueden ser oligonucleótidos de 10 a 50 bases consecutivas del ácido nucleico de la invención en el que dicho ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos del exón E. Las secuencias de 17 bases de longitud deberían ocurrir solamente una vez en el genoma humano y, por lo tanto, ser
30 suficiente para especificar una secuencia diana única. Aunque oligómeros más cortos son más fáciles de realizar e incrementar *in vivo* la accesibilidad, numerosos otros factores están implicados en la determinación de la especificidad de la hibridación. Tanto la afinidad de unión como la especificidad de secuencia de un oligonucleótido a su diana complementaria aumentan con el aumento de la longitud. Se contempla que se usarán los oligonucleótidos ilustrativos de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50. También se describen polinucleótidos más largos que codifican 250, 500, 1.000, 1.212, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000 ó 3.431 bases
35 y más largos. Tales oligonucleótidos encontrarán uso, por ejemplo, como sondas en las transferencias Southern y Northern y como cebadores en reacciones de amplificación.

Las condiciones de hibridación adecuadas serán bien conocidas por los expertos en la técnica. En ciertas aplicaciones, por ejemplo, sustitución de aminoácidos mediante mutagénesis dirigida a sitio, se aprecia que se requieren condiciones de inferior rigor. Bajo estas condiciones, la hibridación puede ocurrir aún cuando las
40 secuencias de sonda y la cadena diana no sean perfectamente complementarias, pero estén mal emparejadas en

una o más posiciones. Las condiciones pueden resultar menos rigurosas mediante el incremento de la concentración de sal y la disminución de la temperatura. Por ejemplo, una condición de rigor medio se podría proporcionar mediante NaCl aproximadamente 0,1 a 0,25 M a temperaturas de aproximadamente 37°C a aproximadamente 55°C, mientras que una condición de rigor bajo se podría proporcionar mediante sal aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M, a temperaturas que oscilan entre aproximadamente 20°C a aproximadamente 55°C. Por tanto, las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente, y así generalmente será un método de elección que depende de los resultados deseados.

En otras realizaciones, se puede alcanzar la hibridación bajo condiciones de, por ejemplo, Tris-HCl 50mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotretitol 10 mM, a temperaturas entre aproximadamente 20°C a aproximadamente 37°C. Otras condiciones de hibridación utilizadas podrían incluir aproximadamente Tris HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 15 µM, a temperaturas que oscilan desde aproximadamente 40°C a aproximadamente 72°C. También se pueden usar formamida y SDS para alterar las condiciones de hibridación.

Un método de uso de las sondas y cebadores está en la investigación de genes relacionados con TS10q23.3 o, más particularmente, homólogos de TS10q23.3 de otras especies. La existencia de un homólogo de murine fuertemente sugiere que otros homólogos del TS10q23.3 humano se descubrirán en especies más estrechamente relacionadas, y quizás más remotas, que ratón. Normalmente, el ADN diana será una biblioteca genómica o de ADNc, aunque la investigación puede implicar el análisis de moléculas de ARN. Al variar el rigor de la hibridación, y la región de la sonda, se pueden descubrir diferentes niveles de homología.

Otro modo de explotar las sondas y cebadores es en mutagénesis dirigida a sitio o específica de sitio. La mutagénesis específica de sitio es una técnica útil en la preparación de péptidos individuales, o péptidos o proteínas equivalentes biológicamente funcionales, a través de mutagénesis específica del ADN subyacente. La técnica proporciona además una capacidad lista para preparar y ensayar variantes de la secuencia, incorporando una o más de las consideraciones anteriores, mediante la introducción de uno o más cambios de secuencia de nucleótidos dentro del ADN. La mutagénesis específica a sitio permite la producción de mutantes a través del uso de las secuencias específicas de oligonucleótidos que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia cebador de tamaño suficiente y complejidad de secuencia para formar un dúplex estable en ambos lados de la junta de delección a atravesar. Típicamente, se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, con aproximadamente 5 a 10 residuos en ambos lados de la junta de la secuencia a alterar.

La técnica típicamente emplea un vector bacteriófago que existe tanto en forma de una cadena sencilla como doble cadena. Típicamente los vectores útiles en la mutagénesis dirigida a sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos vectores de fago están comercialmente disponibles y su uso generalmente es bien conocido por los expertos en la técnica. También se emplean de forma rutinaria en la mutagénesis dirigida a sitio los plásmidos de doble cadena, lo cual elimina la etapa de transferencia del gen de interés de un fago a un plásmido.

En general, la mutagénesis dirigida a sitio se realiza mediante la primera obtención de un vector de cadena sencilla, o la fusión de dos cadenas de un vector de doble cadena que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica la proteína deseada. Sintéticamente se prepara un cebador de oligonucleótido que soporta la secuencia mutada deseada. A continuación, este cebador se alineó con la preparación de ADN de cadena sencilla, tomando en cuenta el nivel de error de emparejamiento cuando se seleccionan las condiciones de hibridación, y se somete a enzimas de polimerización de ADN tal como el fragmento Klenow de polimerasa I de *E. coli*, para completar la síntesis de la cadena que soporta la mutación. Por tanto, se forma un heterodúplex en el que una cadena codifica la secuencia no mutada original y la segunda cadena soporta la mutación deseada. Este vector heterodúplex a continuación se usa para transformar las células apropiadas, tales como las células de *E. coli*, y los clones se seleccionan de modo que incluyan vectores recombinantes que soportan la disposición de la secuencia mutada.

La preparación de las variantes de secuencia del gen seleccionado que usa la mutagénesis dirigida a sitio se proporciona como un medio de producción de especies potencialmente útiles y no se supone que es limitante, ya que hay otras formas en las cuales se puede obtener las variantes de secuencia de los genes. Por ejemplo, se puede tratar los vectores recombinantes que codifican el gen deseado con agentes mutágenos, tal como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia.

C. Construcciones Antisentido

En algunos casos, los supresores de tumor mutantes no pueden ser no-funcionales. Más bien, pueden tener funciones aberrantes que no se pueden superar mediante terapia genética de reemplazamiento, incluso si la molécula "de tipo natural" se expresa en cantidades por encima del polipéptido mutante. El tratamiento antisentido es una forma de dirigir esta situación. La tecnología antisentido también se puede usar para la función "knockout" de TS10q23.3 en el desarrollo de líneas celulares o ratones transgénicos para los propósitos de estudio, diagnóstico e investigación.

La metodología antisentido toma ventaja del hecho de que los ácidos nucleicos tienden a emparejarse con secuencias "complementarias". Por complementario, se quiere decir polinucleótidos que son capaces de

emparejamiento de base de acuerdo con las reglas de complementariedad estándar de Watson-Crick. Es decir, que las purinas más grandes se emparejarán por base con las pirimidinas más pequeñas para formar combinaciones de guanina emparejada con citosina (G:C) y adenina emparejada con o bien timina (A:T) en el caso de ADN, o adenina emparejada con uracilo (A:U) en el caso de ARN. La inclusión de bases menos comunes tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras en las secuencias de hibridación no interfiere con el emparejamiento.

El direccionamiento del ADN de doble cadena (dc) con polinucleótidos conduce a la formación de triple hélice; el direccionamiento de ARN conducirá a la formación de doble hélice. Los polinucleótidos antisentido, cuando se introducen en una célula diana, específicamente se unen a su polinucleótido diana e interfiere con la transcripción, procesamiento de ARN, transporte, traducción y/o estabilidad. Las construcciones de ARN antisentido, o ADN que codifica tales ARNs antisentido, se pueden emplear para inhibir la transcripción o traducción del gen o ambas dentro de una célula hospedante, o bien *in vitro* o *in vivo*, tal como dentro de un animal hospedante, incluyendo un sujeto humano.

Las construcciones antisentido pueden estar diseñadas para unirse al promotor y a otras regiones control, exones, intrones o incluso límites exón-intrón de un gen. Se contempla que las construcciones antisentido más eficaces incluirán regiones complementarias a juntas de corte y empalme intrón/exón. Por tanto, se propone que una realización preferida incluye una construcción antisentido con complementariedad a regiones dentro de 50-200 bases de una junta de corte y empalme intrón-exón. Se ha observado que algunas secuencias exón pueden estar incluidas en la construcción sin afectar seriamente la propia selectividad de la diana. La cantidad de material exónico incluido variará dependiendo de las secuencias exón e intrón particulares usadas. Se puede fácilmente ensayar si demasiado ADN exón está incluido simplemente ensayando las construcciones *in vitro* para determinar si la función celular normal está afectada o si la expresión de genes relacionados que tienen secuencias complementarias está afectada.

Tal como se ha planteado anteriormente, "complementario" o "antisentido" quiere decir secuencias de polinucleótidos que son sustancialmente complementarias sobre su longitud entera y tienen muy pocos errores de emparejamientos de base. Por ejemplo, secuencias de quince bases de longitud se pueden calificar complementarias cuando tienen nucleótidos complementarios en trece o catorce posiciones. Naturalmente, las secuencias que son completamente complementarias serán secuencias que son enteramente complementarias por toda su longitud entera y no tienen malos emparejamientos de base. También se contemplan otras secuencias con niveles inferiores de homología. Por ejemplo, se podría diseñar una construcción antisentido que ha limitado regiones de alta homología, pero también contiene una región no homóloga (por ejemplo, ribozima, véase a continuación). Estas moléculas, aunque teniendo menos del 50% de homología, se unirían a secuencias diana bajo condiciones apropiadas.

Puede ser ventajoso combinar porciones de ADN genómico con ADNc o secuencias sintéticas para generar construcciones específicas. Por ejemplo, si se desea un intrón en la construcción final, se necesitará usar un clon genómico. El ADNc o un polinucleótido sintetizado pueden proporcionar sitios de restricción más conveniente para la porción restante de la construcción, por lo tanto, se usaría para el resto de la secuencia.

D. Ribozimas

Otro enfoque para dirigir el supresor de tumor mutante "dominante negativo" es a través del uso de ribozimas. Aunque tradicionalmente las proteínas se han usado para catálisis de ácidos nucleicos, han surgido otra clase de macromoléculas útiles en este intento. Los ribozimas son complejos ARN-proteína que escinden ácidos nucleicos de un modo específico a sitio. Los ribozimas tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad endonucleasa (Kim y Cook, 1987; Gerlach et al., 1987; Forster y Simons, 1987). Por ejemplo, un gran número de ribozimas aceleran las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto nivel de especificidad, sometiendo a escisión con frecuencia solamente a uno de los varios fosfoésteres en un sustrato de oligonucleótido (Cook et al., 1981; Michael y Westhof, 1990; Reinhold-Hurek y Shub, 1992). Esta especificidad se ha atribuido al requerimiento de que el sustrato se une vía interacciones de emparejamiento de base específicas a la secuencia guía interna ("IGS", del Inglés "Internal Guide Sequence") de la ribozima antes de la reacción química.

La catálisis de ribozima principalmente se ha observado como parte de reacciones de escisión/ligación específicas a secuencia que implican los ácidos nucleicos (Joyce, 1989; Cook et al., 1981). Por ejemplo, el documento de Patente U.S. N° 5.354.855 informa que ciertas ribozimas pueden actuar como endonucleasas con una especificidad de secuencia mayor que la de las ribonucleasas conocidas y el enfoque de las enzimas de restricción de ADN. Por tanto, la inhibición mediada por ribozima específica a secuencia de la expresión de gen particularmente puede ser adecuada para las aplicaciones terapéuticas (Scalon et al., 1991; Sarver et al., 1990). Recientemente, se informó que las ribozimas provocaban cambios genéticos en algunas líneas celulares a las cuales se aplicaron; los genes alterados incluían los oncogenes H-ras, c-fos y genes de VIH. La mayoría de este trabajo implicaba la modificación de un ARNm diana, basado en un codón mutante específico que se escinde mediante una ribozima específica.

E. Vectores para la Clonación, Transferencia y Expresión del Gen

Dentro de ciertas realizaciones se emplearon vectores de expresión para expresar el producto de polipéptido TS10q23.3, el cual a continuación se puede purificar y, por ejemplo, usarse para vacunar animales para generar antisueros o anticuerpo monoclonal con el cual se pueden conducir estudios adicionales. En otras realizaciones, los vectores de expresión se pueden usar en terapia de gen. La expresión requiere que se proporcionen señales adecuadas en los vectores, y que incluyan diversos elementos regulatorios, tales como potenciadores/promotores a partir tanto de fuentes víricas como mamíferas que conducen la expresión de los genes de interés en las células hospedantes. También se definen elementos diseñados para optimizar la estabilidad y la capacidad de traducción del ARN mensajero en las células hospedantes. También se proporcionan las condiciones para el uso de un número de marcadores de selección de fármaco dominantes para establecer clones celulares permanentes y estables que expresan los productos, ya que es un elemento que relaciona la expresión de los marcadores de selección de fármaco con la expresión del polipéptido.

(i) Elementos Reguladores

A lo largo de toda esta solicitud, el término "construcción de expresión" se supone que incluye cualquier tipo de construcción genética que contenga un ácido nucleico que codifique un producto de gen en el cual parte o toda la secuencia codificadora de ácido nucleico es capaz de ser transcrita. El transcrito se puede someter a traducción en una proteína, pero no es necesario. En ciertas realizaciones, la expresión incluye tanto transcripción de un gen como traducción de ARNm en un producto de gen. En otras realizaciones, la expresión solamente incluye transcripción del ácido nucleico que codifica un gen de interés.

En realizaciones preferidas, el ácido nucleico que codifica un producto de gen está bajo control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocido por la maquinaria sintética de la célula, o la maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. La frase "bajo control transcripcional" quiere decir que el promotor está en la localización y orientación correcta en relación con el ácido nucleico para controlar la iniciación de la ARN polimerasa y la expresión del gen.

El término promotor se usará en la presente memoria para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que se agrupan alrededor del sitio de iniciación para la ARN polimerasa II. La mayoría de las creencias sobre cómo los promotores se organizan deriva de los análisis de diversos promotores víricos, que incluyen aquellos para la timidina quinasa (tk) de HSV y las unidades de transcripción temprana de SV40. Estos estudios, aumentados por trabajos más recientes, han mostrado que los promotores están compuestos de módulos funcionales discretos, consistiendo cada uno de aproximadamente 7-20 pb de ADN, y conteniendo uno o más sitios de reconocimiento para el activador transcripcional o las proteínas represoras.

Al menos un módulo en cada promotor funciona para localizar el sitio de comienzo para la síntesis de ARN. El mejor ejemplo conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, tal como el promotor para el gen de deoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que recubre el sitio de comienzo propio ayuda a fijar el lugar de iniciación.

Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de la iniciación transcripcional. Típicamente, estos están localizados en la región en dirección 5' ("upstream") de 30-110 pb del sitio de comienzo, aunque se ha mostrado también recientemente que un número de promotores contienen elementos funcionales en dirección 3' ("downstream") del sitio de comienzo. El espacio entre los elementos promotor frecuentemente es flexible, de manera que la función del promotor se preserva cuando los elementos se invierten o mueven relativos a otro. En el promotor tk, el espacio entre elementos promotor se puede aumentar en 50 pb antes de que la actividad empiece a declinar. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar o bien de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción.

No se cree que el promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés sea importante, siempre que sea capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en la célula diana. Por tanto, donde una célula humana es seleccionada como diana, es preferible colocar la región codificadora de ácido nucleico adyacente a y debajo del control de un promotor que sea capaz de ser expresado en una célula humana. Generalmente hablando, tal promotor debería incluir o bien un promotor humano o vírico.

En diversas realizaciones, se pueden usar el promotor de gen temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) humano, el promotor temprano de SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el promotor de insulina de rata y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa para obtener expresión de alto nivel de la secuencia codificadora de interés. También se contempla el uso de otros promotores celulares de mamífero o celulares víricos o de fago bacteriano los cuales son bien conocidos en la técnica para alcanzar la expresión de una secuencia codificadora de interés, proporcionó que los niveles de expresión sean suficientes para un propósito dado.

Al emplear un promotor con propiedades bien conocidas, se puede optimizar el nivel y modelo de expresión de la proteína de interés seguido de la transfección o transformación. Además, la selección de un promotor que se regula en respuesta a señales fisiológicas específicas puede permitir la expresión inducible del producto de gen. Las Tablas 2 y 3 enumeran varios elementos/promotores que se pueden emplear, en el contexto de la presente invención, para

regular la expresión del gen de interés. Esta lista no intenta ser exhaustiva de todos los posibles elementos implicados en el ascenso de la expresión del gen, pero, simplemente, ser ilustrativa de los mismos.

Los potenciadores son elementos genéticos que incrementan la transcripción a partir de un promotor localizado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Los potenciadores se organizan muy parecidos a los promotores. Es decir, están compuestos de muchos elementos individuales, cada uno de los cuales se unen a una o más proteínas transcripcionales.

La distinción básica entre potenciadores y promotores es operacional. Una región potenciadora como un todo debe ser capaz de estimular la transcripción en una distancia, esto no necesita ser cierto para una región promotor o sus elementos componentes. Por otro lado, un promotor debe tener uno o más elementos que dirijan la iniciación de la síntesis de ARN en un sitio particular y en una orientación particular, mientras que los potenciadores carecen de estos sitios específicos. Los promotores y los potenciadores con frecuencia están solapados y son contiguos, pareciendo con frecuencia tener una organización modular muy similar.

A continuación hay una lista de promotores víricos, promotores/potenciadores celulares y promotores/potenciadores inducibles que podrían usarse en combinación con el ácido nucleico que codifica un gen de interés en una construcción de expresión (Tabla 2 y Tabla 3). Adicionalmente, también se podría usar cualquier combinación promotor/potenciador (tal como por la Base de Datos de Promotor Eucariota EPDB, del Inglés "Eukaryotic Promoter Data Base") para conducir la expresión del gen. Las células eucariotas pueden soportar transcripción citoplasmática a partir de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasas bacteriana apropiada, o bien como parte del complejo de liberación o como una construcción de expresión genética adicional.

TABLA 2

POTENCIADOR/PROMOTOR
Cadena Pesada de Inmunoglobulina
Cadena Ligera de Inmunoglobulina
Receptor de Célula T
HLA DQ α y DQ β
β -Interferón
Interleukina-2
Receptor de Interleukina-2
MHC Clase II 5
MHC Clase II HLA-DR α
β -Actina
Quinasa de Creatina de Músculo
Prealbumina (Transtiretin)
Elastasa I
Metalotioneina
Colagenasa
Gen de Albumina
α -Fetoproteína
τ -Globina
β -Globina
e-fos
c-HAS-ras
Insulina
Molécula de Adhesión Celular Neural (NCAM, del Inglés "Neural Cell Adhesion Molecule")
α 1-Antitripsina

POTENCIADOR/PROMOTOR
H2B(THZB) Histona
Colágeno de Ratón o Tipo I
Proteínas Reguladas por Glucosa (GRP94 y GRP78)
Hormona de Crecimiento de Rata
Amiloide A de Suero Humano (SAA, del Inglés "Serum Amyloid A")
Troponina I (TNI)
Factor de Crecimiento Derivado de Plaqueta
Distrofia Muscular Duchenne
SV40
Polioma
Retrovirus
Virus del Papiloma
Virus de Hepatitis B
Virus de la Inmunodeficiencia Humana
Citomegalovirus
Virus de Leucemia de Simio Gibón

TABLA 3

Elemento	Inductor
MT II	Metales pesados de Éster de Forbol
MMTV ("House Mammary Tumor Virus")(virus de tumor mamario de ratón)	Glucocorticoides
13-Interferón	Poli(rl)X Poli(rc)
Adenovirus 5 E2	Ela
c-jun	Éster de Forbol (TPA), H2O2
Colagenasa	Éster de Forbol (TPA)
Estromelisina	Éster de Forbol (TPA), IL-1
SV40	Éster de Forbol (TPA)
Gen MX Murine	Interferón, Virus de Enfermedad de Newcastle
Gen GRP78	A23187
α -2-Macroglobulina	IL-6
Vimeatina	Suero
Gen H2KB de Clase I MHC	Interferón
HSP70	Ela, Antígeno T largo de SV40
Proliferina	Éster de Forbol-TPA
Factor de Necrosis Tumoral	FMA
Gen de la Hormona α Estimuladora de Tiroides	Hormona de Tiroides
Caja de Insulina E	Glucosa

Si se emplea un inserto de ADNc, típicamente se deseará incluir una señal de poliadenilación para efectuar la apropiada poliadenilación del transcrito del gen. Se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación es crucial para la exitosa práctica de la invención, y se puede emplear cualquiera de tales secuencias tales como las señales de la hormona de crecimiento humana y de poliadenilación de SV40. También se contempla un terminador como un elemento del casete de expresión. Estos elementos pueden servir para aumentar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura a través del casete dentro de otras secuencias

(ii) Marcadores Seleccionables

En ciertas realizaciones de la invención, las células contienen las construcciones de ácido nucleico de la presente invención, una célula se puede identificar *in vitro* o *in vivo* al incluir un marcador en la construcción de expresión. Tales marcadores conferirían un cambio identificable a la célula que permite la fácil identificación de células que contienen la construcción de expresión. Normalmente la inclusión de un marcador de selección de fármaco ayuda en la clonación y en la selección de transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Alternativamente, se pueden emplear enzimas tales como la timidin quinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). También se pueden emplear marcadores inmunológicos. No se cree que el marcador seleccionable empleado sea importante, siempre que sea capaz de ser expresado simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto de gen. Ejemplos adicionales de marcadores seleccionables son bien conocidos por los expertos en la técnica

(iii) Construcciones Multigen e IRES

En ciertas realizaciones de la invención, el uso de elementos de sitios de unión a ribosoma internos (IRES, del Inglés "Internal Ribosome Entry Sites") se usa para crear mensajes multigen, o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de eludir el modelo de escaneado de ribosoma de la traducción dependiente de Cap metilado 5' y la traducción del empuje en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito (Pelletier y Sonenberg, 1988) elementos IRES a partir de dos miembros de la familia de los picanovirus (polio y encefalomiocarditis), así como IRES a partir de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES se pueden enlazar a marcos de lectura abierta heterólogos. Los marcos de lectura abierta múltiples se pueden transcribir juntos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierta es accesible a ribosomas para la traducción eficiente. Los genes múltiples se puede expresar eficientemente usando un promotor/potenciador sencillo para transcribir un mensaje sencillo.

Cualquier marco de lectura abierta heterólogo se puede enlazar a los elementos IRES. Esto incluye genes para proteínas secretadas, proteínas multi-subunidad, codificadas por genes independientes, proteínas unidas a membrana o intracelulares y marcadores seleccionables. De esta forma, se puede producir simultáneamente por ingeniería diversas proteínas dentro de una célula con una construcción sencilla y un marcador seleccionable sencillo.

(iv) Liberación de Vectores de Expresión

Hay una serie de formas por las cuales se pueden introducir vectores de expresión dentro de las células. Construcciones de expresión pueden comprender un virus o una construcción producida por ingeniería derivada de un genoma vírico. La capacidad de ciertos virus para entrar en las células vía endocitosis mediada por receptor, para integrarse dentro del genoma celular hospedante y expresar genes víricos establemente y eficientemente los han hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños dentro de las células mamíferas (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubenstein, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Temin, 1986). Los primeros virus usados como vectores de gen fueron los virus de ADN que incluyen los papovavirus (virus de simio 40, virus del papiloma bovino y poliovirus)(Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y adenovirus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986). Estos tienen una capacidad relativamente baja para las secuencias extrañas de ADN y tienen un espectro hospedante restringido. Además, sus efectos citopáticos y potenciales oncogénicos en las células permisivas elevan los asuntos de seguridad. Pueden acomodar solamente hasta 8 kb de material genético extraño pero se pueden introducir fácilmente en una diversidad de líneas celulares y animales de laboratorio (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986).

Uno de los métodos preferidos para la liberación *in vivo* implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. "Vector de expresión de adenovirus" se supone que incluye aquellas construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento de la construcción y (b) para expresar un polinucleótido antisentido que se ha clonado en el mismo. En este contexto, la expresión no requiere que se sintetice el producto de gen.

El vector de expresión comprende una forma de adenovirus producida por ingeniería genética. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN de doble cadena, lineal y de 36 kb, permite la sustitución de piezas largas del ADN adenovírico con secuencias extrañas hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992). A diferencia del retrovirus, la infección adenovírica de las células hospedantes no da como resultado integración cromosómica porque el ADN adenovírico puede replicarse de una manera episomal sin genotoxicidad potencial. Además, los

adenovirus son estructuralmente estables, y se ha detectado no reorganización del genoma después de la extensa amplificación. El adenovirus puede infectar prácticamente todas las células epiteliales a pesar de su fase del ciclo celular. Hasta ahora, la infección adenovírica parece estar relacionada solamente con enfermedades leves tales como enfermedad respiratoria aguda en humanos.

5 El adenovirus es particularmente adecuado para usarse como vector de transferencia de gen debido a su genoma de medio tamaño, facilidad de manipulación, alto título ("titer"), amplio intervalo de célula diana y alta capacidad de infección. Ambos extremos del genoma vírico contienen repeticiones invertidas (ITRs, del Inglés "Inverted Repeats") de 100-200 pares de bases, las cuales son elementos *cis* necesarios para la replicación y empaquetamiento del ADN. Las regiones tempranas (E, del Inglés "Early") y tardías (L, del Inglés "Late") del genoma
10 contienen diferentes unidades de transcripción que se dividen mediante el comienzo de la replicación de ADN vírico. La región E1 (E1A y E1B) codifica proteínas responsables para la regulación de la transcripción del genoma vírico y pocos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B) da como resultado la síntesis de las proteínas para la replicación del ADN vírico. Estas proteínas están implicadas en la replicación de ADN, la expresión del gen tardío y cierre de la célula hospedante (Renan, 1990). Los productos de los genes tardíos, que incluyen la mayoría de las
15 proteínas de la cápsida vírica, se expresan solamente después del procesamiento significativo de un transcrito primario único emitido por el promotor tardío principal (MLP, del Inglés "Major Late Promoter"). El MLP, (localizado en 16.8 m.u.) es particularmente eficaz durante la fase tardía de la infección, y todo el ARNm's emitido a partir de este promotor posee una secuencia líder tripartita 5' (TPL, del Inglés "Tripartite Leader") que los convierte en ARNm's preferidos para la traducción.

20 En un sistema actual, se genera adenovirus recombinantes a partir de recombinación homóloga entre el vector lanzadera y el vector provirus. Debido a la posible recombinación entre dos vectores províricos, se puede generar el adenovirus de tipo natural a partir de este proceso. Por lo tanto, es crítico aislar un clon sencillo del virus a partir de una placa individual y examinar su estructura genómica.

La generación y propagación de los actuales vectores de adenovirus, los cuales son deficientes en la replicación,
25 depende de una única línea celular ayudante, designada 293, que se transforma a partir de células de riñón embrionarias humanas mediante fragmentos de ADN de Ad5 y expresa constitutivamente proteínas E1 (Graham et al., 1977). Puesto que la región E3 es prescindible a partir del genoma de adenovirus (Jones y Shenk, 1978), los vectores de adenovirus actuales, con la ayuda de las células 293, llevan ADN extraño en cualquiera de las regiones E1, D3 o ambas (Graham y Prevec, 1991). En la naturaleza, el adenovirus puede empaquetarse aproximadamente
30 al 105% del genoma del tipo natural (Ghosh-Choudhury et al., 1987), proporcionando la capacidad para aproximadamente 2 extra kb de ADN combinado con los aproximadamente 5,5 kb de ADN que es reemplazable en las regiones E1 y E3, la capacidad máxima del actual vector de adenovirus está por debajo de 7,5 kb, o aproximadamente 15% de la longitud total del vector. Más del 80% del genoma vírico del adenovirus permanece en la cadena principal del vector y es la fuente de la citotoxicidad aguantada por el vector. Además, la deficiencia de
35 replicación del virus deletado por E1 es incompleta. Por ejemplo, se ha observado la unión de la expresión del gen vírico con los vectores actualmente disponibles en altas multiplicidades de la infección (MOI, del Inglés "Multiplicities of Infection") (Mulligan, 1993).

Las líneas celulares ayudantes pueden derivarse de las células humanas tales como células de riñón embrionarias humanas, células musculares, células hematopoyéticas u otras células mesenquimales o epiteliales embrionarias humanas. Alternativamente, las células ayudantes pueden derivarse de las células de otras especies mamíferas que
40 son permisivas para los adenovirus humanos. Tales células incluyen, por ejemplo, células Vero u otras células mesenquimales o epiteliales embrionarias de mono. Tal como se ha planteado anteriormente, la línea de célula ayudante preferida es 293.

Recientemente, Racher et al., (1995) describió métodos mejorados para el cultivo de células 293 y la propagación de
45 adenovirus. En un formato, los agregados celulares naturales se hacen crecer mediante inoculación de células individuales en matraces de centrifugadora silicizados de 1 litro (Techne, Cambridge, UK) que contienen 100-200 ml de medio. Después de agitación a 40 rpm, la viabilidad de la célula se estima con azul de trypan. En otro formato, se emplea microvehículos de Fibra-Cel (Bibby Sterlin, Stone, UK) (5g/l) tal como sigue. Se añade un inóculo de célula, en resuspensión en 5 ml de medio, al vehículo (50 ml) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se deja reposar,
50 con agitación ocasional, durante 1 a 4 h. A continuación, se reemplaza el medio con 50 ml de medio fresco y se inicia la agitación. Para la producción de virus, las células se dejan crecer al 80% aproximadamente de confluencia, después de dicho tiempo el medio se reemplaza (al 25% del volumen final) y se añade el adenovirus a un MOI de 0,05. Los cultivos se dejan reposar durante toda la noche, después de lo cual se aumenta el volumen al 100% y se comienza la agitación durante otras 72 h.

Además del requerimiento de que el vector de adenovirus sea defectuoso en replicación, o al menos
55 condicionalmente defectuoso, se cree que la naturaleza del vector de adenovirus es crucial para la práctica exitosa de la invención. El adenovirus puede ser de cualquiera de los 42 serotipos diferentes conocidos o subgrupos A-F. El adenovirus tipo 5 del subgrupo C es el material de comience preferido para obtener el vector de adenovirus defectuoso en replicación condicional para usar en la presente invención. Esto es debido a que el Adenovirus tipo 5
60 es un adenovirus humano sobre el cual se conoce mucha información bioquímica y genética, e históricamente se ha usado para la mayoría de construcciones que emplean adenovirus como vector.

Tal como se ha planteado anteriormente, el vector típico de acuerdo con la presente descripción es defectuoso en replicación y no tendrá una región E1 de adenovirus. Por tanto, lo más conveniente será introducir el polinucleótido que codifica el gen de interés en la posición a partir de la cual se han separado las secuencias que codifican E1. Sin embargo, la posición de la inserción de la construcción dentro de las secuencias de adenovirus no es crítica para la invención. También se puede insertar el polinucleótido que codifica el gen de interés en vez de la región E3 delecionada en vectores de reemplazamiento de E3 como los descritos por Karlsson et al., (1986) o en la región E4 donde una línea celular ayudante o virus ayudante complementa el defecto de E4.

El adenovirus es fácil de hacer crecer y manipular y presenta amplio intervalo hospedante *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus se puede obtener en altos títulos, por ejemplo, 10^9 - 10^{11} unidades formadoras de placa por ml, y son altamente infecciosos. El ciclo de vida de los adenovirus no requiere integración dentro del genoma de la célula hospedante. Los genes extraños liberados por vectores de adenovirus son episomales y, por lo tanto, tienen baja genotoxicidad para las células hospedantes. Se ha informado de no efectos secundarios en estudios de vacunación con adenovirus tipo natural (Couch et al., 1963; Top et al., 1971), demostrando su seguridad y potencial terapéutico como vectores de transferencia de gen *in vivo*.

Los vectores de adenovirus se han usado en expresión de gen eucariota (Levrero et al., 1991; Gomez-Foix et al., 1992) y desarrollo de vacuna (Grunhaus y Horwitz, 1992; Graham y Prevec, 1992). Recientemente, estudios animales sugieren que los adenovirus recombinantes se podrían usar para terapia de gen (Stratford-Perricaudet y Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet et al., 1990; Rich et al., 1993). Los estudios en la administración de adenovirus recombinante a diferentes tejidos incluyen instilación de tráquea (Rosenfeld et al., 1991; Rosenfeld et al., 1992), inyección muscular (Ragot et al., 1993), inyecciones intravenosas periféricas (Herz y Gerard, 1993) e inoculación estereotáctica dentro del cerebro (Le Gal La Salle et al., 1993).

Los retrovirus son un grupo de virus de ARN de cadena sencilla caracterizados por una capacidad para convertir su ARN a ADN de doble cadena en células infectadas por un proceso de transcripción inversa (Coffin, 1990). Entonces, el ADN resultante se integra establemente dentro de los cromosomas celulares como un provirus y dirige la síntesis de proteínas víricas. La integración da como resultado la retención de las secuencias del gen vírico en la célula recipiente y sus descendientes. El genoma retroviral contiene tres genes, gag, pol y env que codifican las proteínas de la cápsida, la enzima polimerasa y los componentes de la envoltura, respectivamente. Una secuencia encontrada en dirección 5' desde el gen gag contiene una señal para empaquetar el genoma dentro de viriones. Dos secuencias de repetición terminal larga (LTR, del Inglés "Long Terminal Repeat") están presentes en los extremos 5' y 3' del genoma vírico. Estas contienen fuertes secuencias promotor y potenciador y también se requieren para la integración en el genoma celular hospedante (Coffin, 1990).

Para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico que codifica un gen de interés dentro del genoma vírico en el lugar de ciertas secuencias víricas para producir un virus que sea defectuoso en replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular empaquetadora que contiene los genes gag, pol y env pero sin los componentes de empaquetamiento y LTR (Mann et al., 1983). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con las secuencias LTR y de empaquetamiento retrovirales en esta línea celular (por ejemplo mediante precipitación de fosfato de calcio), la secuencia de empaquetamiento permite la transcripción de ARN del plásmido recombinante a empaquetar dentro de las partículas víricas, las cuales a continuación se secretan dentro de los medios de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). A continuación, se recoge los medios que contienen los retrovirus recombinantes, opcionalmente se concentran, y se usan para transferir gen. Los vectores retrovirales son capaces de infectar una amplia diversidad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de las células hospedantes (Paskind et al., 1975).

Recientemente se desarrolló un enfoque novedoso diseñado para permitir el direccionamiento específico de los vectores de retrovirus basado en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de residuos de lactosa a la envoltura vírica. Esta modificación podría permitir la infección específica de hepatocitos vía receptores de sialoglicoproteína.

Se diseñó un enfoque diferente para el direccionamiento de retrovirus recombinantes en el cual se usaron anticuerpos biotinilados frente a una proteína de la envoltura retroviral y frente a un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron vía los componentes de biotina mediante el uso de estreptavidina (Roux et al., 1989). Usando anticuerpos frente a los muy importantes antígenos de clase I y clase II del complejo de histocompatibilidad, demostraron la infección de una diversidad de células humanas que soportaban aquellos antígenos de superficie con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux et al., 1989).

Hay ciertas limitaciones para el uso de vectores de retrovirus en todos los aspectos de la presente invención. Por ejemplo, los vectores de retrovirus normalmente se integran dentro de los sitios al azar en el genoma celular. Esto puede conducir a mutagénesis insercional a través de la interrupción de los genes hospedantes o a través de la inserción de secuencias reguladoras víricas que pueden interferir con la función de los genes flanqueantes (Varmus et al., 1981). Otro asunto con el uso de los vectores de retrovirus defectuosos es la apariencia potencial del virus componente de replicación de tipo natural en las células de empaquetamiento. Esto puede dar como resultado los sucesos de recombinación en los cuales la secuencia intacta de los virus recombinantes se inserta en dirección 5' a partir de la secuencia gag, pol, env integrada en el genoma de la célula hospedante. Sin embargo, las nuevas líneas

celulares de empaquetamiento en realidad están disponibles de modo que deberían disminuir mayormente la similitud de recombinación (Markowitz et al., 1988; Hersdorffer et al., 1990).

Se pueden emplear otros vectores víricos como construcciones de expresión en la presente invención. Se pueden emplear vectores derivados de virus tales como el virus vaccinia (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar et al., 1988) virus adenoasociados (AAV, del Inglés "Adeno-associated Virus") (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984) y herpesvirus. Ofrecen varios rasgos atractivos para diversas células mamíferas (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990).

Con el reciente reconocimiento de los virus defectuosos de la hepatitis B, el nuevo entendimiento se ganó dentro de la relación función-estructura de diferentes secuencias víricas. Estudios *in vitro* mostraron que los virus podrían retener la capacidad para el empaquetamiento dependiente de ayudante y la transcripción inversa a pesar de la delección de hasta 80% de su genoma (Horwich et al., 1990). Esto sugiere que grandes porciones del genoma podrían ser reemplazadas con material genético extraño. El hepatotropismo y la persistencia (integración) eran propiedades particularmente atractivas para la transferencia de gen dirigida a riñón. Chang et al. recientemente introdujeron el gen de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) dentro del genoma del virus de hepatitis B de pato en el lugar de las secuencias codificadoras superficiales o presuperficiales de la polimerasa. Se sometieron a cotransfección con virus tipo natural dentro de una línea celular de hepatoma de aves. Se usaron los medios de cultivo que contenían altos títulos de los virus recombinantes para infectar hepatocitos de pato primarios. Se detectó la expresión del gen CAT estable durante al menos 24 días después de la transfección (Chang et al., 1991).

Para efectuar la expresión de las construcciones de gen sentido y antisentido, la construcción de expresión se debe liberar dentro de la célula. Esta liberación se puede conseguir *in vitro*, como en procedimientos de laboratorio para la transformación de líneas celulares, o *in vivo* o *ex vivo*, como en el tratamiento de ciertos estados de enfermedad. Un mecanismo para la liberación es vía infección vírica donde la construcción de expresión es encapsulada en una partícula vírica infecciosa.

Varios métodos no víricos para la transferencia de las construcciones de expresión dentro de las células de mamífero cultivadas también están contemplados por la presente invención. Estos incluyen precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe et al., 1990) DEAE-dextrano (Gopal, 1985), electroporación (Tur-Kaspa et al., 1986; Potter et al., 1984), microinyección directa (Harland y Weintraub, 1985), liposomas cargados de ADN (Nicolau y Sene, 1982; Fraley et al., 1979) y complejos lipofectamina-ADN, sonicación celular (Fechheimer et al., 1987), bombardeamiento de gen usando microproyectiles de alta velocidad (Yang et al., 1990) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988). Algunas de las técnicas se pueden adaptar con éxito para usar *in vivo* o *ex vivo*.

Una vez se haya liberado la construcción de expresión dentro de la célula se puede colocar el ácido nucleico que codifica el gen de interés y expresarse en diferentes sitios. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el gen se puede integrar de manera estable dentro del genoma de la célula. Esta integración puede ser en la localización y orientación cognadas vía recombinación homóloga (reemplazamiento de gen) o se puede integrar en un localización no específica al azar (aumento de gen). En aún más realizaciones el ácido nucleico se puede mantener de manera estable en la célula como un segmento de ADN episomal separado. Tales segmentos de ácido nucleico o "episomas" codifican secuencias suficientes para permitir la permanencia y replicación independiente de o en sincronización con el ciclo celular hospedante. Cómo se libere la construcción de expresión a una célula y dónde se mantenga el ácido nucleico en la célula es dependiente del tipo de construcción de expresión empleada.

La construcción de expresión puede simplemente consistir en ADN recombinante desnudo o plásmidos. Se puede realizar la transferencia de la construcción mediante cualquiera de los métodos anteriormente mencionados los cuales permeabilizan físicamente o químicamente la membrana celular. Esto es particularmente aplicable para transferir *in vitro* pero también se puede aplicar para usar *in vivo*. Dubensky et al. (1984) inyectaron con éxito ADN de poliomavirus en la forma de precipitados de fosfato de calcio dentro de hígado y bazo de ratones adultos o recién nacidos demostrando la replicación vírica activa e infección grave. Benvenisty y Neshif (1986) también demostraron que la inyección intraperitoneal directa de los plásmidos precipitados con fosfato de calcio da como resultado la expresión de los genes transfectados. Se prevé que el ADN codificador de un gen de interés también puede ser transferido de una manera similar *in vivo* y expresar el producto de gen.

En aún otra realización de la invención para la transferencia de una construcción de expresión de ADN desnudo dentro de las células puede implicar bombardeamiento de partícula. Este método depende de la capacidad de acelerar microproyectiles revestidos de ADN a una alta velocidad permitiéndolos perforar las membranas celulares y entrar en las células sin matarlas (Klein et al., 1987). Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar pequeñas partículas. Uno de tales dispositivos depende de una descarga a alto voltaje para generar una corriente eléctrica, la cual por turnos proporciona la fuerza motriz (Yang et al., 1990). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como gotas de tungsteno u oro.

Se han bombardeado *in vivo* órganos seleccionados que incluyen el riñón, la piel y el tejido muscular de ratas y ratones (Yang et al., 1990; Zelenin et al., 1991). Esto puede requerir exposición quirúrgica del tejido o células, para

eliminar cualquier tejido intermedio entre el arma y el órgano diana, es decir, tratamiento *ex vivo*. De nuevo, se puede liberar ADN que codifica un gen particular vía este método.

En una realización adicional de la invención, la construcción de expresión puede ser atrapada en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa de fosfolípido y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelar tienen capas lipídicas múltiples separadas por medio acuoso. Se forman de manera espontánea cuando los lípidos están suspendidos por encima de la solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan auto reorganización antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contemplan los complejos lipofectamina-ADN.

La liberación de ácido nucleico mediada por liposoma y la expresión de ADN extraño *in vitro* ha sido muy exitosa. Wong et al. (1980) demostraron la viabilidad de la liberación mediada por liposoma y la Expresión de ADN extraño en células cultivadas de embrión de pollito, HeLa y hepatoma. Nicolau et al. (1987) consiguieron exitosa transferencia de gen mediada por liposoma en ratas después de la inyección intravenosa.

En ciertas realizaciones de la invención, el liposoma puede estar formado en complejo con un virus de hemaglutinación (HVJ). Esto ha demostrado que facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada celular del ADN encapsulado en liposoma (Kaneda et al., 1989). En otras realizaciones, el liposoma puede estar formado en complejo o emplearse junto con proteínas cromosómicas de no-histidina nuclear (HMG-1)(Kato et al., 1991). En aún más realizaciones, el liposoma se puede formar en complejo o emplear junto con tanto HVJ como HMG-1. En el sentido de que las construcciones de expresión se han empleado con éxito en la transferencia y expresión del ácido nucleico *in vitro* e *in vivo*, entonces son aplicables para la presente invención. Si se emplea un promotor bacteriano en la construcción de ADN, también será deseable incluir dentro del liposoma una polimerasa bacteriana apropiada.

Otros construcciones de expresión que se pueden emplear para liberar un ácido nucleico que codifica un gen particular dentro de las células son los vehículos de liberación mediados por receptor. Estos toman la ventaja de la absorción selectiva de macromoléculas mediante endocitosis mediada por receptor en casi todas las células eucariotas. Debido a la distribución específica a tipo celular de diversos receptores, la liberación puede ser altamente específica (Wu y Wu, 1993).

Los vehículos de direccionamiento de gen mediado por receptor generalmente consisten en dos componentes: un ligando específico a receptor celular y un agente de unión a ADN. Se han usado varios ligandos para la transferencia de gen mediada por receptor. Los ligando más extensamente caracterizados son los asialoorosomucoides (ASOR)(Wu y Wu, 1987) y la transferrina (Wagner et al., 1990). Recientemente, se ha usado una neoglicoproteína sintética, la cual reconoce el mismo receptor que ASOR, como vehículo de liberación de gen (Ferkol et al., 1993; Perales et al., 1994) y también se ha usado factor de crecimiento epidérmico (EGF, del Inglés "Epidermal Growth Factor") para liberar genes a células de carcinoma escamoso (Myers, EPO 0273085).

En otras realizaciones, el vehículo de liberación puede comprender un ligando y un liposoma. Por ejemplo, Nicolau et al. (1987) emplearon lactosil ceramida, un asialgangliosido terminal de galactosa, incorporado dentro de los liposomas y observaron un incremento en la absorción del gen de insulina por los hepatocitos. Por tanto, es viable que un ácido nucleico que codifica un gen particular también pueda ser liberado específicamente dentro de un tipo celular tal como las células pulmonares, epiteliales o tumorales, mediante cualquier número de sistemas receptor-ligando con o sin liposomas. Por ejemplo, se puede usar el factor de crecimiento epidérmico (EGF) como receptor para la liberación mediada de un ácido nucleico que codifica un gen en muchas células tumorales que presentan regulación al alza del receptor de EGF. Se puede usar manosa para identificar el receptor de manosa sobre células de riñón. También, los anticuerpos a CD5 (CLL), CD22 (linfoma), CD25 (leucemia de célula T) y MAA (melanoma) se pueden usar igualmente como restos de direccionamiento.

La transferencia del gen se puede realizar más fácilmente bajo condiciones *ex vivo*. La terapia de gen *ex vivo* se refiere al aislamiento de las células a partir de un animal, la liberación de un ácido nucleico dentro de las células *in vitro*, y a continuación el retorno de las células modificadas de vuelta en un animal. Esto puede implicar la separación quirúrgica de tejidos/órganos de un animal o el cultivo primario de células y tejidos.

Se pueden preparar cultivos celulares de mamífero primarios de diversas formas. Para que las células se mantengan viables mientras *in vitro* y en contacto con la construcción de expresión, es necesario asegurar que las células mantienen contacto con la relación correcta de oxígeno y dióxido de carbono y nutrientes pero están protegidas de la combinación microbiana. Las técnicas de cultivo celular están bien documentadas (Freshner, 1992).

Una realización de lo anterior implica el uso de transferencia de gen para inmortalizar células para la producción de proteínas. Se puede transferir el gen para la proteína de interés tal como se ha descrito anteriormente dentro de las células hospedantes apropiadas seguido de cultivo de células bajo las condiciones apropiadas. De esta manera se puede emplear el gen para prácticamente cualquier polipéptido. La generación de vectores de expresión recombinantes, y los elementos incluidos en la misma, se han discutido anteriormente. Alternativamente, la proteína a producir puede ser una proteína endógena normalmente sintetizada por la célula en cuestión.

Ejemplos de líneas celulares hospedantes de mamífero útiles son las células Vero y HeLa y las líneas celulares de ovario de hámster chino, células W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, NIH3T3, RIN y MDCK. Además, se puede elegir una cepa celular hospedante que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto de gen de la manera deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedantes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traducción y la modificación de las proteínas. Se pueden elegir líneas celulares apropiadas o sistemas hospedantes para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada.

Se pueden usar un número de sistemas de selección que incluyen, pero no se limitan a, genes de timidin quinasa de HSV, fosforibosiltransferasa de hipoxantin-guanina y fosforibosiltransferasa, en células *tk-*, *hgpri-* o *apri-*, respectivamente. Además, se puede usar resistencia antimetabolito como la base de selección para *dhfr*, que confiere resistencia a; *gpt*, que confiere resistencia a ácido micofenólico; *neo*, que confiere resistencia al aminoglicosido G418; y *hygro*, que confiere resistencia a higromicina.

Se pueden propagar células animales *in vitro* de dos modos: como células dependientes de no-anclaje que crecen en suspensión por todo el volumen del cultivo o como células dependientes de anclaje que requieren la unión a un sustrato sólido para su propagación (es decir, un tipo monocapa de crecimiento celular).

Los cultivos en suspensión o dependientes de no-anclaje a partir de líneas celulares establecidas continuas son los medios más ampliamente usados de producción a gran escala de células y productos celulares. Sin embargo, la células cultivadas en suspensión tienen limitaciones, tales como el potencial tumorigeno y menor producción de proteína que las células T adherentes.

El cultivo en suspensión a gran escala de células de mamífero en matraces agitados es un método común para la producción de proteínas recombinantes. Dos diseños de reactor de cultivo en suspensión están en amplio uso (el reactor agitado y el reactor de suspensión de aire). El diseño agitado ha sido usado con éxito en una capacidad de 8.000 litros para la producción de interferón. Las células crecen en un tanque de acero inoxidable con una relación altura-diámetro de 1:1 a 3:1. El cultivo normalmente se mezcla con uno o más agitadores, basado en discos con filos o patrones de hélice marina. Se han descrito sistemas de agitador que ofrecen menos fuerzas de rotura que las hojas. La agitación se puede conducir o bien directamente o indirectamente mediante controladores magnéticamente acoplados. Los controladores indirectos reducen el riesgo de contaminación microbiana a través de sellos sobre los mangos del agitador.

El reactor de suspensión de aire, también inicialmente descrito para la fermentación microbiana y adaptado más tarde para el cultivo de mamíferos, depende de una corriente de gas para tanto mezclar como oxigenar el cultivo. La corriente de gas entra en una sección más elevada del reactor y conduce la circulación. El gas se suelta en la superficie de cultivo, causando que el líquido más denso libre de las pompas de gas viaje hacia abajo en la sección de la esquina inferior del reactor. La ventaja principal de este diseño es la simplicidad y la carencia de la necesidad de la mezcla mecánica. Típicamente, la relación altura-diámetro es de 10:1. El reactor de suspensión de aire es relativamente fácil agrandar a escala, tiene buena transferencia de masa de gases y genera relativamente bajas fuerzas de rotura.

Los anticuerpos de la presente invención son particularmente útiles para el aislamiento de antígenos mediante inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación implica la separación del componente antígeno diana a partir de una mezcla de complejo, y se usa para discriminar o aislar cantidades mínimas de proteína. Para el aislamiento de las proteínas de membrana las células deben estar solubilizadas dentro de las micelas de detergente. Se prefieren las sales no iónicas, ya que otros agentes tales como las sales biliares, precipitan en pH ácido o en presencia de cationes bivalentes. A continuación, los anticuerpos y sus usos se discuten más.

III. Generación de Anticuerpos Reactivos con TS10q23.3

En otro aspecto, la presente invención contempla un anticuerpo que es inmunoreactivo con una molécula de TS10q23.3 de la presente invención, o cualquier porción de la misma con función fosfatasa. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. En una realización preferida, un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Los medios para preparar y caracterizar los anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Howell y Lane, 1988).

En resumen, se prepara un anticuerpo policlonal mediante inmunización de un animal con un inmunógeno que comprende un polipéptido de la presente invención y recogida de los antiseros de ese animal inmunizado. Se puede usar un amplio intervalo de especies animales para la producción de antiseros. Típicamente un animal usado para la producción de anti-antiseros es un animal no humano que incluye conejos, ratones, ratas, hámsters, cerdos y caballos. Debido al relativamente gran volumen de sangre de los conejos, un conejo es una elección preferida para la producción de anticuerpos policlonales.

Se pueden preparar anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, específicos para las isoformas de antígeno usando técnicas de inmunización convencionales, ya que serán generalmente conocidas por los expertos en la técnica. Se puede usar una composición que contiene epítopos antígenicos de los compuestos de la presente

invención para inmunizar uno o más animales experimentales, tales como conejo o ratón, los cuales entonces procederán a producir anticuerpos específicos frente a los compuestos de la presente invención. Se pueden obtener antisueros policlonales, después de dejar el tiempo para la generación de anticuerpo, simplemente haciendo sangrar al animal y preparando muestras de suero a partir de toda la sangre.

Se propone que los anticuerpos monoclonales de la presente invención encontrarán aplicación útil en los procedimientos inmunoquímicos estándares, tales como los métodos ELISA y transferencia Western y en procedimientos inmunohistoquímicos tales como tinción de tejido, así como en otros procedimientos que pueden utilizar anticuerpos específicos a epítomos de antígeno relacionados con TS10q23.3. Adicionalmente, se propone que se pueden utilizar anticuerpos monoclonales específicos al TS10q23.3 particular de diferentes especies en otras aplicaciones útiles.

En general, se pueden usar anticuerpos tanto policlonales como monoclonales frente a TS10q23.3 en una diversidad de realizaciones. Por ejemplo, se pueden emplear en protocolos de clonación de anticuerpo para obtener ADNc o genes que codifican otro TS10q23.3. También se pueden usar en estudios de inhibición para analizar los efectos de péptidos relacionados con TS10q23.3 en células o animales. Los anticuerpos anti-TS10q23.3 también serán útiles en estudios de inmunolocalización para analizar la distribución de TS10q23.3 durante diversos sucesos celulares, por ejemplo, determinar la distribución celular o específica a tejido de los polipéptidos TS10q23.3 bajo diferentes puntos en el ciclo celular. Una aplicación particularmente útil de tales anticuerpos está en la purificación de TS10q23.3 nativo o recombinante, por ejemplo, usando una columna de afinidad a anticuerpo. La operación de todas estas técnicas inmunológicas será bien conocida por los expertos en la técnica en vista de la presente descripción.

Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1998). En los ejemplos de a continuación, se dan ejemplos más específicos de la preparación de anticuerpo monoclonal.

Tal como se conoce bien en la técnica, una composición dada puede variar en su inmunogenicidad. Por lo tanto, con frecuencia es necesario estimular el sistema inmune hospedante, ya que se puede alcanzar acoplando un inmunógeno de péptido o polipéptido a un vehículo. Vehículos ilustrativos y preferidos son la hemocianina de lapa (KLH) y la albúmina de suero bovina (BSA). También se pueden usar como vehículos otras albúminas tales como ovalbumina, albúmina de suero de ratón o albúmina de suero de conejo. Los medios para conjugar un polipéptido a una proteína vehículo son bien conocidos en la técnica e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobencoil-N-hidroxisucinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

Tal como también es conocido en la técnica, se puede aumentar la inmunogenicidad de una composición particular de inmunógeno mediante el uso de estimuladores no-específicos de la respuesta inmune, conocidos como adyuvantes. Adyuvantes ilustrativos y preferidos incluyen adyuvante de Freund completo (un estimulador no específico de la respuesta inmune que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerto), adyuvantes de Freund incompletos y adyuvante de hidróxido de aluminio.

La cantidad de composición de inmunógeno usada en la producción de anticuerpos policlonales varía sobre la naturaleza del inmunógeno así como el animal usado para la inmunización. Se pueden usar una diversidad de rutas para administrar el inmunógeno (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). Se puede hacer un seguimiento de la producción de los anticuerpos policlonales muestreando sangre del animal inmunizado en diversos puntos después de la inmunización. También se puede administrar una segunda inyección, refuerzo. El proceso de estimulación y producción de título ("titring") se repite hasta que se alcanza un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, se puede sangrar el animal inmunizado y aislar el suero y almacenar, y/o el animal se puede usar para generar mAbs.

Los MAb se pueden preparar fácilmente a través del uso de técnicas bien conocidas, tales como las ilustradas en el documento de Patente U.S. 4.196.265. Típicamente, esta técnica implica la inmunización de un animal adecuado con una composición de inmunógeno seleccionada, por ejemplo, una proteína TS10q23.3 purificada o parcialmente purificada, polipéptido o péptido o célula que expresa altos niveles de TS10q23.3. La composición de inmunización se administra de una manera eficaz para estimular las células productoras de anticuerpo. Roedores tales como ratones y ratas son los animales preferidos, sin embargo, también es posible el uso de células de conejo, oveja, rana. El uso de ratas puede proporcionar ciertas ventajas (Goding, 1986), pero se prefieren los ratones, siendo el ratón BALB/c el más preferido ya que este es el más usado de manera rutinaria y generalmente da un porcentaje mayor de fusiones estables.

Después de la inmunización, se seleccionan células somáticas con el potencial para producir anticuerpos, específicamente B-linfocitos (células B), para usarse en el protocolo de generación de mAb. Estas células se pueden obtener a partir de hígados, amígdalas o ganglios linfáticos sometidos a biopsia, o a partir de una muestra de sangre periférica. Se prefieren las células de bazo y las células sanguíneas periféricas, las primeras porque son una fuente rica de células productoras de anticuerpo que están en la fase plasmoblasto de división, y las últimas porque la sangre periférica es fácilmente accesible. Con frecuencia, se habrá inmunizado un panel de animales y se separará el bazo del animal con los más altos títulos de anticuerpo y se obtendrá los linfocitos de bazo mediante

homogenización del bazo con una jeringuilla. Típicamente, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente de 5×10^7 a 2×10^3 linfocitos.

A continuación, los linfocitos B productores de anticuerpo del animal inmunizado se fusionan con las células de un mieloma celular inmortal, generalmente una de la misma especie que el animal que se inmunizó. Las líneas celulares de mieloma adecuadas para usar en los procedimientos de fusión productora de hibridoma preferentemente son no productoras de anticuerpo, tienen alta eficacia de fusión y deficiencias de enzima que entonces resultan incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de solamente la células fusionadas deseadas (hibridomas).

Se puede usar cualquiera de un número de células de mieloma, ya que son conocidas por los expertos en la técnica (Goding, 1986; Campbell, 1984). Por ejemplo, si el animal inmunizado es un ratón, se pueden usar P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NSI/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; para ratas, se pueden usar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6 son todas útiles en la conexión con las fusiones celulares.

Los métodos para generar híbridos de células de ganglio linfático o bazo productoras de anticuerpo y células de mieloma normalmente comprenden mezcla de células somáticas con células de mieloma en una relación 2:1, aunque la relación puede variar desde aproximadamente 20:1 hasta aproximadamente 1:1, respectivamente, en presencia de un agente o agentes (químico o eléctrico) que promueven la fusión de membranas celulares. Se han descrito los métodos de fusión que usan virus Sendai (Kohler y Milstein, 1975; 1976), y aquellos que usan polietilenglicol (PEG), tal como PEG al 37% (v/v), por Geffer et al. (1977). El uso de métodos de fusión eléctricamente inducidos también es apropiado (Goding, 1986).

Los procedimientos de fusión normalmente producen híbridos viables a bajas frecuencias, alrededor de 1×10^{-6} a 1×10^{-8} . Sin embargo, esto no supone un problema, ya que los híbridos fusionados viables se diferencian de las células no fusionadas parentales (particularmente las células de mieloma no fusionadas que normalmente continuarían dividiéndose indefinidamente) mediante el cultivo en un medio selectivo. El medio selectivo es generalmente uno que contiene un agente que bloquea la síntesis *de novo* de nucleótidos en los medios de cultivo de tejido. Agentes ilustrativos y preferidos son la aminopterina, el metotrexato y la azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis *de novo* de tanto purinas como pirimidinas, mientras que la azaserina bloquea solamente la síntesis de purina. Si se usa la aminopterina o el metotrexato, los medios se complementan con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT). Si se usa la azaserina, los medios se complementan con hipoxantina.

El medio de selección preferido es HAT. Solamente las células capaces de manejar rutas de rescate de nucleótido son capaces de sobrevivir en el medio HAT. Las células de mieloma son defectuosas en enzimas clave de la ruta de rescate, por ejemplo, la hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT, del Inglés "Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase"), y no pueden sobrevivir. Las células B pueden manejar esta ruta, pero tienen una duración limitada en el cultivo y generalmente mueren dentro de aproximadamente dos semanas. Por lo tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en los medios selectivos son aquellos híbridos formados a partir de mieloma y células B.

Este cultivo proporciona una población de hibridomas a partir de los cuales se seleccionan los hibridomas específicos. Típicamente, la selección de hibridomas se realiza mediante el cultivo de células por dilución de clon único en placas de microtiter, seguido de ensayo de los sobrenadantes clonales individuales (después de aproximadamente dos a tres semanas) para la reactividad deseada. El ensayo debería ser sensible, simple y rápido, tal como los radioinmunoensayos, los inmunoensayos enzimáticos, los ensayos de citotoxicidad, los ensayos de placa, los ensayos de inmunounión en punto y similares.

A continuación, se diluirían en serie los hibridomas seleccionados y se clonarían dentro de las líneas celulares individuales productoras de anticuerpo, tales clones a continuación se pueden propagar indefinidamente para proporcionar mAbs. Las líneas celulares se pueden explotar para la producción de mAb de dos formas básicas. Se puede inyectar una muestra del hibridoma (con frecuencia dentro de la cavidad peritoneal) en un animal histocompatible del tipo que se usa para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido celular fusionado. Los fluidos corporales del animal, tales como suero o fluido de ascitis, a continuación se pueden sacar para proporcionar mAbs en alta concentración. Las líneas celulares individuales también podrían cultivarse *in vitro*, donde los mAbs se secretan de manera natural en el medio de cultivo a partir del cual se pueden obtener fácilmente en altas concentraciones. Los mAbs producidos por otros modos se pueden purificar más, si se desea, usando filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad.

IV. Diagnóstico de Cánceres que Implican TS10q23.3

Los presentes inventores han determinado que las alteraciones en TS10q23.3 están asociadas con la malignidad. Por lo tanto, se puede emplear TS10q23.3 y el gen correspondiente como indicador de diagnóstico o de pronóstico de cáncer. Más específicamente, mutaciones puntuales, deleciones, inserciones o perturbaciones reguladoras que se relacionan con TS10q23.3 pueden causar cáncer o promover el desarrollo de cáncer, causar o promover progresión

tumoral en un sitio principal, y/o causar o promover metástasis. Otros fenómenos asociados con la malignidad que pueden estar afectados por la expresión de TS10q23.3 incluyen angiogénesis e invasión de tejido.

A. Diagnóstico Genético

Una realización de la presente invención comprende un uso de la región codón de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 2, una variante alélica, un anticuerpo o un oligonucleótido como el definido en las reivindicaciones para determinar la expresión de TS10q23.3. Esto puede comprender la determinación de ese nivel de TS10q23.3. Una realización adicional de la invención comprende un método de diagnóstico de cáncer o ascenso del desarrollo del cáncer o metástasis que comprende la determinación de alteraciones específicas en el producto expresado. Obviamente, este tipo de ensayo tiene importancia en la diagnosis de cánceres relacionados. Dicho cáncer puede implicar cánceres del cerebro (glioblastomas, meduloblastoma, astrocitoma, oligodendroglioma, ependimomas), pulmón, hígado, bazo, riñón, páncreas, intestino delgado, células sanguíneas, ganglio linfático, colon, pecho, endometrio, estómago, próstata, testículo, ovario, piel, cabeza y cuello, esófago, médula ósea, sangre u otro tejido. En particular, la presente invención se refiere a la diagnosis de gliomas.

La muestra biológica puede ser cualquier tejido o fluido. Diversas realizaciones incluyen células de la piel, músculo, fascia, cerebro, próstata, pecho, endometrio, pulmón, cabeza y cuello, páncreas, intestino delgado, células sanguíneas, hígado, testículos, ovarios, colon, piel, estómago, esófago, bazo, ganglio linfático, médula ósea o riñón. Otras realizaciones incluyen muestras de fluido tales como sangre periférica, fluido linfático, ascitis, fluido seroso, efusión pleural, esputo, fluido cerebroespinal, fluido lacrimal, heces u orina.

El ácido nucleico usado se aísla de las células contenidas en la muestra biológica, de acuerdo con las metodologías estándar (Sambrook et al., 1989). El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN celular completo o fraccionado. Si se usa ARN, se puede desear convertir el ARN a un ADN complementario. En una realización, el ARN es ARN celular completo; en otro, es ARN de poli A. Normalmente, se amplifica el ácido nucleico.

Dependiendo del formato, se identifica el ácido nucleico de interés en la muestra directamente usando amplificación o con un segundo ácido nucleico conocido después de la amplificación. Luego, se detecta el producto identificado. En ciertas aplicaciones, la detección se puede realizar por medio visuales (por ejemplo, tinción con bromuro de etidio de un gel). Alternativamente, la detección puede implicar identificación indirecta del producto vía quimioluminiscencia, escintigrafía radioactiva o radiomarcage o marcate fluorescente o incluso vía un sistema que usa señales de impulsos eléctricos o térmicos (Affymax Technology; Bellus, 1994).

Después de la detección, se puede comparar los resultados vistos en un paciente dado con un grupo de referencia estadísticamente significativo de pacientes normales y pacientes que tienen patologías relacionadas con TS10q23.3. De esta forma, es posible correlacionar la cantidad o clase de TS10q23.3 detectado con diversos estados clínicos.

Diversos tipos de defectos son para ser identificados. Por tanto, "alteraciones" debería ser leído como que incluyen delecciones, inserciones, mutaciones puntuales y duplicaciones. Las mutaciones puntuales dan como resultado codones de terminación, mutaciones de desplazamiento de la pauta de lectura o sustituciones de aminoácidos. Mutaciones somáticas son aquellas que ocurren en tejidos de no línea germinal. El tejido de línea germinal puede ocurrir en cualquier tejido y se hereda. Las mutaciones dentro y fuera de la región codificadora también pueden afectar a la cantidad de TS10q23.3 producido, ambas por alteración de la transcripción del gen o en la desestabilización o de otra manera alterar el procesamiento de o bien el transcrito (ARNm) o la proteína.

Una diversidad de ensayos diferentes están contemplados en este aspecto, que incluyen pero no se limitan a, hibridación fluorescente *in situ* (FISH, del Inglés "Fluorescent In Situ Hybridization"), secuenciación directa de ADN, análisis PFGE, transferencia Southern o Northern, análisis de conformación de cadena sencilla (SSCA, del Inglés "Single-Stranded Conformation Analysis"), ensayo de protección de ARNasa, oligonucleótido específico a alelo (ASO, del Inglés "Allele-specific Oligonucleotide"), análisis de transferencia puntual, electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización, RFLP y PCR-SSCP.

(i) Cebadores y Sondas

El término cebador, tal como se define en la presente memoria, supone que abarca cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de plantilla. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos desde diez a veinte pares de bases de longitud, pero se pueden emplear secuencias más largas. Los cebadores pueden ser proporcionados en forma de cadena doble o de cadena sencilla, aunque se prefiere la forma de cadena sencilla. Las sondas se definen de manera diferente, aunque pueden actuar como cebadores. Las sondas, aunque quizás capaces de cebar, están diseñadas para unirse al ADN diana o ARN y no necesitan ser usadas en un proceso de amplificación.

En las realizaciones preferidas, las sondas y los cebadores están marcados con especies radioactivas (^{32}P , ^{14}C , ^{35}S , ^3H u otro marcate), con un fluoróforo (rodamina, fluoresceína) o un quimioluminiscente (luciferasa).

(ii) Métodos de Amplificación Dependientes de Plantilla

Un número de procesos dependientes de plantilla están disponibles para amplificar las secuencias marcadoras presentes en una muestra de plantilla dada. Uno de los mejores métodos de amplificación conocidos es la reacción en cadena de polimerasa (referida como PCR™, del Inglés Polymerase Chain Reaction) la cual se describe en detalle en el documento de Patente U.S. N°s 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159 y en Innis et al., 1990.

En resumen, en la PCR, se preparan dos secuencias cebadoras que son complementarias a las regiones en cadenas complementarias opuestas de la secuencia marcadora. Se añade un exceso de deoxinucleósido trifosfatos a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, por ejemplo, *Taq* polimerasa. Si la secuencia marcadora está presente en una muestra, los cebadores se unirán al marcador y la polimerasa causará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia marcadora añadiendo nucleótidos. Al elevar o bajar la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del marcador para formar productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán al marcador y a los productos de reacción y el proceso se repetirá.

Se puede realizar un procedimiento de amplificación PCR con transcriptasa inversa para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado. Los métodos de ARN de transcripción inversa dentro del ADNc son bien conocidos y descritos en Sambrook et al., 1989. Los métodos alternativos para la transcripción inversa utilizan ADN polimerasas dependientes de ARN termoestables. Estos métodos están descritos en el documento WO 90/07641 presentado el 21 de Diciembre de 1990. Las metodologías de reacción en cadena con polimerasa son bien conocidas en la técnica.

Otro método para la amplificación es la reacción en cadena con ligasa ("LCR", del Inglés "Ligase Chain Reaction"), descrita en el documento EPO N° 320 308. En la LCR, se preparan dos pares sondas complementarios, y en presencia de la secuencia diana, cada par se unirá a cadenas complementarias opuestas a la diana de modo que estén contiguos. En presencia de una ligasa, los dos pares sondas se enlazarán para formar una unidad única. Al hacer oscilar la temperatura, como en la unión de PCR de las unidades ligadas se disocian de la diana y a continuación sirven como "secuencias diana" para la unión de los pares sondas en exceso. El documento de Patente U.S. 4.883.750 describe un método similar a la LCR para unir pares sondas a una secuencia diana.

La Qbeta Replicasa, descrita en la Solicitud de PCT N° PCT/US87/00880, también se puede usar como otro método más de amplificación en la presente invención. En este método, se añade una secuencia replicativa de ARN que tiene una región complementaria a la de una diana a una muestra en presencia de una ARN polimerasa. La polimerasa copiará la secuencia replicativa que entonces se puede detectar.

También puede ser útil un método de amplificación isotérmica, en el cual se usan las endonucleasas de restricción y las ligasas para alcanzar la amplificación de las moléculas diana que contienen nucleótido 5'-[alfa-tio]-trifosfatos en una cadena de un sitio de restricción en la amplificación de los ácidos nucleicos en la presente invención, Walker et al. (1992).

La Amplificación con Desplazamiento de Cadena (SDA, del Inglés "Strand Displacement Amplification") es otro método para llevar a cabo la amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos que implica rondas múltiples de desplazamiento y síntesis de cadena, es decir, traducción del "nick". Un método similar, denominado Reacción en Cadena de Reparación (RCR, del Inglés "Repair Chain Reaction"), implica alineación de varias sondas por toda una región diana para la amplificación, seguido de una reacción de reparación en la cual solamente están presentes dos de las cuatro bases. Se pueden añadir las otras dos bases como derivados biotinilados para la detección fácil. Un enfoque similar se usa en SDA. Las secuencias específicas a diana también se pueden detectar usando una reacción de sonda cíclica (CPR, del Inglés "Cyclic Probe Reaction"). En la CPR, se hibrida una sonda que tiene secuencias 3' y 5' de ADN no específico y una media secuencia del ARN específico con ADN que está presente en una muestra. Tras la hibridación, la reacción se trata con ARNasa H y los productos de la sonda identificados como productos característicos que se liberan después de la digestión. La plantilla original se alineó a otra sonda cíclica y se repite la reacción.

Se pueden usar otros métodos de amplificación más descritos en la Solicitud GB N° 2.202.328, y en la solicitud PCT N° PCT/US89/01025. En la primera solicitud, se usan cebadores "modificados" en una síntesis dependiente de enzima y plantilla, similar a PCR. Los cebadores se pueden modificar marcando con un resto de captura (por ejemplo, biotina) y/o un resto detector (por ejemplo, enzima). En la última solicitud, se añaden un exceso de sondas marcadas a una muestra. En presencia de la secuencia diana, la sonda se une y se escinde catalíticamente. Después de la escisión, se libera la secuencia diana intacta para unirse por sonda en exceso. La escisión de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia diana.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen sistemas de amplificación basados en transcripción (TAS, del Inglés "Transcription-based Amplification Systems"), que incluyen amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA, del Inglés "Nucleic Acid Sequence Based Amplification") y 3SR (Kwoh et al., 1989; Gingeras et al., Solicitud PCT WO 88/10315).

En NASBA, los ácidos nucleicos se pueden preparar para la amplificación mediante extracción estándar por fenol/cloroformo, desnaturalización por calor de una muestra clínica, tratamiento con tampón lisis y columnas de minispín para el aislamiento de ADN y ARN o extracción con cloruro de guanidino de ARN. Estas técnicas de

amplificación implican la alineación de un cebador que tiene secuencias específicas a diana. Después de la polimerización, se digieren los híbridos de ADN/ARN con ARNasa H mientras que las moléculas de ADN de doble cadena se desnaturalizan de nuevo por calor. En cualquier caso el ADN de cadena sencilla está hecho completamente de doble cadena mediante la adición de segundo cebador específico a diana, seguido de polimerización. A continuación, las moléculas de ADN de doble cadena se transcriben de manera múltiple mediante una ARN polimerasa tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, los ARN son transcritos a la inversa en ADN de cadena sencilla, el cual a continuación se convierte en ADN de doble cadena, y a continuación transcritos una vez de nuevo con una ARN polimerasa tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, truncados o completos, indican las secuencias específicas a diana.

Davey et al., el documento EPO N° 239.822 describe un proceso de amplificación de ácido nucleico que implica sintetizar cíclicamente ARN de cadena sencilla ("ARNcs"), ADNcs y ADN de doble cadena (ADNdc), los cuales se pueden usar de acuerdo con la presente invención. El ARNcs es una plantilla para un primer oligonucleótido cebador, el cual se alarga mediante transcriptasa inversa (ADN polimerasa dependiente de ARN). A continuación, se separa el ARN del dúplex ADN:ARN resultante mediante la acción de la ribonucleasa H (ARNasa H, una ARNasa específica para el ARN en el dúplex con o bien ADN o ARN). El ADNcs resultante es una plantilla para un segundo cebador, el cual también incluye las secuencias de un promotor de ARN polimerasa (ilustrado por la ARN polimerasa T7) 5'para su homología a la plantilla. A continuación, se extiende este cebador mediante la ADN polimerasa (ilustrado por el fragmento largo "Klenow" de la ADN polimerasa I de *E. coli*), dando como resultado una molécula de ADN de doble cadena ("ADNdc"), que tiene una secuencia idéntica a la del ARN original entre los cebadores y que tiene adicionalmente, en un extremo, una secuencia promotor. Esta secuencia promotor se puede usar mediante la ARN polimerasa apropiada para realizar muchas copias ARN del ADN. Estas copias entonces pueden entrar de nuevo en el ciclo que conduce a una amplificación muy rápida. Con la elección apropiada de las enzimas, esta amplificación se puede hacer isotérmicamente sin adición de las enzimas en cada ciclo. Debido a la naturaleza cíclica de este proceso, la secuencia de comience puede ser elegida para estar en forma de o bien ADN o ARN.

Miller et al., Solicitud PCT WO 89/06700 describen un esquema de amplificación de secuencia de ácido nucleico basado en la hibridación de una secuencia promotor/cebador con un ADN de cadena sencilla diana ("ADNcs") seguido de transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, no se producen nuevas plantillas a partir de los transcritos de ARN resultantes. Otros métodos de amplificación incluyen "RACE" y "PCR de un lado" (Frohman, M.A., En:PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Academic Press, N.Y., 1990; Ohara et al., 1989).

También se pueden usar en la etapa de amplificación métodos basados en la unión de dos (o más) oligonucleótidos en presencia del ácido nucleico que tiene la secuencia del "di-oligonucleótido" resultante, amplificando de ese modo el di-oligonucleótido. (Wu et al., (1989)).

(iii) Transferencia Southern/Northern

Las técnicas de transferencia son bien conocidas por los expertos en la técnica. La transferencia Southern implica el uso de ADN como diana, mientras que la transferencia Northern implica el uso de ARN como diana. Cada uno proporciona diferentes tipos de información, aunque la transferencia de ADN es análoga, en muchos aspectos, a transferencia de especies de ARN.

En resumen, una sonda se usa para identificar una especie de ADN o ARN que se ha inmovilizado en una matriz adecuada, con frecuencia un filtro de nitrocelulosa. Las diferentes especies deberían estar espacialmente separadas para facilitar el análisis. Esto con frecuencia se consigue mediante electroforesis en gel de especies de ácido nucleico seguido de "transferencia" sobre el filtro.

Posteriormente, la diana sometida a transferencia se incuba con una sonda (normalmente marcada) bajo condiciones que promueven la desnaturalización y la rehibridación. Debido a que la sonda está diseñada para emparejar de base con la diana, la sonda unirá una porción de la secuencia diana bajo condiciones de renaturalización. A continuación, se separa la sonda no unida, y la detección se consigue tal como se ha descrito anteriormente.

(iv) Métodos de Separación

Normalmente es deseable, en una fase u otra, separar el producto de amplificación de la plantilla y el cebador en exceso con el propósito de determinar si ha ocurrido la amplificación específica. En una realización, los productos de amplificación son separados mediante electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poliácridamida usando métodos estándar. Véase Sambrook et al., 1989.

Alternativamente, se pueden emplear las técnicas cromatográficas para efectuar la separación. Hay muchas clases de cromatografía que se pueden usar en la presente invención: absorción, partición, intercambio iónico y criba molecular, y muchas técnicas especializadas para usarlas que incluyen cromatografía en columna, en papel, de capa fina y de gas (Freifelder, 1982).

(v) Métodos de Detección

Los productos se pueden visualizar para confirmar la amplificación de las secuencias marcadoras. Un método de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización bajo luz UV. Alternativamente, si los productos de amplificación están íntegramente marcados con nucleótidos radio o fluorométricamente marcados, entonces los productos de amplificación se pueden exponer a película de rayos X o visualizar bajo el apropiado espectro estimulador, después de la separación.

En una realización, la visualización se alcanza indirectamente. Después de la separación de los productos de amplificación, se pone en contacto una sonda de ácido nucleico marcada con la secuencia marcadora amplificada. La sonda preferentemente se conjuga con el cromóforo pero se puede radiomarcarse. En otra realización, la sonda se conjuga a una pareja de unión, tal como un anticuerpo o biotina, y el otro miembro del par de unión lleva un resto detectable.

En una realización, la detección es mediante una sonda marcada. Las técnicas implicadas son bien conocidas por los expertos en la técnica y se pueden encontrar en muchos libros estándares o protocolos moleculares. Véase Sambrook et al., 1989. Por ejemplo, el cromóforo o sondas radiomarcadas o cebadores identifican la diana durante o después de la amplificación.

Un ejemplo de lo anterior está descrito en el documento de Patente U.S. Nº 5.219.721, el cual describe un aparato y método para la electroforesis automatizada y la transferencia de los ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y la transferencia sin manipulación externa del gel y es idealmente adecuado para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la presente invención.

Además, los productos de amplificación anteriormente descritos pueden someterse a análisis de secuencia para identificar clases específicas de variaciones usando técnicas de análisis de secuencia estándar. Dentro de ciertos métodos, se lleva a cabo análisis exhaustivos de genes mediante análisis de secuencia usando series cebadores diseñados para la óptima secuenciación (Pignon et al., 1994). La presente invención proporciona métodos por los cuales se pueden usar cualquier o todos estos tipos de análisis. Usando las secuencias descritas en la presente memoria, los cebadores de oligonucleótido pueden estar diseñados para permitir la amplificación de las secuencias por todo el gen de TS10q23.3 que a continuación se pueden analizar mediante secuenciación directa.

(vi) Componentes del kit

Todos los materiales esenciales y reactivos requeridos para detectar y secuenciar el TS10q23.3 y variantes del mismo se pueden reunir en un kit. Esto generalmente comprenderá los cebadores y las sondas preseleccionadas. También incluidas pueden estar las enzimas adecuadas para la amplificación de ácidos nucleicos que incluyen diversas polimerasas (RT, Taq, Sequenase™ etc.), deoxinucleótidos y tampones para proporcionar la mezcla de reacción necesaria para la amplificación. Dichos kits también generalmente comprenderán, en medios adecuados, distintos recipientes para cada reactivo y enzima individual así como para cada cebador o sonda.

(vii) Diseño y Consideraciones Teóricas para RT-PCR Cuantitativa Relativa

La transcripción inversa (RT) de ARN o ADNc seguida de PCR cuantitativa relativa (RT-PCR) se puede usar para determinar las concentraciones relativas de las especies de ARNm específicas aisladas de los pacientes. Al determinar que la concentración de una especie de ARNm específica varía, se demuestra que el gen codificador de las especies de ARNm específico se expresa de manera diferente.

En la PCR, el número de moléculas del ADN diana amplificado aumenta mediante un factor que aproxima dos con todo el ciclo de la reacción hasta que algún reactivo llega a ser limitante. A partir de entonces, el índice de amplificación llega a estar cada vez más disminuido hasta que hay no incremento en la diana amplificada entre ciclos. Si se traza una gráfica en la cual el número de ciclo está sobre el eje X y el logaritmo de la concentración del ADN diana amplificado está sobre el eje Y, se forma una línea curvada de forma característica al conectar los puntos trazados. Empezando con el primer ciclo, la pendiente de la línea es positiva y constante. Esto se dice que es la porción lineal de la curva. Después de que un reactivo llega a ser limitante, la pendiente de la línea empieza a disminuir y finalmente llega a ser cero. En este punto la concentración del ADN diana amplificado llega a ser asintótico a algún valor fijado. Esto se dice que es la porción meseta de la curva.

La concentración del ADN diana en la porción lineal de la amplificación por PCR es directamente proporcional a la concentración inicial de la diana antes de empezar la reacción. Al determinar la concentración de los productos amplificados del ADN diana en las reacciones PCR que han completado el mismo número de ciclos y están en sus intervalos lineales, es posible determinar las concentraciones relativas de la secuencia diana específica en la mezcla de ADN original. Si las mezclas de ADN son ADNc sintetizados a partir de ARN aislados de diferentes tejidos o células, se pueden determinar las abundancias relativas del ARNm específico a partir del cual se deriva la secuencia diana para los respectivos tejidos o células. Esto proporcionalmente directo entre la concentración de los productos de PCR y las abundancias relativas de ARNm es únicamente cierto en el intervalo lineal de la reacción de PCR.

La concentración final del ADN diana en la porción meseta de la curva se determina mediante la disponibilidad de los reactivos en la mezcla de reacción y es independiente de la concentración original del ADN diana. Por lo tanto, la primera condición que debe encontrarse antes de que las abundancias relativas de una especie de ARNm se

puedan determinar mediante RT-PCR para una colección de poblaciones de ARN es que las concentraciones de los productos de PCR amplificados se deben muestrear cuando las reacciones de PCR están en la porción lineal de sus curvas.

La segunda condición que debe encontrarse para un experimento de RT-PCR para determinar con éxito las abundancias relativas de una especie de ARNm particular es que las concentraciones relativas de los ADNc amplificados deben ser normalizados a algún patrón independiente. El objetivo de un experimento de RT-PCR es determinar la abundancia de una especie de ARNm particular relativa a la abundancia promedio de todas las especies de ARNm en la muestra. En los experimentos descritos a continuación, se usaron los ARNm para β -actina, asparagina sintetasa y lipocortina II como patrones externos e internos a los cuales se compara la abundancia relativa de otros ARNm.

La mayoría de los protocolos para la PCR competitiva utilizan los patrones de PCR internos que son aproximadamente tan abundantes como la diana. Estas estrategias son eficaces si los productos de las amplificaciones de PCR se muestrean durante sus fases lineales. Si los productos se muestrean cuando las reacciones están aproximándose a la fase meseta, entonces el producto menos abundante llega a ser relativamente sobre representado. Las comparaciones de las abundancias relativas se dirigen a muchas muestras de ARN diferentes, tales como es el caso cuando al examinar las muestras de ARN para la expresión diferencial, se llegan a deformar de tal forma que hace que las diferencias en las abundancias relativas de los ARN parezcan menos de lo que son en realidad. Esto no es un problema significativo si el patrón interno es mucho más abundante que la diana. Si el patrón interno es mucho más abundante que la diana, entonces se puede realizar comparaciones lineales entre las muestras de ARN.

La anterior discusión describe consideraciones teóricas para un ensayo de RT-PCR para materiales clínicamente derivados. Los problemas inherentes en las muestras clínicas son que son de cantidad variable (haciendo la normalización problemática), y que son de calidad variable (necesitando la amplificación conjunta de un control interno fiable, preferentemente de mayor tamaño que la diana). Ambos problemas se superan si la RT-PCR se hace como una RT-PCR cuantitativa relativa con un patrón interno en el cual el patrón interno es un fragmento de ADNc amplificable que es mayor que el fragmento de ADNc diana y en el cual la abundancia del ARNm codificador del patrón interno es aproximadamente 5-100 veces mayor que el ARNm codificador de la diana. Este ensayo mide la abundancia relativa, no la abundancia absoluta de la respectiva especie de ARNm.

Otros estudios se pueden hacer usando un ensayo de RT-PCR cuantitativa relativa convencional con un protocolo estándar externo. Estos ensayos muestrean los productos PCR en la porción lineal de sus curvas de amplificación. El número de ciclos PCR que son óptimos para muestrear debe ser empíricamente determinado para cada fragmento de ADNc diana. Además, los productos de transcriptasa inversa de cada población de ARN aislada de las diversas muestras de tejido deben ser cuidadosamente normalizadas para concentraciones iguales de ADNc amplificables. Esta consideración es muy importante puesto que el ensayo mide la abundancia absoluta de ARNm. La abundancia absoluta de ARNm se puede usar como una medida de expresión de gen diferencial solamente en muestras normalizadas. Si la determinación empírica del intervalo lineal de la curva de amplificación y la normalización de las preparaciones de ADNc es tediosa y son procesos que consumen tiempo, los ensayos de RT-PCR resultantes pueden ser superiores a los derivados del ensayo de RT-PCR cuantitativa relativa con un patrón interno.

Una razón para esta ventaja es que sin el patrón/competidor interno, todos los reactivos se pueden convertir en un producto de PCR sencillo en el intervalo lineal de la curva de amplificación, incrementando así la sensibilidad del ensayo. Otra razón es que con solamente un producto de PCR, la exposición del producto sobre un gel electroforético u otro método de exposición llega a ser menos complejo, tiene menos antecedentes y es más fácil de interpretar.

(viii) Tecnologías de Chip

Específicamente contemplada por los presentes inventores son las tecnologías de ADN basadas en chip tales como las descritas por Hacia et al. (1996) y Shoemaker et al. (1996). En resumen, estas tecnologías implican métodos cuantitativos para analizar grandes números de genes rápidamente y exactamente. Al etiquetar genes con oligonucleótidos o usar las formaciones de sonda fijada, se puede emplear tecnología de chip para segregar moléculas diana como formaciones de alta densidad e investigar estas moléculas sobre la base de la hibridación. Véase también Pease et al. (1994); Fodor et al. (1991).

B. Inmunodiagnos

Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en la caracterización del contenido de TS10q23.3 de tejidos sanos y enfermos, a través de técnicas tales como ELISA y transferencia Western. Esto puede proporcionar una investigación de presencia o ausencia de malignidad o como un indicador de futuro cáncer.

El uso de los anticuerpos de la presente invención, se contempla en un ensayo ELISA. Por ejemplo, se inmovilizan anticuerpos anti-TS10q23.3 sobre una superficie seleccionada, preferentemente una superficie que presenta una afinidad de proteína tal como los pocillos de una placa microtiter de poliestireno. Después de lavar para separar el

material incompletamente adsorbido, es deseable unir o revestir los pocillos de la placa de ensayo con una proteína no específica que se sabe que es antigénicamente neutral en relación con los antisueros de ensayo tal como albúmina de suero bovina (BSA), caseína o disoluciones de leche en polvo. Esto permite el bloqueo de sitios de adsorción no específicos sobre la superficie de inmovilización y así reduce los antecedentes causados por la unión no específica de antígeno sobre la superficie.

Después de la unión del anticuerpo al pocillo, el revestimiento con un material no reactivo para reducir los antecedentes, y el lavado para separar el material no unido, se conecta la superficie de inmovilización con la muestra a ensayar de una manera propicia a la formación de complejo inmune (antígeno/anticuerpo).

Después de la formación de inmunocomplejos específicos entre la muestra de ensayo y el anticuerpo unido, y el posterior lavado, se puede determinar la incidencia e incluso la cantidad de formación de inmunocomplejo sometiendo la misma a un segundo anticuerpo que tiene especificidad para TS10q23.3 que difiere del primer anticuerpo. Las condiciones apropiadas preferentemente incluyen dilución de la muestra con diluyentes tales como BSA, gama globulina bovina (BGG, del Inglés "Bovine Gamma Globulin") y disolución salina tamponada con fosfato (PBS)/Tween®. Estos agentes añadidos también tienden a asistir en la reducción de antecedentes no específicos. A continuación, se deja incubar los antisueros capeados durante aproximadamente 2 a aproximadamente 4 h., a temperaturas preferentemente alrededor de aproximadamente 25° a aproximadamente 27°C. Después de la incubación, se lava la superficie conectada a antisuero para separar el material no formado en inmunocomplejo. Un procedimiento de lavado preferido incluye lavado con una disolución tal como PBS/Tween® o tampón de borato.

Para proporcionar un medio de detección, el segundo anticuerpo preferentemente tendrá una enzima asociada que generará un desarrollo de color tras la incubación con un sustrato cromogénico apropiado. Por tanto, por ejemplo, se deseará poner en contacto e incubar la superficie unida al segundo anticuerpo con un IgG antihumano conjugado con peroxidasa o ureasa durante un periodo de tiempo y bajo condiciones que favorecen el desarrollo de la formación del inmunocomplejo (por ejemplo, incubación durante 2 h a temperatura ambiente en una disolución que contiene PBS tal como PBS/Tween®).

Después de la incubación con el segundo anticuerpo etiquetado con enzima, y posterior al lavado para separar el material no unido, se cuantifica la cantidad de marcaje mediante incubación con un sustrato cromogénico tal como urea y púrpura de bromocresol o el ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) y H₂O₂, en el caso de peroxidasa como marcaje de enzima. A continuación, se alcanza la cuantificación mediante la medición del nivel de generación de color, por ejemplo, usando un espectrofotómetro de espectro visible.

El formato precedente se puede alterar al unir primero la muestra a la placa de ensayo. A continuación, el anticuerpo primario se incuba con la placa de ensayo, seguido de la detección del anticuerpo primario unido usando un segundo anticuerpo marcado con especificidad para el anticuerpo primario.

Las composiciones de anticuerpo de la presente invención encontrará gran uso en los análisis de inmunotransferencia o transferencia Western. Los anticuerpos se pueden usar como reactivos primarios de alta afinidad para la identificación de proteínas inmovilizadas sobre una matriz soporte sólida, tal como nitrocelulosa, nylon o combinaciones de los mismos. Junto con la inmunoprecipitación, seguido de electroforesis en gel, estos se pueden usar como un reactivo de etapa única para usar en la detección de antígenos frente a los cuales los reactivos secundarios usados en la detección del antígeno causan un antecedente adverso. Los métodos de detección inmunológicamente basados para usar junto con transferencia Western incluyen anticuerpos secundarios enzimáticamente-, radiomarcado o fluorescentemente etiquetados frente al resto de toxina se consideraron que eran de uso particular en este aspecto.

V. Métodos para la Investigación de Compuestos Activos

También se describe el uso de TS10q23.3 y fragmentos activos, y ácidos nucleicos que codifican los mismos, en la investigación de compuestos para la actividad en o bien la estimulación de la actividad de TS10q23.3, la superación de la carencia de TS10q23.3 o el bloqueo del efecto de una molécula TS10q23.3 mutante. Estos ensayos pueden producir el uso de una diversidad de diferentes formatos y pueden depender de la clase de "actividad" para la cual se está conduciendo la investigación. Las "lecturas de salida" funcionales contempladas incluyen la unión a un compuesto, la inhibición de la unión a un sustrato, ligando, receptor u otra pareja de unión mediante un compuesto, actividad fosfatasa, actividad anti-fosfatasa, fosforilación de TS10q23.3, desfosforilación de TS10q23.3, inhibición o estimulación de una señalización célula-célula, crecimiento, metástasis, división celular, migración celular, formación de colonia en agar blando, inhibición por contacto, capacidad de invasión, angiogénesis, apoptosis, progresión tumoral u otro fenotipo maligno.

A. Ensayos *In Vitro*

Se describe la investigación de los compuestos que se unen a la molécula de TS10q23.3 o fragmento de los mismos. El polipéptido o fragmento puede ser cualquiera libre en disolución, fijado a un soporte, expresado en o sobre la superficie de una célula. O bien el polipéptido o el compuesto pueden estar marcados, permitiendo de ese modo determinar la unión.

El ensayo puede medir la inhibición de la unión de TS10q23.3 a un sustrato natural o artificial o pareja de unión. Se pueden realizar ensayos de unión competitiva en los cuales se marque uno de los agentes (TS10q23.3, pareja de unión o compuesto). Normalmente, el polipéptido será la especie marcada. Se puede medir la cantidad de marcaje libre frente al marcaje unido para determinar la unión o inhibición de la unión.

- 5 En el documento WO 84/03564 se describe otra técnica para la investigación de alto rendimiento de los documentos. Se sintetizan grandes números de compuestos de ensayo de pequeño péptido sobre un sustrato sólido, tal como alfileres de plástico u alguna otra superficie. Se hacen reaccionar los compuestos de ensayo de péptido con TS10q23.3 y se lavan. El polipéptido unido es detectado mediante diversos métodos.

- 10 El TS10q23.3 purificado puede ser revestido directamente sobre placas para usarse en las anteriormente mencionadas técnicas de investigación de fármaco. Sin embargo, se pueden usar los anticuerpos no neutralizantes al polipéptido para inmovilizar el polipéptido a una fase sólida. Además, se pueden usar las proteínas de fusión que contienen una región reactiva (preferentemente una región terminal) para enlazar la región activa de TS10q23.3 a una fase sólida.

- 15 Diversas líneas celulares que contienen mutaciones de tipo natural o naturales o producidas por ingeniería en TS10q23.3 se pueden usar para estudiar diversos atributos funcionales de TS10q23.3 y cómo un compuesto candidato afecta a estos atributos. Métodos para las mutaciones producidas por ingeniería están descritos en otra parte de este documento, ya que son mutaciones que ocurren de manera natural en TS10q23.3 que llevan a contribuir y/o por otra parte causar malignidad. En tales ensayos, el compuesto se formularía apropiadamente, se daría su naturaleza bioquímica, y se pondría en contacto con una célula diana. Dependiendo del ensayo, se puede
20 requerir cultivo. A continuación, se puede examinar la célula en virtud de un número de diferentes ensayos fisiológicos. Alternativamente, se puede realizar el análisis molecular en el cual se puede explorar la función de TS10q23.3, o rutas relacionadas. Esto puede implicar ensayos tales como aquellos para la expresión de proteína, función enzimática, utilización de sustrato, estados de fosforilación de diversas moléculas incluyendo TS10q23.3, niveles de cAMP, expresión de ARNm (incluyendo exposición diferencial de toda la célula o ARN políA) y otros.

25 B. Ensayos *In Vivo*

- También se describe el uso de diversos modelos animales. En la presente memoria, la igualdad vista entre TS10q23.3 humano y de ratón proporciona una excelente oportunidad para examinar la función de TS10q23.3 en un sistema animal completo donde normalmente se expresa. Al desarrollar o aislar líneas celulares mutantes que fallan para expresar TS10q23.3 normal, se puede generar modelos de cáncer en ratones que serán altamente indicadores
30 de cánceres en humanos y otros mamíferos. Estos modelos pueden emplear la administración ortotópica o sistemática de células tumorales para cánceres mimicos primarios y/o metastático. Alternativamente, se puede inducir cánceres en animales al proporcionar agentes conocidos por ser responsables de ciertos sucesos asociados con la transformación maligna y/o progresión tumoral. Finalmente, los animales transgénicos (discutidos a continuación) que carecen de un TS10q23.3 tipo natural se pueden utilizar como modelos para el desarrollo y
35 tratamiento del cáncer.

- El tratamiento de animales con compuestos de ensayo implicará la administración del compuesto, en una forma apropiada, al animal. La administración será mediante cualquier ruta que se pudiera utilizar para propósitos clínicos o no-clínicos, incluyendo pero no limitado a oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o local. Alternativamente, la
40 administración puede ser por instilación intratraqueal, instilación bronquial, inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Específicamente contemplados están la inyección intravenosa sistemática, la administración regional vía suministro sanguíneo o linfático y la inyección intratumoral.

- La determinación de la eficacia de un compuesto *in vivo* puede implicar una diversidad de diferentes criterios. Tales criterios incluyen, pero no se limitan a, supervivencia, reducción de la carga o masa tumoral, la detención o la desaceleración de la progresión tumoral, la eliminación de tumores, la inhibición de la prevención de metástasis, el
45 nivel de actividad incrementado, el mejoramiento en la función efectora inmune y la mejorada toma de comida.

C. Diseño Racional de Fármaco

- El objetivo del diseño racional del fármaco es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos o compuestos con los cuales interactúan (agonistas, antagonistas, inhibidores, parejas de unión, etc.). Al crear tales análogos, es posible crear fármacos que son más activos o estables que las moléculas naturales, las cuales tienen
50 diferente susceptibilidad a la alteración o las cuales puede afectar a la función de otras diversas moléculas. En un enfoque, se generaría una estructura tridimensional para TS10q23.3 o un fragmento del mismo. Esto se podría conseguir mediante cristalografía por rayos X, modelización por ordenador o mediante una combinación de ambos enfoques. Un enfoque alternativo, "escaneado con alanina", implica el reemplazamiento al azar de residuos por toda la molécula con alanina, y el resultante afecta a la función determinada.

- 55 También es posible aislar un anticuerpo específico a TS10q23.3, seleccionado mediante un ensayo funcional, y a continuación solucionar su estructura de cristal. En principio, este enfoque produce un farmacóforo sobre el cual se puede basar el posterior diseño de fármaco. Es posible evitar la cristalografía proteica toda junta mediante la generación de anticuerpos anti-idiotípicos a un anticuerpo farmacológicamente activo y funcional. Como una imagen

espejo de una imagen espejo, el sitio de unión del anti-idiotipo se esperaría que fuera un análogo del antígeno original. A continuación, el anti-idiotipo se podría usar para identificar y aislar los péptidos de los bancos de péptidos producidos químicamente o biológicamente. A continuación, los péptidos seleccionados servirían como el farmacóforo. Los anti-idiotipos se pueden generar usando los métodos descritos en la presente memoria para la producción de anticuerpos, usando un anticuerpo como antígeno.

Por tanto, se puede diseñar fármacos que tengan actividad TS10q23.3 mejorada o que actúen como estimuladores, inhibidores, agonistas, antagonistas o TS10q23.3 o moléculas afectadas por la función de TS10q23.3. En virtud de la disponibilidad de las secuencias de TS10q23.3 clonadas, se pueden producir cantidades suficientes de TS10q23.3 para realizar estudios cristalográficos. Además, el conocimiento de las secuencias de polipéptidos permite las predicciones empleadas por ordenador de las relaciones estructura-función.

VI. Enfermedades Relacionadas con Tratamiento de 10q23.3

La presente invención se puede usar en el tratamiento de cáncer. Los tipos de cáncer que se pueden tratar, de acuerdo con la presente invención, están limitados únicamente por la participación de TS10q23.3. Por la participación, incluso no es un requerimiento que TS10q23.3 sea mutado o anormal (la sobreexpresión de este supresor de tumor en realidad puede superar otras lesiones dentro de la célula). Por tanto, se contempla que una amplia diversidad de tumores puedan ser tratados usando terapia de TS10q23.3, incluyendo cánceres del cerebro (glioblastoma, astrocitoma, oligodendroglioma, ependimomas), pulmón, hígado, bazo, riñón, ganglio linfático, páncreas, intestino delgado, células sanguíneas, colon, estómago, pecho, endometrio, próstata, testículo, ovario, piel, cabeza y cuello, esófago, médula ósea, sangre u otro tejido.

En muchos contextos, no es necesario que se mate la célula tumoral o que sea inducida a experimentar muerte celular normal o "apoptosis". Además, para conseguir un tratamiento significativo, todo eso requiere que el crecimiento tumoral se ralentice a algún nivel. Puede ser que se bloquee completamente el crecimiento tumoral, sin embargo, o que se alcance alguna regresión tumoral. La terminología clínica tal como carga de "remisión" y "reducción de tumor" también se contempla dado su uso normal.

A. Terapias Basadas en la Genética

Una de las realizaciones terapéuticas contempladas por los presentes inventores es la intervención, al nivel molecular, en los sucesos implicados en la tumorigénesis de algunos cánceres. Específicamente, los presentes inventores intentan proporcionar, a una célula cancerosa, una construcción de expresión capaz de proporcionar TS10q23.3 a esa célula. Debido a que los genes humanos, de ratón y perro todos codifican el mismo polipéptido, cualquiera de estos ácidos nucleicos se podría usar en terapia humana, como podría cualquiera de las variantes de secuencia de gen anteriormente discutidas las cuales codificarían el mismo, o un polipéptido biológicamente equivalente. La prolongada discusión de los vectores de expresión y los elementos genéticos empleados en la presente invención está incorporada dentro de esta sección por referencia. Los vectores de expresión particularmente preferidos son los vectores víricos tales como los adenovirus, virus adeno asociados, herpesvirus, virus vaccinia y retrovirus. También preferido es el vector de expresión liposomalmente encapsulado.

Aquellos expertos en la técnica son conscientes de cómo aplicar la liberación de gen a situaciones *in vivo* y *ex vivo*. Para los vectores víricos, generalmente se preparará un banco de vector vírico. Dependiendo de la clase de virus y el título alcanzable, se liberaría 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} partículas infecciosas al paciente. Figuras similares pueden ser extrapoladas para formulaciones liposomales u otras no víricas mediante la comparación de las eficiencias de absorción relativa. A continuación, se discute la formulación como una composición farmacéuticamente aceptable.

Se contemplan diversas rutas para diversos tipos tumorales. La sección de a continuación contiene una extensa lista de posibles rutas. Para prácticamente cualquier tumor, se contempla la liberación sistemática. Esto se probará especialmente importante para el ataque del cáncer microscópico o metastático. Si se puede identificar la masa tumoral discreta, se pueden tomar una diversidad de enfoques directos, locales y regionales. Por ejemplo, el tumor puede ser directamente inyectado con el vector de expresión. Se puede tratar un lecho tumoral antes de, durante o después de la resección. Después de la resección, generalmente se liberaría el vector mediante un catéter izquierdo en lugar de la siguiente cirugía. Se puede utilizar la basculación del tumor para introducir el vector dentro del tumor al inyectar una vena o arteria de soporte. También se puede utilizar una ruta de suministro sanguíneo distal.

También se describe la terapia de gen *ex vivo*. Este enfoque es particularmente adecuado, aunque no limitado, al tratamiento de cánceres asociados a médula ósea. En una realización *ex vivo*, las células del paciente se separan y se mantienen fuera del cuerpo durante al menos algún periodo de tiempo. Durante este periodo, se libera una terapia, después de la cual se reintroducen las células dentro del paciente; con optimismo, se han matado cualquiera de las células tumorales en la muestra.

El trasplante de médula ósea autóloga (ABMT, del Inglés "Autologous Bone Marrow Transplant") es un ejemplo de terapia de gen *ex vivo*. Básicamente, la noción bajo el ABMT es que el paciente servirá como su propio donador de médula ósea. Por tanto, se puede liberar una dosis normalmente letal de irradiación o quimioterapia al paciente para matar las células tumorales, y repoblar la médula ósea con las propias células del paciente que se han mantenido (y

quizás expandido) *ex vivo*. Debido a que, la médula ósea con frecuencia se contamina con células tumorales, es deseable purgar la médula ósea de estas células. El uso de la terapia de gen para conseguir este objetivo es incluso otra forma más en que TS10q23.3 se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

B. Inmunoterapias

- 5 Las inmunoterapéuticas, generalmente, depende del uso de las células efectoras inmunes y las moléculas para identificar y destruir las células cancerosas. El efector inmune puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador sobre la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como efector de la terapia o puede reclutar otras células para efectuar en realidad la matanza celular. El anticuerpo también se puede conjugar a un fármaco o toxina (quimioterapéutica, radionúclido, cadena de ricina A, toxina del cólera, toxina de pertussis, etc.) y sirven simplemente como un agente de direccionamiento. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interactúa, o bien directamente o indirectamente, con una diana celular de tumor. Diversas células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK.

- 10 Es improbable que el TS10q23.3 de la presente invención pudiera servir como una diana para un efector inmune dado que (i) es improbable que se exprese sobre la superficie de la célula y (ii) que la presencia, no ausencia, de TS10q23.3 está asociada con el estado normal. Sin embargo, es posible que formas mutantes particulares de TS10q23.3 se puedan identificar mediante inmunoterapia, o bien usando anticuerpos, conjugados de anticuerpo o células efectoras inmune.

- 15 Un escenario más probable es que la inmunoterapia se pudiera usar como parte de una terapia combinada, junto con terapia de gen diana a TS10q23.3. A continuación, se discute el enfoque general para la terapia combinada. Generalmente, la célula tumoral debe soportar algún marcador que es susceptible a direccionamiento, es decir, no está presente en la mayoría de las otras células. Muchos marcadores tumorales existen y algunos de estos pueden ser adecuados para direccionamiento en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, Antígeno Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógeno, receptor de laminina, *erb B* y p155.

C. Terapia de Proteína

- 20 Otro enfoque de terapia es la provisión, a un sujeto, de polipéptido TS10q23.3, fragmentos activos, péptidos sintéticos, miméticos u otros análogos del mismo. La proteína se puede producir por medios de expresión recombinante o, si es demasiado pequeña, generar mediante un sintetizador de péptido automatizado. Las formulaciones se seleccionarían en base a la ruta de administración y al propósito que incluyen, pero no se limitan a, formulaciones liposomales y preparaciones farmacéuticas clásicas.

D. Terapia Combinada con Inmunoterapia, Quimio o Radioterapia Tradicional

- 25 La resistencia celular tumoral a agentes que dañan el ADN representa un problema muy importante en la oncología clínica. Un objetivo del actual estudio del cáncer es encontrar las formas para mejorar la eficacia de la quimio y radioterapia. Una forma es mediante la combinación de dichas terapias tradicionales con la terapia de gen. Por ejemplo, el gen de la timidin quinasa del herpes simple (HS-*tk*), cuando se liberó a tumores cerebrales mediante un sistema de vector retroviral, con éxito indujeron susceptiblemente al agente ganciclovir antiviral (Culver et al., 1992). En el contexto de la presente invención, se contempla que la terapia de reemplazamiento de TS10q23.3 se podría usar igualmente junto con la intervención quimio o radioterapéutica. También puede demostrar eficacia para combinar la terapia de gen de TS10q23.3 con inmunoterapia, tal como se ha descrito anteriormente.

- 30 Para matar células, inhibir el crecimiento celular, inhibir la metástasis, inhibir la angiogénesis o de otra manera invertir o reducir el fenotipo maligno de las células tumorales, usando los métodos y composiciones de la presente invención, generalmente se pondría en contacto una célula "diana" ("target") con una construcción de expresión de TS10q23.3 y al menos otro agente. Estas composiciones serían proporcionadas en una cantidad combinada eficaz para matar o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar poner en contacto las células con la construcción de expresión y el(los) agente(s) o factor(es) al mismo tiempo. Esto se puede alcanzar poniendo en contacto la célula con una composición sencilla o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en el que una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye el agente.

- 35 Alternativamente, el tratamiento con terapia de gen puede preceder o seguir al otro tratamiento con agente mediante intervalos que oscilan desde minutos a semanas. Si el otro agente y construcción de expresión se aplican separadamente a la célula, generalmente se aseguraría que un significativo periodo de tiempo no expiraría entre el tiempo de cada liberación, de modo que el agente y la construcción de expresión serían incluso capaces de ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre la célula. En tales ejemplos, se contempla que se pondría en contacto la célula con ambas modalidades dentro de aproximadamente 12-24 horas de cada uno y, más preferentemente, dentro de aproximadamente 6-12 horas de cada uno, con un tiempo de demora de solamente aproximadamente 12 horas que es lo más preferido. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el periodo de tiempo para el

tratamiento de manera significativa, sin embargo, donde varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8) transcurren entre las respectivas administraciones.

También es concebible que será deseable más de una administración de o bien TS10q23.3 o el otro agente. Se pueden emplear diversas combinaciones, donde TS10q23.3 es "A" y el otro agente es "B", tal como se ilustra a continuación:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/AB B/A/A/A A/B/A/A A/AB/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

Se contempla otras combinaciones. De nuevo, para alcanzar la muerte celular, se liberan ambos agentes a una célula en una cantidad combinada eficaz para matar la célula.

Los agentes o factores adecuados para usar en una terapia combinada son cualquier compuesto químico o método de tratamiento que induce daño de ADN donde se suministra a una célula. Tales agentes y factores incluyen radiación y ondas que inducen daño de ADN tales como irradiación γ , rayos X, irradiación UV, microondas, emisiones electrónicas y similares. Una diversidad de compuestos químicos, también descritos como "agentes quimioterapéuticos", funcionan para inducir daño de ADN, todos los cuales se intenta que sean de uso en los métodos de tratamiento combinado descritos en la presente memoria. Los agentes quimioterapéuticos contemplados para ser de uso, incluyen, por ejemplo, adriamicina, 5-fluorouracilo (5FU), etopósido (VP-16), camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, asplatina (CDDP) e incluso peróxido de hidrógeno. La invención también abarca el uso de una combinación de uno o más agentes que dañan el ADN, compuestos actuales o basados en radiación, tales como el uso de rayos X con cisplatina o el uso de cisplatina con etopósido. En ciertas realizaciones, particularmente se prefiere el uso de cisplatina en combinación con una construcción de expresión de TS10q23.3 como este compuesto.

En el tratamiento de cáncer de acuerdo con la invención, se pondrían en contacto las células tumorales con un agente además de la construcción de expresión. Esto se puede alcanzar irradiando el sitio de tumor localizado con radiación tal como rayos X, luz UV, rayos γ o incluso microondas. Alternativamente, las células tumorales se pueden poner en contacto con el agente mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto tal como, adriamicina, 5-fluorouracilo, etopósido, camptotecina, actinomicina D, mitomicina C o, más preferentemente, cisplatina. El agente se puede preparar y usar como una composición terapéutica combinada, o kit, combinándolo con una construcción de expresión de TS10q23.3, tal como se ha descrito anteriormente.

Agentes que directamente entrecruzan ácidos nucleicos, específicamente ADN, se conciben para facilitar el daño de ADN que conduce a una combinación sinérgica, antineoplásica con TS10q23.3. Se pueden usar agentes tales como cisplatina, y otros agentes alquilantes de ADN. La cisplatina ha sido ampliamente usada para tratar cáncer, con dosis eficaces usadas en aplicaciones clínicas de 20 mg/m² durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres cursos. La cisplatina no se absorbe oralmente por lo tanto se debe liberar vía inyección intravenosamente, subcutáneamente, intratumoralmente o intraperitonealmente.

Los agentes que dañan ADN también incluyen compuestos que interfieren con la replicación de ADN, mitosis y segregación cromosómica. Tales compuestos quimioterapéuticos incluyen adriamicina, también conocida como doxorubicina, etopósido, verapamila, podofilotoxina y similares. Ampliamente usado en un entorno clínico para el tratamiento de neoplasmos, estos compuestos se administran a través de inyecciones de bolos intravenosamente a dosis que oscilan entre 25-75 mg/m² en intervalos de 21 días para adriamicina, a 35-50 mg/m² para etopósido intravenosamente o el doble de la dosis intravenosa oralmente.

Los agentes que interrumpen la síntesis y fidelidad de los precursores de ácidos nucleicos y subunidades también conducen al daño de ADN. Se han desarrollado como tales un número de precursores de ácido nucleico. Particularmente útil son los agentes que han experimentado ensayo exhaustivo y están fácilmente disponibles. Como tales, agentes tales como 5-fluorouracilo (5-FU), preferentemente se usan mediante tejido neoplásico, haciendo a este agente particularmente útil para el direccionamiento a células neoplásicas. Aunque bastante tóxico, 5-FU, es aplicable en un amplio rango de vehículos, incluyendo local, sin embargo siendo comúnmente usada la administración intravenosa con dosis que oscilan entre 3 y 15 mg/kg/día.

Otros factores que causan daño de ADN y se han usado extensivamente incluyen los comúnmente conocidos como rayos γ , rayos X y/o la liberación dirigida de radioisótopos a células tumorales. Otras formas de factores que dañan ADN también se contemplan tal como microondas e irradiación UV. Lo más probable es que todos estos factores efectúan un amplio intervalo de daño de ADN, sobre los precursores de ADN, la replicación y reparación de ADN, y el ensamblaje y mantenimiento de cromosomas. Los intervalos de dosificación para el intervalo de rayos X desde las

dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante periodos de tiempo prolongados (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2.000 a 6.000 roentgens. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la vida útil del isótopo, la fuerza y tipo de radiación emitida y la absorción mediante las células neoplásicas.

5 El experto en la técnica se dirige a "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, capítulo 33, en particular páginas 624-652. Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración, en un suceso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deberían encontrar patrones de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza tal como lo requerido por la Oficina de FDA de Patrones Biológicos.

10 Los inventores proponen que la liberación regional de las construcciones de expresión de TS10q23.3 a pacientes con cánceres relacionados con 10q23.3 será un método muy eficiente para la liberación de un gen terapéuticamente eficaz para contrarrestar la enfermedad clínica. Igualmente, la quimio o radioterapia puede estar dirigida a una región afectada particular del cuerpo de los sujetos. Alternativamente, la liberación sistemática de la construcción de expresión y/o el agente puede ser apropiada en ciertas circunstancias, por ejemplo, donde ha ocurrido la metástasis extensiva.

15 Además de la combinación de terapias de direccionamiento a TS10q23.3 con quimio y radioterapias, también se contempla que la combinación con otras terapias de gen será ventajosa. Por ejemplo, el direccionamiento de TS10q23.3 y mutaciones p53 o p16 al mismo tiempo pueden producir un tratamiento anticáncer mejorado. Cualquier otro gen relacionado con tumor concebiblemente puede estar sometido a direccionamiento de esta manera, por ejemplo, p21, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, BCRA2, p16, FHIT, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *src*, *fms*, *jun*, *trk*, *ret*, *gsp*, *hst*, *bcl* y *abl*.

20 También se debería indicar que cualquiera de las terapias anteriores puede probar ser útil por ella misma en el tratamiento de un TS10q23.3. En este aspecto, la referencia a compuestos quimioterapéuticos y terapia de gen de no TS10q23.3 en combinación también debería leerse como una reflexión de que estos enfoques se pueden emplear separadamente.

E. Formulaciones y Rutas para la Administración a Pacientes

Si se contemplan aplicaciones clínicas, será necesario preparar composiciones farmacéuticas (vectores de expresión, reservas de virus, proteínas, anticuerpos y fármacos) en una forma apropiada para la aplicación deseada. Generalmente, esto implicará la preparación de composiciones que están esencialmente libres de pirógenos, así como otras impurezas que podrían ser perjudiciales para humanos o animales.

30 Generalmente se deseará emplear sales y tampones apropiados para hacer los vectores de liberación estables y permitir la absorción mediante células diana. Los tampones también se emplearán cuando se introduzcan las células recombinantes dentro de un paciente. Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz del vector a células, disueltas o dispersas en un vehículo farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. Tales composiciones también se refieren como inóculos. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras perjudiciales cuando se administra a un animal o un humano. Tal como se ha usado en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye alguno y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes que retrasan la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el grado en el que cualquier medio convencional o agente es incompatible con los vectores o células de la presente invención, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Los ingredientes activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

45 Las composiciones activas de la presente invención pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones de acuerdo con la presente invención será vía cualquier ruta común siempre que el tejido diana esté disponible vía esa ruta. Esto incluye oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o local. Alternativamente, la administración puede ser mediante inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Tales composiciones normalmente se administrarían como composiciones farmacéuticamente aceptables, descritas anteriormente.

50 Los compuestos activos también se pueden administrar parenteralmente o intraperitonealmente. Las disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de los microorganismos.

55 Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de las disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que existe fácil para usar con jeringuilla. Debe

ser estable bajo las condiciones de producción y almacenamiento y debe preservarse frente la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede traer aproximadamente mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede traer aproximadamente mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoesterato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes anteriormente enumerados, tal como se requiere, seguido de la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados dentro de un vehículo estéril el cual contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los anteriormente enumerados. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución filtrada previamente estéril del mismo.

Tal como se ha usado en la presente memoria, el "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye alguno y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardante de la absorción y similares. Es bien conocido en la técnica el uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas. Excepto en la medida de que cualquier medio convencional o agente es incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos complementarios dentro de las composiciones.

Para la administración oral los polipéptidos de la presente invención se pueden incorporar con excipientes y usar en forma de enjagües bucales no ingeribles y dentífricos. Un enjagüe bucal se puede preparar incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, tal como una disolución de borato de sodio (Disolución de Dobell). Alternativamente, el ingrediente activo se puede incorporar dentro de un lavado antiséptico que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El ingrediente activo también se puede dispersar en dentífricos, incluyendo: geles, pastas, polvos y suspensiones. El ingrediente activo se puede añadir en una cantidad terapéuticamente eficaz a un dentífrico en pasta que puede incluir agua, ligantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes.

Las composiciones de la presente invención pueden estar formuladas en una forma neutral o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos de amino libre de la proteína) y las cuales se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos hidroc্লórico o fosfórico o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos de carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad como sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones fácilmente se administran en una diversidad de formas de dosificación tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares. Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debería ser adecuadamente tamponada si fuera necesario y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En esta conexión, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la técnica teniendo en cuenta la presente descripción. Por ejemplo, se podría disolver una dosificación en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y o bien se añade a 1.000 ml de fluido de hipodermoclasia o se inyecta en el sitio propuesto de la infusión, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1.035-1.038 y 1.570-1.580). Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto a tratar. La persona responsable para la administración, en cualquier suceso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deberían encontrar patrones de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y de pureza tal como se requiere por la Oficina FDA de Patrones Biológicos.

VII. Animales Transgénicos/Animales "Knockout"

Se pueden producir animales transgénicos los cuales contienen un transgen funcional que codifica un polipéptido TS10q23.3 funcional o variantes del mismo. Los animales transgénicos que expresan transgenes TS10q23.3, líneas celulares recombinantes derivadas de tales animales y embriones transgénicos pueden ser útiles en métodos para la investigación y la identificación de agentes que inducen o reprimen la función de TS10q23.3. Los animales

transgénicos de la presente invención también se pueden usar como modelos para el estudio de indicaciones tales como cánceres.

Se introduce un transgen de TS10q23.3 dentro de un hospedante no humano para producir un animal transgénico que expresa un gen de TS10q23.3 humano o de murine. El animal transgénico se produce mediante la integración del transgen dentro del genoma de una manera que permita la expresión del transgen. Los métodos para producir animales transgénicos están descritos de manera general por Wagner y Hoppe (documento de Patente U.S. Nº 4.873.191),

Brinster et al. 1985 y en "Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual" 2ª edición (eds., Hogan, Beddington, Costantini y Long, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994).

Puede ser deseable reemplazar el TS10q23.3 endógeno mediante recombinación homóloga entre el transgen y el gen endógeno; o se puede eliminar el gen endógeno mediante la delección como en la preparación de animales "knockout". Típicamente, se transfiere un gen de TS10q23.3 flanqueado por secuencias genómicas mediante microinyección dentro de un huevo fertilizado. Los huevos microinyectados se implantan dentro de un hospedante femenino, y se investiga la progenie para la expresión del transgen. Los animales transgénicos se pueden producir a partir de los huevos fertilizados de un número de animales que incluyen, pero no se limitan a reptiles, anfibios, pájaros, mamíferos y peces. Los ratones transgénicos que se generan sobreexpresan TS10q23.3 o expresan una forma mutante del polipéptido. Alternativamente, en una realización preferida la ausencia de un TS10q23.3 en ratones "knockout" permite el estudio de los efectos que la pérdida de la proteína de TS10q23.3 tiene sobre una célula *in vivo*. Los ratones "Knockout" también proporcionan un modelo para el desarrollo de cánceres relacionados con TS10q23.3.

Tal como se ha indicado anteriormente, los animales transgénicos y las líneas celulares derivadas de tales animales pueden encontrar uso en ciertos experimentos de ensayo. En este aspecto, los animales transgénicos y las líneas celulares capaces de expresar TS10q23.3 de tipo natural o mutante pueden ser expuestos a sustancias de ensayo. En estas sustancias de ensayo se puede investigar la capacidad de aumentar la expresión de TS10q23.3 de tipo natural y o funcionan o afectan a la expresión o función del TS10q23.3 mutante.

VIII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Se debería apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y por tanto se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica

Ejemplo 1 – Deleciones Homocigotas en las Líneas Celulares de Glioma

Los inventores han examinado el ADN de una serie de 21 líneas celulares de glioma y cultivos primarios, junto con células normales, para identificar deleciones homocigotas de material genómico en el cromosoma 10. Se eligieron marcadores para su localización aproximada en o cerca de regiones previamente implicadas (FIG. 1). Las células analizadas fueron generadas en el Departamento de Neuro-Oncología UTMDACC (LG11, EFC-2, PL-1, PC-1, JW, FG-2, FG-0, NG-1, PH-2, KE, PC-3 y D77), estaban comercialmente disponibles (U138, A172, U373, U87, U251, U118 y T98G), o se obtuvieron de colaboradores (13 wk astro, D54-MG). Los marcadores se obtuvieron de Research Genetics, Huntsville, AL, o se sintetizaron de la secuencia informada. Una vez la línea celular, EFC-2, reveló una gran delección homocigota asociada con cuatro marcadores de alrededor D10S215 (FIG. 2). Esta delección también se observó por FISH usando YAC 746h6, el cual mapea la región. Otras tres líneas celulares (D-54, A172 y LG11) también demostraron deleciones homocigotas en AFMA086WG9 (AFM086), de ese modo implicando fuertemente la región que contiene un gen supresor de tumor putativo (FIG. 2). Las deleciones en las reacciones PCR™ se realizaron en presencia de dos pares de cebadores (multiplexados) para asegurar condiciones de amplificación apropiadas. Todas las deleciones se confirmaron mediante (al menos) reacciones triplicadas. Esta misma región también se ha implicado en el carcinoma de próstata (Gray et al., 1995). Las deleciones homocigotas en las líneas celulares también se han usado para definir un locus del gen supresor de tumor en 3p21.3 en carcinoma de pulmón de célula pequeña (Daly et al., 1993; Kok et al., 1994; Wei et al., 1996).

Ejemplo 2 – Retención del Loci 10q en las Células Híbridas Suprimidas

La segunda estrategia de los inventores fue examinar las regiones del cromosoma 10 que se retenían en los clones híbridos suprimidos, pero ausentes en los clones revertidos ("revertant"). Este análisis extendió el estudio previo de los inventores, mostrando la presencia de dos loci supresores de tumor en el cromosoma 10 y analizando las regiones que se retenían. Los híbridos que retenían todo o porciones de 10q fallaron en crecer en la agarosa blanda y en ratones nude (clones "completamente" suprimidos), mientras que las células híbridas que perdieron la mayoría del cromosoma 10q insertado crecieron en agarosa blanda, pero eran no tumorigénicas (clones "parcialmente" suprimidos; Steck et al., 1995; FIG. 3, lado derecho). Se mostró que clones originales U251N10.6, N10.7 y N10.8 previamente retenían solamente fragmentos de 10q (Pershouse et al., 1993; Steck et al., 1995). Usando marcadores microsatélites informativos adicionales, se identificaron tres regiones retenidas en todos los tres clones suprimidos;

una región de 22 cM desde D10S219 a D10S110, una región de 14 cM desde D10S192 a D10S187 y una región de 18 cM desde D10S169 a través de D10S1134 (FIG. 3).

Para evitar esta limitación, el cromosoma 10 etiquetado para resistencia a neomicina originalmente transferido desde el híbrido U251.N10.7 fue “rescatado” mediante la transferencia del cromosoma mediado por microcélula dentro de las células A9 de ratón. Esto permite que todos los marcadores microsatélites humanos sean informativos para la presencia del cromosoma 10. La bases para este análisis es que todos los subclones “completamente” suprimidos deberían retener una región común y esta región estar deletcionada en los subclones “parcialmente” suprimidos. Un impulso adicional fue que N10.7 manifestó considerable heterogeneidad en el tamaño del cromosoma 10 retenido, tal como se determinó mediante FISH usando sondas específicas al cromosoma 10. Además, en las células híbridas usadas para este rescate se ensayó en primer lugar el crecimiento en agarosa blanda y mostraron no formación de colonia. Todos los híbridos de ratón que contenían el cromosoma 10 humano transferido contenían el brazo corto del cromosoma 10. La misma región era retenida en los clones “parcialmente” suprimidos (N10.5a-j) que crecían en agarosa blanda (Steck et al., 1995), excluyendo así esta región (10pter-10q11) ya que contiene el gen supresor de tumor 10q. El examen de las regiones de 10q retenidas ilustró la considerable heterogeneidad (FIG. 3). La mayoría de los clones mostraron deleciones o bien parciales o extensas de 10q23-26. En todos los subclones examinados solamente dos regiones fueron retenidas. La región más centromérica retenida implicaba los marcadores D10S210 y D10S219. Sin embargo, estos marcadores estaban ausentes en los clones N10.6 y/o N10.8 originales, excluyendo esta región (FIG.3). La otra región era centromérica de D4S536 pero telomérica de D10S215 (≈4 cM). Los marcadores AFM086 y D10S536 estaban retenidos en todos los clones examinados (región recuadrada en la FIG. 3). Estos marcadores estaban ausentes en los clones parcialmente suprimidos (N10.5a-j). Estos resultados demostraron que una región común, de alrededor de AFM086, es retenida en todas las células híbridas que son suprimidas de manera fenotípica. Esta misma región está deletcionada en varias líneas celulares de glioma.

Este análisis tiene varias limitaciones. En primer lugar, no se pueden analizar la actividad biológica en los clones rescatados, por lo tanto algunos cambios en el cromosoma 10 que pueden haber ocurrido durante o después de la transferencia no se podrían detectar. Para dirigir parcialmente este suceso, se realizó el análisis de los inventores tan pronto como se pudieron recoger los clones. Además, la retención de esta porción del cromosoma solamente puede “corregir” una deleción artefacto *in vitro*. Por consiguiente, se realizaron estudios de deleción alélica para determinar si esta región estaba implicada en gliomas. Además, se sugirió una región alternativa mediante este análisis en D10S1158, donde todos los clones excepto uno (C7) retuvieron esta región. Sin embargo, la región retenida en AFM086 también presentó deleciones homocigóticas, estando implicadas de ese modo por dos métodos alternativos en comparación con D10S1158. También es interesante indicar que la región del gen supresor de tumor parece que preferentemente se retiene, mientras se fragmenta el resto de 10q.

Ejemplo 3 – Análisis de Deleción Alélica de 10q

Se realizó un estudio de deleción alélica sobre ADN de una serie de 53 especímenes de glioma y linfocitos de paciente correspondientes usando marcadores microsatélites específicos para el cromosoma 10. Este estudio se emprendió para determinar si nuestra región crítica también estaba implicada en los especímenes de glioma. Se observaron extensas deleciones en la mayoría de los especímenes derivados de GBM, con 30 de 38 GBMs que presentan deleción de la mayoría o de todos los marcadores del cromosoma 10. Se observaron deleciones menos extensas en la mayoría si los especímenes derivaban de astrocitomas anaplásicos, mientras que se observaron deleciones infrecuentes en los astrocitomas y en la mayoría de los oligodendrogliomas (FIG. 4 y datos no mostrados). La mayoría de los marcadores usados en este análisis se mapearon en 10q23-26 (Gyapay et al., 1994). Similar a otros estudios, no se podría demostrar convincentemente una región común de deleción, debido a las grandes deleciones en la mayoría de las muestras de GBM (Fults et al., 1993; Rasheed et al., 1995).

Sin embargo, para los especímenes GBM examinados, todos excepto una muestra de tumor (Nº 9; FIG. 4) revelaron deleciones que implicaban la región desde D10S579 a D10S541. Además, solamente un AA mostró una deleción en la región crítica de los inventores, y no astrocitomas. Dos oligodendrogliomas presentaron deleciones dentro de la región crítica, pero ambos fueron diagnosticados como malignos. Este estudio presenta diversas posibilidades. En primer lugar, las deleciones que implican la región crítica de los inventores ocurren predominantemente en GBMs y no en tumores de grado inferior. Esto implicaría que la pérdida del gen supresor de tumor en el cromosoma 10q en la región crítica de los inventores representaría una alteración genética asociada con la progresión a GBM. En apoyo a esta hipótesis, aún cuando las deleciones ocurren en 10q en tumores de grado inferior, no se identificó región común de deleción en 10q para estos especímenes. Estas observaciones apoyarían, de nuevo, la sugerencia anterior de los inventores de que la deleción del gen supresor de tumor 10q predominantemente está asociada con GBMs y no todas las deleciones en 10q afectan al gen supresor de tumor. La región D10S216 a D10S587, sugerida por Rasheed, mostró deleciones extensas, pero varios GBMs presentaron retención de heterocigosidad en esta región (tumores Nº 2, Nº 9, Nº 13, Nº 26; FIG.4). Además, si se excluyen los tumores de grado bajo de su estudio, la región de los inventores está implicada en todos GBMs. Esta combinación de enfoques independientes fuertemente sugiere un gen supresor de tumor 10q que mapea en la región D10S215 a D10S541, específicamente en AFM086.

Ejemplo 4 – Mapeado de la Región del Gen del Supresor de Tumor Candidato

La región crítica que los inventores han identificado está centrada en AFM086 y está bordeada por D10S215 y S10S541 (FIGs. 2 y 8). Esta región es relativamente pequeña, estando contenida dentro de varios YACs individuales (787d7; 746h8; 934d3). FISH que aplica con YAC 746h8 en las propagaciones de la metafase EFC-2 muestra que la delección homocigótica está contenida dentro del YAC ya que se observó parcialmente el YAC y YACs adjuntos sobre ambos lados estaban presentes. Se han aislado cromosomas artificiales bacterianos (BACs, del Inglés "Bacterial Artificial Chromosome") o PACs para todos los marcadores en la región (FIG. 8). El BAC que sigue a la región estaba construido a partir de las secuencias finales de BACs que mapeaban en la región. Se han identificado varios rasgos notables. En primer lugar, se identificaron dos BACs solapados (46b12 y 2f20) y verifican la integridad genómica de 106d16. En segundo lugar, se identificó un sitio *Not I* en un extremo de los BACs. La presencia del sitio *Not I* y la digestión de restricción coincidente con *SacII*, *EagI* y *BssHII* sugiere la presencia de una isla CpG dentro de 106d16.

Se usaron los fragmentos *EcoRI* de BAC 106d16 para examinar la extensión de las delecciones homocigóticas, mediante transferencia Southern, en las células de glioma que previamente se muestra que habían deleccionado homocigóticamente AFM086 (FIGs. 2 y 5). El lado derecho (fragmento 14 de *EcoRI*) contiene la probable isla CpG y está presente en tres de las cuatro líneas celulares. Se usó un fragmento *NotI/EcoRI* (Nº 3) como sonda en una transferencia Southern que contiene varios BACs y la línea celular de glioma (FIG. 2). No se han detectado delecciones al lado telomérico (lado derecho) usando sondas del 46b12, excepto para las células EFC-2. Sin embargo, se han observado delecciones homocigóticas adicionales en las células dentro de la región definida por 106d16 (65 kb). Se observa una delección homocigótica para la banda 3 para las células LG11 y EFC-2, pero no para las células de glioma adicionales o controles normales. Se ha observado que 106d16 está presente en todas las células (EFC-2 presenta una banda de migración alterada), que sugiere que la delección homocigótica está contenida enteramente dentro de 106d16.

Ejemplo 5 – Identificación de Genes Expresados dentro de la Región Crítica

Se generaron fragmentos *EcoRI* a partir de BAC 106d16 y se separaron por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa. Se ligaron bandas individuales o conjuntos de bandas de tamaño similar dentro de pSPL3 (GIBCO, Gaithersburg, MD). Se identificaron exones putativos tal como lo describe el fabricante. Se sometieron a maduración por corte y empalme apropiadamente dos exones dentro del vector atrapante. Los exones se derivan del conjunto de banda 2, 3, 4, 5 y banda 7. Se determinó la secuencia de los exones atrapados y se definieron por la secuencia vector atrapante conocida. Usando búsquedas BLAST de la base de datos de etiqueta de secuencia expresada (dbEST), se identificaron cinco etiquetas potenciales de secuencia expresada (ESTs, del Inglés "Expressed Sequence Tag"). Se observaron dos ESTs (gb/H92038, AA009519) que contenían o bien uno o ambos de los exones (si bien es cierto que una EST estaba en la orientación equivocada).

Se generaron cebadores de secuenciación a partir de las ESTs y se usaron para definir los límites de exón-intrón putativos usando BAC46b12 como plantilla. Se identificaron nueve exones. Las diferencias de secuencia entre las ESTs y la plantilla genómica fueron corregidas. Todos los exones estaban contenidos dentro de BAC 46b12. Se generaron cebadores a partir de las secuencias de intrón adyacentes a los exones para formar unidades amplicón para cada exón. Dos de los exones se correspondían a los exones atrapados de las secuencias BAC 106d16 *EcoRI*. La secuencia del gen se muestra en la FIG. 6. La lectura de aminoácidos pronosticada se definió por la presencia de un sitio de comienzo ATG, codones de terminación TGA y TAA en el marco, la presencia de codones de terminación múltiples en todos los tres marcos de lectura en otro lugar en la secuencia, nueve sitios de maduración por corte y empalme, y la presencia de señales Kozak cerca del sitio de iniciación. La secuencia de aminoácidos 403 se muestra en la FIG. 7 y FIG. 9. El peso molecular pronosticado es de 47.122 con un pl de 5,86.

Se sugiere un posible papel funcional para el producto proteico mediante su homología de secuencia a varios motivos de proteína. Un motivo crítico a partir de los residuos 88 a 98[*IHC*KAGKGRG](SEC. ID. Nº: 17) tiene una correspondencia exacta para el dominio catalítico conservado de una proteína tirosin fosfatasa [(*I/V*)HCxAGxxR(S/T)G](SEC. ID. Nº: 18)(Denu et al., 1996). Se identificaron varios otros motivos que concordarían con la función fosfatasa del gen supresor de tumor.

Se generaron amplicones (productos de PCR™ generados a partir de diversas regiones del gen) a partir de ADNc cebado al azar. La secuencia de los amplicones correspondían a la secuencia de ADN. Se usaron amplicones no solapados para sondar transferencias Northern de tejido normal derivadas de diversos órganos (Clontech, Palo Alto, CA; transferencias multitejido). Todos los amplicones identificaron una banda principal en 5,5 a 6 kb sobre las transferencias Northern y varias bandas menores. El mensaje se expresó en todos los tejidos examinados (corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, esqueleto, músculo, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, ovario, intestino delgado, colon y linfocitos de sangre periférica).

Ejemplo 6 – Análisis Mutacional

Los análisis mutacionales inicialmente han avanzado sobre dos frentes. En primer lugar, se analizó la presencia del gen candidato en las líneas celulares de glioma que inicialmente mostraron tener delecciones homocigóticas. Tal como se muestra en la FIG. 8, todas la líneas celulares que presentaron delección de AFM086 tenían delecciones homocigóticas de exones múltiples del gen candidato. Además, las delecciones ocurrieron en medio del gen,

definiendo así los límites de delección (deleciones similares en todas las líneas celulares) entre exones B y G. Las deleciones que afectan a la mitad del gen además indican que el gen identificado representa el gen diana para la mutación.

- 5 También se realizaron análisis preliminares para las mutaciones de secuencia en una serie de líneas celulares de glioma. Se observaron mutaciones y/o deleciones en todas excepto tres líneas celulares de glioma examinadas (Tabla 4). La referencia al número base en la tabla se refiere al exón, no a las secuencias enteras, es decir, a la 98ª base del exón G para U251.

TABLA 4

MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL GEN CANDIDATO				
	Células	Tipo de Célula	Mutación	Efecto Pronosticado
1	U87	Glioma	Exón c de junta de corte y empalme:G+1>T	Variante de corte y empalme
2	U138	Glioma	Exón h del sitio de corte y empalme: G+1>T	Variante de corte y empalme
3	U251	Glioma	Exón G de adición de 2 pb; 98 ins TT	
4	U373	Glioma	Exón G de desplazamiento de pauta de lectura	
5	EFC-2	Glioma	-todos los exones	No producto
6	D54	Glioma	-exones C-I	No producto
7	A172	Glioma	-exones C-I	No producto
8	LG11	Glioma	-exones B-1	No producto
9	T98G	Glioma	Exón B de sentido erróneo; T46->G	leu>arg
10	KE	Glioma	Exón B de sentido erróneo; G28->A	gly>glu
11	F60	Glioma	Exón H de mutación terminal; C202->T	Parada terminal
12	D77	Glioma	No mutación (heterogéneo para 10q)	
13	PC-3	Bajo grado	No mutación	
14	PH-2	Bajo grado	No mutación	
15	nLnCap	Próstata	Exón A de delección, 16-17 del AA; mutación B, C53->T	silencio

- Además, se encontraron deleciones de exones en LnCap, una línea celular de próstata. Las células de glioma que fallaron en mostrar una mutación/delección eran derivadas de tumores de bajo grado (PC-3 y PH-2) donde se espera no delección alélica del cromosoma 10 y se ha observado para estas células. Las otras células (D77) eran un cultivo celular primario, y se mostró que el cromosoma 10 era heterocigótico a partir de un polimorfismo de 1 pb dentro del género. Una línea celular de cáncer de pecho también mostró una mutación. Este análisis inicial apoya la conclusión de los inventores de que la pérdida de un gen supresor de tumor 10q representa un marcador molecular crítico para la enfermedad y la progresión del glioblastoma.

IX. Referencias

- Albarosa et al., Deletion mapping of gliomas suggest the presence of two small regions for candidate tumor-suppressor genes in a 17-cM interval on chromosome 10q. *Am. J. Genet.*, 58:1.260-1.267, 1996.
- 20 Baichwal y Sudgen, Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes. En: *Gene Transfer*, Kucherlapati R. ed, New York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986.
- Barany y Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds., Academic Press, New York, pp. 1-284, 1979.
- Benvenisty y Neshif, Direction introduction of genes into rats and expression of the genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83:9.551-9.555, 1986.
- 25 Bianchi et al., Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumor types. *Nature Genetics*, 6:185-192, 1994.
- Bigner et al., Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res.*, 48:405-411, 1988.

- Bigner et al., Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res.* 48:405-411, 1988.
- Bishop, J. M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64:2351-248, 1991.
- Boring et al., *Cancer Statistics*, 1994 CA, 43:7-26, 1994.
- Brinster et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82:4.438-4.442, 1985.
- 5 Capaldi et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977.
- Carter et al., Allelic loss of chromosome 16q and 10q in human prostate carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8.751-8.755, 1990.
- Chang et al., Foreign gene delivery and expression in hepatocytes using a hepatitis B virus vector. *Hepatology*, 14:124A, 1991.
- 10 Chen y Okayama, High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 7:2.745-2.752, 1987
- Coffin, Retroviridae and Their Replication. En: *Virology*, Fields et al., eds., Raven Press, New York, pp. 1.437-1.500, 1990.
- 15 Cohen, P., The discovery of protein phosphatases: From chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease. *Bioessays*, 61-583-588, 1994.
- Collet et al., Protein Kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:2.021-2.024, 1978.
- Coupar et al., A general method for the construction of recombinant vaccinia virus expressing multiple foreign genes, *Gene*, 68:1-10, 1988.
- 20 Culver et al., In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 256:1.550-1.552, 1992.
- Daly et al., A homozygous deletion on chromosome 3 in small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressive activity. *Oncogene* 8:1.721-1.729, 1993. Denu et al., Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* 87:361-364, 1996. Dubensky et al., Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7.529-7.533, 1984.
- 25 El-Azouzi et al., Loss of distinct regions on the short arm of chromosome 17 associated with tumorigenesis of human astrocytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7.186-7.190, 1989. EP 329 822, Davey et al. Fearron y Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61:759-767, 1990. Fechheimer et al., Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8.463-8.467, 1987.
- 30 Ferkol et al., Regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase/human factor IX gene introduced into the livers of adult rats by receptor-mediated gene transfer. *FASEB J.*, 7:1.081-1.091, 1993.
- Fodor et al., Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251:767-773, 1991.
- Foulds, The natural history of cancer. *J. Chronic Dis.*, 8:2-37, 1958.
- 35 Fraley et al., Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3.348-3.352, 1979.
- Freshner, *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2^a ed., Oxford/New York, IRL Press, Oxford University Press, 1992.
- Friedmann, Progress toward human gene therapy. *Science*, 244:1.275-1.281, 1989.
- Frohmann, En: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990.
- 40 Fujimoto et al., Loss of heterozygosity on chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *Genomics*, 4:210-214, 1989.
- Fults & Pedone, Deletion mapping of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma and multiforme. *Genes Chromosom. Cancer* 7:173-177, 1993.
- Fults et al., Allelotype of human malignant astrocytoma, *Cancer Res.*, 50:5.784-5.789, 1990. GB 2 202 328.
- 45 Gefter et al., *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.

- Ghosh-Choudhury et al, EMBO J., 6:1.733-1.739, 1987.
- Ghosh y Bachhawat, Targeting of Liposomes to Hepatocytes. En: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy using Specific Receptors and Ligands. Wu et al., eds., Marcel Dekker, New York, pp. 87-104, 1991.
- 5 Goding, 1986, En: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª ed, Academic Press, Orlando, Fla., pp. 60-61 y 71-74, 1986.
- Gomez-Foix et al., J. Biol. Chem., 267:25.129-25.134, 1992.
- Gopal, Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and cotransfection of suspension cell cultures. Mol. Cell. Biol., 5:1.188-1.190, 1985.
- 10 Graham y Prevec, En: Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol, E.J. Murray, ed., Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991.
- Graham y van der Eb, A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA Virology, 52:456-467, 1973.
- Graham et al., Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J. Gen. Virol., 36:59-72, 1977.
- 15 Gray et al., Loss of chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. Cancer Res., 55:4.800-4.803, 1995.
- Gray et al., Loss of chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. Cancer Res., 55:4.800-4.803, 1995.
- Grunhaus y Horwitz, Adenovirus as cloning vector. Seminar in Virology, 3:237-252, 1992. Gyapay et al., The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. Nat. Genet., 7:246-339, 1994.
- 20 Hacia et al., Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. Nature Genetics, 14:441-447, 1996.
- Harland y Weintraub, Translation of mammalian mRNA injected into Xenopus oocytes is specifically inhibited by antisense RNA. J. Cell Biol., 101:1.094-1.099, 1985.
- Henson et al., The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. Ann. Neurol., 36: 714-721, 1994.
- 25 Herbst et al., Loss of heterozygosity for 10q22-qter in malignant melanoma progression. Cancer Res., 54:3.111-3.114, 1994.
- Hermonat y Muzycska, Use of adenoassociated virus as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6.466-6.470, 1984.
- Hersdorffer et al., DNA Cell Biol., 9:713-723, 1990.
- 30 Herz y Gerard, Proc. Nat'l Acad Sci. USA, 90:2.812-2.816, 1993.
- Horwich, et al., Synthesis of hepadnavirus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured HuH7 cells. J. Virol., 64:642-650, 1990.
- Hunter, T., Cooperation between oncogenes. Cell, 64-249-270, 1991.
- Ittmann, Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. Cancer Res., 56:2.143-2.147, 1996.
- 35 James et al., Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. Cancer Res., 48:5.546-5.551, 1988.
- Johnson et al., Peptide Turn Mimetics. En: Biotechnology And Pharmacy, Pezzuto et al., eds., Chapman and Hall, New York, 1993.
- Jones y Shenk, Cell, 13:181-188, 1978.
- Kamb et al., A cell cycle regulator potentially involved in genesis of may tumor types. Science, 264:436-440, 1984,
- 40 Kaneda et al., Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. Science, 243:375-378, 1989.
- Karlhom et al., Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. Hum. Genet., 92:169-174, 1993.
- Karisson et al., EMBO J., 5:2.377-2.385, 1986.

- Kato et al., Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. *J. Biol. Chem.*, 266:3.361-3.364, 1991.
- Kimmelman et al., Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics* 34:250-254, 1996.
- Klein et al., High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327:70-73, 1987.
- 5 Kok et al., A homozygous deletion in a small cell lung cancer cell line involving a 3p21 region with a marked instability in yeast artificial chromosomes. *Cancer Res.* 54:4.183-4.187, 1994.
- Komiya et al., Allelic losses at loci on chromosome 10 are associated with metastasis and progression of human prostate cancer. *Genes Chromo. Cancer* 17:245-253, 1996.
- Kwoh et al., *Proc. Nat. Acad Sci. USA*, 86:1.173, 1989.
- Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- 10 Le Gal La Salle et al., *Science*, 259:988-990, 1993.
- Lee et al., Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*, 235:1.394-1.399, 1987.
- Levin et al., Neoplasms of the central nervous system. En: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 4^a ed., DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1993.
- 15 Levrero et al., *Gene*, 101:165-202, 1991.
- Macejak y Samow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 2^o ed., Hogan et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- 20 Mann et al., Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Markowitz et al., *J. Virol.*, 62:1.120-1.124, 1988.
- Merrifield, *Science*, 232:341-347, 1986.
- Morita et al., Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 51:5.817-5.820, 1991.
- 25 Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993.
- Murakami et al., Suppression of the malignant phenotype of human prostate cancer cell line PPC-1 by introduction of normal fragments of human chromosome 10. *Cancer Res.*, 56:2.157-2.160, 1996.
- Myers, EP 0273085.
- 30 Nicolas y Rubinstein, En: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham:Butterworth, pp. 494-513, 1988.
- Nicolau y Sene, Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nihei et al., Localization of a metastasis suppressor gene(s) for rat prostatic cancer to the long arm of human chromosome 10. *Genes Chromosom. Cancer*, 14:112-119, 1995.
- 35 Nishi et al., Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 gene transcripts related to neural differentiation. *Oncogene*, 6:1.555-1.559, 1991
- Paskind et al., Dependence of moloney murine leukemia virus production on cell growth. *Virology*, 67:242-248, 1975.
- PCT/US87/00880
- PCT/US89/01025
- 40 Pease et al., Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 91:5.022-5.026, 1994.
- Peiffer et al., Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res.*, 55:1.922-1.926, 1995.

- Pelletier y Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988.
- Perales et al., Gene transfer in vivo: Sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:4.086-4.090, 1994.
- 5 Pershouse et al., Analysis of the functional role of chromosome 10 loss in human glioblastomas. *Cancer Res.* 53: 5.043-5.050, 1993.
- Petersen et al., Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 13q y 17p. *Brit. J. Cancer* 75:79-86, 1997.
- Pignon et al., *Hum. Mutat.*, 3:126-132, 1994.
- Racher et al., *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.
- 10 Ragot et al., *Nature*, 361:647-650, 1993.
- Ransom et al., Correlation of cytogenetic analysis and loss of heterozygosity studies in human diffuse astrocytomas and mixed oligo-astrocytomas. *Genes Chromosom. Cancer* 5:357-374, 1992.
- Rasheed et al., Loss of heterozygosity for 10q loci in human gliomas. *Genes Chromo. Cancer*, 5:75-82, 1992.
- 15 Rasheed et al., *Oncogene*, 11:2.243-2.246, 1995. Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15^a ed., pp. 1.035-.038 y 1.570-1.580.
- Rempel et al., Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res.*, 53:2.386-2.392, 1993.
- Rich et al., *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
- 20 Ridgeway, *Mammalian Expression Vectors*, En: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez et al., eds., Stoneham:Butterworth, pp. 467-492, 1988.
- Ritland et al., Region-specific loss of heterozygosity on chromosome 19 is related to the morphologic type of human glioma. *Genes. Chromo. Cancer*, 12:277-282, 1995.
- Rosenfeld et al., In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, 68:143-155, 1992.
- 25 Rosenfeld et al., *Science*, 252:431-434, 1991.
- Roux et al., A versatile and potentially general approach to the targeting of specific cell types by retroviruses: Application to the infection of human cells by means of major histocompatibility complex class I and class II antigens by mouse ecotropic murine leukemia virus-derived viruses. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9.079-9.083, 1989.
- 30 Rubio et al., Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas, *Cancer Res.*, 54:45-47, 1994.
- Russell y Rubinstein, *Tumors of the neuroepithelial origin*, En: *Pathology of Tumors of the Nervous System*, 5^a ed., Williams and Wilkins, eds., pp. 82-219, 1989.
- Sambrook et al., En: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 35 Sanchez et al., Tumor suppression and apoptosis of human prostate carcinoma mediated by a genetic locus within human chromosome 10pter-q11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pp. 2.551-2.556, 1996.
- Sarver et al., *Science*, 247:1.222-1.225, 1990.
- Scheck y Coons, Expression of the tumor suppressor gene DCC in human gliomas. *Cancer Res.*, 53:5.605-5.609, 1993.
- 40 Shoemaker et al., Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular barcoding strategy. *Nature Genetics* 14:450-456, 1996.
- Sonoda et al., *Cancer Res.*, 55:2.166-2.168, 1995.
- Steck et al., Evidence for two tumor suppressive loci on chromosome 10 involved in glioblastomas. *Genes Chromosom. Cancer* 712:255-261, 1995.

- Steck et al., Evidence for two tumor suppressive loci on chromosome 10 involved in glioblastomas. *Genes Chromosom. Cancer* 712:255-261, 1995.
- Stewart y Yound, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2^a ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- 5 Stratford-Perricaudet y Perricaudet, Gene transfer into animals: the promise of adenovirus. En: *Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenuer et al., eds., John Libbey Eurotext, Francia, pp. 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet et al., Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.
- Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6.442, 1983.
- 10 Temin, Retrovirus vectors for gene transfer: Efficient integration into and expression of exogenous DNA in vertebrate cell genome. En: *Gene Transfer*, Kucherlapati R., ed. New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
- Trybus et al., Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer. *Cancer Res.* 56:2.263-2.267, 1996.
- Tur-Kaspa et al., Use of electroporation to introduce biologically active foreing genes into primary rat hepatocytes. *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- 15 U.S. 4.873.191, Wagner y Hoppe U.S. 5.279.721
- Varmus et al., *Cell*, 25:23-36, 1981.
- Von Deimling et al., Deletion mapping of chromosome 19 in human gliomas. *Int. J. Cancer*, 57:676-680, 1994.
- Voullaire et al., A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? *Am. J. Hum. Genet.*, 52:1.153-1.163.
- 20 Wagner et al., *Science*, 260: 1.510-1.513, 1993.
- Walker et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:392-396, 1992.
- Wei et al., Construction of a 600-kilobase cosmid clone contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer TSG. *Cancer Res.* 56:1.487-1.494, 1996.
- 25 Weinberg, Positive and negative controls on cell growth. *Biochemistry*, 28:8.263-8.269, 1989. WO 88/10351, Gingeras et al., WO 89/06700, Miller et al., WO 90/07641, presentado 21 de Diciembre, 1990.
- Wong et al., Appearance of b-lactanase activity in animal cells upon liposome mediated gene transfer, *Gene*, 10:87-94, 1980
- Wong et al., Increased expression of the EGF receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6.899-6.903, 1987.
- 30 Wu y Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu y Wu, Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells in vitro. *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.
- Wu y Wu, Receptor-mediated in vitro gene transfections by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.*, 262:4.429-4.432, 1987.
- 35 Wu et al., *Genomics*, 4:560, 1989.
- Yamaguchi et al., Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:484-488, 1994.
- Yang et al., In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:9.568-9.572, 1990.
- 40 Zelenin et al., High-velocity mechanical DNA transfer of the chloramphenicol acetyltransferase gene into rodent liver, kidney and mammary gland cells in organ explants and in vivo. *FEBS Lett.*, 280:94-96, 1991.

INFORMACIÓN GENERAL DEL LISTADO DE SECUENCIA (1)

(i) SOLICITANTE:

- 5 (A) NOMBRE: Board of Regents, The University of Texas System
(B) CALLE: 201 West 7th Street
(C) CIUDAD: Austin
(D) ESTADO: Texas
(E) PAÍS: USA
(F) CÓDICO POSTAL (ZIP): 78701
- 10 (A) NOMBRE: Myriad Genetics, Inc.
(B) CALLE: 320 Wakara Way
(C) CIUDAD: Sal Lake City
(D) ESTADO: Utah
(E) PAÍS: USA
(F) CÓDIO POSTAL(ZIP): 84108
- 15 (A) NOMBRE: Peter Steck
(B) CALLE: 5421 Holly
(C) CIUDAD: Bellaire
(D) ESTADO: Texas
(E) PAÍS: USA
20 (F) CÓDIO POSTAL(ZIP): 77401
- (A) NOMBRE: Mark A. Pershouse
(B) CALLE: 4065 McDermed
(C) CIUDAD: Houston
(D) ESTADO: Texas
25 (E) PAÍS: USA
(F) CÓDIO POSTAL(ZIP): 77025
- (A) NOMBRE: Samar A. Jasser
(B) CALLE: 9411 Kristin
(C) CIUDAD: Houston
(D) ESTADO: Texas
30 (E) PAÍS: USA
(F) CÓDIO POSTAL(ZIP): 77031
- (A) NOMBRE: W.K. Alfred Yung
(B) CALLE: 4141 Byron
(C) CIUDAD: Houston
(D) ESTADO: Texas
35 (E) PAÍS: USA
(F) CÓDIO POSTAL(ZIP): 77005
- (A) NOMBRE: Sean V. Tantigian
(B) CALLE: 557 East 1st Avenue N° 3
(C) CIUDAD: Salt Lake City
(D) ESTADO: Utah
40 (E) PAÍS: USA
(F) CÓDIO POSTAL(ZIP): 84103
- 45 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: UN SUPRESOR DE TUMOR DESIGNADO TS10q23.3
(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 21
(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 50 (A) TIPO DE MEDIO: Floppy disk
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release N° 1.0, Versión N° 1.30 (EPO)
- (v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
NÚMERO DE SOLICITUD: Desconocido
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: US 08/791.115
- (B) DATOS DE PRESENTACIÓN: 30 de Enero de 1997

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 403 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (C) ESTADO DE LA CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 1:

ES 2 361 044 T5

Met	Thr	Ala	Ile	Ile	Lys	Glu	Ile	Val	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Arg	Tyr	1	5	10	15
Gln	Glu	Asp	Gly	Phe	Asp	Leu	Asp	Leu	Thr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Asn	Ile	20	25	30	
Ile	Ala	Met	Gly	Phe	Pro	Ala	Glu	Arg	Leu	Glu	Gly	Val	Tyr	Arg	Asn	35	40	45	
Asn	Ile	Asp	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Leu	Asp	Ser	Lys	His	Lys	Asn	His	50	55	60	
Tyr	Lys	Ile	Tyr	Asn	Leu	Cys	Ala	Glu	Arg	His	Tyr	Asp	Thr	Ala	Lys	65	70	75	80
Phe	Asn	Cys	Arg	Val	Ala	Gln	Tyr	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Asn	Pro	Pro	85	90	95	
Gln	Leu	Glu	Leu	Ile	Lys	Pro	Phe	Cys	Glu	Asp	Leu	Asp	Gln	Trp	Leu	100	105	110	
Ser	Glu	Asp	Asp	Asn	His	Val	Ala	Ala	Ile	His	Cys	Lys	Ala	Gly	Lys	115	120	125	
Gly	Arg	Thr	Gly	Val	Met	Ile	Cys	Ala	Tyr	Leu	Leu	His	Arg	Gly	Lys	130	135	140	
Phe	Leu	Lys	Ala	Gln	Glu	Ala	Leu	Asp	Phe	Tyr	Gly	Glu	Val	Arg	Thr	145	150	155	160
Arg	Asp	Lys	Lys	Gly	Val	Thr	Ile	Pro	Ser	Gln	Arg	Arg	Tyr	Val	Tyr	165	170	175	
Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Leu	Lys	Asn	His	Leu	Asp	Tyr	Arg	Pro	Val	Ala	180	185	190	
Leu	Leu	Phe	His	Lys	Met	Met	Phe	Glu	Thr	Ile	Pro	Met	Phe	Ser	Gly	195	200	205	
Gly	Thr	Cys	Asn	Pro	Gln	Phe	Val	Val	Cys	Gln	Leu	Lys	Val	Lys	Ile	210	215	220	
Tyr	Ser	Ser	Asn	Ser	Gly	Pro	Thr	Arg	Arg	Glu	Asp	Lys	Phe	Met	Tyr	225	230	235	240
Phe	Glu	Phe	Pro	Gln	Pro	Leu	Pro	Val	Cys	Gly	Asp	Ile	Lys	Val	Glu				

				245						250					255
Phe	Phe	His	Lys	Gln	Asn	Lys	Met	Leu	Lys	Lys	Asp	Lys	Met	Phe	His
			260					265					270		
Phe	Trp	Val	Asn	Thr	Phe	Phe	Ile	Pro	Gly	Pro	Glu	Glu	Thr	Ser	Glu
		275					280					285			
Lys	Val	Glu	Asn	Gly	Ser	Leu	Cys	Asp	Gln	Glu	Ile	Asp	Ser	Ile	Cys
	290					295					300				
Ser	Ile	Glu	Arg	Ala	Asp	Asn	Asp	Lys	Glu	Tyr	Leu	Val	Leu	Thr	Leu
305					310					315					320
Thr	Lys	Asn	Asp	Leu	Asp	Lys	Ala	Asn	Lys	Asp	Lys	Ala	Asn	Arg	Tyr
				325					330					335	
Phe	Ser	Pro	Asn	Phe	Lys	Val	Lys	Leu	Tyr	Phe	Thr	Lys	Thr	Val	Glu
				340				345					350		
Glu	Pro	Ser	Asn	Pro	Glu	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Val	Thr	Pro	Asp
		355					360					365			
Val	Ser	Asp	Asn	Glu	Pro	Asp	His	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Asp	Thr	Thr	Asp
	370					375					380				
Ser	Asp	Pro	Glu	Asn	Glu	Pro	Phe	Asp	Glu	Asp	Gln	His	Thr	Gln	Ile
385					390					395					400
Thr	Lys	Val													

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

5

- (A) LONGITUD: 3.160 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 2:

CCTCCCCCTCG	CCCCGGCGCGG	TCCCGTCCGC	CTCTCGCTCG	CCTCCCGCCT	CCCCTCGGTC	60
TTCCGAGGCG	CCCCGGCTCC	CGGCGCGGCG	GCGGAGGGGG	CGGGCAGGCC	GGCGGGCGGT	120
GATGTGGCAG	GACTCTTTAT	GCGCTGCGGC	AGGATACGCG	CTCGGCGCTG	GGACGCGACT	180
GCGCTCAGTT	CTCTCCTCTC	GGAAGCTGCA	GCCATGATGG	AAGTTTGAGA	GTTGAGCCGC	240
TGTGAGGCGA	GGCCGGGCTC	AGGCGAGGGA	GATGAGAGAC	GGCGGCGGCC	GCGGCCCGGA	300
GCCCCCTCTCA	GCGCCTGTGA	GCAGCCGCGG	GGGCAGCGCC	CTCGGGGAGC	CGGCCGGCCT	360
GCGGCGGCGG	CAGCGGCGGC	GTTTCTCGCC	TCCTCTTCGT	CTTTTCTAAC	CGTGCAGCCT	420
CTTCCTCGGC	TTCTCCTGAA	AGGGAAGGTG	GAAGCCGTGG	GCTCGGGCGG	GAGCCGGCTG	480
AGGCGCGGCG	GCGGCGGCGG	CGGCACCTCC	CGCTCCTGGA	GCGGGGGGGA	GAAGCGGCGG	540
CGGCGGCGGC	CGCGGCGGCT	GCAGCTCCAG	GGAGGGGGTC	TGAGTCGCCT	GTCACCATTT	600
CCAGGGCTGG	GAACGCCGGA	GAGTTGGTCT	CTCCCCTTCT	ACTGCCTCCA	ACACGGCGGC	660

GGCGGCGGGC	GCACATCCAG	GGACCCGGGC	CGGTTTTAAA	CCTCCCGTCC	GCCGCCGCCG	720
CACCCCCCGT	GGCCCGGGCT	CCGGAGGCCG	CCGGCGGAGG	CAGCCGTTCG	GAGGATTATT	780
CGTCTTCTCC	CCATTCCGCT	GCCGCCGCTG	CCAGGCCTCT	GGCTGCTGAG	GAGAAGCAGG	840
CCCAGTCGCT	GCAACCATCC	AGCAGCCGCC	GCAGCAGCCA	TTACCCGGCT	GCGGTCCAGA	900
GCCAAGCGGC	GGCAGAGCGA	GGGGCATCAG	CTACCGCCAA	GTCCAGAGCC	ATTTCCATCC	960
TGCAGAAGAA	GCCCCGCCAC	CAGCAGCTTC	TGCCATCTCT	CTCCTCCTTT	TTCTTCAGCC	1020
ACAGGCTCCC	AGACATGACA	GCCATCATCA	AAGAGATCGT	TAGCAGAAAC	AAAAGGAGAT	1080
ATCAAGAGGA	TGGATTGAC	TTAGACTTGA	CCTATATTTA	TCCAAACATT	ATTGCTATGG	1140
GATTTCTGC	AGAAAGACTT	GAAGGCGTAT	ACAGGAACAA	TATTGATGAT	GTAAGTAAAGT	1200
TTTTGGATTG	AAAGCATAAA	AACCATTACA	AGATATACAA	TCTTTGTGCT	GAAAGACATT	1260
ATGACACCGC	CAAATTTAAT	TGCAGAGTTG	CACAATATCC	TTTTGAAGAC	CATAACCCAC	1320
CACAGCTAGA	ACTTATCAAA	CCCTTTTGTG	AAGATCTTGA	CCAATGGCTA	AGTGAAGATG	1380
ACAATCATGT	TGCAGCAATT	CACTGTAAAG	CTGGAAAGGG	ACGAACTGGT	GTAATGATAT	1440
GTGCATATTT	ATTACATCGG	GGCAAATTTT	TAAAGGCACA	AGAGGCCCTA	GATTTCTATG	1500
GGGAAGTAAG	GACCAGAGAC	AAAAAGGGAG	TAACTATTCC	CAGTCAGAGG	CGCTATGTGT	1560
ATTATTATAG	CTACCTGTTA	AAGAATCATC	TGGATTATAG	ACCAGTGGCA	CTGTTGTTTC	1620
ACAAGATGAT	GTTTGAAACT	ATTCCAATGT	TCAGTGGCGG	AACTTGCAAT	CCTCAGTTTG	1680
TGGTCTGCCA	GCTAAAGGTG	AAGATATATT	CCTCCAATTC	AGGACCCACA	CGACGGGAAG	1740
ACAAGTTCAT	GTAATTTGAG	TTCCCTCAGC	CGTTACCTGT	GTGTGGTGAT	ATCAAAGTAG	1800
AGTTCTTCCA	CAAACAGAAC	AAGATGCTAA	AAAAGGACAA	AATGTTTCAC	TTTTGGGTAA	1860
ATACATTCTT	CATACCAGGA	CCAGAGGAAA	CCTCAGAAAA	AGTAGAAAAT	GGAAGTCTAT	1920
GTGATCAAGA	AATCGATAGC	ATTTGCAGTA	TAGAGCGTGC	AGATAATGAC	AAGGAATATC	1980
TAGTACTTAC	TTTAACAAAA	AATGATCTTG	ACAAAGCAAA	TAAAGACAAA	GCCAACCGAT	2040
ACTTTTCTCC	AAATTTTAAG	GTGAAGCTGT	ACTTCACAAA	AACAGTAGAG	GAGCCGTCAA	2100
ATCCAGAGGC	TAGCAGTTCA	ACTTCTGTAA	CACCAGATGT	TAGTGACAAT	GAACCTGATC	2160
ATTATAGATA	TTCTGACACC	ACTGACTCTG	ATCCAGAGAA	TGAACCTTTT	GATGAAGATC	2220
AGCATACACA	AATTACAAAA	GTCTGAATTT	TTTTTTTATCA	AGAGGGATAA	AACACCATGA	2280
AAATAAACTT	GAATAAACTG	AAAATGGACC	TTTTTTTTTT	TAATGGCAAT	AGGACATTGT	2340
GTCAGATTAC	CAGTTATAGG	AACAATTCTC	TTTTCTTGAC	CAATCTTGTT	TTACCCCTATA	2400
CATCCACAGG	GTTTTGACAC	TTGTTGTCCA	GTTGAAAAAA	GGTTGTGTAG	CTGTGTCATG	2460
TATATACCTT	TTTGTGTCAA	AAGGACATTT	AAAATTCAAT	TAGGATTAAT	AAAGATGGCA	2520
CTTTCCCGTT	TTATTCCAGT	TTTATAAAAA	GTGGAGACAG	ACTGATGTGT	ATACGTAGGA	2580

ATTTTTTCCT TTTGTGTTCT GTCACCAACT GAAGTGGCTA AAGAGCTTTG TGATATACTG	2640
GTTACACATCC TACCCCTTTG CACTTGTGGC AACAGATAAG TTTGCAGTTG GCTAAGAGAG	2700
GTTTCCGAAA GGTTTTGCTA CCATTCTAAT GCATGTATTC GGGTTAGGGC AATGGAGGGG	2760
AATGCTCAGA AAGGAAATAA TTTTATGCTG GACTCTGGAC CATATACCAT CTCCAGCTAT	2820
TTACACACAC CTTTCTTTAG CATGCTACAG TTATTAATCT GGACATTCGA GGAATTGGCC	2880
GCTGTCACTG CTTGTTGTTT GCGCATTTTT TTTTAAAGCA TATTGGTGCT AGAAAAGGCA	2940
GCTAAAGGAA GTGAATCTGT ATTGGGGTAC AGGAATGAAC CTTCTGCAAC ATCTTAAGAT	3000
CCACAAATGA AGGGATATAA AAATAATGTC ATAGGTAAGA AACACAGCAA CAATGACTTA	3060
ACCATATAAA TGTGGAGGCT ATCAACAAAG AATGGGCTTG AAACATTATA AAAATTGACA	3120
ATGATTTATT AAATATGTTT TCTCAATTGT AAAAAAAAAA	3160

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 1.962 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) ESTADO DE LA CADENA: sencillo
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 3:

GCGAGGGAGA TGAGAGACGG CGGCGGCCAC GGCCCAGAGC CCCTCTCAGC GCCTGTGAGC	60
AGCCGCGGGG GCAGCGCCCT CGGGGAGCCG GCCGGGCGGC GCGGGCGGCA GCGGCGGCGG	120
GCCTCGCCTC CTCGTCGTCT GTTCTAACCG GGCAGCTTCT GAGCAGCTTC GGAGAGAGAC	180
GGTGGAAGAA GCCGTGGGCT CGAGCGGGAG CCGGCGCAGG CTCGGCGGCT GCACCTCCCG	240
CTCCTGGAGC GGGGGGGAGA AGCGGCGGCG GCGGCCGCGG CTCCGGGGAG GGGGTGCGGAG	300
TCGCCTGTCA CCATTGCCAG GGCTGGGAAC GCCGGAGAGT TGCTCTCTCC CCTTCTCCTG	360
CCTCCAACAC GCGGCGGCG GCGGCGGCAC GTCCAGGGAC CCGGGCCGGT GTTAAGCCTC	420
CCGTCCGCCG CCGCCGCACC CCCCCTGGCC CGGGCTCCGG AGGCCGCCGG AGGAGGCAGC	480
CGCTGCGAGG ATTATCCGTC TTCTCCCCAT TCCGCTGCCT CGGCTGCCAG GCCTCTGGCT	540
GCTGAGGAGA AGCAGGCCCCA GTCTCTGCAA CCATCCAGCA GCGCCCGCAG CAGCCATTAC	600
CCGGCTGCGG TCCAGGGCCA AGCGGCAGCA GAGCGAGGGG CATCAGCGAC CGCCAAGTCC	660
AGAGCCATTT CCATCCTGCA GAAGAAGCCT CGCCACCAGC AGCTTCTGCC ATCTCTCTCC	720
TCCTTTTTCT TCAGCCACAG GCTCCCAGAC ATGACAGCCA TCATCAAAGA GATCGTTAGC	780
AGAAACAAAA GGAGATATCA AGAGGATGGA TTCGACTTAG ACTTGACCTA TATTTATCCA	840
AATATTATTG CTATGGGATT TCCTGCAGAA AGACTTGAAG GTGTATACAG GAACAATATT	900
GATGATGTAG TAAGGTTTTT GGATTCAAAG CATAAAAACC ATTACAAGAT ATACAATCTA	960

TGTGCTGAGA GACATTATGA CACCGCCAAA TTAACTGCA GAGTTGCACA GTATCCTTTT	1020
GAAGACCATA ACCCACCACA GCTAGAACTT ATCAAACCCT TCTGTGAAGA TCTTGACCAA	1080
TGGCTAAGTG AAGATGACAA TCATGTTGCA GCAATTCAC TAAAGCTGG AAAGGGACGG	1140
ACTGGTGTAA TGATTTGTGC ATATTTATTG CATCGGGGCA AATTTTAAA GGCACAAGAG	1200
GCCCTAGATT TTTATGGGGA AGTAAGGACC AGAGACAAAA AGGGAGTCAC AATCCCAGT	1260
CAGAGGCGCT ATGTATATTA TTATAGCTAC CTGCTAAAA ATCACCTGGA TTACAGACCC	1320
GTGGCACTGC TGTTTCACAA GATGATGTTT GAACTATTC CAATGTTTCA TGGCGGAACT	1380
TGCAATCCTC AGTTTGTGGT CTGCCAGCTA AAGGTGAAGA TATATTCCTC CAATTCAGGA	1440
CCCACGCGGC GGGAGGACAA GTTCATGTAC TTTGAGTTCC CTCAGCCATT GCCTGTGTGT	1500
GGTGATATCA AAGTAGAGTT CTTCCACAAA CAGAACAAGA TGCTCAAAAA GGACAAAATG	1560
TTTCACTTTT GGGTAAATAC GTTCTTCATA CCAGGACCAG AGGAAACCTC AGAAAAAGTG	1620
GAAAAATGGAA GTCTTTGTGA TCAGGAAATC GATAGCATTT GCAGTATAGA GCGTGCAGAT	1680
AATGACAAGG AGTATCTTGT ACTCACCTA AAAAAAACG ATCTTGACAA AGCAAACAAA	1740
GACAAGGCCA ACCGATACTT CTCTCCAAAT TTTAAGGTGA AACTATACTT TACAAAAACA	1800
GTAGAGGAGC CATCAAATCC AGAGGCTAGC AGTTCAACTT CTGTGACTCC AGATGTTAGT	1860
GACAATGAAC CTGATCATT TAGATATTCT GACACCACTG ACTCTGATCC AGAGAAATGAA	1920
CCTTTTGATG AAGATCAGCA TACACAAATT ACAAAGTCT GA	1962

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 1.291 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 4:

CCGCCCCCGG CCAGGCCCGG GGCCGCCTGC AGCCTGCGGA GGAGGCCCGG CCGCCCCCGG	60
CTCCTGCCGT CTCTCTCCTC CTTCTCTCC AGCCACCGGC TCCCAGACAT GACAGCCATC	120
ATCAAGGAGA TCGTCAGCAG AAACAAAAGG CGCTACCAGG AGGATGGGTT CGACTTGGAC	180
TTGACCTATA TTTATCCCAA CATTATTGCT ATGGGGTTTC CTGCAGAAAG ACTTGAAGGC	240
GTATACAGGA ACAATATTGA TGATGTAGTA AGGTTTTTGG ATTCAAAGCA TAAAAACCAT	300
TACAAGATAT ACAATCTGTG TGCTGAAAGA CATTATGATA CCGCCAAATT TAACTGCAGA	360
GTTGCACAGT ATCCTTTTGA AGACCATAAT CCACCACAGC TAGAACTTAT CAAACCCTTT	420
TGTGAAGATC TTGACCAATG GCTAAGTGAA GATGACAATC ATGTTGCAGC AATTCACTGT	480
AAAGCTGGAA AGGGACGAAC TGGTGTAATG ATTTGTGCAT ATTTATTACA TCGGGGCAAA	540
TTTCTAAAGG CACAAGAGGC CCTAGATTTT TATGGGGAAG TAAGGACCAG AGACAAAAG	600
GGAGTAACTA TTCCCAGTCA GAGGCGCTAT GTGTATTATT ATAGCTACCT GTTAAAGAAT	660
CATCTGGATT ATAGACCACT GGCCTGTTG TTTCACAAGA TGATGTTTGA AACTATTCCA	720
ATGTTTCAGTG GCGGAACTTG CAATCCTCAG TTTGTGGTCT GCCAGCTAAA GGTGAAGATC	780
TATTCCTCCA ATTCAGGACC CACACGACGG GAAGACAAGT TCATGTACTT TGAGTTCCCT	840
CAGCCATTGC CTGTGTGCGG TGACATCAAA GTAGAGTTCT TCCACAAACA GAACAAGATG	900
CTAAAAAGG ACAAATGTT TCACTTTTGG GTAAACACAT TCTTCATACC AGGACCAGAG	960
GAAACCTCAG AAAAAGTAGA AAATGGAAGT CTATGTGATC AAGAAATTGA TAGTATTTGC	1020
AGTATAGAAC GTGCAGATAA TGACAAGGAA TATCTAGTAC TCACTTTAAC AAAAAATGAT	1080
CTCGACAAAG CAAATAAAGA CAAGGCCAAC CGATATTTTT CTCCAAATTT TAAGGTGAAG	1140
CTGTACTTCA CAAAACTGT AGAGGAGCCA TCAAACCCGG AGGCTAGCAG TTCAACTTCT	1200
GTGACGCCAG ATGTTAGTGA CAATGAACCT GATCATTATA GATATTCTGA CACCACTGAC	1260
TCTGACCCAG AGAATGAACC CTTTGATGAA G	1291

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 742 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) ESTADO DE LA CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 5:

Ser	Pro	Arg	Pro	Ala	Arg	Ser	Arg	Pro	Pro	Leu	Ala	Arg	Leu	Pro	Pro
1				5					10					15	
Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Ser	Arg	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly
			20					25					30		
Gly	Gly	Gln	Ala	Gly	Gly	Arg	Cys	Gly	Arg	Thr	Leu	Tyr	Ala	Leu	Arg
		35					40					45			
Gln	Asp	Thr	Arg	Ser	Ala	Leu	Gly	Arg	Asp	Cys	Ala	Gln	Phe	Ser	Pro
	50					55					60				
Leu	Gly	Ser	Cys	Ser	His	Asp	Gly	Ser	Leu	Arg	Val	Glu	Pro	Leu	Gly
65					70					75					80
Glu	Ala	Gly	Leu	Arg	Arg	Gly	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg
				85					90					95	
Ser	Pro	Ser	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Ser
			100					105					110		
Arg	Pro	Ala	Cys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Ser	Arg	Leu	Leu	Phe
		115					120					125			
Val	Phe	Ser	Asn	Arg	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Pro	Glu	Arg	Glu
	130					135					140				
Gly	Ser	Arg	Gly	Leu	Gly	Arg	Glu	Pro	Ala	Glu	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg

ES 2 361 044 T5

145		150		155		160
Arg Arg His Leu	Pro Leu Leu Glu Arg	Gly Gly Glu Ala Ala Ala Ala				
	165		170			175
Ala Ala Ala Ala	Ala Ala Pro Gly Arg Gly Ser Glu Ser Pro Val					
	180		185			190
Thr Ile Ser Arg Ala	Gly Asn Ala Gly Glu Leu Val Ser Pro Leu Leu					
	195		200			205
Leu Pro Pro Thr Arg Arg Arg Arg Arg Arg His Ile Gln Gly Pro Gly						
	210		215			220
Pro Val Leu Asn Leu Pro Ser Ala Ala Ala Ala Pro Pro Val Ala Arg						
	225		230			235
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Gly Ser Arg Ser Glu Asp Tyr Ser Ser						
	245		250			255
Ser Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Ala Arg Pro Leu Ala Ala Glu Glu						
	260		265			270
Lys Gln Ala Gln Ser Leu Gln Pro Ser Ser Ser Arg Arg Ser Ser His						
	275		280			285
Tyr Pro Ala Ala Val Gln Ser Gln Ala Ala Ala Glu Arg Gly Ala Ser						
	290		295			300
Ala Thr Ala Lys Ser Arg Ala Ile Ser Ile Leu Gln Lys Lys Pro Arg						
	305		310			315
His Gln Gln Leu Leu Pro Ser Leu Ser Ser Phe Phe Phe Ser His Arg						
	325		330			335
Leu Pro Asp Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys						
	340		345			350
Arg Arg Tyr Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr						
	355		360			365
Pro Asn Ile Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val						
	370		375			380
Tyr Arg Asn Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His						
	385		390			395
Lys Asn His Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp						
	405		410			415
Thr Ala Lys Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His						
	420		425			430
Asn Pro Pro Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp						
	435		440			445
Gln Trp Leu Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys						
	450		455			460
Ala Gly Lys Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His						
	465		470			475
Arg Gly Lys Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu						
	485		490			495

Val Arg Thr Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg
500 505 510

Tyr Val Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg
515 520 525

Pro Val Ala Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met
530 535 540

Phe Ser Gly Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys
545 550 555 560

Val Lys Ile Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys
565 570 575

Phe Met Tyr Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile
580 585 590

Lys Val Glu Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys
595 600 605

Met Phe His Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu
610 615 620

Thr Ser Glu Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp
625 630 635 640

Ser Ile Cys Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val
645 650 655

Leu Thr Leu Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala
660 665 670

Asn Arg Tyr Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys
675 680 685

Thr Val Glu Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val
690 695 700

Thr Pro Asp Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp
705 710 715 720

Thr Thr Asp Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His
725 730 735

Thr Gln Ile Thr Lys Val
740

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. N°: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 5 (A) LONGITUD: 645 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) ESTADO DE LA CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

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

Arg Glu Thr Ala Ala Ala Thr Ala Gln Ser Pro Ser Gln Arg Leu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ala Ala Pro Ser Gly Ser Arg Pro Gly Gly Gly Gly Gly

ES 2 361 044 T5

	20		25		30	
Ser	Gly	Gly	Gly	Pro	Arg	Leu
	35					40
				Val	Val	Cys
						Ser
						Asn
						Arg
						Ala
						Ala
Ser	Glu	Gln	Glu	Arg	Asp	Gly
	50					55
						Gly
						Arg
						Ser
						Arg
						Gly
						Leu
						Glu
						Arg
						Glu
Pro	Ala	Gln	Ala	Arg	Arg	Leu
	65					70
						Leu
						His
						Leu
						Pro
						Leu
						Leu
						Glu
						Arg
						Gly
						Gly
Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro
						85
						Gly
						Arg
						Gly
						Ser
						Glu
						Ser
						Pro
						Val
						Thr
Ile	Ala	Arg	Ala	Gly	Asn	Ala
						100
						Gly
						Asn
						Ala
						Gly
						Glu
						Leu
						Leu
						Ser
						Pro
						Leu
						Leu
						Leu
Pro	Pro	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg
						115
						Arg
						Arg
						Arg
						Arg
						His
						Val
						Gln
						Gly
						Pro
						Gly
						Pro
						Gly
						Pro
Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Ala
	130					135
						Ala
						Ala
						Ala
						Pro
						Pro
						Leu
						Ala
						Arg
						Ala
Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly
	145					150
						Ser
						Arg
						Cys
						Glu
						Asp
						Tyr
						Pro
						Ser
						Ser
Pro	His	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala
						165
						Ala
						Ala
						Arg
						Pro
						Leu
						Ala
						Ala
						Glu
						Glu
						Lys
Gln	Ala	Gln	Ser	Leu	Gln	Pro
						180
						Gln
						Pro
						Ser
						Ser
						Ser
						Arg
						Arg
						Ser
						Ser
						His
						Tyr
Pro	Ala	Ala	Val	Gln	Gly	Gln
						195
						Ala
						Ala
						Ala
						Glu
						Arg
						Gly
						Ala
						Ser
						Ala
Thr	Ala	Lys	Ser	Arg	Ala	Ile
						210
						Ser
						Ile
						Leu
						Gln
						Lys
						220
						Lys
						Pro
						Arg
						His
Gln	Gln	Leu	Leu	Pro	Ser	Leu
						225
						Ser
						Ser
						Ser
						Phe
						Phe
						Phe
						Ser
						His
						Arg
						Leu
Pro	Asp	Met	Thr	Ala	Ile	Ile
						245
						Lys
						Glu
						Ile
						Val
						Ser
						Arg
						Asn
						Lys
						Arg
Arg	Tyr	Gln	Glu	Asp	Gly	Phe
						260
						Asp
						Leu
						Asp
						Leu
						Thr
						Tyr
						Ile
						Tyr
						Pro
Asn	Ile	Ile	Ala	Met	Gly	Phe
						275
						Pro
						Ala
						Glu
						Arg
						Leu
						Glu
						Gly
						Val
						Tyr
Arg	Asn	Asn	Ile	Asp	Asp	Val
						290
						Val
						Arg
						Phe
						Leu
						Asp
						Ser
						Lys
						His
						Lys
Asn	His	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Asn
						305
						Leu
						Cys
						Ala
						Glu
						Arg
						His
						Tyr
						Asp
						Thr
Ala	Lys	Phe	Asn	Cys	Arg	Val
						325
						Ala
						Gln
						Tyr
						Pro
						Phe
						Glu
						Asp
						His
						Asn
Pro	Pro	Gln	Leu	Glu	Leu	Ile
						340
						Lys
						Pro
						Phe
						Cys
						Glu
						Asp
						Leu
						Asp
						Gln
Trp	Leu	Ser	Glu	Asp	Asp	Asn
						355
						His
						Val
						Ala
						Ala
						Ile
						His
						Cys
						Lys
						Ala

Gly Lys Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg
370 375 380

Gly Lys Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val
385 390 395 400

Arg Thr Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr
405 410 415

Val Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro
420 425 430

Val Ala Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe
435 440 445

Ser Gly Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val
450 455 460

Lys Ile Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe
465 470 475 480

Met Tyr Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys
485 490 495

Val Glu Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met
500 505 510

Phe His Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr
515 520 525

Ser Glu Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser
530 535 540

Ile Cys Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu
545 550 555 560

Thr Leu Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn
565 570 575

Arg Tyr Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr
580 585 590

Val Glu Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr
595 600 605

Pro Asp Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr
610 615 620

Thr Asp Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Ser
625 630 635 640

Gln Ile Thr Lys Val
645

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 430 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) ESTADO DE LA CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 7:

ES 2 361 044 T5

Pro Pro Ala Ala Arg Pro Gly Ala Ala Cys Ser Leu Arg Arg Arg Pro
1 5 10 15
Arg Arg Pro Pro Leu Leu Pro Ser Leu Ser Ser Phe Leu Ser Ser His
20 25 30
Arg Leu Pro Asp Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn
35 40 45
Lys Arg Arg Tyr Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile
50 55 60
Tyr Pro Asn Ile Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly
65 70 75 80
Val Tyr Arg Asn Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys
85 90 95
His Lys Asn His Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr
100 105 110
Asp Thr Ala Lys Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp
115 120 125
His Asn Pro Pro Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu
130 135 140
Asp Gln Trp Leu Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys
145 150 155 160
Lys Ala Gly Lys Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu
165 170 175
His Arg Gly Lys Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly
180 185 190
Glu Val Arg Thr Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg
195 200 205
Arg Tyr Val Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr
210 215 220
Arg Pro Val Ala Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro
225 230 235 240
Met Phe Ser Gly Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu
245 250 255
Lys Val Lys Ile Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp
260 265 270
Lys Phe Met Tyr Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp
275 280 285
Ile Lys Val Glu Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp
290 295 300
Lys Met Phe His Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu
305 310 315 320
Glu Thr Ser Glu Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile
325 330 335

```

Asp Ser Ile Cys Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu
      340                      345                      350
Val Leu Thr Leu Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys
      355                      360                      365
Ala Asn Arg Tyr Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr
      370                      375                      380
Lys Thr Val Glu Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser
385                      390                      395                      400
Val Thr Pro Asp Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser
      405                      410                      415
Asp Thr Thr Asp Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu
      420                      425                      430

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 1.257 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 8:

CCTCCCCTCG	CCCGGCGCGG	TCCCGTCCGC	CTCTCGCTCG	CCTCCCGCCT	CCCCTCGGTC	60
TTCCGAGGCG	CCCGGGCTCC	CGGCGCGGCG	GCGGAGGGGG	CGGGCAGGCC	GGCGGGCGGT	120
GATGTGGCAG	GACTCTTTAT	GCGCTGCGGC	AGGATACGCG	CTCGGCGCTG	GGACGCGACT	180
GCGCTCAGTT	CTCTCCTCTC	GGAAGCTGCA	GCCATGATGG	AAGTTTGAGA	GTTGAGCCGC	240
TGTGAGGCGA	GGCCGGGCTC	AGGCGAGGGA	GATGAGAGAC	GGCGGCGGCC	GCGGCCCGGA	300
GGCCCTCTCA	GCGCCTGTGA	GCAGCCGCGG	GGGCAGCGCC	CTCGGGGAGC	CGGCCGGCCT	360
GCGGCGGGCG	CAGCGGCGGC	GTTTCTCGCC	TCCTCTTCGT	CTTTTCTAAC	CGTGCAGCCT	420
CTTCCTCGGC	TTCTCCTGAA	AGGGAAGGTG	GAAGCCGTGG	GCTCGGGCGG	GAGCCGGCTG	480
AGGCGCGGGC	GCGGCGGGCG	CGGCACCTCC	CGCTCCTGGA	GCGGGGGGGA	GAAGCGGCGG	540
CGGCGGCGGC	CGCGGCGGCT	GCAGCTCCAG	GGAGGGGGTC	TGAGTCGCCT	GTCACCATTT	600
CCAGGGCTGG	GAACGCCGGA	GAGTTGGTCT	CTCCCTTCT	ACTGCCTCCA	ACACGGCGGC	660
GGCGGCGGGC	GCACATCCAG	GGACCCGGGC	CGGTTTTAAA	CCTCCCGTCC	GCCGCCGCCG	720
CACCCCCCGT	GGCCCCGGCT	CCGGAGGCCG	CCGGCGGAGG	CAGCCGTTCG	GAGGATTATT	780
CGTCTTCTCC	CCATTCCGCT	GCCGCCGCTG	CCAGGCCTCT	GGCTGCTGAG	GAGAAGCAGG	840
CCCAGTCGCT	GCAACCATCC	AGCAGCCGCC	GCAGCAGCCA	TTACCCGGCT	GCGGTCCAGA	900
GCCAAGCGGC	GGCAGAGCGA	GGGGCATCAG	CTACCGCCAA	GTCCAGAGCC	ATTTCCATCC	960
TGCAGAAGAA	GCCCCGCCAC	CAGCAGCTTC	TGCCATCTCT	CTCCTCCTTT	TTCTTCAGCC	1020
ACAGGCTCCC	AGACATGACA	GCCATCATCA	AAGAGATCGT	TAGCAGAAAC	AAAAGGAGAT	1080
ATCAAGAGGA	TGGATTCGAC	TTAGACTTGA	CCTGTATCCA	TTTCTGCGGC	TGCTCCTCTT	1140
TACCTTTCTG	TCACTCTCTT	AGAACGTGGG	AGTAGACGGA	TGCGAAAATG	TCCGTAGTTT	1200
GGGTGACTAT	AACATTTAAC	CCTGGTCAGG	TTGCTAGGTC	ATATATTTTG	TGTTTCC	1257

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 1.084 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 9:

GAGACATAGC CAGCTCTTAA ATCTGACTTC CAGATTTTCA CTGTGTCTTC TTTTTCTGT	60
AACGTGTTGC CTTTTTTAGC CATGAAAAAT TAGAAGTTGA ACTCTTGTCT TTTCAGGCAG	120
GTGTCAATTT TGGGGTTTTG TTTTGATTTT TGGTTTTTGA CATAAAGTAC TTTAGTTCTG	180
TGATGTATAA ACCGTGAGTT TCTGTTTTTC TCATATACCT GAATACTGTC CATGTGGAAG	240
TTACCTTTTA TCTTTACCAG TATTAACACA TAAATGGTTA TACATAAATA CATTGACCAC	300
CTTTTATTAC TCCAGCTATA GTGGGGAAAG CTTTCTTTTC ATAACCTAGCT AATGTTTTAA	360
AAAGTATTCT TTTAGTTTGA TTGCTGCATA TTTCAGATAT TTCTTTCCTT AACTAAAGTA	420
CTCAGATATT TATCCAAACA TTATTGCTAT GGGATTTCTT GCAGAAAGAC TTGAAGGCGT	480
ATACAGGAAC AATATTGATG ATGTAGTAAG GTAAGAATGC TTTGATTTTC TATTTCAAAT	540
ATTGATGTTT ATATTCATGT TGTGTTTTCA TTTAGAAAAG ATTTCTAAGC CACAGAAAAA	600
GATACTTTGT GATGTAAACT ATTATTGTAG TGCTCTATAA TCATTTTTTG GCTTACCGTA	660
CCTAATGGAC TTCAGGGGGA TACAGTTCAT TTGATAAGAA CTGACCTTAT ACATTACATA	720
ATCAGGTACT TATGTGATAT CATTTCCTGG ACTCCATAAA ATGCTGGTCA CCAGGTTTAA	780
TACCTGGATT CCATTACAGT GTGATTTTTG TCTTATTTCA TAGTTGGGGA TTAGGCTTAA	840
AATCCTAGAG TGGATTTATT CAGTTAAATT TATTCACACT AAGATGTGAT GACTAATACT	900
GTATATTTTT ATGTAGACCA AATTTTAAGG TACCACTGTG CATATGTTAC CAACTACCTG	960
AAGAATATTT GGTGGTACA GAATATATAA AGGAATCGCT GGTGTTCCAA GGCTAATCCA	1020
GTTTTATAAT TTTGCATAAT TTCCTAACTG CGAATATCAT TTATTTAAAC AATTTATTCT	1080
CCAG	1084

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 1.104 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC.ID. Nº: 10:

GAATTAATAG TTAGTACGTG GATCTTTCAA ATATCAAAG TTTTCAGTTT GATGGGAAAA	60
TGATGTCTGA ATTTTCAGGG TTATTTTAA GAGTACTTGA TTATGACTGT CTTGTAAATC	120
TCTATGAGCT AGGTATACTT GCACTAAATG CTAATGCTTT TTAAAGAAGT TATGTCTTAA	180
TATTCAGTCT CATTATGTTA GGTGAAGAT AGAAGATTAT GAAAATATTC TCTGAAAAGC	240
TCTGGTTTTA CTTGAGATTG TATAAATCTG TGTAAATGTA TAATTATTTA AGAATGACAT	300
GATTACTACT CTAAACCCAT AGAAGGGGTA TTTGTTGGAT TATTTATTTT CACTTAAATG	360
GTATTTGAGA TTAGGAAAAA GAAAATCTGT CTTTGGTTT TTCTTGATAG TATTAATGTA	420
ATTTCAAATG TTAGCTCATT TTTGTTAATG GTGGCTTTTT GTTGTTTGT TTTGTTTTAA	480
GGTTTTTGGA TTCAAAGCAT AAAAACCATT ACAAGATATA CAATCTGTAA GTATGTTTTTC	540
TTATTGTAT GCTTGCAAAT ATCTTCTAAA ACAACTATTA AGTGAAAGTT ATCTGCTTGT	600
TAGAGTGAGG TAGAGTTAAA GATACATTTT AACAGAATTG TATTCCTAAA CCGATTAAAGT	660
CAAGAAGTCC AAGAGCATTG TTAGATCATT TAGAAAGTGT AGTGATGAGG TAAAACATTG	720
TTGGCACAGA TTCATGTTAC TTGATCTGCT TTAAATGACT TGGCATCTAG CCCATATTTG	780
AGCCCATAC CGTGTGGTAA TTTGAAGTGT AATTCACAGT AGAGCTTCTG TTAAAGCACT	840
AATAGCATCT TCCATGGAGG TATACTTCAG AGTGAATATA ATTTGTTTA TCCTGTGTCT	900
CTAGAGCTAT TGAAGTAAA AGCTGTTAGG GCATTCTCTA ACTGTACATC ACCTAAGTTA	960
TTTAAAATTG CTGAATTAAG TGGCTTGTCT TGTCTAGACA GATTTTAAGG ACTGCCACC	1020
TGATTGATAG AACTAGTTGA CCTATCTTT AACTTTTTGT TTTCTTTGA CTTGGGATAA	1080
AAGTTGAAAA GGTAAAAGGA AGGA	1104

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 656 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 11:

TTGCATACAC TTAATCTTTT AAGCTTTGGT TTTATTATTA TAATATGGGG GTGATAACAG	60
TATCTACTTA ATAGAATTCT TGTTATTAAC ATGAAATAAT TAATGTTAAA CACAGCATAA	120
TATGTGTCAC ATTATAAAGA TTCAGGCAAT GTTTGTTAGT ATTAGTACTT TTTTTCTTC	180
CTAAGTGCAA AAGATAACTT TATATCACTT TTAACTTTT CTTTGTAGTTG TGCTGAAAGA	240
CATTATGACA CCGCCAAATT TAATTGCAGA GGTAGGTATG AATGTACTGT ACTATGTTGT	300
ATAACTTAAA CCCGATAGAC TGTATCTTAC TGTGATAACA ATAATGAGTC ATCCAGATTA	360

TCGAGTGAGA TACATATTTA TCTTAAGAAT TATCTTTAAA AATTTCAAAA ATTTTAATTT	420
TACTGTTGTG TTTTAGGAAA AAGTATTGCA TAAAGCTATT AATATTGTCA GGAAGACTAA	480
AGTGCAGCAT AGACTAAGCA ATCAGGAAAA TTCCTAGACT AAAAATAGTA TAAGGAGAGG	540
GTTTACCTAC TATTTGAGGC AGTTGGTCTA ATAGTAAGCA ATCACAGGGA GGAAAGCAGA	600
AACTACTTAA CTCTTCTGTG TTGAGGAATG ACATAAAAGG TATGAAAGGA TATAAC	656

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 808 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) RASGO:

- 10 (A) NOMBRE/CLAVE: base modificada
(B) LOCALIZACIÓN: 463..754
(C) OTRA INFORMACIÓN:/nota="N=C, G, A ó T"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 12:

ATACATTATT TTTCTCTGGA ATCCAGTGTT TCTTTTAAAT ACCTGTTAAG TTTGTATGCA	60
ACATTTCTAA AGTTACCTAC TTGTTAATTA AAAATTCAAG GGTTTTTTTT TCTTATTCTG	120
AGGTTATCTT TTTACCACAG TTGCACAATA TCCTTTTGAA GACCATAACC CACCACAGCT	180
AGAACTTATC AAACCCTTTT GTGAAGATCT TGACCAATGG CTAAGTGAAG ATGACAATCA	240
TGTTGCAGCA ATTCACTGTA AAGCTGGAAA GGGACGAACT GGTGTAATGA TATGTGCATA	300
TTTATTACAT CGGGGCAAAT TTTTAAAGGC ACAAGAGGCC CTAGATTTCT ATGGGGAAAGT	360
AAGGACCAGA GACAAAAGG TAAGTTATTT TTTGATGTTT TTCCTTTCCT CTTCTGGAT	420
CTGAGAATTT ATTGGAAAAC AGATTTTGGG TTTCTTTTTT TCNNNNNNNN NNNNNNNNNN	480
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	540
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	600
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	660
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	720
NNNNNNNNNN NTCCTCCCTC CCCACCCTCA GTCNCTGGAA AACAGGTTTT AAAGATAGTT	780
GCTAATCCTT ATTTCTTCTA AATTTTAA	808

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 13:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 670 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 13:

ATATGATAAT TGTTTTAAGG GAGGAGAGTT ATTCTGATAT CCTTGTATTG ATATTGCTCT	60
TATTTATTAT TGAGCTGGAT TTAAGTATTA ATCATTAAAG GTCAAATTTC TAATGTATAA	120
TATGTTCTTA AATGGCTACG ACCCAGTTAC CATAGCAATT TAGTGAAATA ACTATAATGG	180
AACATTTTTT TTCAATTTGG CTTCTCTTTT TTTTCTGTCC ACCAGGGAGT AACTATTCCC	240
AGTCAGAGGC GCTATGTGTA TTATTATAGC TACCTGTTAA AGAATCATCT GGATTATAGA	300
CCAGTGGCAC TGTGTTTCA CAAGATGATG TTTGAACTA TTCCAATGTT CAGTGGCGGA	360
ACTTGACAGTA AGTGCTTGGA AATTCTCATC CTTCCATGTA TTGGAACAGT TTTCTTAACC	420
ATATCTAGAA GTTTACATAA AAATTTAGAA AAGAAATTTA CCACATTTGA AATTTATGCA	480
GGAGACTATA TTTCTGAAGC ATTTGAACAA ATTAATTAGC TTTGTTGTTC AACTCATTGG	540
GCTAAAGAAG CCAAAGCAA TGGGTTTAA TGTAGTCGAA GCCAAATTAT ATTTATGAAA	600
GAAATATTCT GTGTTATAAC CCACCAAATA CAGCCCAATT TCTGACTAGA TGTATGGAAG	660
AACCTGTCCC	670

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 661 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 14:

ATATTTTTAT	TTCATTTATT	TCAGTTGATT	TGCTTGAGAT	CAAGATTGCA	GATACAGAAT	60
CCATATTTTCG	TGTATATTGC	TGATATTAAT	CATTAAAATC	GTTTTTGACA	GTTTGACAGT	120
TAAAGGCATT	TCCTGTGAAA	TAATACTGGT	ATGTATTTAA	CCATGCAGAT	CCTCAGTTTG	180
TGGTCTGCCA	GCTAAAGGTG	AAGATATATT	CCTCCAATTC	AGGACCCACA	CGACGGGAAG	240
ACAAGTTCAT	GTAATTTGAG	TTCCCTCAGC	CGTTACCTGT	GTGTGGTGAT	ATCAAAGTAG	300
AGTTCTTCCA	CAAACAGAAC	AAGATGCTAA	AAAAGGTTTG	TACTTTACTT	TCATTGGGAG	360
AAATATCCAA	AATAAGGACA	GATTAAAAGC	TATATTTTAT	TTTATGACAT	GTAAGGAACT	420
ATAATTTGTT	TTCTATTAGA	TCTGCAGGTG	TTTTGCTTAC	TCTGGCATTG	GTGAGACATT	480
ATAAGGGTAA	ATAATCCTGT	TTGAAGGAAA	AGGCCTTATG	GCATTGTAAC	ATTAGAGGAA	540
TTTTTCTTAA	CAAGGATGGT	TAAGTGAGAA	GAAATTAGCA	TGGGACCAAT	ATTTTAAAAA	600
TTTTTGTTCT	ATAGGTAGAA	ATGAGATCTG	TTCTGTGGTC	TTATGTAGTG	ACACAAACCA	660
C						661

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. N°: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 739 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 15:

GTGTTACCT	TTATTCAGAA	TATCAAATGA	TAGTTTATTT	TGTTGACTTT	TTGCAAATGT	60
TTAACATAGG	TGACAGATTT	TCTTTTTTAA	AAAAATAAAA	CATCATTAAAT	TAAATATGTC	120
ATTCATTTTC	TTTTTCTTTT	CTTTTTTTTT	TTTTTTTAGG	ACAAAATGTT	TCACTTTTGG	180
GTAAATACAT	TCTTCATACC	AGGACCAGAG	GAAACCTCAG	AAAAAGTAGA	AAATGGAAGT	240
CTATGTGATC	AAGAAATCGA	TAGCATTTGC	AGTATAGAGC	GTGCAGATAA	TGACAAGGAA	300
TATCTAGTAC	TTACTTTAAC	AAAAAATGAT	CTTGACAAAG	CAAATAAAGA	CAAAGCCAAC	360
CGATACTTTT	CTCCAAATTT	TAAGGTCAGT	TAAATTAAAC	ATTTTGTGGG	GGTTGGTGAC	420
TTGTATGTAT	GTGATGTGTG	TTTAATTCTA	GGAGTACAGC	TGATGAAGAA	CTTGCTTGAC	480
AAGTTTTTAA	CTTATGTATT	ATTTTGAAGC	AGTGTTTACG	TAGCAGTAAC	ATGAAAGTTT	540
CTAATAAAAT	ACCCAATGTA	CACAGCGTCA	AAAAAGCTGC	ATTTTTCCTT	TTCCTAATTC	600
TTTGTTGTTT	GCTGAAATCT	GGGGCAAAGG	TGCGGGAGGG	GGCTAAATGA	CTGGGATATG	660
AAGTAGGAAT	GGGAGAGGAA	AGAAATAGAT	GGGAACTCAG	TCATTTGGGA	ATGATTCATA	720
TGGAATGTTT	TTACTGCTT					739

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 970 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) ESTADO DE LA CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 16:

ATGAGCCAAG ATCATGCCAC TGCACCTCCAG CTTGGCAACA GAGCAAGACT CTTGTCTCCA	60
GAAATAGAAA ATAAATAAAT TGTATTAACA TCCTGATAGT TTATCTGTCT AGTACCTAGC	120
AAGAAAGAAA ATGTTGAACA TCTTAAGAAG AGGGTCATT AAAAGGCCTC TTAAAAGATC	180
ATGTTTGTTA CAGTGCTTAA AAATTAATAT GTTCATCTGC AAAATGGAAT AAAAAATCTG	240
TTAAAAATAT ATTTCACTAA ATAGTTTAAG ATGAGTCATA TTTGTGGGTT TTCATTTTAA	300
ATTTTCTTTC TCTAGGTGAA GCTGTACTTC AAAAAACAG TAGAGGAGCC GTCAAATCCA	360
GAGGCTAGCA GTTCAACTTC TGTAACACCA GATGTTAGTG ACAATGAACC TGATCATTAT	420
AGATATTCTG ACACCACTGA CTCTGATCCA GAGAATGAAC CTTTGTATGA AGATCAGCAT	480
ACACAAATTA CAAAAGTCTG AATTTTTTTT TATCAAGAGG GATAAACAC CATGAAAATA	540
AACTTGAATA AACTGAAAT GGACCTTTTT TTTTAAATG GCAATAGGAC ATTGTGTCAG	600
ATTACCAGTT ATAGGAACAA TTCTCTTTC CTGACCAATC TTGTTTTACC CTATACATCC	660
ACAGGGTTTT GACACTTGTT GTCCAGTTGA AAAAGGTTG TGTAGCTGTG TCATGTATAT	720
ACCTTTTTGT GTCAAAGGA CATTTAAAT TCAATTAGGA TTAATAAAGA TGGCACTTTC	780
CCGTTTTATT CCAGTTTTAT AAAAAGTGGA GACAGACTGA TGTGTATACG TAGGAATTTT	840
TTCTTTTTGT GTTCTGTCAC CAACTGAAAGT GGCTAAAGAG CTTTGTGATA TACTGGTTCA	900
CATCCTACCC CTTTGCACTT GTGGCAACAG ATAAGTTTGC AGTTGGCTAA GAGAGGTTTC	960
CGAAAGGTTT	970

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) ESTADO DE LA CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 17:

Ile	His	Cys	Lys	Ala	Gly	Lys	Gly	Arg	Thr	Gly
1				5					10	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) ESTADO DE LA CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado
(B) LOCALIZACIÓN: 1
(C) OTRA INFORMACIÓN:/nota="puede ser o bien I=Isoleucina o V=Valina"

10 (ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado
(B) LOCALIZACIÓN: 4..8
(C) OTRA INFORMACIÓN:/nota="X=Cualquier aminoácido"

(ix) RASGO:

- 15 (A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado
(B) LOCALIZACIÓN: 10
(C) OTRA INFORMACIÓN:/nota="puede ser o bien S=Serina o T=Treonina"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 18:

Ile His Cys Xaa Ala Gly Xaa Xaa Arg Ser Gly
1 5 10

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 60 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) ESTADO DE LA CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 19:

Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr
1 5 10 15
Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile
20 25 30
Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Asn Glu Gly Val Tyr Arg Asn
35 40 45
Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys
50 55 60

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 60 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) ESTADO DE LA CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 20:

```

Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr
1           5           10           15
Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile
          20           25           30
Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn
          35           40           45
Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys
          50           55           60

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 60 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) ESTADO DE LA CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 21:

```

Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr
1           5           10           15
Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile
          20           25           30
Ile Ala Met Glu Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn
          35           40           45
Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys
          50           55           60

```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido supresor de tumor designado TS10q23.3 seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - (a) el polipéptido mostrado en la SEC. ID. N°: 1;
 - (b) un fragmento del polipéptido (a) que tiene función fosfatasa; y
 - (c) una variante alélica del polipéptido (a).
2. El polipéptido de la reivindicación 1 el cual se conjuga a una molécula vehículo.
3. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido de la reivindicación 1
4. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la reivindicación 1
5. El anticuerpo de la reivindicación 4 el cual es un anticuerpo monoclonal.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, el cual está marcado con una marca detectable.
7. El anticuerpo de la reivindicación 5, el cual es útil en procedimientos inmunoquímicos o inmunohistoquímicos.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que dicho procedimiento inmunoquímico es un método ELISA o transferencia Western.
9. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que dicho procedimiento inmunohistoquímico es tinción de tejido.
10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que dicho anticuerpo es un reactivo no cruzado con otros polipéptidos humanos.
11. Una célula de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 5.
12. Un método para producir anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de la reivindicación 1 que comprende el uso de dicho polipéptido como inmunógeno.
13. Un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) una secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido mostrado en la SEC. ID. N°: 1;
 - (b) la secuencia codificadora para un polipéptido supresor de tumor mostrado en SEC. ID. N°: 2 que comienza en el nucleótido 1.035 (designado posición +1); SEC. ID. N°: 3 que comienza en el nucleótido 751 (designado posición +1); o SEC. ID. N°: 4 que comienza en el nucleótido 109 (designado posición +1);
 - (c) la secuencia de nucleótidos del exón B, C, D, E, F, G, o H mostrado en la Figura 10;
 - (d) una secuencia de nucleótidos que es un fragmento de la secuencia de nucleótido (b) y la cual codifica un polipéptido que tiene una función fosfatasa; y
 - (e) una secuencia de nucleótidos que codifica una variante alélica de un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótido (b);o la cadena complementaria de dicha secuencia de nucleótido.
14. El ácido nucleico de la reivindicación 13, en el que el polipéptido codificado es un polipéptido de murine, canino o humano.
15. Un oligonucleótido de entre 10 y 50 bases consecutivas del ácido nucleico de la reivindicación 13, o complementario al mismo en el que dicho ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos del exón E.
16. El oligonucleótido de la reivindicación 15 útil para la cuantificación de un ARNm que codifica el polipéptido TS10q23.3 de la reivindicación 1 o para la secuenciación de ADN.
17. Un método de diagnóstico del cáncer o ascenso del desarrollo de cáncer o metástasis en un sujeto humano que comprende la determinación en una muestra de dicho sujeto si hay una mutación puntual, delección o inserción en una secuencia de nucleótidos de TS10q23.3 de dicho sujeto en comparación con la región codificadora de la secuencia de nucleótido mostrada en la SEC. ID. N°: 2, siendo dicha mutación puntual, delección o inserción indicativa de cáncer o ascenso del desarrollo de cáncer o metástasis.
18. El método de la reivindicación 17, en el que dicho cáncer está seleccionado entre el grupo que consiste en cerebro, glioblastoma, meduloblastoma, astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma, pulmón, hígado, bazo, riñón,

páncreas, intestino delgado, células sanguíneas, ganglio linfático, colon, pecho, endometrio, estómago, próstata, testículo, ovario, piel, cabeza y cuello, esófago y médula ósea.

19. El método de la reivindicación 17, en el que dicha mutación, delección o inserción puntual está seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 5 (a) un ácido nucleico que tiene una mutación de maduración por corte y empalme ("splicing") que da como resultado un cambio de G a T en la posición +1 en la junta de maduración por corte y empalme del exón C de la secuencia codificadora mostrada en la Figura 10 para dicho polipéptido supresor de tumor;
- (b) un ácido nucleico que tiene una mutación de maduración por corte y empalme que da como resultado un cambio de G a T en la posición +1 en la junta de maduración por corte y empalme del exón H de la secuencia codificadora mostrada en la Figura 10 para dicho polipéptido supresor de tumor;
- 10 (c) un ácido nucleico el cual tiene una inserción de 2 pares de bases de TT en la posición 98 del exón G de la secuencia codificadora mostrada en la Figura 10 para dicho polipéptido supresor de tumor;
- (d) un ácido nucleico el cual tiene una mutación de desplazamiento de la pauta de lectura en el exón G de la secuencia codificadora mostrada en la Figura 10 para dicho polipéptido supresor de tumor;
- 15 (e) un ácido nucleico el cual tiene una mutación de sentido erróneo que da como resultado un cambio de T a G en la posición 46 del exón B en la secuencia codificadora mostrada en la Figura 10 para dicho polipéptido supresor de tumor;
- (f) un ácido nucleico el cual tiene una mutación de sentido erróneo que da como resultado un cambio de G a A en la posición 28 del exón B en la secuencia codificadora mostrada en la Figura 10 para dicho polipéptido supresor de tumor;
- 20 (g) un ácido nucleico el cual tiene una mutación sin sentido que da como resultado un cambio de C a T en la posición 202 del exón H en la secuencia codificadora mostrada en la Figura 10 para dicho polipéptido supresor de tumor;
- (h) un ácido nucleico en el que dicha mutación es una delección de AA en posiciones 16 y 17 del exón A mostrado en la Figura 10; y
- 25 (i) un ácido nucleico en el que dicha mutación es un cambio de C a T en la posición 53 en el exón B mostrado en la Figura 10.

20. El uso de

- (a) la región codificadora de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°: 2;
- 30 (b) una variante alélica de (a);
- (c) un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10; o
- (d) un oligonucleótido de la reivindicación 15 ó 16

para determinar la expresión de una secuencia de nucleótidos TS10q23.3 en las células de una muestra.

35 21. El uso de la reivindicación 20, que comprende el ensayo de un ácido nucleicos TS10q23.3 o polipéptido en la muestra.

22. El uso de la reivindicación 21 que comprende la cuantificación de la cantidad de ARNm de TS10q23.3.

23. Una composición farmacéutica que comprende una construcción de expresión que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 13, o un polipéptido de la reivindicación 1.

40 24. El uso de un polipéptido de la reivindicación 1 para la producción de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

25. Un polipéptido de la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de cáncer.

26. El uso de un ácido nucleico de las reivindicaciones 13 o 14 para la producción de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que dicho ácido nucleico es capaz de expresar el polipéptido de la reivindicación 1 en las células tumorales asociadas con dicho cáncer.

45 27. Un ácido nucleico de las reivindicaciones 13 o 14 para usar en el tratamiento de cáncer, en el que dicho ácido nucleico es capaz de expresar el polipéptido de la reivindicación 1 en las células tumorales asociadas con dicho cáncer.

28. Un mamífero transgénico no humano en el cual ambas copias del gen codificador del supresor de tumor TS10q23.3 de la reivindicación 1 están interrumpidas o reemplazadas con otro gen.

Localización del Loci del Supresor de Tumor Candidato en el Cromosoma 10

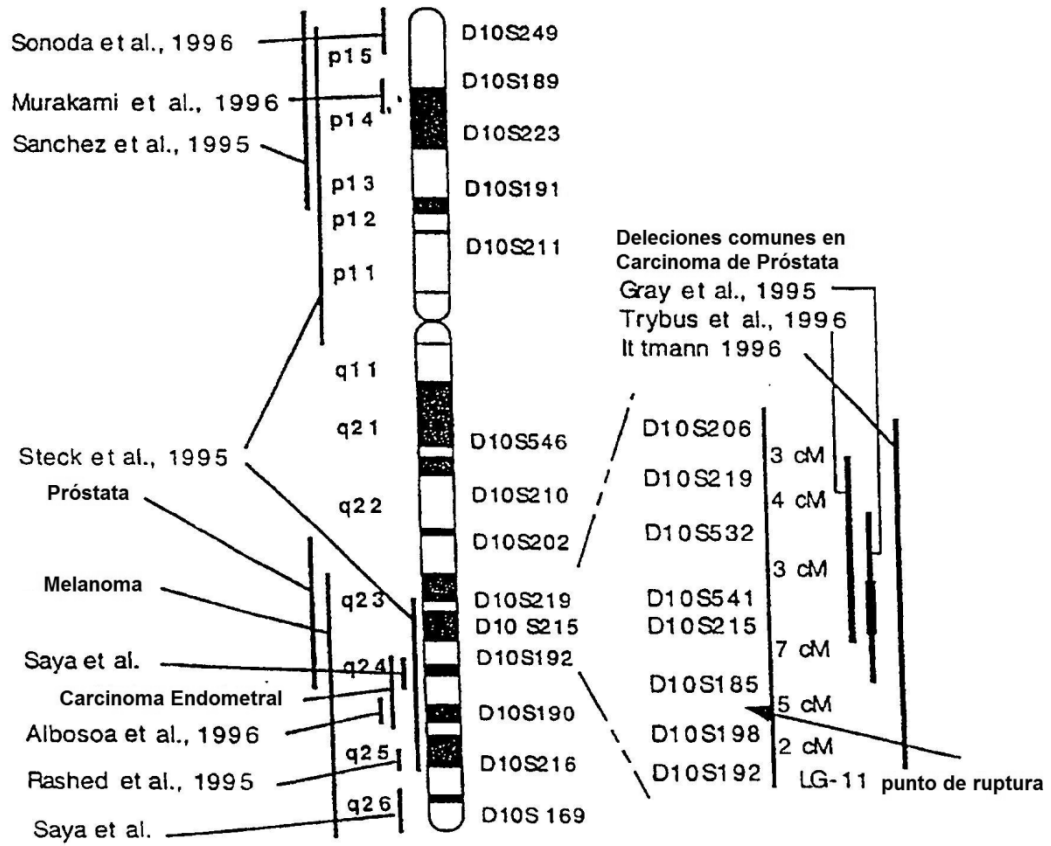


FIG. 1

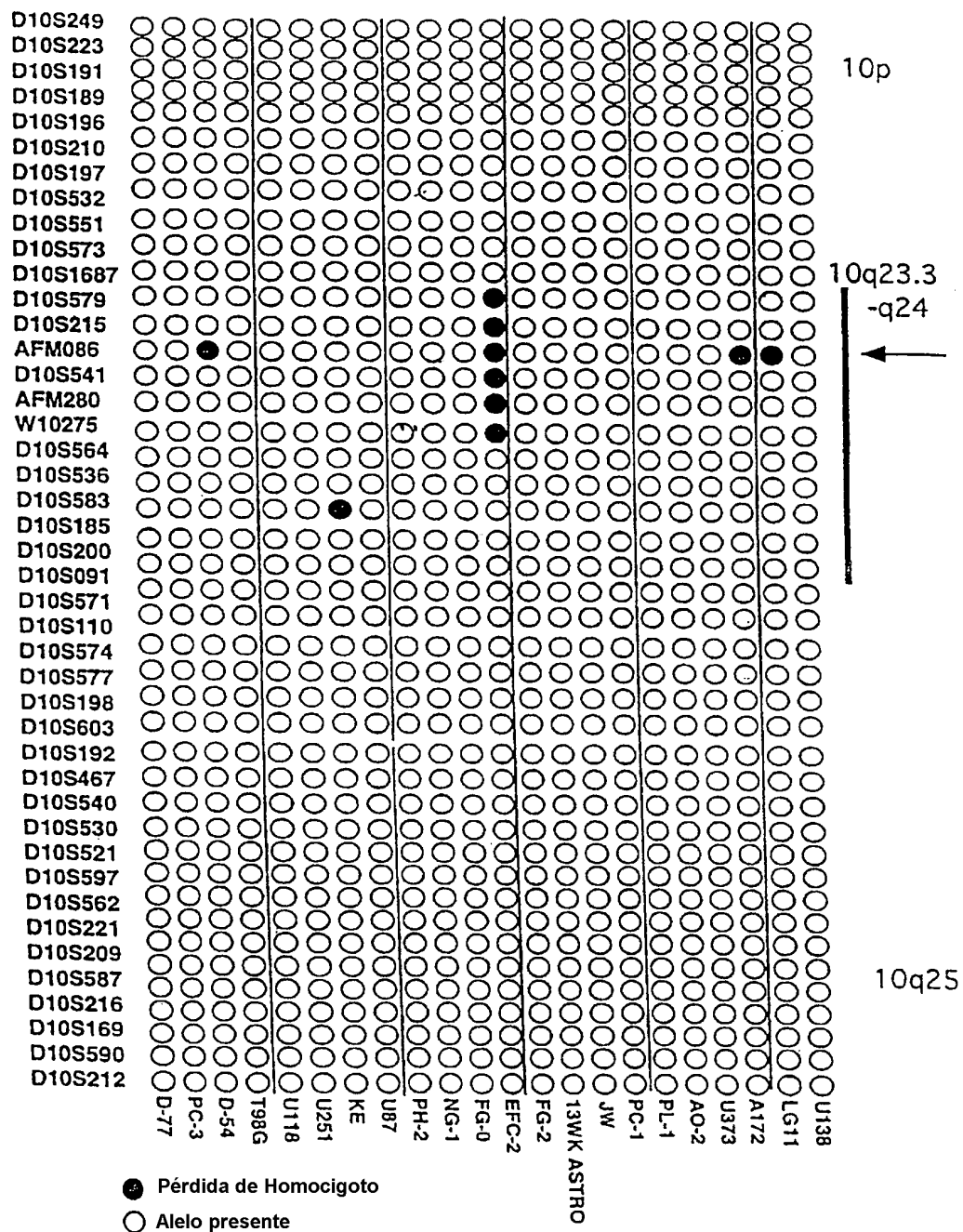


FIG. 2

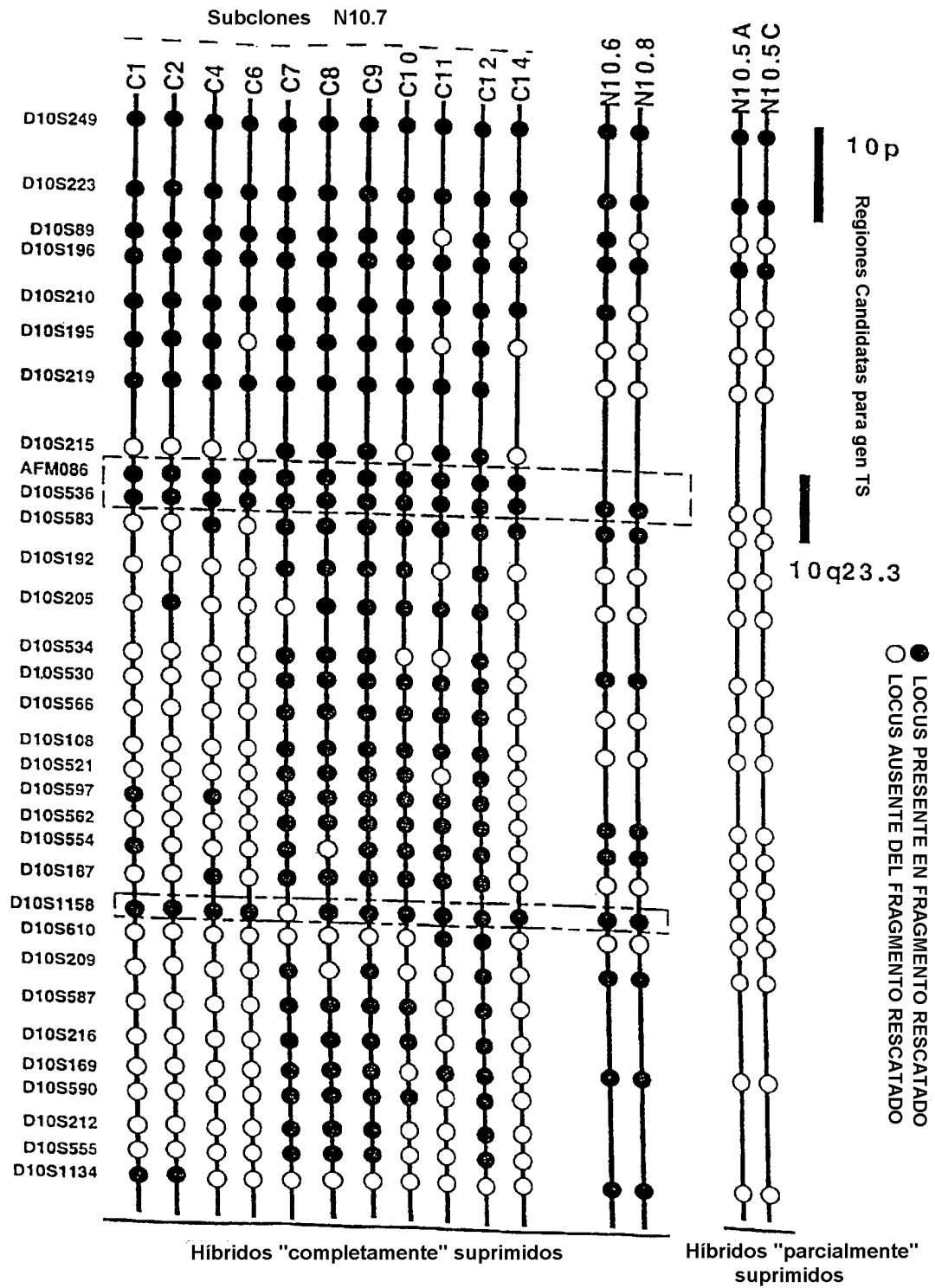


FIG. 3

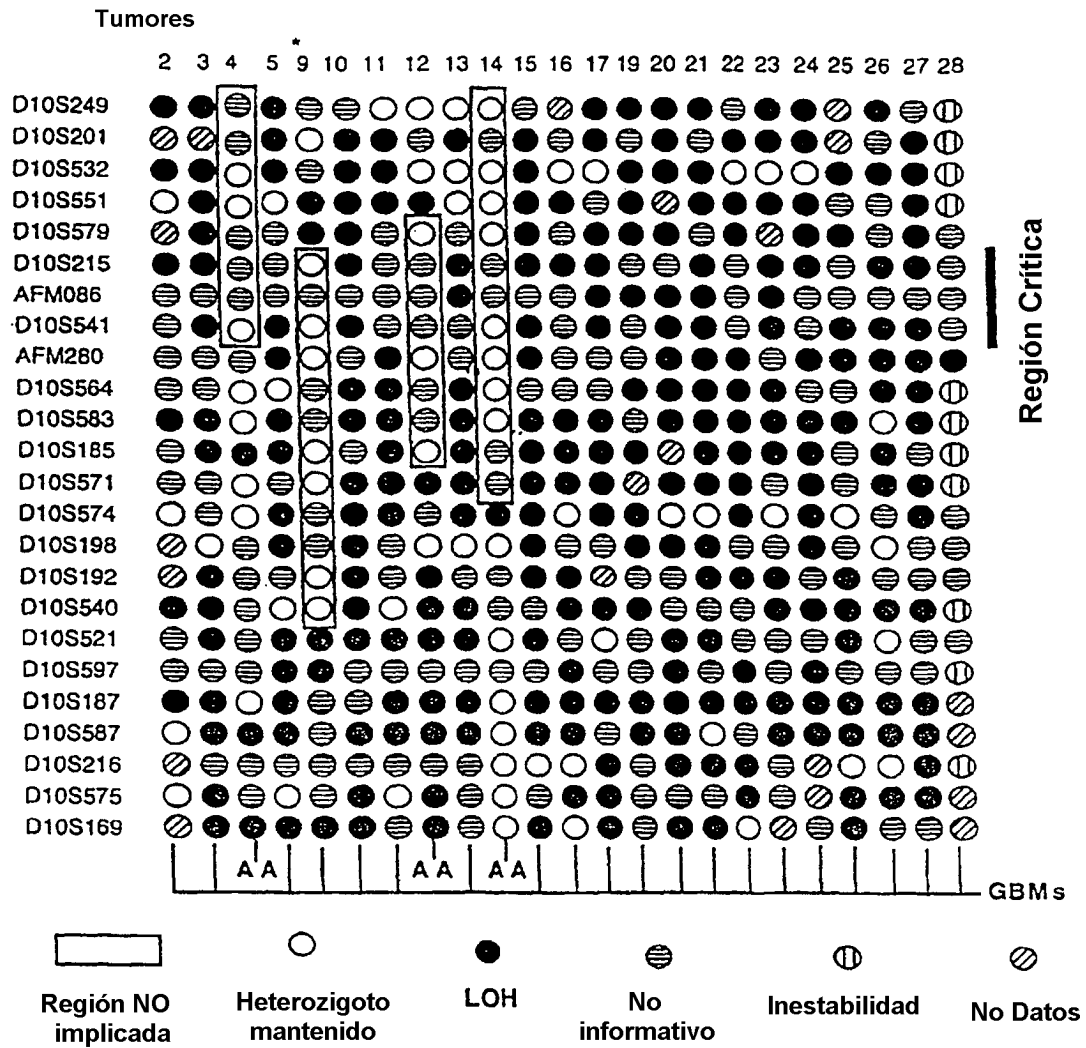


FIG. 4

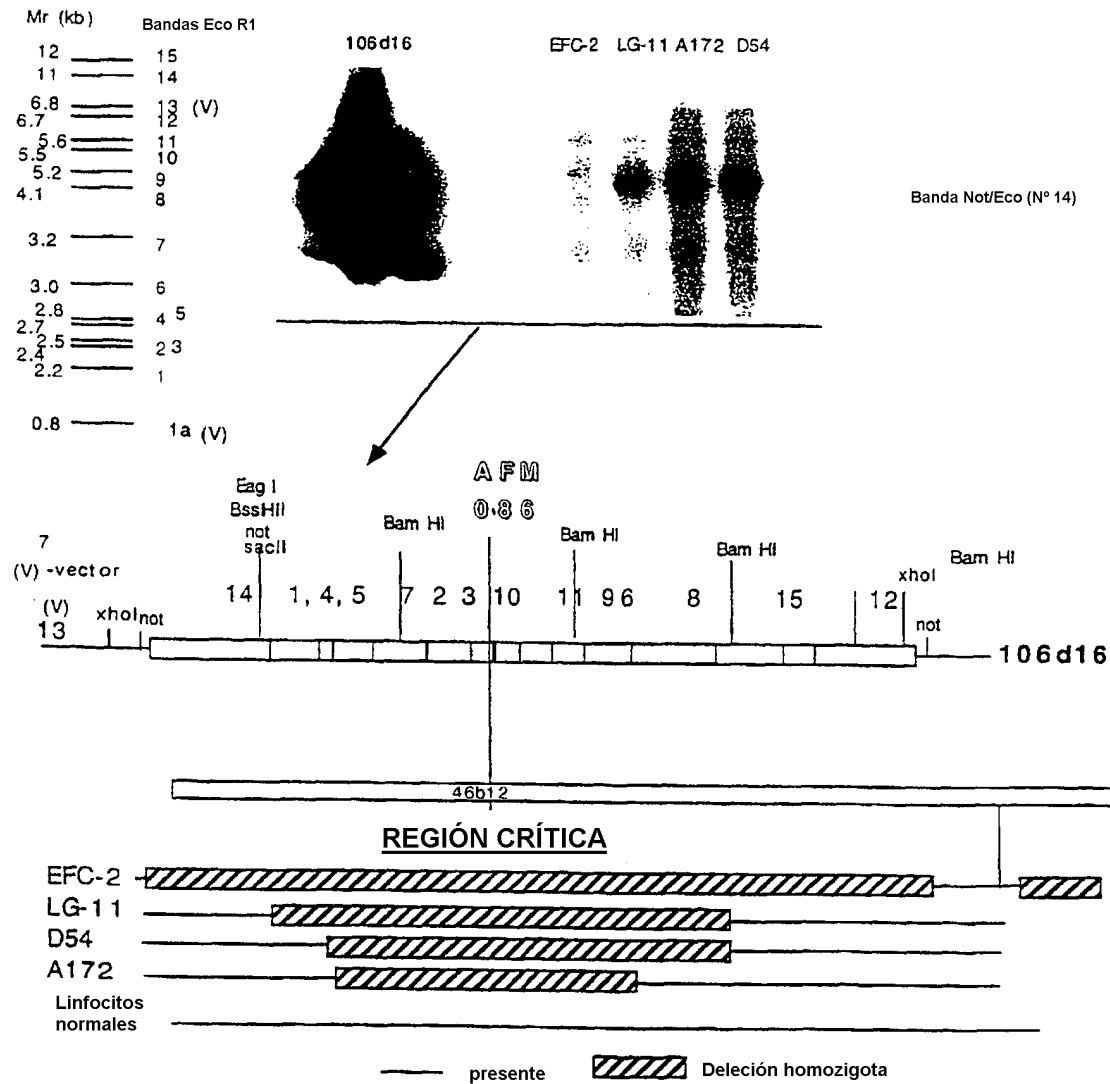


FIG. 5

CCTCCCTTCGCGCGGCGGGTCCGTCGCGCTTCGCTCCCTCCCGCTCCCTCGGTCTTCGAGGCGCGCGGCTCCCGGCGCGCGCGGAGGGG 100
 CGGGCAGCGCGCGCGGCGGTGATGTGGCAGGACTCTTTATGCGCTGCGGAGGATACGCGCTCGCGCTGGGACGCGACTGCGCTCAGTTCTCTCTCTC 200
 GGAAGCTGCAJCCATGATGGAAAGTTTGAGAGTTGAGCGCTGTGAGGCGAGGCGCGGCTCAGGCGAGGAGATGAGAGACGCGCGCGCGCGCGCGGA 300
 GCGCCTCTCAGCGCTGTGAGCAGCGCGCGGCGGAGCGCTTCGCGGAGCGCGCTCGCGCTCGCGCGGCGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGG 400
 CTTTCTTAACGTCAGCGCTCTCTCTCGCTCTCTCTGAAAGGAGGTTGGAAGCGTGGGCTCGGGGAGGCGCGGCTGAGGCGCGCGCGCGCGCGG 500
 CGGCACTCTCCGCTCTCTGAGCGCGGCGGAGAGCGG 600
 CCAGGCTGCGGAGCGCGGAGAGTTGGTCT 700
 CCCTCCGTCGCGCGCTCGCGCGCT 800
 GCGCGCGCTGCGCGCGCT 900
 GCGAGCGG 1000
 CTCTCTCTTTTCT 1100

 TTAGACTTGACCTATATTTATCCAAACATTAATGCTATGGGATTTCTGCAAGAGCTTGAGGCGTATACAGGACAAATTTGATGATGTAGTAAGGT 1200

 TTTTGGATTCAAAGCATAAAGACCATTAAGATATACAACTTTGTGCTGAAGACATTAAGACCGCGCAATTTAATTCAGAGTTGCACAAATATC 1300

 TTTTGAAGACCATAAAGCACACAGCTAGAACTTATCAAGCGCTTTTGTGAAGATTTGACCAATGCGTAAGTGAGATGACAACTATGTTGACGAAAT 1400

 CACTGTAAAGCTGGAAGGGGAGCACTGCTGTATGATATGTGATATTTATTACATCGCGCGCAATTTTAAAGGCGCAAGAGCGCGCTAGATTTCTATG 1500

 GGGAGTAAGGACCGAGAGACAAAGGGAGTAAGTATTCAGCTCAGAGCGCGCTATGTGATTTATTAAGCTACCTGTAAAGAAATCATCTGGATTATG 1600

 ACCAGTGGCACTGTTGTTTCAAGATGATGTTTGAAGCTATTCGAATGTTGAGTGGCGGAACTTGCAATCCTCAGTTTGTGCTCTGCCAGCTAAAGCTG 1700

 AAGATATATTCTCTCAATTCAGGACCCACAGGCGGGAAGACAAATTCATGTACTTTGAGTTCCCTCAGCGTTACCTGTGTGTGTGTATATCAAGCTAG 1800

 AGTTCTTCCACAAACAGAACAGATGCTAAAAAGGACAAATGTTTCACTTTTGGGTAAATACATTCTTCATACCGAGGACAGAGGAACTCTAGAAAA 1900

 AGTAGAAAAAGGAGCTATGTGATCAAGAAATGAGTAGCAATTTGAGTATACAGCGTGCAGATATGACAAAGAAATATCTAGTACTTACTTTAAACAAA 2000

 AATGATCTTGACAAAGCAAAATAAAGACAAAGCCCAAGGATACTTTTCTCAAAATTTTAAAGGTGAAGCTGTACTTCACAAAAACAGTAGAGGAGCGCTCAA 2100

 ATCCAGAGGCTAGCAGTTCAACTTCTGTAAACACAGATGTTAGTACAAATGAAGCTGATCATTAAGATATTTCTGACACCACTGACTCTGATCCAGAGAA 2200

 TGAACCTTTTGTATGAGATCAGCATACACAAATTACAAAAGTCTGAATTTTCTTATCAAGAGGGAATAAACACCATGAAAAATAAACTTGAATAAACTC 2300
 /AAATGGACCTTTTCTTTTAAATGGCAATAGGACATTGTGTGAGATACCAATTAAGGACAAATTCCTTTTCTGACCAATCTTGTTTTACCTATA 2400
 CATCCACAGGCTTTTACACTTGTGTGAGTTGAAAAAGGTTGTGTAGCTGTGTATGTATATACCTTTTGTGTCAAAAGGACATTTAAATTTCAAT 2500
 TAGGATTAATAAGATGGCACTTTCCCGTTTTATTCAGTTTTATAAAGTGGAGACAGCTGATGTGTATACGTAGGAAATTTTCTCTTTTGTGTCT 2600
 GTUACCACTGAAGTGGCTAAAGAGCTTTGTGATATACGTTTCACTCTCTACCGCTTTGCACTTGTGGCAACAGATAAGTTTGCAGTTGCGCTAAGAGAG 2700
 GTTTCGAAAGGTTTTGCTACCATCTTAATGATGTATTGCGTTAGGGCAATGGAGGGGATGCTCAGAAAGGAAATAATTTTATGCTGGACTCTGGAC 2800
 CATATACCATCTCCAGCTATTACACACACCTTTCTTACGATGCTACAGTTATTAATCTGACATTCGAGGAATGGCGCGCTGCTACTGCTTGTGTTT 2900
 GCGCTTTTCTTTTAAAGCATATTTGGTGTAGAAAAGGCAAGCTAAAGGAAGTGAATCTGTATTTGGGTACAGGAATGAACCTTCTCAACATCTTAAGAT 3000
 CCACAAATGAAGGATATAAAAAATATGTCATAGGTAAGAAACACAGCAAGATGACTTAACCATATAATGTGGAGGCTATCAACAAAGAAATGGCGCTG 3100
 AAACATTAATAAAATGACAAATGATTTATTAATATGTTTCTCAATGTAAAAAAA

FIG. 6

```

1  M T A I I K E I V S R N K R R Y Q E D G F D L D L T Y I Y P
31 N I I A M G F P A E R L E G V Y R N N I D D V V R F L D S K
61 H K N H Y K I Y N L C A E R H Y D T L D Q W L S E D D N H V A
91 E D H N P P Q L E L I K P F C E D L D Q W L S E D D N H V A
121 A I H C K A G K G R T G V M I C A Y L L H R G K F L K A Q E
151 A L D F Y G E V R T R D K K G V T I P S Q R R Y V Y Y S Y
181 L L K N H L D Y R P V A L L F H K M M F E T I P M F S G G T
211 C N P Q F V V C Q L K V K I Y S S N S G P T R R E D K F M Y
241 F E F P Q P L P V C G D I K V E F F H K Q N K M L K K D K M
271 F H F W V N T F F I F G P E E T S E K V E N G S L C D Q E I
301 D S I C S I E R A D N D K E Y L V L T L T K N D L D K A N K
331 D K A N R Y F S P N F K V K L Y F T K T V E E P S N P E A S
361 S S T S V T P D V S D N E P D H Y R Y S D T T D S D P E N E
391 P F D E D Q H T Q I T K V

```

FIG. 7

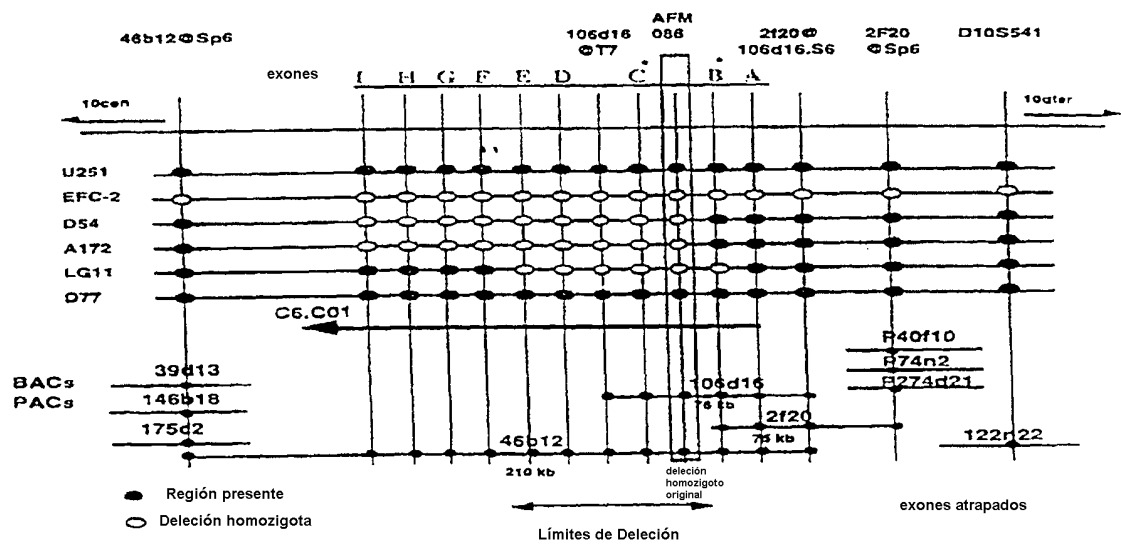


FIG. 8

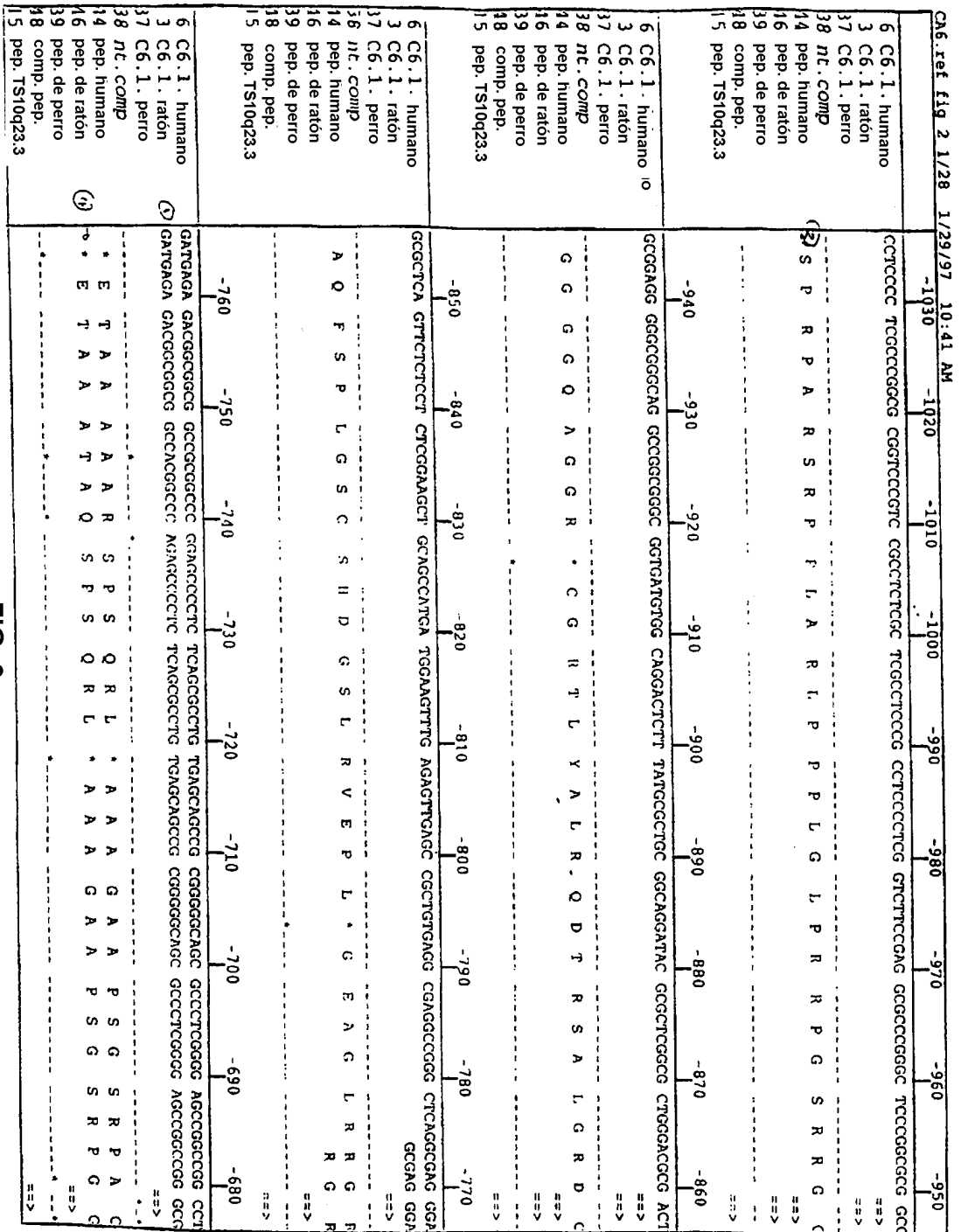


FIG. 9

CAG.ref fig 2 1/28 1/29/97 10:41 AM	
6 C6.1. humano	-670 -660 -650 -640 -630 -620 -610 -600 -590
3 C6.1. ratón	GGGCGG CGGACGCGG GGGCTTCTC GCGTCTCTT GATCTTTCT AACCTGAG CCTCTCTC GGGTCTCTT GAAAGGAG GTG
37 C6.1. perro	GGGCGG CGGACGCGG GGGGCGCTC GCTTCTCTT GATCTTTCT AACCTGAG CCTCTCTC GGGTCTCTT GAAAGGAG GTG
38 nt.comp	GGGCGG CGGACGCGG GGGGCGCTC GCTTCTCTT GATCTTTCT AACCTGAG CCTCTCTC GGGTCTCTT GAAAGGAG GTG
44 pep. humano	G G G S G G V S R L L F V F S N R A A S S S A S P E R E G ?
46 pep. de ratón	G G G S G G G P R L L V V C S N R A A S E Q ? ? ? E R D G G
48 comp. pep.	
15 pep. TS10q23.3	
6 C6.1. humano	-580 -570 -560 -550 -540 -530 -520 -510 -500
3 C6.1. ratón	GAAG CGGTGAGCT GGGCGGAGC CGGCTGAGC GCGGCGGCG CGGCGGCGG ACCTCCGCT CCTGAGCGG GGGGAGAG CGG
37 C6.1. perro	GAAG CGGTGAGCT GGGCGGAGC CGGCTGAGC GCGGCGGCG CGGCGGCGG ACCTCCGCT CCTGAGCGG GGGGAGAG CGG
38 nt.comp	GAAG CGGTGAGCT GGGCGGAGC CGGCTGAGC GCGGCGGCG CGGCGGCGG ACCTCCGCT CCTGAGCGG GGGGAGAG CGG
44 pep. humano	? S R G L G R E P A E A R R R R R R H L P L L E R G G E A A
46 pep. de ratón	R S R G L E R E P A Q A ? ? ? R R L H L P L L E R G G E A A
48 comp. pep.	
15 pep. TS10q23.3	
6 C6.1. humano	-490 -480 -470 -460 -450 -440 -430 -420 -410
3 C6.1. ratón	CGGCGG GCGGCGGCG GCGGCTGAG CTCAGGAG GGGCTGAG TCGCTCTCA CCAITTCAG GCGTGGAG GCGGAGAGT TGC
37 C6.1. perro	CGGCGG GCGGCGGCG GCGGCTGAG CTCAGGAG GGGCTGAG TCGCTCTCA CCAITTCAG GCGTGGAG GCGGAGAGT TGC
38 nt.comp	CGGCGG GCGGCGGCG GCGGCTGAG CTCAGGAG GGGCTGAG TCGCTCTCA CCAITTCAG GCGTGGAG GCGGAGAGT TGC
44 pep. humano	A A A A A A A A P G R G S E S P V T I S R A G N A G E L V
46 pep. de ratón	A A ? ? A ? ? ? P G R G S E S P V T I A R A G N A G E L V
48 comp. pep.	
15 pep. TS10q23.3	
6 C6.1. humano	-400 -390 -380 -370 -360 -350 -340 -330 -320
3 C6.1. ratón	TCTCTC CCTTCTACTG CCTCCACAC GCGGCGGCG GCGGCGGCG ATCCAGGAG CCGGCGGCG TTAAACCTT CCGTCCGCG CGG
37 C6.1. perro	TCTCTC CCTTCTACTG CCTCCACAC GCGGCGGCG GCGGCGGCG ATCCAGGAG CCGGCGGCG TTAAACCTT CCGTCCGCG CGG
38 nt.comp	TCTCTC CCTTCTACTG CCTCCACAC GCGGCGGCG GCGGCGGCG ATCCAGGAG CCGGCGGCG TTAAACCTT CCGTCCGCG CGG
44 pep. humano	S P L L L P P T R R R R R R H I Q G P G P V L N L P S A A A
46 pep. de ratón	S P L L L P P T R R R R R R H V O G P G P V L S L P S A A A
48 comp. pep.	
15 pep. TS10q23.3	

FIG. 9 (cont.)

CA6.ref fig 2 1/28 1/29/97 10:41 AM	
6 C6.1. humano	-310
3 C6.1. ratón	-300
37 C6.1. perro	-290
38 nt.comp	-280
44 pep. humano	-270
46 pep. ratón	-260
39 pep. perro	-250
48 comp. pep.	-240
15 pep. TS10q23.3	-230
CCGCACC CCCCCTGGCC CCGGCTCCCG AGGCGCCCG CCGAGGAGC GCTTCGAGG ATTATTCGT TCCGCTCCG CCG	
CCGCACC CCCCCTGGCC CCGGCTCCCG AGGCGCCCG AGGAGGAGC GCTTCGAGG ATTATTCGT TCCGCTCCG CCG	
A P P V A R A P E A A G G G S R S E D Y S S S P H S A A A A	
A P P L A R A P E A A G G G S R C E D Y P S S P H S A A S A	
-220 -210 -200 -190 -180 -170 -160 -150 -140	
6 C6.1. humano	-130
3 C6.1. ratón	-120
37 C6.1. perro	-110
38 nt.comp	-100
44 pep. humano	-90
46 pep. ratón	-80
39 pep. perro	-70
48 comp. pep.	-60
15 pep. TS10q23.3	-50
CTGCCAG GCCTCTGGCT GCTGAGAGAG AGCAGGCCCA GTCTCTGCA CCATCCAGCA GCCGCGCAG CAGCCATTAC CCGGCTGGG TCC	
CTGCCAG GCCTCTGGCT GCTGAGAGAG AGCAGGCCCA GTCTCTGCA CCATCCAGCA GCCGCGCAG CAGCCATTAC CCGGCTGGG TCC	
A R P L A A E E K Q A Q S L Q P S S S R R S S H Y P A A V Q	
A R P L A A E E K Q A Q S L Q P S S S R R S S H Y P A A V Q	
-130 -120 -110 -100 -90 -80 -70 -60 -50	
6 C6.1. humano	-40
3 C6.1. ratón	-30
37 C6.1. perro	-20
38 nt.comp	-10
44 pep. humano	0
46 pep. ratón	10
39 pep. perro	20
48 comp. pep.	30
15 pep. TS10q23.3	40
AGAGCCA AGCGCGGGA GAGCGAGGG CATCACTAC CGCCAGTCC AGAGCCATT CCATCCGCA GAGGAGGCC CGCCACGAG AGC	
AGAGCCA AGCGCGGGA GAGCGAGGG CATCACTAC CGCCAGTCC AGAGCCATT CCATCCGCA GAGGAGGCC CGCCACGAG AGC	
S Q A A A E R G A S A T A K S R A I S I L Q K K P R H Q Q I	
G Q A A A E R G A S A T A K S R A I S I L Q K K P R H Q Q I	
-40 -30 -20 -10 0 10 20 30 40	
6 C6.1. humano	-40
3 C6.1. ratón	-30
37 C6.1. perro	-20
38 nt.comp	-10
44 pep. humano	0
46 pep. ratón	10
39 pep. perro	20
48 comp. pep.	30
15 pep. TS10q23.3	40
TTCTGCC ATCTCTCTCC TCCCTTTTCT TCAGCCACAG GCTCCACAG ATGACAGCA TCATCAAGA GATCGTTAG AGAACAAAA GGA	
TTCTGCC ATCTCTCTCC TCCCTTTTCT TCAGCCACAG GCTCCACAG ATGACAGCA TCATCAAGA GATCGTTAG AGAACAAAA GGA	
L P S L S S F F F S H R L P D M T A I I K E I V S R N K R R	
L P S L S S F F F S H R L P D M T A I I K E I V S R N K R R	
L P S L S S F L S S H R L P D M T A I I K E I V S R N K R R	
M T A I I K E I V S R N K R R	

FIG. 9 (cont.)

CA6.ref fig. 2 1/28 1/29/97 10:41 AM		50	60	70	80	90	100	110	120	130
6 C6.1. humano	GATATCA AGAGATGGA TTGCACTTAG ACTTGACCTA TATTATCCA AACATTATG CTATGGATT TCCCTGAGAA AGACTGAG GGC									
3 C6.1. ratón	GATATCA AGAGATGGA TTGCACTTAG ACTTGACCTA TATTATCCA AACATTATG CTATGGATT TCCCTGAGAA AGACTGAG GGC									
37 C6.1. perro	GCTACCA GAGAGATGG TTGCACTTG ACTTGACCTA TATTATCCA AACATTATG CTATGGATT TCCCTGAGAA AGACTGAG GGC									
38 nt.comp	Y Q E D G F D L D L T Y I Y P N I I A M G F P A E R L E G V									
44 pep. humano	Y Q E D G F D L D L T Y I Y P N I I A M G F P A E R L E G V									
46 pep. de ratón	Y Q E D G F D L D L T Y I Y P N I I A M G F P A E R L E G V									
39 pep. de perro	Y Q E D G F D L D L T Y I Y P N I I A M G F P A E R L E G V									
48 comp. pep.	Y Q E D G F D L D L T Y I Y P N I I A M G F P A E R L E G V									
15 pep. TS10q23.3	Y Q E D G F D L D L T Y I Y P N I I A M G F P A E R L E G V									
6 C6.1. humano	TATACAG GAACATATT GATGATGTAG TAAAGTTTGT GANTCAAG CATATAAAC ATTACAGAT ATACATCTT TGTGCTGAA GAC	140	150	160	170	180	190	200	210	220
3 C6.1. ratón	TATACAG GAACATATT GATGATGTAG TAAAGTTTGT GANTCAAG CATATAAAC ATTACAGAT ATACATCTT TGTGCTGAA GAC									
37 C6.1. perro	TATACAG GAACATATT GATGATGTAG TAAAGTTTGT GANTCAAG CATATAAAC ATTACAGAT ATACATCTT TGTGCTGAA GAC									
38 nt.comp	Y R N N I D D V V R F L D S K H K N H Y K I Y N L C A E R H									
44 pep. humano	Y R N N I D D V V R F L D S K H K N H Y K I Y N L C A E R H									
46 pep. de ratón	Y R N N I D D V V R F L D S K H K N H Y K I Y N L C A E R H									
39 pep. de perro	Y R N N I D D V V R F L D S K H K N H Y K I Y N L C A E R H									
48 comp. pep.	Y R N N I D D V V R F L D S K H K N H Y K I Y N L C A E R H									
15 pep. TS10q23.3	Y R N N I D D V V R F L D S K H K N H Y K I Y N L C A E R H									
6 C6.1. humano	ATTATGA CACCGCCAA TTTAATGGA GAGTGCACA ATATCCCTTT GAAGACCATA ACCCACCACA GCTAGACTT ATCAAAACCT TTT	230	240	250	260	270	280	290	300	310
3 C6.1. ratón	ATTATGA CACCGCCAA TTTAATGGA GAGTGCACA ATATCCCTTT GAAGACCATA ACCCACCACA GCTAGACTT ATCAAAACCT TTT									
37 C6.1. perro	ATTATGA CACCGCCAA TTTAATGGA GAGTGCACA ATATCCCTTT GAAGACCATA ACCCACCACA GCTAGACTT ATCAAAACCT TTT									
38 nt.comp	Y D T A K F N C R V A Q Y P F E D H N P P Q L E L I K P F C									
44 pep. humano	Y D T A K F N C R V A Q Y P F E D H N P P Q L E L I K P F C									
46 pep. de ratón	Y D T A K F N C R V A Q Y P F E D H N P P Q L E L I K P F C									
39 pep. de perro	Y D T A K F N C R V A Q Y P F E D H N P P Q L E L I K P F C									
48 comp. pep.	Y D T A K F N C R V A Q Y P F E D H N P P Q L E L I K P F C									
15 pep. TS10q23.3	Y D T A K F N C R V A Q Y P F E D H N P P Q L E L I K P F C									
6 C6.1. humano	GTGAGA TCTTGACCA TGGCTAAGT AAGATGACAA TCATGTGGA GCATTCCTT GTAAAGCTG AAAGGACGA ACTGCTGTA TGA	320	330	340	350	360	370	380	390	400
3 C6.1. ratón	GTGAGA TCTTGACCA TGGCTAAGT AAGATGACAA TCATGTGGA GCATTCCTT GTAAAGCTG AAAGGACGA ACTGCTGTA TGA									
37 C6.1. perro	GTGAGA TCTTGACCA TGGCTAAGT AAGATGACAA TCATGTGGA GCATTCCTT GTAAAGCTG AAAGGACGA ACTGCTGTA TGA									
38 nt.comp	E D L D Q W L S E D D N H V A A I H C K A G K G R T G V M I									
44 pep. humano	E D L D Q W L S E D D N H V A A I H C K A G K G R T G V M I									
46 pep. de ratón	E D L D Q W L S E D D N H V A A I H C K A G K G R T G V M I									
39 pep. de perro	E D L D Q W L S E D D N H V A A I H C K A G K G R T G V M I									
48 comp. pep.	E D L D Q W L S E D D N H V A A I H C K A G K G R T G V M I									
15 pep. TS10q23.3	E D L D Q W L S E D D N H V A A I H C K A G K G R T G V M I									

FIG. 9 (cont.)

CAB. ref. fig 2. 1/28 1/29/97 10:41 AM		410	420	430	440	450	460	470	480	490
6 C6.1. humano	TATGTC ATATTATTA CATGGGGCA AATTTTTAA GGCACAAAG GGCCTAGTT TCTATGGGA AGTAGGACC AGAGACAAA AGG									
3 C6.1. ratón	TTTGTC ATATTATTA CATGGGGCA AATTTTTAA GGCACAAAG GGCCTAGTT TCTATGGGA AGTAGGACC AGAGACAAA AGG									
37 C6.1. perro	TTTGTC ATATTATTA CATGGGGCA AATTTTTAA GGCACAAAG GGCCTAGTT TCTATGGGA AGTAGGACC AGAGACAAA AGG									
38 nt.comp										
44 pep. humano	C A Y L L H R G K F L K A Q E A L D F Y G E V R T R D K K G									
46 pep. de ratón	C A Y L L H R G K F L K A Q E A L D F Y G E V R T R D K K G									
39 pep. de perro	C A Y L L H R G K F L K A Q E A L D F Y G E V R T R D K K G									
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3	C A Y L L H R G K F L K A Q E A L D F Y G E V R T R D K K G									
6 C6.1. humano	GAGTAC TATGCCAGT CAGAGCGCT ATGTATTA TTAATGCTAC CTGTTAAGA ATCATCTGA TTATAGACA GTGGCACTGT TGT									
3 C6.1. ratón	GAGTAC TATGCCAGT CAGAGCGCT ATGTATTA TTAATGCTAC CTGTTAAGA ATCATCTGA TTATAGACA GTGGCACTGT TGT									
37 C6.1. perro	GAGTAC TATGCCAGT CAGAGCGCT ATGTATTA TTAATGCTAC CTGTTAAGA ATCATCTGA TTATAGACA GTGGCACTGT TGT									
38 nt.comp										
44 pep. humano	V T I P S Q R R Y V Y Y Y S Y L L K N H L D Y R P V A L L F									
46 pep. de ratón	V T I P S Q R R Y V Y Y Y S Y L L K N H L D Y R P V A L L F									
39 pep. de perro	V T I P S Q R R Y V Y Y Y S Y L L K N H L D Y R P V A L L F									
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3	V T I P S Q R R Y V Y Y Y S Y L L K N H L D Y R P V A L L F									
6 C6.1. de humano	TTTACA GATGATGTT GAACATATTC CATGTCAG TGGCGGACT TGCATCTCT AGTTTGTGT CTGCCAGCTA AAGTGAAAG TAT									
3 C6.1. de ratón	TTTACA GATGATGTT GAACATATTC CATGTCAG TGGCGGACT TGCATCTCT AGTTTGTGT CTGCCAGCTA AAGTGAAAG TAT									
37 C6.1. de perro	TTTACA GATGATGTT GAACATATTC CATGTCAG TGGCGGACT TGCATCTCT AGTTTGTGT CTGCCAGCTA AAGTGAAAG TAT									
38 nt.comp										
44 pep. humano	H K M M F E T I P M F S G G T C N P Q F V V C Q L K V K I Y									
46 pep. de ratón	H K M M F E T I P M F S G G T C N P Q F V V C Q L K V K I Y									
39 pep. de perro	H K M M F E T I P M F S G G T C N P Q F V V C Q L K V K I Y									
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3	H K M M F E T I P M F S G G T C N P Q F V V C Q L K V K I Y									
6 C6.1. humano	ATTCCG CATTCAGGA CCCACAGAC GGCAGACAA GTTCATGTC TTGAGTTC CTACGCGT ACCGTGTGT GGTGATATCA AAG									
3 C6.1. ratón	ATTCCG CATTCAGGA CCCACAGAC GGCAGACAA GTTCATGTC TTGAGTTC CTACGCGT ACCGTGTGT GGTGATATCA AAG									
37 C6.1. perro	ATTCCG CATTCAGGA CCCACAGAC GGCAGACAA GTTCATGTC TTGAGTTC CTACGCGT ACCGTGTGT GGTGATATCA AAG									
38 nt.comp										
44 pep. humano	S S N S G P T R R E D K F M Y F E F P Q P L P V C G D I K V									
46 pep. de ratón	S S N S G P T R R E D K F M Y F E F P Q P L P V C G D I K V									
39 pep. de perro	S S N S G P T R R E D K F M Y F E F P Q P L P V C G D I K V									
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3	S S N S G P T R R E D K F M Y F E F P Q P L P V C G D I K V									

FIG. 9 (cont.)

CA6.ref fig 2 1/28 1/29/97 10:41 AM		770	780	790	800	810	820	830	840	850
6 C6.1. humano	TGAGATT CTTCACACAA CAGAACACAGA TGCTAAATAA GCACAAATG TTTCACATTT GGGTAATAG ATTCTTCATA CCAGACACAG AGG									
3 C6.1. ratón	TGAGATT CTTCACACAA CAGAACACAGA TGCTAAATAA GCACAAATG TTTCACATTT GGGTAATAG ATTCTTCATA CCAGACACAG AGG									
37 C6.1. perro	TGAGATT CTTCACACAA CAGAACACAGA TGCTAAATAA GCACAAATG TTTCACATTT GGGTAATAG ATTCTTCATA CCAGACACAG AGG									
38 nt.comp										
44 pep. humano	E F F H K Q N K M L K K D K M F H F W V N T F F I P G P E E									
46 pep. de ratón	E F F H K Q N K M L K K D K M F H F W V N T F F I P G P E E									
39 pep. de perro	E F F H K Q N K M L K K D K M F H F W V N T F F I P G P E E									
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3	E F F H K Q N K M L K K D K M F H F W V N T F F I P G P E E	860	870	880	890	900	910	920	930	940
6 C6.1. humano	AAACCTC AGAAAAAGTA GAAATATGAA GTCTATGTGA TCACAAATC GATAGCATTT GCAGTATAGA GCGTCAGAT AATGACACAG AAT									
3 C6.1. ratón	AAACCTC AGAAAAAGTA GAAATATGAA GTCTATGTGA TCACAAATC GATAGCATTT GCAGTATAGA GCGTCAGAT AATGACACAG AAT									
37 C6.1. perro	AAACCTC AGAAAAAGTA GAAATATGAA GTCTATGTGA TCACAAATC GATAGCATTT GCAGTATAGA GCGTCAGAT AATGACACAG AAT									
38 nt.comp										
44 pep. humano	T S E K V E N G S L C D Q E I D S I C S I E R A D N D K E Y									
46 pep. de ratón	T S E K V E N G S L C D Q E I D S I C S I E R A D N D K E Y									
39 pep. de perro	T S E K V E N G S L C D Q E I D S I C S I E R A D N D K E Y									
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3	T S E K V E N G S L C D Q E I D S I C S I E R A D N D K E Y	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030
6 C6.1. humano	ATCTAGT ACTTACTTTA ACAAAATG ATCTTGACA AGCAATATA GACAAGCCA ACCGATCTT TTCCTCAAT TTTAAGTGA AGC									
3 C6.1. ratón	ATCTAGT ACTTACTTTA ACAAAATG ATCTTGACA AGCAATATA GACAAGCCA ACCGATCTT TTCCTCAAT TTTAAGTGA AGC									
37 C6.1. perro	ATCTAGT ACTTACTTTA ACAAAATG ATCTTGACA AGCAATATA GACAAGCCA ACCGATCTT TTCCTCAAT TTTAAGTGA AGC									
38 nt.comp										
44 pep. humano	L V L T L T K N D L D K A N K D K A N R Y F S P N F K V K L									
46 pep. de ratón	L V L T L T K N D L D K A N K D K A N R Y F S P N F K V K L									
39 pep. de perro	L V L T L T K N D L D K A N K D K A N R Y F S P N F K V K L									
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3	L V L T L T K N D L D K A N K D K A N R Y F S P N F K V K L	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
6 C6.1. humano	TGTACTT CACAAAACGA GTAGAGAGC CCGCAATCC AGAGGCTAGC AGTTCACTT CTGTACACC AGATGTTAGT GACATGAC CTG									
3 C6.1. ratón	TGTACTT CACAAAACGA GTAGAGAGC CCGCAATCC AGAGGCTAGC AGTTCACTT CTGTACACC AGATGTTAGT GACATGAC CTG									
37 C6.1. perro	TGTACTT CACAAAACGA GTAGAGAGC CCGCAATCC AGAGGCTAGC AGTTCACTT CTGTACACC AGATGTTAGT GACATGAC CTG									
38 nt.comp										
44 pep. humano	Y F T K T V E E P S N P E A S S S T S V T P D V S D N E P D									
46 pep. de ratón	Y F T K T V E E P S N P E A S S S T S V T P D V S D N E P D									
39 pep. de perro	Y F T K T V E E P S N P E A S S S T S V T P D V S D N E P D									
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3	Y F T K T V E E P S N P E A S S S T S V T P D V S D N E P D									

FIG. 9 (cont.)

CAG Ref Fig 2.1/28 1/29/97 10:41 AM		1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210
6 C6.1. humano	ATCATTTA TAGATATTTCT GACACACACTG ACTGTGATCC AGAGATATGA CCTTTTGATG AAGATCAGCA TACACAATTT ACAAAAGTCT GAA									
3 C6.1. ratón	ATCATTTA TAGATATTTCT GACACACACTG ACTGTGATCC AGAGATATGA CCTTTTGATG AAGATCAGCA TACACAATTT ACAAAAGTCT GA									
37 C6.1. perro	ATCATTTA TAGATATTTCT GACACACACTG ACTGTGATCC AGAGATATGA CCTTTTGATG AAG									
38 nt.comp										
44 pep. humano	H Y R Y S D T T D S D P E N E P F D E D Q H T Q I T K V *									
46 pep. de ratón	H Y R Y S D T T D S D P E N E P F D E D Q H S Q I T K V *									
39 pep. de perro	H Y R Y S D T T D S D P E N E P F D E									
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3	H Y R Y S D T T D S D P E N E P F D E D Q H T Q I T K V *									
	1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300									
6 C6.1. humano	TTTTTTT TTATCAAGAG GGATTAACA CCATGAAT AAACCTGAAT AAACGTAAAT TGACCTTTT TTTTTTAAT GGCAATAGCA CAT									
3 C6.1. ratón	TTTTTTT TTATCAAGAG GGATTAACA CCATGAAT AAACCTGAAT AAACGTAAAT TGACCTTTT TTTTTTAAT GGCAATAGCA CAT									
37 C6.1. perro	TTTTTTT TTATCAAGAG GGATTAACA CCATGAAT AAACCTGAAT AAACGTAAAT TGACCTTTT TTTTTTAAT GGCAATAGCA CAT									
38 nt.comp										
44 pep. humano										
46 pep. de ratón										
39 pep. de perro										
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3										
	1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390									
6 C6.1. humano	TGTGTCA GATTACCACT TATAGAGACA ATTCTCTTTT CCTGACCAAT CTGTGTTTAC CCTATACATC CACAGGGTTT TGACACTTGT TGT									
3 C6.1. ratón	TGTGTCA GATTACCACT TATAGAGACA ATTCTCTTTT CCTGACCAAT CTGTGTTTAC CCTATACATC CACAGGGTTT TGACACTTGT TGT									
37 C6.1. perro	TGTGTCA GATTACCACT TATAGAGACA ATTCTCTTTT CCTGACCAAT CTGTGTTTAC CCTATACATC CACAGGGTTT TGACACTTGT TGT									
38 nt.comp										
44 pep. humano										
46 pep. de ratón										
39 pep. de perro										
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3										
	1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480									
6 C6.1. humano	CCAGTTG AAAAAGGTT GTGTAGCTGT GTCATGTATA TACCTTTTG TGTCAAAAG ACATTATAA TTCAATTAG ATTATAAAG ATG									
3 C6.1. ratón	CCAGTTG AAAAAGGTT GTGTAGCTGT GTCATGTATA TACCTTTTG TGTCAAAAG ACATTATAA TTCAATTAG ATTATAAAG ATG									
37 C6.1. perro	CCAGTTG AAAAAGGTT GTGTAGCTGT GTCATGTATA TACCTTTTG TGTCAAAAG ACATTATAA TTCAATTAG ATTATAAAG ATG									
38 nt.comp										
44 pep. humano										
46 pep. de ratón										
39 pep. de perro										
48 comp. pep.										
15 pep. TS10q23.3										

FIG. 9 (cont.)

CAG ref fig 2 1/28 1/29/97 10:41 AM		1480	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570
6 C6.1. humano	GCACCTT CCCGTTTAT TCCAGTTTA TAAAGCTG AGACAGACTG AAGTGATATAC GTAGAAATTT TTTCCTTTTG TGTTCTGTCA CCA									
3 C6.1. ratón	<==									
37 C6.1. perro	<==									
38 nt.comp	<==									
44 pep.humano	<==									
46 pep.ratón	<==									
39 pep.perro	<==									
48 comp.pep.	<==									
15 pep.TS10q23.3	<==									
6 C6.1. humano	ACTGAAG TGGCTAAGA GCTTGTGAT ATACTGGTTC ACATCTTACC CCTTGCACCT TGTGCAACA GATAAGTTTG CAGTTGGCTA AGA	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660
3 C6.1. ratón	<==									
37 C6.1. perro	<==									
38 nt.comp	<==									
44 pep.humano	<==									
46 pep.ratón	<==									
39 pep.perro	<==									
48 comp.pep.	<==									
15 pep.TS10q23.3	1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750									
6 C6.1. humano	GAGGTT CCGAAGGTT TTGCTACCAT TCTATGTCAT GTATCGGT TAGGCAATG GAGGGGAATG CTCAGAAAGG AAATAATTTT ATG									
3 C6.1. ratón	<==									
37 C6.1. perro	<==									
38 nt.comp	<==									
44 pep.humano	<==									
46 pep.ratón	<==									
39 pep.perro	<==									
48 comp.pep.	<==									
15 pep.TS10q23.3	1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840									
6 C6.1. humano	CTGGACT CTGACACATA TACCATCTCC AGCTATTTC ACACAGCTTT CTTAGCATG CTACAGTTAT TAATCTGGAC ATTGACAGAA TTG									
3 C6.1. ratón	<==									
37 C6.1. perro	<==									
38 nt.comp	<==									
44 pep.humano	<==									
46 pep.ratón	<==									
39 pep.perro	<==									
48 comp.pep.	<==									
15 pep.TS10q23.3	<==									

FIG. 9 (cont.)

CAG.ref fig 2 1/28 1/29/97 10:41 AM										
	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	
6 C6.1. humano 3 C6.1. ratón 37 C6.1. perro 38 nt.comp 44 pep. humano 46 pep. de ratón 39 pep. de perro 48 comp. pep. 15 pep. TS10q23.3	GCCGCTG TCACGCTTG TTGTTGGCC ATTTTTTTT AAAGCATATT GGTGCTAGAA AAGCAGCTA AAGGAAGTGA ATCTGTATTG GGG									
6 C6.1. humano 3 C6.1. ratón 37 C6.1. perro 38 nt.comp 44 pep. humano 46 pep. de ratón 39 pep. de perro 48 comp. pep. 15 pep. TS10q23.3	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	
	TACAGGA ATGAACCTTC TGCACATCT TAGATCCAC AATGAAGG ATATTAAAT AATGTCATAG GTAAGNACA CAGCAACAAT GAC									
6 C6.1. humano 3 C6.1. ratón 37 C6.1. perro 38 nt.comp 44 pep. humano 46 pep. de ratón 39 pep. de perro 48 comp. pep. 15 pep. TS10q23.3	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	
	TTNACCA TATAATGTG GAGGCTATCA ACAAGCATG GCCTGGAAC ATTATNAAA TTGACAATGA TTTATTAAAT ATGTTTCTC AAT									
6 C6.1. humano 3 C6.1. ratón 37 C6.1. perro 38 nt.comp 44 pep. humano 46 pep. de ratón 39 pep. de perro 48 comp. pep. 15 pep. TS10q23.3	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	
	TGTAANA AAAANA									

FIG. 9 (cont.)

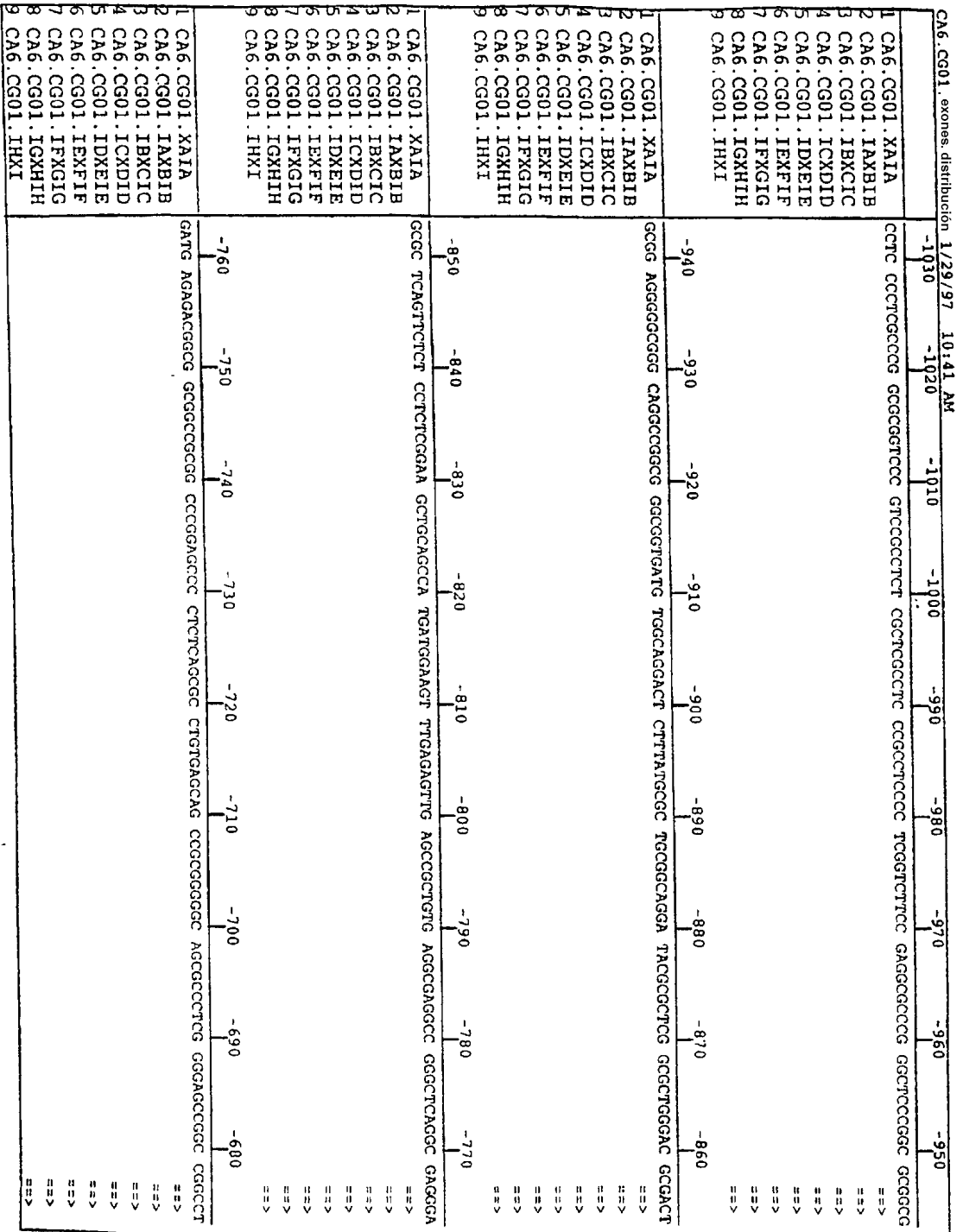


Fig. 10

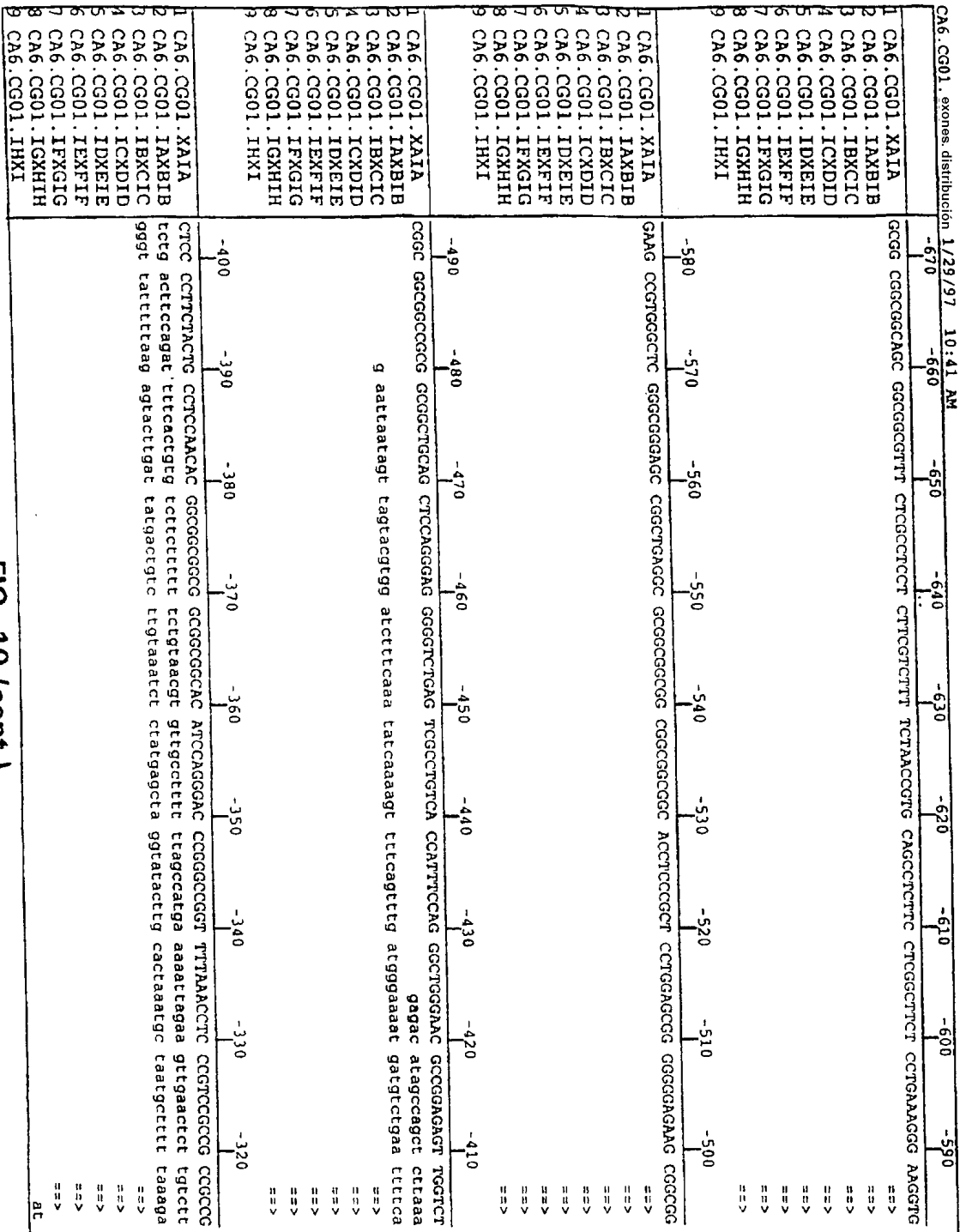


FIG. 10 (cont.)

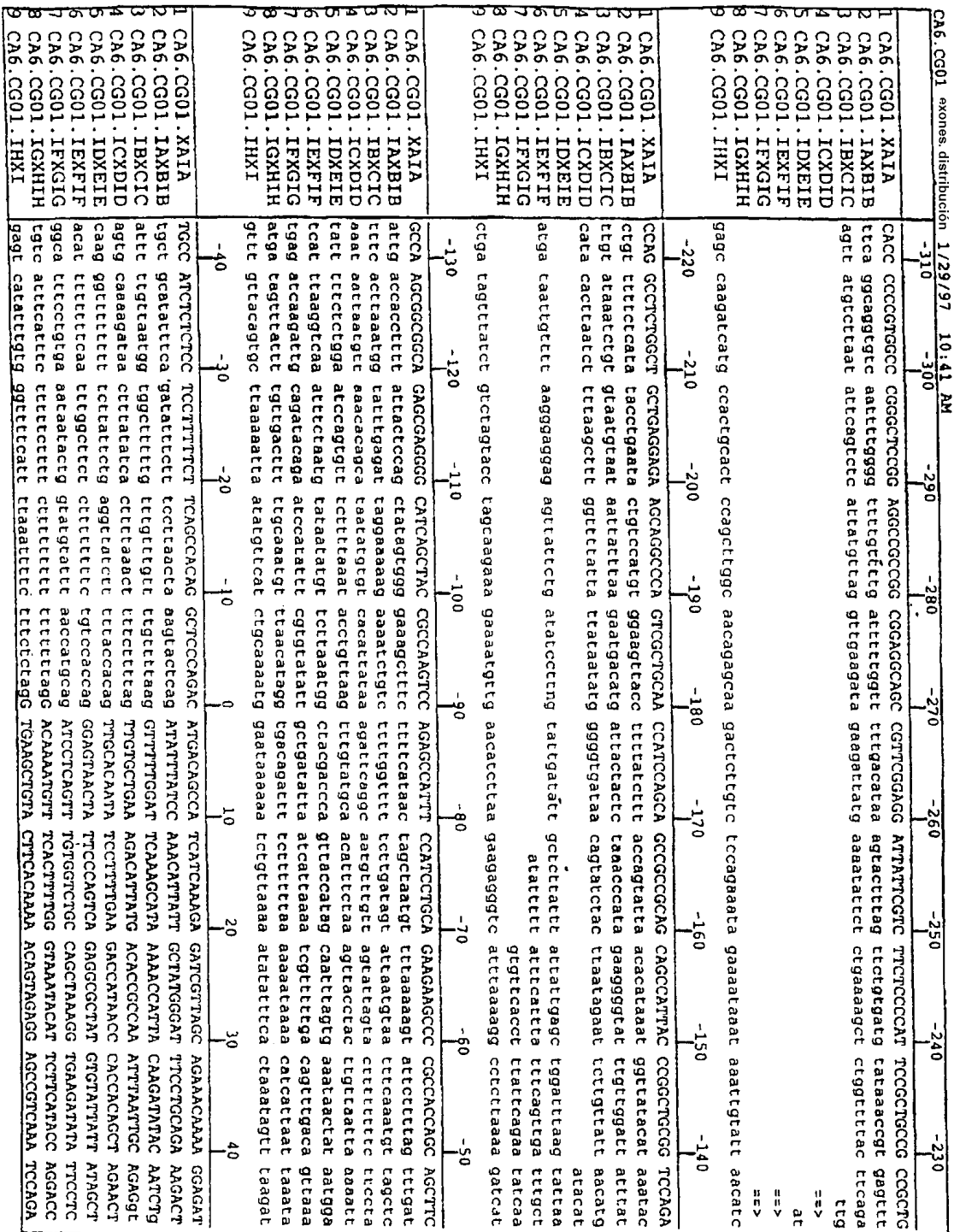


FIG. 10 (cont.)

CA6.CG01. exons. distribución 1/29/97 10:41 AM		50	60	70	80	90	100	110	120	130	
1	CA6.CG01.XAIA	ATCA	AGAGATGGA	TTGCACTTAG	ACTTGACCTG	TATCCATTTC	TGCGGCTGCT	CCCTTTTACC	TTTCTGTGAC	TCTCTTAGAA	CGTGGG
2	CA6.CG01.IAXBIB	TCGA	GGCGTATACA	GGACAAATAT	TCATGATGTA	GTAAGGTAAG	AAATGCTTGA	TTTCTATC	CAATATGGA	TCCTTATC	CAATG
3	CA6.CG01.IBXCIC	laag	taagtttctc	taattgtag	cttgcaata	tccttcaaaa	caactattaa	gtgaagttga	tttctcatat	tgcttataat	caatgtc
4	CA6.CG01.ICXDID	aggt	atgaatgtac	tgtaactatg	tgataactc	aaaccggata	gaactgtatc	tactgtcata	acaaatga	gtcaatcaga	ttatcg
5	CA6.CG01.IDXEIE	TATC	AAACCTTTT	GTGAAGATCT	TGACCAATG	CTAAGTAGAG	ATGACATACA	TGTTGACAGA	ATTCACTGTA	AACTGGAATA	GGGAGA
6	CA6.CG01.IEXFIF	ACCT	GTAAAGAT	CATCTGAT	ATAGACAT	GGCACTTGTG	TTTCAACAGA	TGATGTTTGA	AACTATTCCA	ATGTTCAAGT	AGAGTT
7	CA6.CG01.IFXGIG	CAAT	TCAGAGCCA	CACGACGCGA	AGACAGTTC	ATGTACTTTG	AGTTCCTTCA	TGACATTTGC	AGTATAGACC	GTGCAATATA	TGACAA
8	CA6.CG01.IGXHIH	AGAG	GAACCTTAG	AAAAAGTACA	AAATGAGT	CTATGTATC	AGATGATC	AAATGATC	TGACATTTGC	AGTATAGACC	GTGCAATATA
9	CA6.CG01.IHXI	GGCT	AGCAATTCAA	CTTCTGTCAA	ACCAGATGTT	AGTGACATG	AACTGTATCA	TTATAGATAT	TCTGACACCA	CTGACTCTGA	TCCAGA
1	CA6.CG01.XAIA	140	150	160	170	180	190	200	210	220	
2	CA6.CG01.IAXBIB	AGTA	GACGATGCG	AAATGTCCG	TAGTTTGGGT	GACTATACA	TTTAACTCTG	GTCAAGTTGC	TAGCTCANAT	ATTTGTGCTT	TCC
3	CA6.CG01.IBXCIC	grgt	tttcatlttag	aaaagatttc	taagccacag	aaaagataac	tttgatagtg	aaactatlat	tgatgtgtc	tataatcatc	ttttgg
4	CA6.CG01.ICXDID	aaag	atacatctta	acagaaatgt	attccctaac	cgatlaagtc	aagaagttcca	agagcatltg	taagttcatc	agaaagtga	gtgatg
5	CA6.CG01.IDXEIE	agtg	agatacatat	ttatcttcaag	aattatcttc	aaaaattcca	aaaatttttaa	tttcatgtgt	gtgttttagg	aaaaagtatc	gcataa
6	CA6.CG01.IEXFIF	AACT	GCTGTAAATGA	TATGTGCATA	TTTATTACAT	CGGGGCMAAT	TTTTAAAGGC	ACAAAGGGCC	CTAGATTTC	ATGGGAAAGT	AAGGAC
7	CA6.CG01.IFXGIG	CTTG	CAGtaagtcg	tcggaatttc	tcattctcc	atgtatgtga	acagtttttc	taaccatatac	tagaagtlla	cataaaaatc	tagaaa
8	CA6.CG01.IGXHIH	CTTC	CACAAACAGA	ACAAATGCT	AAAAAGT	tgtaacttgc	tttcatcttc	tttcatcttc	agaaatatac	aaaataagga	cagatttaaa
9	CA6.CG01.IHXI	GAAT	TATCTGTAC	TTACTTTAAC	AAAAATGAT	CTTGACAAAG	CAATATAGGA	CAAAAGCAAC	CGATACCTTT	CTCCMAATTT	TAAAGT
1	CA6.CG01.XAIA	230	240	250	260	270	280	290	300	310	
2	CA6.CG01.IAXBIB	<==									
3	CA6.CG01.IBXCIC	ctta	ccgtacctaa	tggaattcag	gggagatacag	ttcatltgat	aagaattgac	cttatatact	acataatcag	gtacttlatgt	gataac
4	CA6.CG01.ICXDID	aggt	aaacatttgc	tggaacagat	tcattgttact	tgatctgctc	taaatgtact	ggcatcttag	ccatatttga	gccataaac	gtgtgg
5	CA6.CG01.IDXEIE	agct	attatatttg	tcaggaagac	taaatgtcag	catagactaa	gcaatcagga	aaatttctag	actaataata	gtataagag	aggttc
6	CA6.CG01.IEXFIF	CAGA	GACAAAAG	taagttaatt	tttgatgttc	ttctcttctc	cttccctggat	cttggaattc	atttgaaaac	agattttggg	ttcttc
7	CA6.CG01.IFXGIG	agaa	atttaccaca	tttgaatttc	atgcagagga	ctatatcttc	gaagcatltg	aacaaattaa	ttagctttgt	tgltcaactc	alttgg
8	CA6.CG01.IGXHIH	cttc	attttatgac	atgttaagaa	ctataatctg	ttttctatga	gaatctcag	tgatttgc	actctggac	tgatgaagaa	ctttaa
9	CA6.CG01.IHXI	cagt	taaatlaaac	attttgtggg	ggttgtgtgc	ttgtatgtat	gtatgtgtg	tttaattcta	ggagtacag	tgatgaagaa	ctttaa
1	CA6.CG01.XAIA	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
2	CA6.CG01.IAXBIB	<==									
3	CA6.CG01.IBXCIC	taatt	cttggaattc	atgaattcag	gaagttctgt	taagcaacta	atagacatct	ccatgtgggt	atactcaga	gtgaatataa	ttttgt
4	CA6.CG01.ICXDID	tacc	tactatctga	ggcaatttgc	ctaatagtaa	gcaatcagag	ggaagaaagc	agaaactact	taactcttc	gtgtttgagga	atgaca
5	CA6.CG01.IDXEIE	cttc	tcnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnn
6	CA6.CG01.IEXFIF	ctaa	agaagcccaa	agcaattggg	tttaattgag	tcgaagccaa	attatattta	tgaaagaat	attctgtgtc	atnaaccacc	aaatcc
7	CA6.CG01.IFXGIG	gggt	aaatcaactc	gtttgaagga	aaaagctcta	tggaacttga	acatttgag	aaattttctc	aaacaagatg	gttaactgag	aagaaa
8	CA6.CG01.IGXHIH	tgac	aaatttttaa	cttaatgtat	atttcaagc	agctttttag	tagcagtaac	atgaagtttc	ctataaatac	accatattga	cacagc
9	CA6.CG01.IHXI	gacc	aatcttggtt	taacctatac	atccacag	tttttgcact	tggtgtccag	ttgaaaaaag	gtttgtttag	tgctgttcatg	ataaac

FIG. 10 (cont.)

CA6.CG01. exones distribución 1/29/97 10:41 AM		410	420	430	440	450	460	470	480	490
1 CA6.CG01.XAIA	<==									
2 CA6.CG01.IAXBIB	taag cttaaatcc tagatggat ttatcāgt aaattatcc acactaagat gtnatgact aatacgtat attttaagt agacca									
3 CA6.CG01.IBXCIC	ttat cctgtgctc tagagctat gactgaaaa gctgttagg catctctaa ctgtacatca cctaaatlat ttaaatgic tgaatt									
4 CA6.CG01.ICXDID	taaa aggtatgaaa gatatatc									
5 CA6.CG01.IDXEIE	NNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN									
6 CA6.CG01.IEXFIF	agcc caattctcga ctatgtlat ggaagaact gtccc									
7 CA6.CG01.IFXGIG	ttag catggacca atactttaa aatttttgg ctatagtag aatgaagat tcttcttgg tcttatgtag tgaacaaaac cac									
8 CA6.CG01.IGXHIH	gtca aaaaagctgc attttcctt ttcctaatic ttgttgttg gtgaaatcc ggggcaaaag tgcgggaagg ggtctaatga ctggga									
9 CA6.CG01.IHXI	cctt ttgtgtcaa aggacattta aattcaatt aggatataa aagatggcac ttcccggtt tatccagtt ttataaaaag tggaga									
	500 510 520 530 540 550 560 570 580									
1 CA6.CG01.XAIA	<==									
2 CA6.CG01.IAXBIB	aatt ttaaggtacc actgtgcata tctntaccaa ctaccgaag aantatttgg ttgtacnag amatataaa aggaatcgct ngtgt									
3 CA6.CG01.IBXCIC	aagt ggtctgctc gtctangaca ganttttaag gactgccac ctgatgtata gaactagttg accttatctt taacttttg ttctc									
4 CA6.CG01.ICXDID	<==									
5 CA6.CG01.IDXEIE	NNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN									
6 CA6.CG01.IEXFIF	<==									
7 CA6.CG01.IFXGIG	taig aatgagaat gggagagaaa agaaatagat gggaaactcag tcaatttggga atgattcata tggaaatgtt ctactgctt									
8 CA6.CG01.IGXHIH	caga ctgatgtgla taagtagaaa ttitttctt ttgttgttg tcaccaactg aagtggctaa agagctttgt gatataactg ttcaaa									
9 CA6.CG01.IHXI	590 600 610 620 630 640 650 660 670									
1 CA6.CG01.XAIA	<==									
2 CA6.CG01.IAXBIB	tcca aggtaatcc agtttataa ttitgataa ttctctaact gccaatatca ttatttana acaatttatt ctccag									
3 CA6.CG01.IBXCIC	tttg acttggant aaaangtga aaaggtaaaa ggaagga									
4 CA6.CG01.ICXDID	<==									
5 CA6.CG01.IDXEIE	NNNN Ntccctctc cccaacctca gtcnctggaa aacagtttt aagatagtt gctaactctt atttctctaa aattttaa									
6 CA6.CG01.IEXFIF	<==									
7 CA6.CG01.IFXGIG	<==									
8 CA6.CG01.IGXHIH	<==									
9 CA6.CG01.IHXI	tcct accccttgc acttgtgca acagataagt ttgcagtttg ctgaagagag ttccgaaag gtct									

FIG. 10 (cont.)

FIG. 11A

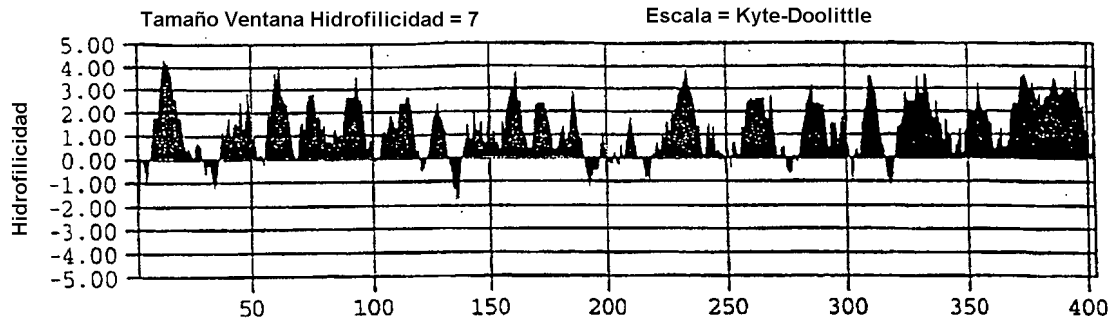


FIG. 11B

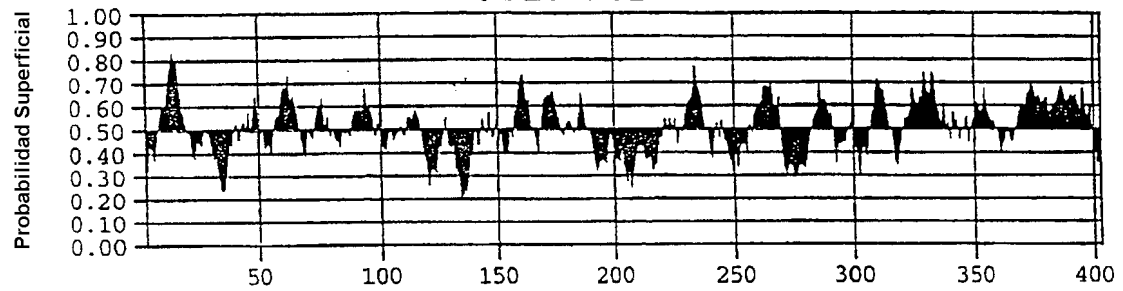


FIG. 11C

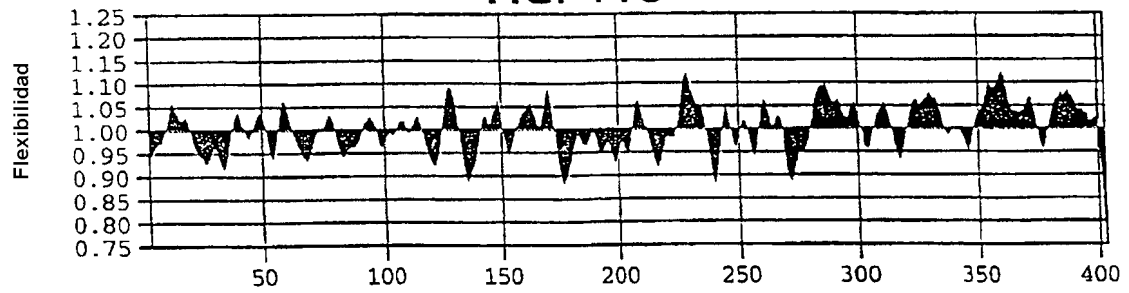


FIG. 11D

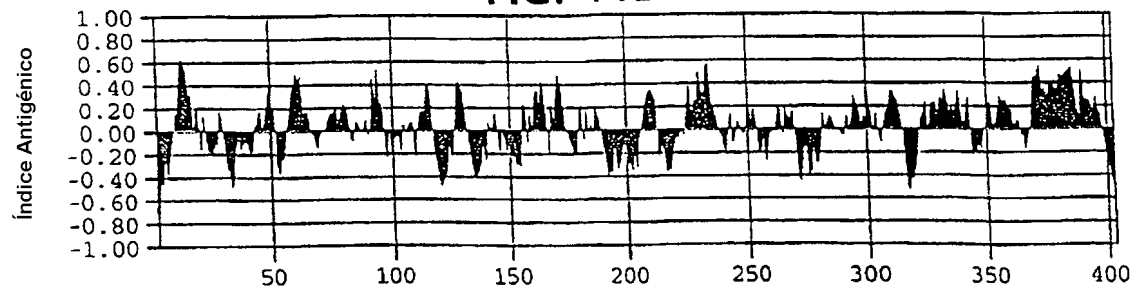


FIG. 11E

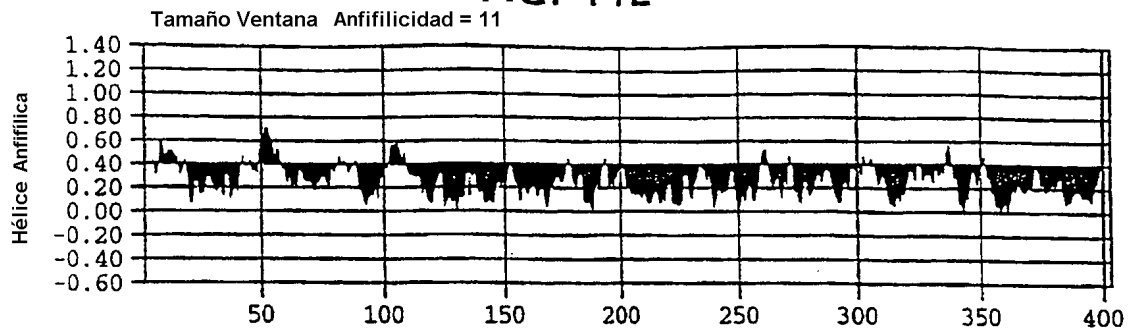


FIG. 11F

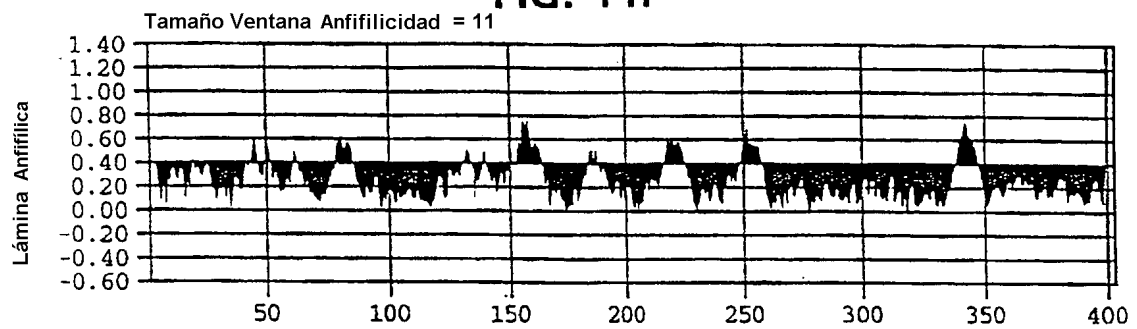


FIG. 11G

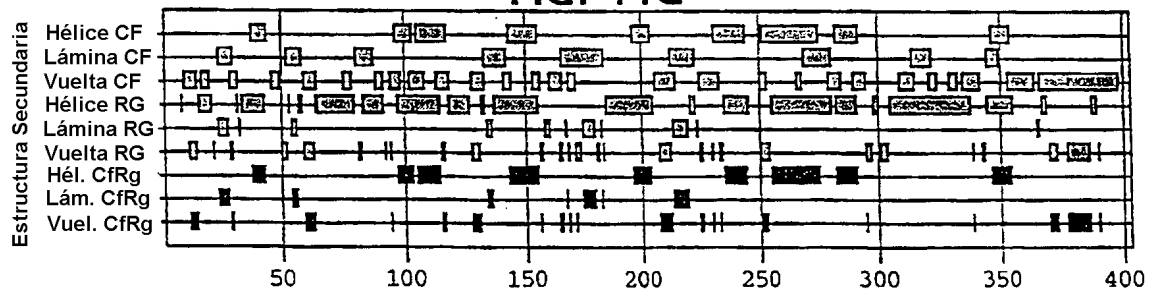


FIG. 12A

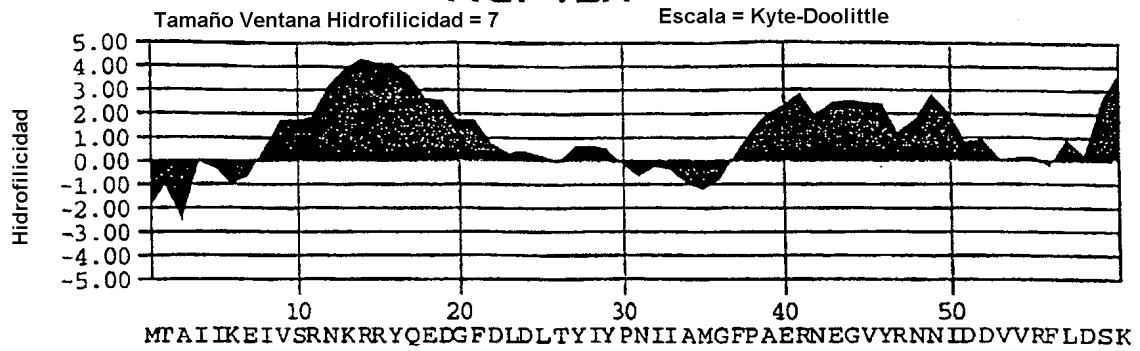


FIG. 12B

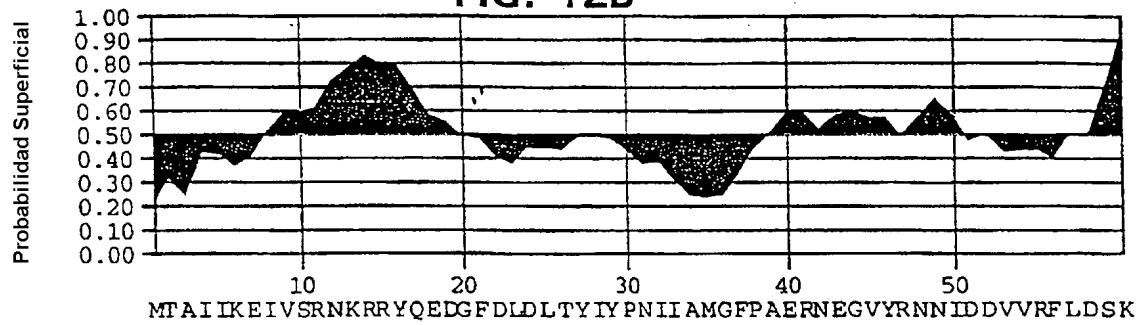


FIG. 12C

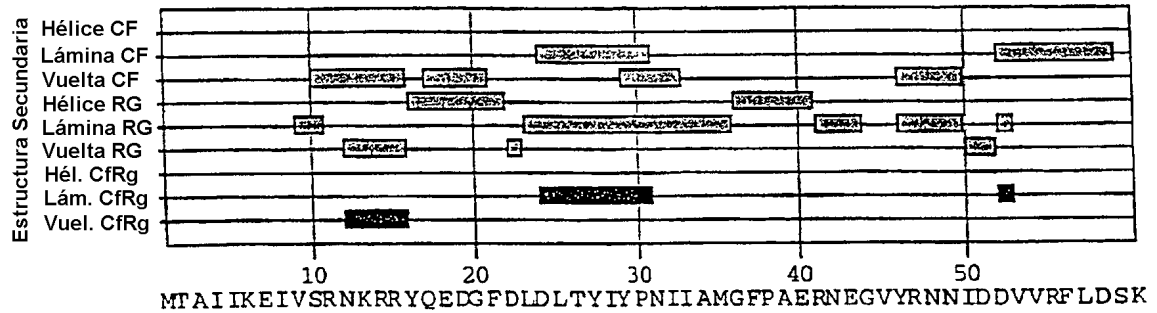


FIG. 12D

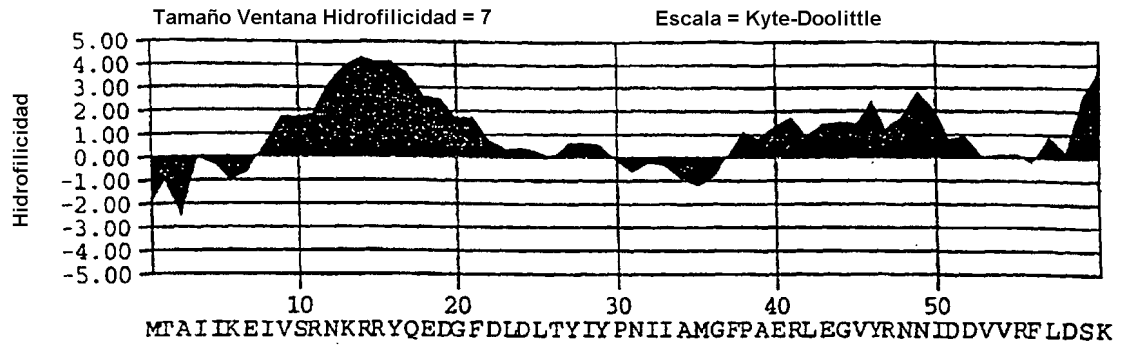


FIG. 12E

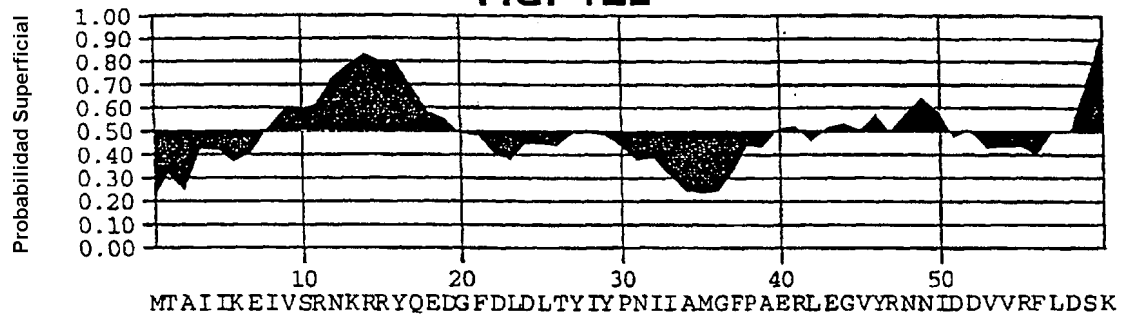


FIG. 12F

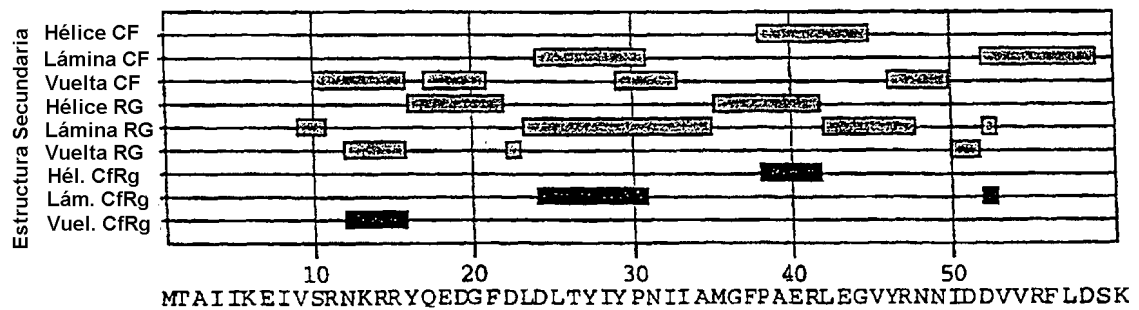


FIG. 12G

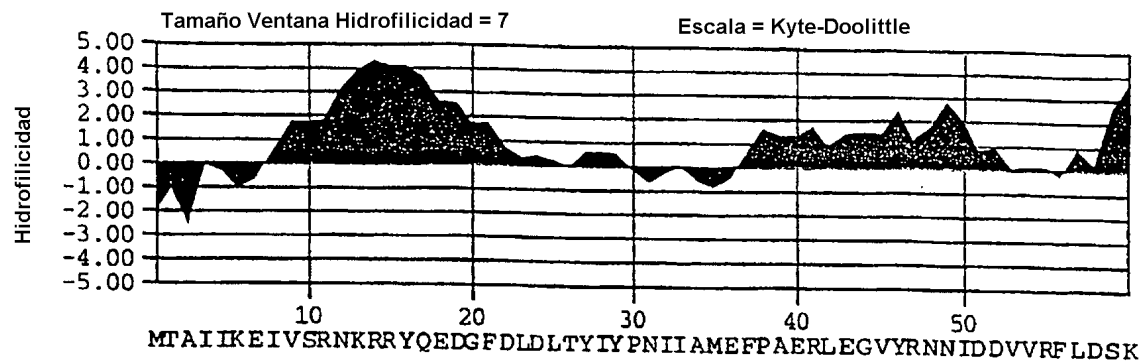


FIG. 12H

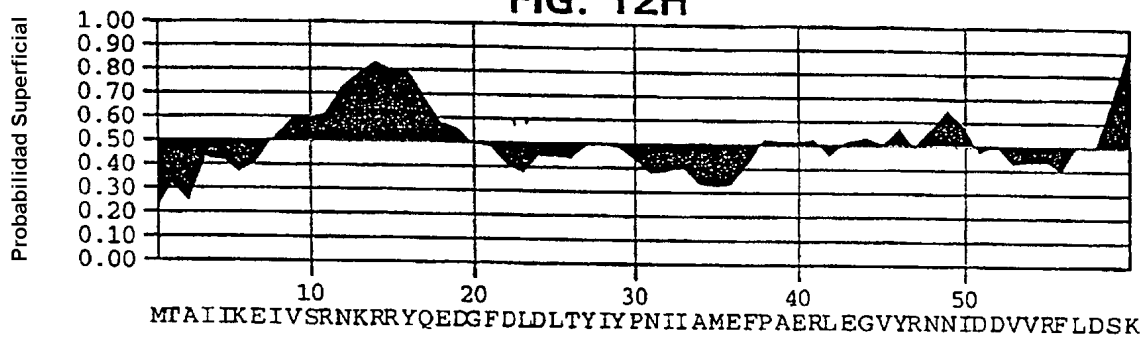


FIG. 12I

