



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 191**

51 Int. Cl.:
C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01959230 .2**

86 Fecha de presentación : **25.07.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1319064**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2003**

54 Título: **Polipéptidos de GSK3.**

30 Prioridad: **27.07.2000 US 221242 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

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

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Harrison, Stephen, D.;**
Hall, John, A.;
Calderon-Cacia, Maria;
Zhong, Ziyang;
Fang, Eric, Y.;
Coit, Doris, G.;
Nguyen, Steven, H. y
Medina-Selby, Angelica

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de GSK3.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La invención proporciona materiales para uso en procedimientos que se refieren a la identificación y optimización de inhibidores selectivos de la glicogeno-sintasaquinasa 3 (GSK3) y también se refiere a procedimientos para tratar una afección mediada por la actividad de la GSK3. Entre tales afecciones están incluidas la enfermedad de Alzheimer, la diabetes de tipo 2 y la inflamación.

Descripción de la técnica afín

15 La glicogenosintasaquinasa 3 (GSK3) es una quinasa de serina/treonina dirigida por prolina identificada originalmente como una actividad que fosforila la glicogenosintasa como ha sido descrito por Woodgett, en Trends Biochem Sci 16:177-181 (1991). El papel del metabolismo de glucosa ha sido elaborado recientemente por Summers y otros, J. Biol. Chem. 274:17934-17940(1999). La GSK3 está constituida por dos isomorfos, α y β , y es constitutivamente activa en detener células, inhibiendo la glicogenosintasa por fosforilación directa. Después de la activación de la insulina, se inactiva la GSK3, lo que permite la activación de la glicogenosintasa y posiblemente otros acontecimientos dependientes de la insulina. La GSK3 es inactivada por otros factores de crecimiento u hormonas que, como la insulina, señalan a través de la tirosinaquinasas del receptor. Los ejemplos de tales moléculas de señalización incluyen IGF-1 y EGF como lo describen Saito y otros, Biochem J. 303:27-31 (1994), Welsh y otros, Biochem. J. 294:625-629 (1993) y Cross y otros, Biochem. J. 303:21-26 (1994). La GSK3 ha demostrado que fosforila β -catenina, como lo describen Peifer y otros, Develop-Biol. 166:543-56 (1994). Entre otras actividades de GSK3 en un contexto biológico está incluida la capacidad de GSK3 de fosforilar la proteína tau *in vitro* como describen Mandelkow y Maudelkow, Trends in Biochem. Sci. 18:480-83 (1993), Mulot y otros, Febs Lett 349:359-64 (1994) y Lovestone y otros, Curr. Biol. 4:1077-86 (1995), y en cultivos de células como describen Latimer y otros en Febs Lett 365:42-6 (1995). La inhibición selectiva de GSK3 puede ser útil para tratar o inhibir trastornos mediados por la actividad de GSK3.

Hay necesidad en la técnica de composiciones y moléculas que se unan o que interaccionen con GSK3, con lo que mediarían la actividad de GSK3. La invención satisface esta necesidad por proporcionar polipéptidos de GSK3 útiles para diseñar y optimizar inhibidores de GSK3.

35 **Breve resumen de la invención**

La invención proporciona moléculas de GSK3 con truncamientos C-terminales y N-terminales, en las que las moléculas son capaces de cristalización.

40 En particular, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido constituido por la SEQ ID NO:3, en el que el mencionado polipéptido cristalizará y tendrá como mínimo una actividad biológica seleccionada entre el grupo constituido por (a) una unión que une un inhibidor de GSK3 y (b) una actividad de quinasa.

45 La invención proporciona también un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 en el que el mencionado polipéptido cristalizará y tendrá como mínimo una actividad biológica seleccionada entre el grupo constituido por (a) unión a un inhibidor de GSK3 y (b) actividad de quinasa.

50 La invención proporciona también un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de GSK3 de la invención son capaces de interaccionar con inhibidores de GSK3.

55 Los polipéptidos de GSK3 de la invención se pueden usar en un procedimiento para identificar un polipéptido de GSK3 enzimáticamente activo, que comprende: (a) proporcionar un polipéptido de GSK3 truncado; (b) poner en contacto el polipéptido con un sustrato de GSK3; y (c) medir la actividad de la quinasa del polipéptido después de poner en contacto el polipéptido con el sustrato, siendo activo el polipéptido si presenta más de 0,01 x la actividad de la enzima de longitud entera y, preferiblemente, más de 0,1 x la actividad de la enzima de longitud entera.

Breve descripción de los dibujos e identificadores de secuencia

Las Figuras que no se relacionan específicamente con la invención reivindicada se incluyen sólo para ilustración.

65 La Fig. 1 proporciona la secuencia de polipéptido de GSK3 β humana (SEQ ID NO:1)

La Fig. 2 proporciona la secuencia de polipéptido del 557 polipéptido de GSK3 β truncado (SEQ ID NO:2). Los diez primeros aminoácidos representan un rótulo-Glu seguido por un conector Gly antes de Met de la posición 1.

La Fig. 3 representa la secuencia de polipéptido del 580 polipéptido de GSK3 β truncado (SEQ ID NO: 3). Los diez primeros aminoácidos representan una Glu seguida por un conector Gly antes de Gly de la posición 34.

La Fig. 4 proporciona la secuencia de polipéptido de GSK3 α (SEQ ID NO:4).

La Fig. 5 proporciona la secuencia de polipéptido de GSK3 α truncada en la posición 447 (SEQ ID NO: 5).

La Fig. 6 proporciona la secuencia de polipéptido de GSK3 α truncada en la posición 97 (SEQ ID NO:6).

La Fig. 7 proporciona secuencia de polipéptido de GSK3 α desde la posición 97 a la posición 447 (SEQ ID NO:7).

Descripción detallada de la invención

Los aspectos de la descripción detallada que no se refieren específicamente a la invención reivindicada se incluyen sólo para información.

La invención proporciona materiales para uso para identificar y optimizar inhibidores de GSK3, en particular GSK3 β . Los materiales proporcionados incluyen moléculas de GSK3 β C-terminales y N-terminales truncadas que son capaces de cristalización y que pueden, pero no necesitan, retener la actividad de GSK3 quinasa, preferiblemente más de 0,0 x de la actividad de la enzima de longitud entera y, más preferiblemente, más de 0,1 x la actividad de la enzima de longitud entera. Hay necesidad en la técnica de tales inhibidores a la vista del papel de la GSK3 en una variedad de enfermedades y afecciones, incluidas la enfermedad de Alzheimer, la diabetes de tipo 2 y la inflamación. Se pueden identificar tales inhibidores y los inhibidores identificados se pueden optimizar usando los polipéptidos de GSK3 cristalizables de la invención.

Se describen en esta memoria una variedad de polipéptidos de GSK3 β que difieren del polipéptido nativo en el terminal C y/o N. La secuencia de aminoácidos de GSK3 β se presenta en la Fig. 1 (SEQ ID NO:1). Incluido en el ámbito de la descripción está cualquiera y la totalidad de los truncamientos de polipéptido de GSK3 β , siendo el polipéptido truncado capaz de cristalización, y puede, pero no necesita, retener la actividad de quinasa según la medición efectuada usando los ensayos de quinasa descritos en esta memoria. Las personas expertas en la técnica comprenderán que una mutación limitada de la proteína, o ciertas modificaciones postranslacionales, pueden ser suficientes para inactivar la quinasa reteniendo la estructura 3D esencial. Tales moléculas inactivas pero estructuralmente afines serían también útiles para el diseño y optimización de inhibidores. Los ensayos de quinasas se describen en las patentes U.S. n°. 6.057.117 y n°. 6.057.286. La actividad porcentual retenida, si la hay, no es crucial. Se describen en esta memoria procedimientos para ensayar la actividad en presencia o ausencia de un inhibidor.

Se describen en esta memoria numerosos polipéptidos de GSK3 β truncados que satisfacen estos criterios. Un polipéptido preferido se designa BV557, en el que el aminoácido C-terminal es R³⁸⁴. Esta molécula ha sido cristalizada con éxito. Entre los polipéptidos activos adicionales están incluidos los que tienen truncamientos en el aminoácido R³⁴⁴, R³⁵⁴, A³⁷⁴ e I³⁸⁴.

También se describen en esta memoria polipéptidos GSK3 α truncados, incluido el polipéptido de GSK3 α que comienza en S⁹⁷ y termina en S⁴⁴⁷.

Entre los polipéptidos de GSK3 truncados están incluidos los que comienzan con un aminoácido N-terminal que se diferencia del de la proteína nativa en que un aminoácido o más aminoácidos está suprimidos del término N. Entre los truncamientos N-terminales preferidos están incluidas moléculas de GSK3 β en las que la traducción de la molécula empieza en G³⁴, T³⁹, D⁴⁹ o V⁵⁴. Un ejemplo es BV580 (aminoácidos 34 a 384), que se ha cristalizado.

La discusión no se limita a estas moléculas truncadas descritas. Usando los procedimientos y ensayos descritos en esta memoria, un experto puede construir moléculas truncadas adicionales, tales como las que tienen suprimidos los aminoácidos 36-76 del término C y/o los aminoácidos 35-54 suprimidos del término N. Tales supresiones se pueden producir individualmente, o un polipéptido puede tener una supresión N-terminal y una supresión C-terminal. Es preferible, pero no necesario, que el dominio de la quinasa permanezca relativamente intacto como se refleja por la detección de actividad enzimática, por ejemplo usando los ensayos descritos en esta memoria. También es deseable, aunque no esencial, que la actividad enzimática sea capaz de ser inhibida por un inhibidor de GSK3 conocido, tal como litio. Una molécula truncada que satisface estos requerimientos será adecuada para ensayar inhibidores de GSK3 como potenciales agentes terapéuticos y para optimizar inhibidores de GSK3.

Un polipéptido de GSK3 puede estar constituido por entre aproximadamente 250 y 419 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO : 1; preferiblemente entre aproximadamente 278 y 419 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:1; más preferiblemente, entre aproximadamente 285 y 384 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:1 y, muy preferiblemente, entre aproximadamente 351 y 384 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:1. Entre los polipéptidos de GSK3 β truncados están incluidos los que comienzan en los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 39, 40, 41, 42, 43, 44 45, 46, 47, 48, 49, 50,

ES 2 295 191 T3

51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 58, 59, 60, 61 o 62 de SEQ ID NO: 1; y terminando en el aminoácido 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418 o 419 de SEQ ID NO:1. El polipéptido puede empezar con uno cualquiera de los aminoácidos iniciales y terminar con uno cualquiera de los aminoácidos terminales. Ejemplos representativos y no limitativos comienzan en el aminoácido 34, 39, 44 o 54 y terminan en el aminoácido 420. Otros ejemplos particularmente preferidos comienzan en aproximadamente el aminoácido 1 y terminan en el aminoácido 340, 344, 374, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, A.10, 411, 412 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419 o 420.

Un polipéptido de GSK3 α truncado puede estar constituido por entre aproximadamente 182 y 482 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 4; preferiblemente entre aproximadamente 182 y 386 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 4; más preferiblemente entre aproximadamente 182 y 351 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 4 y, muy preferiblemente, de aproximadamente S⁹⁷ a S⁴⁴⁷ de la SEQ ID NO: 4.

Los polipéptidos truncados de GSK3 se pueden preparar por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Un procedimiento implica la expresión de un polinucleótido adecuadamente preparado antes que codifica un polipéptido que tiene el truncamiento deseado. Por ejemplo, se preparó un polipéptido mencionado en esta memoria, BV557, creando una construcción que codifica GSK3 β comenzando en M¹ y terminando en I³⁸⁴ como se describe en los Ejemplos. En resumen, se transfectaron células de insecto con vector de baculovirus (designado pBlue-Bac4.5.Glu.GSKB.DC.1384#28) que codifica EU557 y se extrajo la proteína de las células lisadas. La proteína se purificó por cromatografía de afinidad usando un anticuerpo monoclonal anti rótulo-glu inmovilizado sobre una columna Sepharose. La actividad de la proteína purificada se ensayó usando un ensayo de quinasa *in vitro* descrito en la patente U.S. n°. 6.057.286.

Los Ejemplos que se presentan más adelante describen la producción de BV557, BV580 y otros polipéptidos de GSK3 truncados por expresión de vectores que codifican los polipéptidos, a lo que sigue el aislamiento y la purificación de los polipéptidos. Los polipéptidos se pueden producir también por escisión enzimática de una proteína de GSK3 nativa usando procedimientos conocidos en la técnica. Entre otros procedimientos adecuados está la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido truncado en una variedad de tipos de células, incluidas células de mamífero, de bacterias o levadura. Sin embargo, la célula preferida para expresión del polipéptido es una célula de insecto, preferiblemente una célula de insecto infectable por baculovirus, tal como una célula S19.

La invención se puede usar también para obtener formas no fosforiladas de GSK3 en las que el sitio de unión de ATP es idéntico al de la proteína de tipo salvaje. Entre tales formas está incluidas GSK3 β no fosforilada en Y216 y GSK3 α no fosforilada en Y279. Otras formas incluyen las construcciones con al menos un cambio de aminoácido que evita la fosforilación, tal como GSK3 β en la que Y216 se cambia a F216 y GSK3 α en la que Y279 se cambia a F279. Estas formas son adecuadas para ensayos de unión de inhibidor con el fin de identificar inhibidores de GSK3. La invención se puede usar para proporcionar una molécula de GSK3 β en la que la posición 216 no está fosforilada. Los solicitantes han demostrado que un péptido de GSK3 β con Y216 mutado a F216 cristalizaba y exhibe una estructura en la que el sitio de unión de ATP no es sustancialmente diferente del de un péptido no mutado.

Otros cambios singulares y múltiples de aminoácidos incluyen S⁹ a A⁹ en GSK3 β y S²¹ a A²¹ en GSK3 α .

Estos cambios en la fosforilación o la capacidad de ser fosforilados se incorporan opcionalmente a las formas truncadas de GSK3 α y GSK3 β descritas.

La invención proporciona por tanto moléculas de GSK3 adecuadas para diseño y optimización de inhibidores de GSK3 como agentes farmacéuticos.

Las construcciones de GSK3 de la invención son capaces de cristalizar. En forma purificada, las construcciones se unen a inhibidores de una manera que es comparable a la de un inhibidor que se une al polipéptido de GSK3 nativo, debido a la retención de la conformación de plegado correcta en el sitio de unión del inhibidor. El potencial de cristalizar se mide usando una variedad de ensayos, incluidos los de actividad específica, agregación, microheterogeneidad. (Véase, por ejemplo, Tabla 1). Estos parámetros son indicativos de la pureza de la preparación y la solubilidad de la construcción. La actividad específica es también un ensayo preferido para detectar la unión de un inhibidor al sitio de unión correcto de la construcción de GSK3. Otro procedimiento adecuado es mediante polarización de fluorescencia. En resumen, un inhibidor putativo, con un fluoróforo anexo, voltea libremente en solución. Así, cuando la luz polarizada excita el fluoróforo, la luz emitida que se produce después de una demora finita tiene ahora una polaridad al azar y la luz emitida ya no está polarizada. En presencia de una construcción de GSK3 con un sitio de unión del inhibidor intacto, la velocidad de volteo baja suficientemente para asegurar que, incluso si la emisión de luz se demora con respecto a la excitación, el fluoróforo sólo se ha movido muy ligeramente. Así, la luz excitada mantiene la polarización. Una medición de la polarización de fluorescencia indica, por tanto, si la construcción de GSK3 es adecuada o no para identificar y optimizar un inhibidor. El fluoróforo se puede unir a un compuesto tal como estaurosporina (ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA). Las construcciones de GSK3 pueden no retener la actividad de la quinasa, pero su unión al inhibidor se puede todavía estimar usando ensayos de polarización de fluorescencia.

El término “glicogenosintasaquinasa 3 truncada” o “GSK3 truncada”, tal como se usa en esta memoria, se refiere a GSK3 α o GSK3 β . GSK3 es una proteína originalmente identificada por su forforilación de glicogenosintasa como describen Woodgett y otros en Trends Biochem Sci. 16:177-181 (1991). Son sinónimos de GSK3 proteínquinasa I tau (TPK-1), FA quinasa y quinasa FA. Se han truncado formas mamíferas de GSK3 según describe Woodgett en EMBO J. 9(8):2431-2439 (1990). Pueden ser inhibidores de polipéptidos de GSK3 inhibidores de cualquiera de las formas conocidas de GSK3, incluidas tanto GSK3 α como GSK3 β o ambas. Los polipéptidos truncados descritos en esta memoria tiene una o más de las bioactividades de la proteína GSK3, incluidas actividades de quinasa tales como la de polimerizar proteína tau, o fosforilar glicogenosintasa, por ejemplo. Así, los polipéptidos de GSK3 truncados útiles para diseñar y optimizar inhibidores de GSK3 pueden tener una identidad de secuencia de como mínimo 40%, preferiblemente de 50%, preferiblemente de 60%, preferiblemente de 70%, más preferiblemente de 80% y, muy preferiblemente, de 90% con la secuencia de la proteína nativa, sea derivada de fuentes humanas o de fuentes no humanas. Los polinucleótidos que codifican un polipéptido de GSK3 pueden tener una identidad de secuencia de 60%, preferiblemente de 70%, más preferiblemente de 80%, más preferiblemente de 90% y, muy preferiblemente, de 95% con la secuencia de polinucleótidos nativos de GSK3. Por tanto, también son útiles alelos y variantes de la secuencia de polinucleótido nativo tal que el polinucleótido codifica una secuencia de aminoácidos con sustituciones, supresiones o inserciones en comparación con la secuencia nativa.

El término “sustrato de péptido” se refiere a un péptido o polipéptido o un derivado sintético de péptido que se puede fosforilar por actividad de GSK3 en presencia de una cantidad apropiada de ATP o un dador fosfato. Generalmente, la detección del sustrato fosforilado se realiza añadiendo un fosfato marcado que se puede detectar por algún medio común en la técnica de marcar, como puede ser con fosfato radiomarcado. El sustrato de péptido puede ser un péptido que reside en una molécula como parte de un polipéptido mayor, o puede ser un péptido aislado diseñado para fosforilación por GSK3.

Como se describe en las patentes U.S. n.º. 6.057.117 y n.º. 6.057.286, entre los procedimientos de ensayo *in vitro* de la actividad de GSK3 está incluida la construcción de sustratos de péptidos. El sustrato de péptido puede ser cualquier sustrato de péptido fosforilable por GSK3 y puede ser un sustrato de péptido que incluye la fórmula: ligando de anclaje-(X)_nSXXXS(X)_m (SEQ ID NO:8) (en la que X es cualquier aminoácido, n es cualquier número entero, m es cualquier número entero y, preferiblemente, n+m+5<20, esto es, n+m<15) prefosforilado en la serina C-terminal. El ensayo se realiza poniendo en contacto el sustrato prefosforilado con polipéptido de GSK3 truncado en presencia de fosfato γ -ATP marcado, un anclaje del sustrato y, opcionalmente, un inhibidor candidato. El procedimiento de identificación *in vitro* de un inhibidor de la actividad de GSK3 quinasa incluye poner en contacto un sustrato peptídico acoplado a un ligando de anclaje con polipéptido de GSK3 truncado en presencia de fosfato γ -ATP radiomarcado, un anclaje de sustrato y el inhibidor candidato, medir una incorporación del radiomarcador en el sustrato peptídico, luego, en un recipiente de ensayo separado, poner en contacto un sustrato peptídico acoplado a un ligando de anclaje con GSK3 truncada en presencia de fosfato γ -ATP radiomarcado, y un anclaje de sustrato, y medir la incorporación del radiomarcador en el mencionado sustrato peptídico; finalmente se identifica un inhibidor de la actividad de GSK3 truncada por reducción de la incorporación del marcador en el ensayo con el inhibidor candidato comparativamente con el ensayo sin el inhibidor candidato.

Para realizar el ensayo *in vitro* de quinasa usando micropocillos descrito, se puede introducir centelleo prerrevisando los pocillos con un material centellador, o añadiendo este último posteriormente después de una etapa de lavado, como se describe en el Ejemplo 4. El material centellador se puede obtener de Packard, Meridian, Conn. Los pocillos revestidos con el material centellador se revisten además con estreptavidina como un anclaje de sustrato, en el que la biotina es el ligando de anclaje en el péptido. Alternativamente, la estreptavidina puede estar presente sobre perlas de agarosa que contienen el material centellador o puede revestir una placa no tratada de otra forma a la que se añade el material centellador posteriormente. En cualquier caso, la estreptavidina de los pocillos se une a la biotina en contacto con ella. Después de un ensayo usando ATP radiomarcado, el radiomarcador incorporado al sustrato fosforilado que se ha conjugado con la biotina causará que el material centellador emita luz. Cuando la estreptavidina está unida a las perlas de agarosa que contienen el material centellador, la unión de un sustrato de péptido radiomarcado conjugado con biotina causará que centelleen las perlas. En ambos casos, el de los pocillos forrados con el material centellador y el de las perlas de agarosa que contienen el material centellador, una reducción del centelleo en comparación con una cantidad de control del material centellador medida en condiciones no inhibidoras indica la presencia de un inhibidor funcional de la actividad de GSK3. Si el péptido ha sido fosforilado por GSK3 con fosfato marcado con ³²P o ³³P, el decaimiento radiactivo causará que el material centellador presente en un micropocillo o mezclado en perlas de agarosa emita luz y la medida de la luz emitida será una medida de la actividad de GSK3 en el ensayo. Una actividad baja de GSK3 observada en presencia de un inhibidor candidato, comparada con la actividad de GSK3 en ausencia del inhibidor, puede indicar que el inhibidor es funcional y puede inhibir la actividad de la GSK3 quinasa. En cualquier caso, en cada pocillo se debe cargar un exceso de estreptavidina sobre el péptido o se debe fijar a las perlas de agarosa.

La actividad inhibidora de GSK3 se puede medir usando un ensayo exento de células como se describe en la publicación WO 99/65897 y como se describe en el Ejemplo 4 de esta memoria. La actividad se puede medir también usando un ensayo basado en células. En resumen, una línea de células, tal como una línea de células Cos, se transfecta con Tau y con un polipéptido de GSK3. La fosforilación de Tau en un sitio específico se controla usando un anticuerpo monoclonal, pues la fosforilación en ese sitio depende de la actividad de GSK3.

ES 2 295 191 T3

Entre los polipéptidos ejemplares considerados en esta memoria están incluidos los siguientes polipéptidos truncados que se refieren a la SEQ ID NO:1:

GSK3 β truncado en R³⁴⁴

GSK3 β truncado en R³⁵⁴

GSK3 β truncado en T³⁶⁴

GSK3 β truncado en A³⁷⁴

GSK3 β truncado en I³⁸⁴

GSK3 β que comienza en G³⁴

GSK3 β que comienza en T³⁹

GSK3 β que comienza en P⁴⁴

GSK3 β que comienza en D⁴⁹

GSK3 β que comienza en V⁵⁴

Los truncamientos anteriores se pueden combinar, resultando un polipéptido de GSK3 β que comienza en cualquiera de G³⁴, T³⁹, P⁴⁴, D⁴⁹ o V⁵⁴ y finaliza en cualquiera de R³⁴⁴, R³⁵⁴, T³⁶⁴, A³⁷⁴ o I³⁸⁴.

Otros polipéptidos ejemplares considerados en esta memoria incluyen los siguientes polipéptidos truncados que se refieren a la SEQ ID NO:4:

GSK3 α truncado en S⁴⁴⁷

GSK3 α que comienza en S⁹⁷

GSK3 α que comienza en S⁹⁷ y truncado en S⁴⁴⁷.

Se puede seleccionar un polipéptido truncado de GSK3, descrito en esta memoria, sobre la base de uno o más parámetros. Preferiblemente, un polipéptido cristalizará en una forma similar a la de la GSK3 nativa, con un plegado correcto en el sitio de unión del inhibidor y en torno a él. La cristalización se puede realizar usando un kit Crystal Screen (Hampton Research, Laguna Niguel, CA) o por procedimientos descritos por Jancarik, J. y otros, J. Appl. Cryst. 24:409-411, 1991. Se puede evaluar el potencial de un polipéptido para formar cristales sobre la base de actividad específica, pureza, homogeneidad, espectrometría de masas, agregación y dispersión dinámica de la luz. Un polipéptido truncado preferido satisfará los parámetros siguientes: pureza de como mínimo 90%; menos de 100% de agregación a 4°C a las dos semanas, y menos de 50% de heterogeneidad (50% o más de la forma deseada). Un polipéptido truncado muy preferido tendrá una pureza de como mínimo 98%, ninguna agregación a 4°C a las dos semanas, y menos de 50% de heterogeneidad (forma no fosforilada). Tales parámetros indican que la preparación de polipéptido probablemente cristalice, lo que la haría adecuada para descubrir y optimizar inhibidores de GSK3.

Un requisito previo para cristalización es obtener unas existencias de proteína suficientemente concentrada. No todas las construcciones de GSK3 permanecerán solubles a la concentración requerida. Una concentración preferida es > 1 mg/ml, más preferida > 5 mg/ml y muy preferida, > 10 mg/ml.

Los polipéptidos considerados en esta memoria como 557 (SEQ ID NO:2), 580 (SEQ ID NO: 3), 458 y 524 satisfacen los criterios descritos antes (véase el Ejemplo 3). El polipéptido 458 está constituido por los aminoácidos 1-420 de SEQ ID NO: 1 más la siguiente adición en el término N: EFMPTEAMAAPKRVI (SEQ ID NO:8). El polipéptido 524 está constituido por los aminoácidos 1-420 de la SEQ ID NO: 1 más la siguiente adición en el término N: EYMPMEGGG (SEQ ID NO: 9). Se pueden preparar y ensayar como se describe en esta memoria otros polipéptidos de GSK3 modificados o truncados.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos tienen sólo carácter ejemplar y no tienen la finalidad de limitar la invención.

Ejemplo 1

Preparación y purificación de la construcción 557 de GSK3 β

Los ejemplos que no se refieren específicamente a la invención reivindicada se incluyen sólo para información.

Lisis y extracción. Se combinó una suspensión de células de insecto de células Sf9 (aproximadamente 10 g) de un crecimiento en un matraz de 1 litro con 30 ml de tampón de lisado Tris 20 mM, pH 8,0/NaCl 80 mM/MgCl₂ 1 mM/arsenato 1 mM/wolframato 1 mM/PMSF 1 mM/0,5 mg de leupeptina/0,2 mg de aprotinina. Las células se lisaron usando un homogeneizador Dounce. La extracción mejorada de la proteína se realizó añadiendo 0,5% de glicerol y 0,2% de octilglucósido. Se dejó en agitación la mezcla sobre hielo durante 30 minutos. El lisado total se centrifugó a 39000 x g durante 25 minutos a 4°C. El material sobrenadante resultante contenía la GSK3β n°. 557 extraída.

Cromatografía de intercambio iónico. Se usaron los materiales y condiciones siguientes: La resina era Fractogel EMD SO₃-(M); el diámetro de la columna era de 1,6 cm y el volumen de la columna era de 10 ml. La columna funcionó a un caudal de 90 cm/h usando tampón de equilibrado de fosfato sódico 20 mM/5% de glicerol, pH 7,5. La cromatografía se efectuó a 4°C.

El material sobrenadante del lisado se diluyó 1:1 con tampón de igualación S-fractogel y se cargó en la columna equilibrada. La columna se lavó con un total de 14 volúmenes de columna de tampón de equilibrado. Se eluyó la GSK3β con un gradiente lineal salino, con 20 volúmenes de la columna a tampón de equilibrado más 11 VI de NaCl. Se recogieron fracciones de 3 ml durante la elución con gradiente. La combinación se hizo sobre la base de SDS-PAGE y los resultados de transferencia Western de las fracciones recogidas. Se combinaron las fracciones 1,3-24.

La cromatografía por afinidad se realizó usando los materiales y procedimientos siguientes: La resina era anticuerpo monoclonal anti rótulo-glu inmovilizado sobre proteína G Sepharose y el tampón de equilibrado era PBS/NaCl 0,3M/0,2% de octilglucósido/10% de glicerol. El diámetro de la columna era de 1,6 cm y el volumen de la columna era de 13 ml. El caudal era de 30 cm/h durante la carga y lavado y de 15 cm/h durante la elución.

La combinación de S-Fractogel se cargó a 30 cm/h en la columna equilibrada. La columna se lavó hasta la línea base de absorbancia con aproximadamente 6 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y se eluyó GSK3β con 50 ml de tampón de equilibrado que contenía 2 mg de péptido de elución (EYMPTD). El caudal durante la elución se bajó a 15 cm/h. Se recogieron fracciones de 2 ml durante la elución. Sobre la base de los resultados de SDS-PAGE, se combinaron las fracciones 6-17 con un volumen total de 24 ml.

Rendimiento final. La combinación de la columna de afinidad, a una concentración de 0,17 mg/ml, contenía 4,1 mg de GSK3β n°. 557. Esto lleva a un rendimiento final de 4,1 mg de 557 purificado litro de crecimiento. La pureza, después de esta purificación en 2 columnas, se estimó en más de 95% por inspección visual de los resultados de SDS-PAGE.

Ejemplo 2

Preparación y purificación de la construcción 580 de GSK3β

Extracción. Se lavó pasta de células SF29 de una fermentación de 10 l con 100 ml de PBS (NaPi 10 mM, pH 5, NaCl 150 mM) y luego se puso nuevamente en suspensión con 300 ml de tampón H (Tris 20 mM, pH 7,5, wolframato 1 mM, arseniato 1 mM, DTT 5 mM, 10 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de pepstatina A, 10% de glicerol, 0,35% de octilglucósido, Mg²⁺ 1 mM). Se homogeneizaron las células en un homogeneizador Dounce de 10 ml (20 golpes con la mano B). El homogeneizado combinado se centrifugó en un rotor Ti45 a 40.000 rpm durante 35 minutos para eliminar desechos y núcleos de células. El material sobrenadante de la centrifugación se decantó cuidadosamente y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm.

S-Fractogel. Se rellenó con 100 ml de S-Fractogel (EM Science, n°. de Cat. 18882) una columna de 3,2 cm x 12,5 cm y se equilibró ésta con más de 1 l de tampón A (Tris 20 mM, pH 7,5, 10% de glicerol). El filtrado de la etapa previa se cargó en la columna a un caudal de 15 ml/min. La columna se lavó con 1 l de tampón A y luego se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M en tapón A con 20 volúmenes de columna. El eluyente se fraccionó en porciones de 20 ml cada una. Se detectaron las fracciones que contenían GSK3 por transferencia Western usando anticuerpo anti-GSK (Santa Cruz Biotech, n°. de catálogo SC-7291). Se combinaron las fracciones positivas de la transferencia Western y se mezclaron con un volumen igual de tampón M (Tris 20 mM, pH 7,5, 10% de glicerol, NaCl 3,1 M) y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. El filtrado se conservó para cromatografía con Phenyl-650 M.

Phenyl-650 M. Se rellenó con Phenyl-650 M (Tosohass, n°. 014943 del catálogo) una columna de 2,2 x 10 cm y se equilibró con 500 ml de tampón C (Tris 20 mM, pH 7,5, 10% de glicerol, NaCl 1,6 M). El filtrado de la etapa de S-Fractogel se cargó en la columna a 7,5 ml/min. Terminada la carga, la columna se lavó con 6,5 v de c de tampón C y se eluyó con un gradiente lineal de 0% a 100% de tampón D (Tris 20 mM pH 7,5, 10% de glicerol) con 20 volúmenes de columna. Se recogieron fracciones de 15 ml cada una y se detectaron las fracciones que contenían GSK por transferencia Western usando anticuerpo anti-GSK. Se combinaron las fracciones positivas según transferencia Western y se cargaron en una columna de afinidad de anticuerpo rótulo-Glu.

Cromatografía de afinidad con anticuerpo de rótulo-Glu. El uso de un anticuerpo rótulo-Glu es descrito por Rubinfeld y otros, Cell 65:1033-1042, 1991, y se describe un hibridoma que expresa anticuerpo anti rótulo-Glu por Grussenmyer y otros, PNAS 82:7952-7954 (1985). 50 mg del anticuerpo rótulo-Glu se inmovilizaron en 25 ml de Affi-Gel 10 (BioRAD, n°. de catálogo 153-6046) y con él se rellenó una columna de 2,2 x 6,5 cm. La columna se equilibró con 200 ml de tampón E (Tris 20 mM, pH 7,5, 10% de glicerol, NaCl 0,3 M, 0,2% de octilglucósido) y

ES 2 295 191 T3

la combinación de fracciones de la etapa de Phenyl-650 M se cargó a un caudal de 1,0 ml/min. Terminada la carga, la columna se lavó con 100 ml de tampón E y luego se eluyó con 60 ml de péptido de rótulo-Glu (100 $\mu\text{g/ml}$) en tampón E y se fraccionó en fracciones de 5 ml cada una. Las fracciones que contenían GSK se detectaron con SDS-PAGE y tinción con azul Coomassie. Estas fracciones se combinaron y concentraron a aproximadamente 6 mg/ml en un concentrador Amicon usando una membrana 10 k MWCO YM10. El material concentrado quedó preparado para concentración.

Ejemplo 3

10 Actividad de polipéptidos truncados de GSK3 β

Se preparó una mezcla de reacción que contenía 5,9 μM de péptido CREB-unido a SGSG prefosforilado (Wang y otros, Anal. Biochem., 220:397-402 (1994)) en tampón de reacción (Tris 5 mM, pH 7,5, DTT 5 mM; MgCl_2 1 mM, 0,01% de BSA) que contenía la cantidad deseada de polipéptido de GSK3 truncado. Se añadió ATP (actividad específica 5,3 Ci/mmol) a una concentración final de 25 μM y la mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción se frenó pasando 30 μl sobre un disco filtro P81 (Whatman). El disco se lavó cuatro veces con 150 ml de H_3PO_4 75 mM durante 5 minutos cada vez. El filtro se secó al aire y se sometió a recuento bajo 5 ml de fluido de centelleo. La actividad específica se determinó dividiendo el número de recuentos (en cpm) por la masa de GSK3 en la mezcla de reacción (en μg).

La actividad específica para la construcción 557 era de $4,3 \times 10^7$ cpm/ μg ; para la construcción 458, $2,8 \times 10^7$ cpm/ μg y para la construcción 524, $2,2 \times 10^7$ cpm/ μg .

TABLA 1

Construcción	Pureza	Actividad específica media	N	Concentración mg/ml	Agregación a 4 grados	Agregación a temperatura ambiente	Heterogeneidad %
458	>98%	$2,8 \times 10^7$	35	11,5	11% @ >2 semanas	Durante la noche	10-20% no fosforilada
597	>98%	$4,3 \times 10^7$	7	12,7	ninguna a @ > 2 semanas	Durante la noche	5% no fosforilada
524	>98%	$2,2 \times 10^7$	24	10	ND		<5% no fosforilada

N = número de ensayos usados para determinar la "actividad específica media"

Ejemplo 4

55 Exploración de la actividad inhibidora de GSK3 usando un ensayo exento de células

Los compuestos a ensayar como inhibidores de GSK3 se disuelven en DMSO, luego se ensayan en cuanto a la inhibición de GSK3 β humano. La expresión de GSK3 β humana se describe, por ejemplo, por Hughes y otros, Eur. J. Biochem., 203:305-11 (1992), que se incorpora a esta memoria por referencia. Se dispensa en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos de polipropileno una parte alícuota de 300 μl de tampón de sustrato (Tris-HCl 30 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 2 mM, 3 $\mu\text{g/ml}$ de GSK3 β) y péptido CREB unido a SGSG prefosforilado, biotinilado, 0,5 μM (Chiron Technologies PYT Ltd., Clayton, Australia). Se añaden 3,5 μl /pocillo de DMSO que contiene concentraciones variables de cada compuesto a ensayar o estauesporina (un inhibidor de quinasa conocido usado como control positivo, o control negativo) (esto es, DMSO solo) y se mezcla íntimamente. Se inician luego las reacciones añadiendo 50 μl /pocillo de ATP no marcado 1 μM y $1-2 \times 10^7$ cpm de ATP marcado con $\gamma^{33}\text{P}$ y se deja que transcurra la reacción durante aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente.

ES 2 295 191 T3

A medida que transcurre la reacción, se bloquean placas de captura "Combiplate 8" de Labsystems revestidas con estreptavidina (Labsystems, Finlandia) incubándolas con 300 μ l/pocillo de PBS que contiene 1% de albúmina de suero bovino durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo se elimina luego por aspiración y las placas de captura se llenan con 100 μ l/pocillo de reactivo de freno (ATP 50 μ M/EDTA 20 mM).

Cuando ha finalizado la reacción de la enzima de tres horas, partes alícuotas triplicadas de 100 μ l de cada mezcla de reacción se pasan a tres pocillos que contienen la solución de freno, un pocillo en cada una de las tres placas de captura, y se mezclan bien los contenidos de los pocillos. Después de una hora a temperatura ambiente, se vacían por aspiración los pocillos de las placas de captura y se lavan 5 veces usando PBS y una lavadora de placas de ELISA Coming 430474 de 12 canales. Finalmente se añaden a cada pocillo de la placa 200 μ l del fluido de centelleo Microscint-20. Las placas se revisten con selladuras de placas, luego se dejan en una mesa de sacudidas durante 30 minutos. Cada placa de captura se cuenta con un contador de centelleo Packard TopCount (Meridian, Connecticut) y los resultados se registran en un gráfico en función de la concentración del compuesto.

Los compuestos identificados usando este procedimiento se pueden optimizar ensayando su capacidad de unirse a polipéptidos de GSK3 truncados de esta invención, usando el ensayo de polarización de fluorescencia, por ejemplo, para polipéptidos truncados que no presentan actividad de GSK3 quinasa. Alternativamente, un polipéptido de GSK3 truncado de la invención se puede usar en vez de la proteína nativa de GSK3.

Ejemplo 5

Exploración de la inhibición de la fosforilación de la proteína Tau

A. Transfección transitoria de células COS con plásmido de expresión que codifica GSK3 truncada y construcción de plásmido de expresión de Tau

Se mantienen células COS en matraces de cultivo de células de tejido T25 en medio MEM alto en glucosa/5% de suero fetal bovino. Se cosechan células de un matraz T25 confluyente y se siembran 80.000 células/pocillo en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos Corning en un volumen final de 2 ml/pocillo de medio. Se deja que las células crezcan a 37°C durante 48 horas. Las células se lavan luego dos veces en Opti-MEM que no contiene suero fetal bovino, y finalmente se dejan las células en 1 ml de Opti-MEM.

Se subclona polinucleótido que codifica proteína tau en plásmido pSG5 bajo un promotor precoz SV40 para generar un plásmido de expresión de tau. La clonación de cDNA que codifica proteína tau se describe en general por Goedert y otros en EMBO Journal, 8(2):393-399 (1989), que se incorpora a esta memoria por referencia. Se prepara un plásmido de expresión de GSK3 por subclonación de un polinucleótido que codifica GSK3 truncada en pCG, que es un derivado de ApEVRF descrito por Giese y otros en Genes & Development, 9:995-1008 (1995) y Matthias y otros, en Nucleic Acid Research, 17:6418 (1989), incorporándose ambas publicaciones a esta memoria por referencia. El polinucleótido puede codificar cualquiera de los polipéptidos de GSK3 truncados de la invención.

Las soluciones siguientes se preparan en tubos Eppendorf de 1,5 ml:

Solución A: para cada transfección, 2 μ g de DNA (plásmido de expresión de tau) y 0,7 μ g de DNA (plásmido de expresión de GSK3) se diluyen en 100 μ l de Opti-MEM (Gibco BRL). Solución B: para cada transfección, 8 μ l de reactivo lipofectamina se diluyen en 100 μ l de Opti-MEM. Se combinan las dos soluciones, se mezclan suavemente y se incuban a temperatura ambiente durante 45 minutos para que se puedan formar los complejos de DNA-liposoma. Para cada transfección se añaden al tubo que contiene los complejos 0,8 ml de Opti-MEM. La solución diluida se mezcla suavemente y se pone sobre las células enjuagadas. Se incuban las células con el DNA complejado/lipofectamina durante 6 horas a 37°C en una incubadora con CO₂. Seguidamente a la incubación, se añade a cada pocillo 1 ml de medio de cultivo (MEM alto en glucosa) con 20% de FBS y se incuba a 37°C durante la noche. El medio se reemplaza con medio completo fresco 18 horas después del comienzo de la transfección y se deja que las células crezcan a 37°C durante otras 48 horas.

B. Ensayo de inhibición de la fosforilación

Dos horas antes de cosechar, se añaden a cada pocillo 2 μ l de inhibidor de GSK3 disuelto en DMSO y se incuban a 37°C. Después de 2 horas se elimina el medio y las células se congelan rápidamente en las placas sobre hielo seco y se almacenan a -70°C. Las células se descongelan sobre hielo en presencia de 200 μ l de tampón de lisado (1% de Triton® X-100, Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 137 mM, 15% de glicerol, 25 μ g/ml de leupeptina, 1 μ g/ml de pepstatina-A, PMSF 1 μ M, 21 μ g/ml de aprotinina, NaF 50 mM, β -glicerofosfato 50 mM, pirofosfato sódico 15 mM, ortovanadato sódico 1 mM). El contenido de cada pocillo se centrifuga a 14.000 g a 4°C durante 5 minutos y el material sobrenadante se pasa a tubos limpios. En este momento se pueden almacenar a -20°C los lisados.

ES 2 295 191 T3

C. ELISA para detectar tau fosforilada en lisados de células

Se revisten 4 tiras de Immulon (Dynatech) con tau monoclonal antifosforilada (AT8, Polymedco Inc.) a 5 $\mu\text{g/ml}$ en PBS que contiene Ca^{++} y Mg^{++} , 100 μl /pocillo. Después de incubar a 4°C durante la noche, se lavan las tiras dos veces con tampón de lavado (PBS que contiene 0,05% de Tween[®] 20), y se bloquea con PBS que contiene 1% de BSA, 5% de suero normal de ratón y 0,05% de Tween[®] 20 a temperatura ambiente durante 1 hora. Las tiras se lavan 5 veces con tampón de lavado. Se añade a cada pocillo lisado (100 μl) diluido 1:10 en PBS que contiene 1% de BSA, 0,1% de NaN_3 y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar, a cada pocillo se añaden 100 μl de tau monoclonal anti-(no fosforilada) biotinilada a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (HT7, Polymedco, Inc.) en PBS-BSA. Las tiras se lavan 5 veces y se añade estreptavina conjugada a HRP, se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lava extensamente con tampón de lavado. El sustrato de TMB (Pierce) se usa para que se desarrolle el color y la reacción se frena añadiendo un volumen igual de ácido sulfúrico 0,8 M. Las tiras se leen en un lector de placas de ELISA usando un filtro de 450 nm: la concentración de compuesto que inhibe la fosforilación al 50% del nivel máximo (esto es, I_{50}) se determina ajustando una curva sigmoideal a los datos trazado.

Los expertos en la técnica identificarán, o serán capaces de determinar, sin usar nada más que una experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en esta memoria.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido constituido por la SEQ ID NO:3, en el que el mencionado polipéptido cristalizará y tendrá como mínimo una actividad biológica seleccionada entre el grupo constituido por (a) unión de un inhibidor de GSK3, y (b) actividad de quinasa.

2. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1.

3. Un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

FIGURA 1A

Secuencia de GSK-3 β

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

FIG 1B

Leu	Gly	Thr	Pro	Thr	Arg	Glu	Gln	Ile	Arg	Glu	Met	Asn	Pro	Asn	Tyr	
275						280						285				
Thr	Glu	Phe	Lys	Phe	Pro	Gln	Ile	Lys	Ala	His	Pro	Trp	Thr	Lys	Val	
290						295						300				
Phe	Arg	Pro	Arg	Thr	Pro	Pro	Glu	Ala	Ile	Ala	Leu	Cys	Ser	Arg	Leu	
305						310						315				
Leu	Glu	Tyr	Thr	Pro	Thr	Ala	Arg	Leu	Thr	Pro	Leu	Glu	Ala	Cys	Ala	
			325						330						335	
His	Ser	Phe	Phe	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Pro	Asn	Val	Lys	His	Pro	Asn	
			340						345						350	
Gly	Arg	Asp	Thr	Pro	Ala	Leu	Phe	Asn	Phe	Thr	Thr	Gln	Glu	Leu	Ser	
355						360						365				
Ser	Asn	Pro	Pro	Leu	Ala	Thr	Ile	Leu	Ile	Pro	Pro	His	Ala	Arg	Ile	
370						375						380				
Gln	Ala	Ala	Ala	Ser	Thr	Pro	Thr	Asn	Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Asp	Ala	
385						390						395			400	
Asn	Thr	Gly	Asp	Arg	Gly	Gln	Thr	Asn	Asn	Ala	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	
			405						410						415	
Ser	Asn	Ser	Thr													
420																

FIGURA 2A

Secuencia de la construcción 557 de GSK-3 β

Met Glu Tyr Met Pro Met Glu Gly Gly Gly

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

FIG 2B

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

FIGURA 3A

Secuencia de la construcción 580 de GSK-3 β

Met Glu Tyr Met Pro Met Glu Gly Gly Gly

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

FIG 3B

Thr	Glu	Phe	Lys	Phe	Pro	Gln	Ile	Lys	Ala	His	Pro	Trp	Thr	Lys	Val
290						295					300				
Phe	Arg	Pro	Arg	Thr	Pro	Pro	Glu	Ala	Ile	Ala	Leu	Cys	Ser	Arg	Leu
305					310					315					320
Leu	Glu	Tyr	Thr	Pro	Thr	Ala	Arg	Leu	Thr	Pro	Leu	Glu	Ala	Cys	Ala
				325					330					335	
His	Ser	Phe	Phe	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Pro	Asn	Val	Lys	His	Pro	Asn
			340					345					350		
Gly	Arg	Asp	Thr	Pro	Ala	Leu	Phe	Asn	Phe	Thr	Thr	Gln	Glu	Leu	Ser
		355					360					365			
Ser	Asn	Pro	Pro	Leu	Ala	Thr	Ile	Leu	Ile	Pro	Pro	His	Ala	Arg	Ile
370						375					380				

FIGURA 4

GSK3 α humana

```

MSGGGPSGGG PGGSGRARTS SFAEPGGGGG GGGGGPGGSA SGPGGTGGGK
1 50
ASVGAMGGGV GASSSGGGPG GSGGGGSGGP GAGTSFPPPG VKLGRDSGKV
51 100
TTVVATLGOG PERSQEVAYT DIKVINGSF GVVYQARLAE TRELVAIKKV
101 150
LQDKRFKNRE LOIMRKLDHC NIVRLRYFFY SSGEKKDELY LNLVLEYVPE
151 200
TVYRVARHFT KAKLTIPILY VKVYMYQLFR SLAYIHSQGV CHRDIKPONL
201 250
LVDPD TAVLK LCDFGSAKOL VRGEPNVSYI CSRYYRAPEL IFGATDYTSS
251 300
IDVHSAGCVL AELLGQPIF PGDSGVDOLV EIIKVLGTPT REQUIREMNP
301 350
YTEFKFPOIK AHPWTKVFKS RTPPEAIALC SSLEYTPSS RLSPLEACAH
351 400
SFFDELRCIG TOLPNNRPLP PLFNFSAGEL SIOPSLNAIL IPPHLRSPAG
401 450
TTTTLPSSQA LTETPTSSDW QSTDATPTLT NSS
451 483

```

FIGURA 5

GSK3 α humana

```

MSGGGPSGGG PGGSGRARTS SFAEPGGGGG GGGGGPGGSA SGPGGTGGGK
1 50
ASVGAMGGGV GASSSGGGPG GSGGGGSGGP GAGTSFPPPG VKLGRDSGKV
51 100
TTVVATLGQG PERSQEVAYT DIKVINGSF GVYQARLAE TRELVAIKKV
101 150
LQDKRFKNRE LQIMRKLDHC NIVRLRYFFY SSGEKKDELY LNLVLEYVPE
151 200
TVYRVARHFT KAKLTIPLY VKVYMYQLFR SLAYIHSQGV CHRDIKPQNL
201 250
LVDPDTAVLK LCDFGSAKQL VRGEPNVSYI CSRYYRAPEL IFGATDYTSS
251 300
IDVWSAGCVL AELLGQPIF PGDSGVDQLV EIHKVLGTPT REQIREMNPN
301 350
YTEFKFPQIK AHPWTKVFKS RTPPEAJALC SSLLEYTPSS RLSPLEACAH
351 400
SFFDELRLCG TQLPNNRPLP PLFNFSAGEL SIQPSLNAIL IFPHLRS
401

```

FIGURA 6

GSK3 α humana

	<u>SGKV</u>
TTVVATLGQG PERSQEVAYT DIKVIENGSE GVYQARLAE TRELVAIKKV	100
101	150
LQDKRFKNRE LQIMRKLDHC NIVRLRYFFY SSGEKKDELY LNLVLEYVPE	200
151	250
TVYRVARHFT KAKLTIPILY VKVYMYQLFR SLAYIHSQGV CHRDIKPNL	300
201	350
LVDPDTAVLK LCDFGSAQL VRGEPNVSFI CSRYRAPEL IFGATDYTSS	400
251	450
IDVWSAGCVL AELLGQPIF PGDSGVDQLV EIIKVLGTPT REQUIREMNP	483
301	
YTEFKFPQIK AHPWTKVFKS RTPPEAIALC SSLLEYTPSS RLSPLEACAH	
351	
SFFDELRLCG TQLPNNRPLP PLFNFSAGEL SIQPSLNAIL IPPHLRSPAG	
401	
TTTTLPSSQA LTETPTSSDW QSTDATPTLT NSS	
451	

FIGURA 7

GSK3 α humana

	<u>SGKV</u>
TTVVATLGQG PERSQEVAYT DIKVINGSF GVYQARLAE TRELVAIKKV	100
101	150
LQDKRFKNRE LQIMKLDHC NIVRLRYFFY SSGEKDELY LNLVLEYVPE	200
151	250
TVYRVARHFT KALTIPILY VKVYMYQLFR SLAYIHSQGV CHDIKPQNL	300
201	350
LVDPDTAVLK LCDFGSAQL VRGEPNVSII CSRIYRAPEL IFGATDYTSS	400
251	450
IDVWSAGCVL AELLGQPIF PGDSGVDQLV EIIKVLGTPT REQIREMNP	500
301	550
YTEFKFPQIK AHPWKVFKS RTPPEAIALC SSLEYTPSS RLSPLEACAH	600
351	650
SFFDELRCIG TQFPNNRPLP PLFNFSAGEL SIQPSLNAIL IPPHLRS	700
401	

ES 2 295 191 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Chiron Corporation
Harrison, Stephen D.
5 Hall, John A.
Calderon-Cacia, Maria
Zhong, Ziyang
Fang, Eric Y.
Coit, Doris G.
10 Nguyen, Steve H.
Medina-Selby, Angelica

<120> POLIPÉPTIDOS de GSK3

<130> PP-15876.003/200130.524PC

<140> PCT/US01/23539

<141> 2001-07-25

<160> 11

<170> FastSEQ para Windowas versión 4,0

<210> 1

<211> 420

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

ES 2 295 191 T3

5 Arg Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala
 210 215 220
 Pro Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val
 225 230 235 240
 Trp Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu Gly Gln Pro Ile
 245 250 255
 Phe Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val
 260 265 270
 10 Leu Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr
 275 280 285
 Thr Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val
 290 295 300
 15 Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Arg Leu
 305 310 315 320
 Leu Glu Tyr Thr Pro Thr Ala Arg Leu Thr Pro Leu Glu Ala Cys Ala
 325 330 335
 His Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Asp Pro Asn Val Lys His Pro Asn
 340 345 350
 20 Gly Arg Asp Thr Pro Ala Leu Phe Asn Phe Thr Thr Gln Glu Leu Ser
 355 360 365
 Ser Asn Pro Pro Leu Ala Thr Ile Leu Ile Pro Pro His Ala Arg Ile
 370 375 380
 25 Gln Ala Ala Ala Ser Thr Pro Thr Asn Ala Thr Ala Ala Ser Asp Ala
 385 390 395 400
 Asn Thr Gly Asp Arg Gly Gln Thr Asn Asn Ala Ala Ser Ala Ser Ala
 405 410 415
 30 Ser Asn Ser Thr
 420

<210> 2

<211> 394

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

45 Met Glu Tyr Met Pro Met Glu Gly Gly Gly Met Ser Gly Arg Pro Arg
 1 5 10 15
 Thr Thr Ser Phe Ala Glu Ser Cys Lys Pro Val Gln Gln Pro Ser Ala
 20 25 30
 Phe Gly Ser Met Lys Val Ser Arg Asp Lys Asp Gly Ser Lys Val Thr
 35 40 45
 50 Thr Val Val Ala Thr Pro Gly Gln Gly Pro Asp Arg Pro Gln Glu Val
 50 55 60
 Ser Tyr Thr Asp Thr Lys Val Ile Gly Asn Gly Ser Phe Gly Val Val
 65 70 75 80
 Tyr Gln Ala Lys Leu Cys Asp Ser Gly Glu Leu Val Ala Ile Lys Lys
 85 90 95
 55 Val Leu Gln Asp Lys Arg Phe Lys Asn Arg Glu Leu Gln Ile Met Arg
 100 105 110
 Lys Leu Asp His Cys Asn Ile Val Arg Leu Arg Tyr Phe Phe Tyr Ser
 115 120 125
 60 Ser Gly Glu Lys Lys Asp Glu Val Tyr Leu Asn Leu Val Leu Asp Tyr
 130 135 140
 Val Pro Glu Thr Val Tyr Arg Val Ala Arg His Tyr Ser Arg Ala Lys
 145 150 155 160
 Gln Thr Leu Pro Val Ile Tyr Val Lys Leu Tyr Met Tyr Gln Leu Phe
 165 170 175
 65

ES 2 295 191 T3

Arg Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Phe Gly Ile Cys His Arg Asp Ile
 180 185 190
 Lys Pro Gln Asn Leu Leu Leu Asp Pro Asp Thr Ala Val Leu Lys Leu
 195 200 205
 Cys Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val Arg Gly Glu Pro Asn Val
 210 215 220
 Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro Glu Leu Ile Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val Trp Ser Ala Gly Cys Val
 245 250 255
 Leu Ala Glu Leu Leu Gly Gln Pro Ile Phe Pro Gly Asp Ser Gly
 260 265 270
 Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu Gly Thr Pro Thr Arg
 275 280 285
 Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr Thr Glu Phe Lys Phe Pro
 290 295 300
 Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val Phe Arg Pro Arg Thr Pro
 305 310 315 320
 Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Arg Leu Leu Glu Tyr Thr Pro Thr
 325 330 335
 Ala Arg Leu Thr Pro Leu Glu Ala Cys Ala His Ser Phe Phe Asp Glu
 340 345 350
 Leu Arg Asp Pro Asn Val Lys His Pro Asn Gly Arg Asp Thr Pro Ala
 355 360 365
 Leu Phe Asn Phe Thr Thr Gln Glu Leu Ser Ser Asn Pro Pro Leu Ala
 370 375 380
 Thr Ile Leu Ile Pro Pro His Ala Arg Ile
 385 390

<210> 3

<211> 361

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Met Glu Tyr Met Pro Met Glu Gly Gly Gly Gly Ser Lys Val Thr Thr
 1 5 10 15
 Val Val Ala Thr Pro Gly Gln Gly Pro Asp Arg Pro Gln Glu Val Ser
 20 25 30
 Tyr Thr Asp Thr Lys Val Ile Gly Asn Gly Ser Phe Gly Val Val Tyr
 35 40 45
 Gln Ala Lys Leu Cys Asp Ser Gly Glu Leu Val Ala Ile Lys Lys Val
 50 55 60
 Leu Gln Asp Lys Arg Phe Lys Asn Arg Glu Leu Gln Ile Met Arg Lys
 65 70 75 80
 Leu Asp His Cys Asn Ile Val Arg Leu Arg Tyr Phe Phe Tyr Ser Ser
 85 90 95
 Gly Glu Lys Lys Asp Glu Val Tyr Leu Asn Leu Val Leu Asp Tyr Val
 100 105 110
 Pro Glu Thr Val Tyr Arg Val Ala Arg His Tyr Ser Arg Ala Lys Gln
 115 120 125
 Thr Leu Pro Val Ile Tyr Val Lys Leu Tyr Met Tyr Gln Leu Phe Arg
 130 135 140
 Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Phe Gly Ile Cys His Arg Asp Ile Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Asn Leu Leu Leu Asp Pro Asp Thr Ala Val Leu Lys Leu Cys
 165 170 175

ES 2 295 191 T3

Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val Arg Gly Glu Pro Asn Val Ser
 180 185 190
 Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro Glu Leu Ile Phe Gly Ala
 195 200 205
 Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val Trp Ser Ala Gly Cys Val Leu
 210 215 220
 Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile Phe Pro Gly Asp Ser Gly Val
 225 230 235 240
 Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu Gly Thr Pro Thr Arg Glu
 245 250 255
 Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr Thr Glu Phe Lys Phe Pro Gln
 260 265 270
 Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro
 275 280 285
 Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Arg Leu Leu Glu Tyr Thr Pro Thr Ala
 290 295 300
 Arg Leu Thr Pro Leu Glu Ala Cys Ala His Ser Phe Phe Asp Glu Leu
 305 310 315 320
 Arg Asp Pro Asn Val Lys His Pro Asn Gly Arg Asp Thr Pro Ala Leu
 325 330 335
 Phe Asn Phe Thr Thr Gln Glu Leu Ser Ser Asn Pro Pro Leu Ala Thr
 340 345 350
 Ile Leu Ile Pro Pro His Ala Arg Ile
 355 360

<210> 4

<211> 483

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

ES 2 295 191 T3

Phe Thr Lys Ala Lys Leu Thr Ile Pro Ile Leu Tyr Val Lys Val Tyr
 210 215 220
 Met Tyr Gln Leu Phe Arg Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Gln Gly Val
 225 230 235 240
 Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu Leu Val Asp Pro Asp Thr
 245 250 255
 Ala Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val Arg
 260 265 270
 Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro
 275 280 285
 Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val Trp
 290 295 300
 Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile Phe
 305 310 315 320
 Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu
 325 330 335
 Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr Thr
 340 345 350
 Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val Phe
 355 360 365
 Lys Ser Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Ser Leu Leu
 370 375 380
 Glu Tyr Thr Pro Ser Ser Arg Leu Ser Pro Leu Glu Ala Cys Ala His
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Cys Leu Gly Thr Gln Leu Pro Asn Asn
 405 410 415
 Arg Pro Leu Pro Pro Leu Phe Asn Phe Ser Ala Gly Glu Leu Ser Ile
 420 425 430
 Gln Pro Ser Leu Asn Ala Ile Leu Ile Pro Pro His Leu Arg Ser Pro
 435 440 445
 Ala Gly Thr Thr Thr Leu Thr Pro Ser Ser Gln Ala Leu Thr Glu Thr
 450 455 460
 Pro Thr Ser Ser Asp Trp Gln Ser Thr Asp Ala Thr Pro Thr Leu Thr
 465 470 475 480
 Asn Ser Ser

40 <210> 5
 <211> 447
 <212> PRT
 45 <213> *Homo sapiens*

<400> 5
 50 Met Ser Gly Gly Gly Pro Ser Gly Gly Gly Pro Gly Gly Ser Gly Arg
 1 5 10 15
 Ala Arg Thr Ser Ser Phe Ala Glu Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 55 Gly Gly Gly Pro Gly Gly Ser Ala Ser Gly Pro Gly Gly Thr Gly Gly
 35 40 45
 Gly Lys Ala Ser Val Gly Ala Met Gly Gly Gly Val Gly Ala Ser Ser
 50 55 60
 Ser Gly Gly Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Pro
 65 70 75 80
 Gly Ala Gly Thr Ser Phe Pro Pro Pro Gly Val Lys Leu Gly Arg Asp
 85 90 95
 Ser Gly Lys Val Thr Thr Val Val Ala Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu
 100 105 110

ES 2 295 191 T3

Arg Ser Gln Glu Val Ala Tyr Thr Asp Ile Lys Val Ile Gly Asn Gly
 115 120 125
 Ser Phe Gly Val Val Tyr Gln Ala Arg Leu Ala Glu Thr Arg Glu Leu
 130 135 140
 Val Ala Ile Lys Lys Val Leu Gln Asp Lys Arg Phe Lys Asn Arg Glu
 145 150 155 160
 Leu Gln Ile Met Arg Lys Leu Asp His Cys Asn Ile Val Arg Leu Arg
 165 170 175
 Tyr Phe Phe Tyr Ser Ser Gly Glu Lys Lys Asp Glu Leu Tyr Leu Asn
 180 185 190
 Leu Val Leu Glu Tyr Val Pro Glu Thr Val Tyr Arg Val Ala Arg His
 195 200 205
 Phe Thr Lys Ala Lys Leu Thr Ile Pro Ile Leu Tyr Val Lys Val Tyr
 210 215 220
 Met Tyr Gln Leu Phe Arg Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Gln Gly Val
 225 230 235 240
 Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu Val Asp Pro Asp Thr
 245 250 255
 Ala Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val Arg
 260 265 270
 Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro
 275 280 285
 Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val Trp
 290 295 300
 Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile Phe
 305 310 315 320
 Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu
 325 330 335
 Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr Thr
 340 345 350
 Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val Phe
 355 360 365
 Lys Ser Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Ser Leu Leu
 370 375 380
 Glu Tyr Thr Pro Ser Ser Arg Leu Ser Pro Leu Glu Ala Cys Ala His
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Cys Leu Gly Thr Gln Leu Pro Asn Asn
 405 410 415
 Arg Pro Leu Pro Pro Leu Phe Asn Phe Ser Ala Gly Glu Leu Ser Ile
 420 425 430
 Gln Pro Ser Leu Asn Ala Ile Leu Ile Pro Pro His Leu Arg Ser
 435 440 445

<210> 6

<211> 387

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

ES 2 295 191 T3

5 Leu Gln Ile Met Arg Lys Leu Asp His Cys Asn Ile Val Arg Leu Arg
 65 70 75 80
 Tyr Phe Phe Tyr Ser Ser Gly Glu Lys Lys Asp Glu Leu Tyr Leu Asn
 85 90 95
 10 Leu Val Leu Glu Tyr Val Pro Glu Thr Val Tyr Arg Val Ala Arg His
 100 105 110
 Phe Thr Lys Ala Lys Leu Thr Ile Pro Ile Leu Tyr Val Lys Val Tyr
 115 120 125
 15 Met Tyr Gln Leu Phe Arg Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Gln Gly Val
 130 135 140
 Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu Leu Val Asp Pro Asp Thr
 145 150 155 160
 20 Ala Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val Arg
 165 170 175
 Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro
 180 185 190
 Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val Trp
 195 200 205
 25 Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile Phe
 210 215 220
 Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu
 225 230 235 240
 30 Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr Thr
 245 250 255
 Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val Phe
 260 265 270
 Lys Ser Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Ser Leu Leu
 275 280 285
 35 Glu Tyr Thr Pro Ser Ser Arg Leu Ser Pro Leu Glu Ala Cys Ala His
 290 295 300
 Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Cys Leu Gly Thr Gln Leu Pro Asn Asn
 305 310 315 320
 40 Arg Pro Leu Pro Pro Leu Phe Asn Phe Ser Ala Gly Glu Leu Ser Ile
 325 330 335
 Gln Pro Ser Leu Asn Ala Ile Leu Ile Pro Pro His Leu Arg Ser Pro
 340 345 350
 45 Ala Gly Thr Thr Thr Leu Thr Pro Ser Ser Gln Ala Leu Thr Glu Thr
 355 360 365
 Pro Thr Ser Ser Asp Trp Gln Ser Thr Asp Ala Thr Pro Thr Leu Thr
 370 375 380
 Asn Ser Ser
 385

45
 <210> 7
 <211> 351
 50 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7
 55
 Ser Gly Lys Val Thr Thr Val Val Ala Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu
 1 5 10 15
 Arg Ser Gln Glu Val Ala Tyr Thr Asp Ile Lys Val Ile Gly Asn Gly
 20 25 30
 60 Ser Phe Gly Val Val Tyr Gln Ala Arg Leu Ala Glu Thr Arg Glu Leu
 35 40 45
 Val Ala Ile Lys Lys Val Leu Gln Asp Lys Arg Phe Lys Asn Arg Glu
 50 55 60

ES 2 295 191 T3

5 Leu Gln Ile Met Arg Lys Leu Asp His Cys Asn Ile Val Arg Leu Arg
 65 70 75 80
 Tyr Phe Phe Tyr Ser Ser Gly Glu Lys Lys Asp Glu Leu Tyr Leu Asn
 85 90 95
 10 Leu Val Leu Glu Tyr Val Pro Glu Thr Val Tyr Arg Val Ala Arg His
 100 105 110
 Phe Thr Lys Ala Lys Leu Thr Ile Pro Ile Leu Tyr Val Lys Val Tyr
 115 120 125
 Met Tyr Gln Leu Phe Arg Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Gln Gly Val
 130 135 140
 15 Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu Leu Val Asp Pro Asp Thr
 145 150 155 160
 Ala Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val Arg
 165 170 175
 20 Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro
 180 185 190
 Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val Trp
 195 200 205
 Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile Phe
 210 215 220
 25 Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu
 225 230 235 240
 Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr Thr
 245 250 255
 Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val Phe
 260 265 270
 Lys Ser Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Ser Leu Leu
 275 280 285
 Glu Tyr Thr Pro Ser Ser Arg Leu Ser Pro Leu Glu Ala Cys Ala His
 290 295 300
 30 Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Cys Leu Gly Thr Gln Leu Pro Asn Asn
 305 310 315 320
 Arg Pro Leu Pro Pro Leu Phe Asn Phe Ser Ala Gly Glu Leu Ser Ile
 325 330 335
 35 Gln Pro Ser Leu Asn Ala Ile Leu Ile Pro Pro His Leu Arg Ser
 340 345 350

<210> 8

<211> 15

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Secuencia de adición del término N

<400> 8

50 Glu Phe Met Pro Thr Glu Ala Met Ala Ala Pro Lys Arg Val Ile
 1 5 10 15

<210> 9

55 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Secuencia de adición del término N

<400> 9

65 Glu Tyr Met Pro Met Glu Gly Gly Gly
 1 5

ES 2 295 191 T3

<210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido de elución
 10
 <400> 10

 Glu Tyr Met Pro Thr Asp
 1 5
 15

 <210> 11
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Sustrato de péptido fosforilable por GSK3

 <221> VARIANT
 <222> 2, 3, 4
 30 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

 <400> 11

 Ser Xaa Xaa Xaa Ser
 1 5
 35

 40

 45

 50

 55

 60

 65