



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 320 622**

⑯ Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01) **C12N 9/06** (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) **C12Q 1/26** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **A61K 38/44** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **00910005 .8**

⑯ Fecha de presentación : **27.01.2000**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1149169**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2001**

⑯ Título: **Métodos de uso de una proteína novedosa relacionada con la lisil oxidasa.**

⑯ Prioridad: **27.01.1999 US 117580 P**
25.03.1999 US 276400
23.11.1999 US 448076

⑯ Titular/es: **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, Inc.**
75 Sidney Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

⑯ Fecha de publicación de la mención BOP: **27.05.2009**

⑯ Inventor/es: **Khodadoust, Mehran, M. y**
MacBeth, Kyle, J.

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente: **27.05.2009**

⑯ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

ES 2 320 622 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de uso de una proteína novedosa relacionada con la lisil oxidasa.

5 **Estado de la técnica**

La lisil oxidasa (“LOX”) es una enzima extracelular dependiente de cobre que inicia el reticulado de colágeno y elastina mediante la catalización de una desaminación oxidativa del grupo ε -amino en ciertos residuos de lisina e hidroxilisina de residuos de colágeno y lisina de elastina (Smith-Mungo y Kagan (1998) *Matrix Biol.* 16:387-398 y Kaman en *Biology of Extracellular Matrix*, ed. Mecham (1986) Academic Press pág. 321-389). Se ha demostrado que la lisil oxidasa es importante en diversos procesos celulares o fisiológicos incluyendo la biogénesis de la matriz de tejido conectivo y la resorción ósea. Una deficiencia de la actividad lisil oxidasa se encuentra en dos trastornos del tejido conectivo heredados recesivamente y ligados al cromosoma X, como la variante tipo IX del síndrome de Ehlers-Danlos y el síndrome de Menkes, y en la serie de mutantes alélicos de ratón moteado heredados recesivamente y ligados al cromosoma X (todos caracterizados por anomalías en el metabolismo del cobre). (Byers *et al.* (1980) *New Engl. J. Med.* 303:61-65; Royce *et al.* (1980) *Biochemistry J.* 192:579-586; Kuivaniemi *et al.* (1982) *J. Clin. Invest.* 69:730-733; Kuivaniemi *et al.* (1985) *Amer. J. Human. Genet.* 37:798-808; Pelttonen *et al.* (1983) *Biochemistry* 22:6156-6163; Rowe *et al.* (1977) *J. Biol. Chem.* 252:939-942; Starcher *et al.* (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78:706-712; Danks en *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, eds. Stanbury *et al.* (1983), McGraw-Hill pág. 1251-1268). Se ha asociado una actividad lisil oxidasa incrementada con desórdenes fibróticos como la ateroesclerosis, la hipertensión, y la fibrosis hepática y pulmonar. (Kagan, más arriba).

Más recientemente, se han identificado proteínas que tienen similitudes estructurales y/o funcionales con la lisil oxidasa. Por ejemplo, una proteína parecida a la lisil oxidasa, a la que se hace referencia aquí como “LOL” (del inglés, *lysyl oxidase-like protein*), se identificó a partir de una librería de ADNc de fibroblastos de piel humana que contiene una amplia homología con varios dominios codificantes del ARNm de lisil oxidasa humana, la cual se cree que está involucrada en la maduración del colágeno. (Kenyon *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 18435-18437 y Kim *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:7176-7182). La reciente clonación y el análisis del gen LOL de ratón (Kim *et al.* (1999) *J. Cell Biochem.* 72:181-188) demostró que los niveles de ARNm de LOL y ARNm de procolágeno tipo III incrementaban coincidentemente de forma temprana en el desarrollo de la fibrosis hepática. Por el contrario, los niveles de ARNm de lisil oxidasa incrementaban durante todo el comienzo de la fibrosis hepática y aparecían en paralelo con el incremento de los niveles de ARNm de colágeno pro-alfa (I), sugiriendo que la proteína LOL está involucrada en el desarrollo del reticulado derivado de lisina en los sustratos de colágeno. Además, la especificidad de sustrato de la proteína LOL podría ser diferente a la de la lisil oxidasa y esta diferencia podría ser específica del tipo de colágeno.

Asimismo, una proteína a la que se hace referencia aquí como proteína relacionada con la lisil oxidasa (“Lor”, del inglés, *lysyl-oxidase related protein*) ha sido identificada como inhibidora de muchas de las características estructurales de la lisil oxidasa y se sobreexpresa en los fibroblastos senescentes y se cree que juega un papel en los cambios asociados a la edad en las proteínas extracelulares. (Saito *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:8157-8160). La proteína Lor contiene cuatro dominios a los que se hace referencia aquí como dominios de receptores ricos en cisteína tipo *scavenger* (“dominios SRCR”) los cuales se cree que están involucrados en la unión a otras proteínas de la superficie celular o moléculas extracelulares. Los dominios SRCR se unen a una larga lista de otros dominios que contienen cisteína ampliamente distribuidos y que se encuentran en la porción extracelular de proteínas de membrana y en proteínas secretadas (Doolittle (1985) *Trends Biochem. Sci.* 10:233-237; Krieger en *Molecular Structures of Receptors*, eds. Rossow *et al.* (1986) Horwood, Chichester, U.K. pág. 210-231). Como ejemplos se incluyen el dominio tipo EGF, los dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas, el dominio del receptor de LDL/proteína C9 del complemento, los dominios Kringle de los factores de coagulación, y los dominios de las fibronectinas. Estos dominios unidos por puentes disulfuro parecen que proporcionan estructuras centrales estables que (i) son capaces de resistir los rigores del ambiente extracelular; (ii) son adecuadas para varias tareas bioquímicas, que a menudo incluyen uniones; y (iii) están fácilmente yuxtapuestas a otros tipos de dominios para permitir la construcción de un complejo mosaico de proteínas. (Doolittle, más arriba; Sudhof *et al.* (1985) *Science* 228:815-822). Por último, un ADNc de ratón que codifica una proteína putativa que tiene homología de secuencia con la lisil oxidasa ha sido recientemente identificado teniendo el n° de Adquisición AF053368, y al que se hace referencia aquí como “Lor-2”

Las lisil oxidadas (“LOXs”) se han inmunolocalizado en las regiones de la matriz extracelular del estroma rodeando cánceres de mama tempranos (Decitre *et al.* (1998) *Lab Invest.* 78:143-151), con una expresión reducida observada en el estroma de los alrededores de cánceres de mama invasivos (Peyrol *et al.* (1997) *Am. J. Pathol.* 150:497-507). Una pérdida progresiva de expresión de la LOX se ha observado también durante la progresión del cáncer de próstata en ratones (Ren *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58: 1285-1290). Estas observaciones sugieren que las lisil oxidadas pueden funcionar como supresores tumorales.

Se ha demostrado también que la proteína Lor humana presenta una alta expresión en todas las líneas de células adherentes al tumor examinadas, pero no en las líneas celulares que crecen en suspensión (Saito *et al.*, más arriba), sugiriendo que las LOXs pueden incrementar las propiedades de adhesión de las células tumorales. Se demostró que la expresión de la proteína Lor era concomitante con la sobre-regulación del procolágeno tipo I. Ya que las propiedades de adhesión contribuyen a la habilidad de las células tumorales para colonizar nuevos lugares, el papel de las LOXs como promotoras del tumor es también probable.

Una mayor comprensión del papel que la proteína parecida a la lisil oxidasa, así como el de las proteínas que contienen el dominio SCRC juegan en varios desórdenes podría conducir a la determinación de dianas de fármacos altamente específicas que podrían funcionar para tratar estos desórdenes, p. ej., desórdenes cardiovasculares, una afección que surja por una actividad parecida a la lisil oxidasa alterada o una afección que surja por una actividad de una proteína que contenga el dominio SRCR regulada inadecuadamente dando lugar a procesos celulares regulados inadecuadamente.

Resumen de la invención

10 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de unas moléculas de ácido nucleico y proteínas novedosas codificadas por esas moléculas de ácido nucleico, a las que se refiere aquí como moléculas Relacionadas con la Lisil Oxidasa-2 ("Lor-2"). Las moléculas de ácido nucleico y de las proteínas Lor-2 de la presente invención son útiles como agentes moduladores en la regulación de varios procesos celulares (p. ej., procesos celulares en el sistema cardiovascular, por ejemplo, procesos celulares cardíacos). Por consiguiente, en un aspecto, 15 esta invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, una molécula de ácido nucleico de Lor-2 de la invención es al menos un 89%, p. ej., 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más idéntica a una secuencia de ácido nucleico (p. ej., a toda la longitud de la secuencia de nucleótidos) teniendo la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o a la complementaria 20 de la misma.

En un aspecto preferido, la molécula de ácido nucleico aislada incluye la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, o a la complementaria de la misma. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico incluye los nucleótidos 143-2401 mostrados en SEQ ID NO: 1. En otro aspecto preferido, la molécula de ácido nucleico comprende un fragmento de al menos 500 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1, o a la complementaria 25 de la misma.

En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico de Lor-2 incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos un 95%, p. ej., 96%, 97%, 98%, 99%, o más 30 de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína que tiene actividad Lor-2 (como se describe aquí).

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que es la antisentido de una molécula de ácido nucleico de Lor-2, p. ej., la hebra codificante de una molécula de ácido nucleico de Lor-2.

35 Otro aspecto de la invención proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de Lor-2. En ciertos aspectos, el vector es un vector de expresión recombinante. En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que contiene un vector de la invención. La invención también proporciona un método para producir una proteína, preferiblemente una proteína Lor-2, mediante el cultivo en un medio adecuado, una célula hospedadora, 40 p. ej., una célula hospedadora de mamífero como una célula de mamífero no humano, de la invención que contiene un vector de expresión recombinante, como aquel en el que se produce la proteína.

Otro aspecto de esta invención ofrece proteínas y polipéptidos de Lor-2 aislados o recombinantes como se define 45 en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, el polipéptido aislado incluye uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un dominio LOX y al menos un dominio SCRC. En otro aspecto, el polipéptido aislado incluye una secuencia señal, un dominio LOX y al menos dos, tres o cuatro dominios SCRC. En otro aspecto, la proteína aislada incluye preferiblemente una secuencia señal, un dominio LOX, al menos un dominio SCRC y tiene una secuencia 50 de aminoácidos que es al menos un 95%, p. ej., 96%, 97%, 98%, 99% o más, idéntica a una proteína que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. En otro aspecto más, la proteína aislada, preferiblemente una proteína Lor-2, incluye una secuencia señal, un dominio LOX, al menos un dominio SCRC y se expresa y/o funciona en células del sistema cardiovascular.

En otro aspecto más, una proteína aislada, preferiblemente, una proteína Lor-2, tiene una secuencia señal y/o 55 es secretada. En otro aspecto, la proteína aislada, preferiblemente, una proteína Lor-2, incluye una secuencia señal, un dominio LOX, al menos un dominio SCRC y es codificada por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas de hibridación con una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1.

En otro aspecto, la proteína aislada, preferiblemente, una proteína Lor-2, tiene una secuencia de aminoácidos de 60 al menos un 95%, p. ej., 96%, 97%, 98%, 99% o más de homología con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2 (p. ej., toda la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2). En otro aspecto, la invención ofrece fragmentos de proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2, donde el fragmento comprende al menos alrededor de 250 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2. En otro aspecto, la proteína, preferiblemente, una proteína Lor-2, tiene la 65 secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2.

Otro aspecto de la invención ofrece una proteína aislada, preferiblemente, una proteína Lor-2, que es codificada por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que es al menos un 95%, p. ej., 96%, 97%,

98%, 99%, o más idéntica a un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos (p. ej., a toda la longitud de la secuencia de nucleótidos) mostrada en SEQ ID NO:1, o a la complementaria de la misma. Esta invención además ofrece una proteína aislada, preferiblemente, una proteína Lor-2, que es codificada por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas de hibridación con una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1, o a la complementaria de la misma.

5 Las proteínas de la presente invención o porciones de las mismas, p. ej., porciones biológicamente activas de las mismas, pueden ser ligadas operativamente a un polipéptido que no sea Lor-2 (p. ej., secuencias de aminoácidos heterólogos) para formar proteínas de fusión. La invención además ofrece anticuerpos, como los anticuerpos monoclonales o policlonales, que se unen específicamente a proteínas de la invención, preferiblemente, proteínas Lor-2. Además, las proteínas Lor-2 o porciones de las mismas pueden ser incorporadas en composiciones farmacéuticas, que opcionalmente pueden incluir excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico, una proteína o un polipéptido de Lor-2 en una muestra biológica poniendo en contacto la muestra biológica con un agente capaz de detectar una molécula de ácido nucleico, una proteína o un polipéptido de Lor-2 de manera que la presencia de una molécula de ácido nucleico, una proteína o un polipéptido de Lor-2 se detecta en la muestra biológica (p. ej., muestra tumoral).

20 25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia de la actividad de Lor-2 en una muestra biológica poniendo en contacto la muestra biológica con un agente capaz de detectar un indicador de la actividad de Lor-2 de manera que se detecta la presencia de la actividad de Lor-2 en la muestra biológica.

30 35 40 Los productos de la invención pueden usarse en un método para modular la actividad de Lor-2 que comprende poner en contacto una célula capaz de expresar Lor-2 con un agente que modula la actividad de Lor-2, de manera que se modula la actividad de Lor-2 en la célula. En un aspecto, el agente inhibe la actividad de Lor-2. En otro aspecto, el agente estimula la actividad de Lor-2. En un aspecto, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a la proteína Lor-2. En otro aspecto, el agente modula la expresión de Lor-2 modulando la transcripción de un gen de Lor-2 o la traducción de un ARNm de Lor-2. En otro aspecto más, el agente es una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que es la antisentido de la hebra codificante de una ARNm de Lor-2 o de un gen de Lor-2.

45 En un aspecto, los métodos de la presente invención se utilizan para tratar a un sujeto que tiene un desorden caracterizado por una proteína o una expresión del ácido nucleico o una actividad de Lor-2 aberrante mediante la administración de un agente que es un modulador de Lor-2 en el sujeto. En otro aspecto, el modulador de Lor-2 es una proteína Lor-2. En otro aspecto, el modulador de Lor-2 es una molécula de ácido nucleico de Lor-2. En otro aspecto más, el modulador de Lor-2 es un péptido, peptidomimético, u otra pequeña molécula. En otro aspecto, el desorden caracterizado por una proteína o una expresión del ácido nucleico de Lor-2 aberrante es un desorden proliferativo, p. ej., cáncer de hígado.

50 55 La presente invención también proporciona un ensayo diagnóstico para identificar la presencia o ausencia de una alteración genética caracterizada por al menos una de las siguientes causas: (i) modificación aberrante o mutación de un gen que codifica una proteína Lor-2; (ii) fallo en la regulación del gen; y (iii) modificación aberrante post-traducción de una proteína Lor-2, donde una forma nativa del gen codifica una proteína con actividad de Lor-2.

60 65 También proporciona métodos para el diagnóstico de un tumor hepático en un sujeto, determinando el potencial metastásico de un tumor hepático o elaborando un pronóstico, el cual incluye poner en contacto una muestra del tumor hepático extraído del individuo con un agente capaz de detectar Lor-2 (p. ej., la expresión o la actividad de Lor-2), determinando la cantidad de Lor-2, y configurando el diagnóstico, determinación o pronóstico basado en la cantidad de Lor-2.

En otro aspecto la invención proporciona un método para identificar un compuesto que se une a una proteína Lor-2 o modula su actividad, proporcionando un compuesto indicador que comprende una proteína Lor-2 que tiene actividad de Lor-2, poniendo en contacto el compuesto indicador con un compuesto de prueba, y determinando el efecto del compuesto de prueba sobre la actividad de Lor-2 en la composición indicadora para identificar un compuesto que modula la actividad de una proteína Lor-2.

También se ofrecen métodos de regulación de las metástasis tumorales hepáticas en un individuo o de inhibición de la progresión del tumor en un individuo, los cuales incluyen la administración a los individuos de un modulador de Lor-2 (p. ej., un inhibidor de Lor-2).

Otras características y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

65 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1A-B representa la secuencia de ADNc de Lor-2 humana. La secuencia de nucleótidos se corresponde con los ácidos nucleicos 1-2920 de SEQ ID NO:1.

ES 2 320 622 T3

La Figura 2A-B representa la secuencia de ADNc de Lor-2 humana. La secuencia de aminoácidos se corresponde con los aminoácidos 1-753 de SEQ ID NO:2

5 La Figura 3 representa la secuencia codificante de Lor-2 humana. La secuencia de nucleótidos se corresponde con los ácidos nucleicos 1-2259 de SEQ ID NO:3.

10 La Figura 4 muestra un análisis proteico de la secuencia de aminoácidos de Lor-2 representada en SEQ ID NO:2. Se muestran las regiones identificadas con los siguientes algoritmos: regiones alfa, de giros, beta y helicoidales, algoritmo de Garnier-Robson (Garnier *et al.* (1978) *J Mol Biol* 120:97); regiones alfa, beta y de giros, algoritmo de Chou-Fasman (Chou y Fasman (1978) *Adv in Enzymol Mol* 47:45-148); regiones anfipáticas alfa y anfipáticas beta, algoritmo de Eisenberg (Eisenberg *et al.* (1982) *Nature* 299:371-374); regiones flexibles, algoritmo de Karplus-Schulz (Karplus y Schulz (1985) *Naturwiss-sens-Chafen* 72:212-213); índice antigenico, algoritmo de Jameson-Wolf (Jameson y Wolf (1988) *CABIOS* 4:121-136); gráfico probabilidad de localización superficial, algoritmo de Emini (Emini *et al.* (1985) *J Virol* 55:836-839).

15 La Figura 5A-B describe un alineamiento múltiple de secuencias de la secuencia de aminoácidos de la lisil oxidasa humana, LOX (Número de Adquisición 2144342) (SEQ ID NO:5), la proteína de la lisil oxidasa humana, LOL (Número de Adquisición L21186) (SEQ ID NO:6), la proteína relacionada con la lisil oxidasa humana, Lor (Número de Adquisición U89942) (SEQ ID NO:7), la proteína relacionada con la lisil oxidasa 2 murina, Lor-2 (Número de Adquisición AF053368) (SEQ ID NO:8), y la secuencia de aminoácidos de Lor-2 humana (aminoácidos correspondientes de 1 a 753 de SEQ ID NO:2). El alineamiento se generó utilizando el algoritmo de Clustal que forma parte del paquete de software MegAlignTM. Los parámetros de alineamiento múltiple son los siguientes: Penalización por gap (*Gap Penalty*) = 10; Penalización para la extensión de un gap (*Gap Length Penalty*) = 10. Los parámetros de alineamiento por pares son los siguientes: K-tuple = 1; Penalización por gap = 3; Ventana (*Window*) = 5; *Diagonals Saved* = 5; Matriz de peso de los residuos = PAM250. Los dominios SCRC se indican en cursiva. Los dominios lisil oxidasa están indicados en negrita. Los sitios de unión del cobre están resaltados. La región relacionada con la lisil oxidasa está subrayada. (Para la secuencia huLO representada, los residuos de aminoácidos correspondientes a la enzima procesada están subrayados).

20 30 La Figura 6 describe los resultados del mapeo de híbridos de radiación del gen que codifica la Lor-2 humana (es decir, clon Fbh21967). La localización del clon Fbh21967, relativa a varios marcadores, se muestra como las distancias relativas entre marcadores.

35 La Figura 7 es la descripción gráfica de los niveles relativos de la expresión de Lor-2 en varias muestras de tejido normal.

La Figura 8 es la descripción gráfica de los niveles relativos de la expresión de Lor-2 en tejidos adicionales y muestras de células.

40 40 La Figura 9 es la descripción gráfica de los niveles relativos de expresión de Lor-2 en varias muestras de tejido normal frente a tumoral.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de nuevas moléculas, a las que nos referimos aquí como moléculas Relacionadas con la Lisil Oxidasa 2 (“Lor-2”) o ácido nucleico de Lor-2 o moléculas polipeptídicas de Lor-2, las cuales juegan un papel o funcionan en una variedad de procesos celulares en el sistema cardiovascular, p. ej., función celular cardiaca. Las moléculas de Lor-2 de la presente invención pueden modular la actividad de una o más proteínas involucradas en un desorden cardiovascular, p. ej., fallo cardiaco congestivo, isquemia, hipertrofia cardiaca, daño por isquemia-reperfusión.

50 55 Como se utiliza aquí, el término “desorden cardiovascular” incluye una enfermedad, desorden o estado que involucra el sistema cardiovascular, p. ej., el corazón, los vasos sanguíneos, y/o la sangre. Un desorden cardiovascular puede estar causado por un desajuste de la presión arterial, un mal funcionamiento del corazón, o una oclusión de un vaso sanguíneo, p. ej., por un trombo. Ejemplos de estos desórdenes incluyen hipertensión, ateroesclerosis, espasmo de la arteria coronaria, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad valvular, arritmias y cardiomiopatías.

60 65 Como se utiliza aquí, el término “fallo cardiaco congestivo” incluye una condición caracterizada por una capacidad disminuida del corazón para suministrar las demandas de oxígeno del cuerpo. Los síntomas y signos del fallo cardiaco congestivo incluyen flujo sanguíneo disminuido a varios tejidos del cuerpo, acumulación de un exceso de sangre en varios órganos, p. ej., cuando el corazón es incapaz de bombear la sangre que vuelve a él a través de las grandes venas, disnea de esfuerzo, fatiga, y/o edema periférico, p. ej., edema periférico resultante de una disfunción ventricular izquierda. El fallo congestivo cardiaco puede ser agudo o crónico. La manifestación del fallo congestivo cardiaco normalmente ocurre de forma secundaria a varios desórdenes cardíacos o sistémicos que comparten una pérdida de la función cardíaca temporal o permanente. Ejemplos de estos desórdenes incluyen hipertensión, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad valvular y cardiomiopatías, p. ej., cardiomiopatía hipertrófica, dilatada o restrictiva. El fallo cardiaco congestivo se describe, por ejemplo, en Cohn J.N. *et al.* (1998) *American Family Physician* 57: 1901-04, los contenidos del mismo están incorporados aquí por referencia.

Como se utiliza aquí, el término “procesos celulares cardiacos” incluye procesos intracelulares o intercelulares involucrados en el funcionamiento del corazón. Los procesos celulares incluyen la nutrición y mantenimiento del corazón, el desarrollo del corazón o la habilidad del corazón para bombear sangre al resto del cuerpo, los cuales se entienden como cubiertos por este término. Estos procesos incluyen, por ejemplo, la contracción muscular cardiaca, la distribución y transmisión de impulsos eléctricos y los procesos celulares involucrados en la apertura y cierre de las válvulas cardiacas. El término “procesos celulares cardiacos” además incluye procesos como la transcripción, traducción y modificación post-traduccional de las proteínas involucradas en el funcionamiento del corazón, p. ej., proteínas específicas de miofilamentos, como la troponina I, troponina T, cadena ligera de la miosina 1 (MLC1), y la α actinina.

Un aspecto de la invención muestra moléculas de ácido nucleico de Lor-2, preferiblemente moléculas de Lor-2 humanas, las cuales se identifican a partir de una librería de ADNc fabricada a partir del corazón de un paciente con fallo cardiaco congestivo (CHF). El ácido nucleico y las moléculas de proteínas Lor-2 de la invención se describen con más detalle en las siguientes sub-secciones.

En otro aspecto más, las proteínas aisladas de la presente invención, preferiblemente proteínas Lor-2 pueden identificarse basándose en la presencia de al menos un dominio SRCR y/o un dominio lisil oxidasa y/o una secuencia señal.

En un aspecto preferido, un miembro de la familia Lor-2 incluye al menos 1, 2, 3, 4, o más dominios de receptores ricos en cisteína tipo *scavenger* (“dominios SRCR”). Los receptores *scavenger* son proteínas que se han implicado en el desarrollo de la ateroesclerosis y otras funciones asociadas a macrófagos. Por ejemplo, los receptores *scavenger* tipo I de los macrófagos de mamíferos son glicoproteínas de membrana implicadas en la deposición patológica de colesterol en las paredes arteriales durante la aterogénesis (Freeman *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 8810-8814). Los receptores *scavenger* se caracterizan por la presencia de un dominio rico en cisteína, el cual se piensa que está involucrado en la unión de ligandos fisiológicos (p. ej., proteínas de la superficie celular). Este dominio rico en cisteína se identifica aquí y en el estado de la técnica como dominios de receptores ricos en cisteína tipo *scavenger* (“dominios SRCR”). La unión intra- o intercelular de un ligando al dominio SRCR se cree que juega algún papel en la señalización o adhesión.

Como se define aquí, un dominio SRCR incluye un dominio proteico que tiene una longitud de unos 88-112 residuos de aminoácidos y tiene un 16-60% de identidad con un SRCR del receptor *scavenger* tipo I de los macrófagos de humanos (p. ej., residuos de aminoácidos 353-450 de SEQ ID NO: 10). En otro aspecto, un SCRC tiene alrededor de 90-110, 94-106, o 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, ó 106 residuos de aminoácidos de longitud y tiene sobre 22-54%, 26-50%, 28-48%, o 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, o 47% de identidad con un SRCR del receptor *scavenger* tipo I de los macrófagos de humanos (p. ej., residuos de aminoácidos 353-450 de SEQ ID NO: 10). Por ejemplo, un dominio SRCR puede encontrarse en el receptor *scavenger* tipo I murino (Nº Acceso 1709140) en los residuos de aminoácidos 360-457. los dominios SRCR también se han encontrado en diversas proteínas secretadas y otras proteínas de la superficie celular de humanos (p. ej., CD5 y el factor del complemento I), ratones (Ly-1) y erizos de mar (receptor *speract*). Además, muchas proteínas incluyen más de un dominio SRCR (p. ej., Ly-1 incluye 3 dominios SRCR y el receptor *speract* incluye 4 dominios SRCR). Asimismo, la Lor-2 humana incluye 4 dominios SRCR, como se establece más abajo.

Para identificar la presencia de un SRCR en un miembro de la familia Lor-2, la secuencia de aminoácidos del miembro de la familia de la proteína puede buscarse en una base de datos de HMMs (p. ej., la base de datos de familia de proteína Pfam, versión 3.3) p. ej., utilizando los parámetros por defecto. Por ejemplo, la búsqueda puede llevarse a cabo utilizando el programa hmmsf (específico de familia) y una puntuación umbral de 15 para determinar una coincidencia (*hit*). El hmmsf está disponible como parte del paquete de programas de búsqueda HMMER (HMMER 2.1.1 Dic. 1998) que se distribuye gratuitamente por parte de la escuela de medicina de la Universidad de Washington. En un aspecto, una coincidencia en HMM de SRCR teniendo una puntuación de al menos 30-40, preferiblemente de al menos 50-60, más preferiblemente de al menos 70-80, y más preferiblemente de al menos 90 ó más es determinante de la presencia de un dominio SRCR dentro de la proteína problema. Se llevó a cabo una búsqueda utilizando la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 con la base de datos HMM dando como resultado la identificación de 4 dominios SRCR en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. De acuerdo con esto, una proteína Lor-2 tiene un dominio SRCR en los aminoácidos 51-145 de SEQ ID NO:2 (puntuación de 91.4 en el perfil de HMM del dominio SRCR, Nº de Acceso PF00530). En otro aspecto, una proteína Lor-2 tiene un dominio SRCR en los aminoácidos 183-282 de SEQ ID NO:2. (Puntuación de 35.8). En otro aspecto, una proteína Lor-2 tiene un dominio SRCR en los aminoácidos 420-525 de SEQ ID NO:2. (Puntuación de 55.2). Los SRCRs de Lor-2, así como aquellos de huLor-2 y muLor-2 están indicados en cursiva en la Figura 5.

Los miembros de la familia Lor-2 pueden además incluir al menos uno o más patrones de dominios repetidos de los receptores *speract* (“SRDD”). El receptor *speract* es una glicoproteína de membrana de 500 residuos de aminoácidos (Dangott *et al.* (1989) PNAS U.S.A. 86:2128-2132) que consiste en un gran dominio extracelular de 450 que contiene 4 repeticiones de ~115 aminoácidos denominados dominios repetidos de los receptores *speract* o “SRDDs”. El alineamiento múltiple de secuencias de las cuatro repeticiones revela al menos 17 residuos perfectamente conservados (incluyendo seis cisteínas, seis glicinas, y tres glutamatos). Se ha generado un patrón SRCR a partir de un alineamiento de los cuatro SRCRs y tiene la secuencia consenso: G-x(5)-G-x(2)-E-x(6)-W-G-x(2)-C-x(3)-[FYW]-x(8)-C-x(3)-G, correspondiente a SEQ ID NO:4. El patrón SRRD se describe con detalle en el Documento PROSITE, Nº

de Acesso PDOC00348 (<http://expasy.ch/cgi-bin/prosite-search-ac?PDOC00021>) y como Nº de Acceso a PROSITE PS00420. En un aspecto, un patrón SRRD se incluye dentro de un SRCR. Por ejemplo, un SRRD puede encontrarse en un SRCR de la sección C-terminal de un receptor *scavenger* tipo I de un macrófago de mamífero (Freeman *et al.* (1990) PNAS U.S.A. 87:8810-8814). Asimismo, un patrón SRRD puede encontrarse dentro del dominio SRCR de Lor-2 humana en los aminoácidos 312-349 de SEQ ID NO:2.

Las secuencias de consenso se describen aquí de acuerdo a la designación estándar de Patrones Prosite (p. ej., todos los aminoácidos se indican de acuerdo a la designación universal de una única letra; X designa cualquier aminoácido; X(n) designa n aminoácidos cualquiera, p. ej., X(2) designa dos aminoácidos cualquiera; [FYW] indica cualquiera de los aminoácidos que aparecen entre los corchetes, p. ej., cualquiera de F, Y o W, en la designación alternativa, cualquiera de Phe, Tyr, o Trp; y {x} indica cualquier aminoácido excepto el que se incluye entre los corchetes.)

Los miembros de la familia Lor-2 pueden además incluir al menos un dominio característico de la lisil oxidasa, al que se hace referencia aquí como un dominio de la lisil oxidasa o “dominio LOX”. La lisil oxidasa es una enzima extracelular dependiente de cobre que cataliza la desaminación oxidativa de los residuos de peptidil lisina en los precursores de varios colágenos y elastinas. Las lisinas desaminadas son entonces capaces de formar entrecruzamientos aldehído. (Krebs *et al.* (1993) Biochem. Biophys. Acta. 1202:7-12). La secuencia de aminoácidos de la lisil oxidasa incluye una secuencia señal (p. ej., aminoácidos 1 a 21 de la lisil oxidasa humana establecidos en SEQ ID NO:5), una región pro-peptido (p. ej., aminoácidos 22 a 168 de SEQ ID NO:2), y una región correspondiente a la proteína activa y procesada (p. ej., aminoácidos 169-417 de SEQ ID NO:5), la cual es responsable de la función enzimática de la molécula. La lisil oxidasa puede ser además caracterizada mediante la presencia de un lugar de unión de cobre (Krebs *et al.* (1993) Biochem. Biophys. Acta. 12-2:7-12) que tiene cuatro residuos de histidina conservados que se cree proporcionan los ligandos de nitrógeno para la coordinación del cobre, y un sitio de unión a la quinona como cofactor (Wang *et al.* (1996) Science 273:1078-1084) (p.ej., his289, his292, his294, e his296 de SEQ ID NO:5), también conocido como “garra de cobre” (“copper talon”). El sitio de unión de cobre de la Lor-2 humana puede encontrarse, por ejemplo, en los aminoácidos 286-296 de SEQ ID NO:5.

Por consiguiente, como se utiliza aquí, el término “dominio LOX” incluye un dominio de proteína que tiene alrededor de 245-275 residuos de aminoácidos de longitud, y tiene alrededor del 38-64% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la lisil oxidasa procesada (p. ej., residuos de aminoácidos 169-417 de SEQ ID NO:5). Preferiblemente, un dominio LOX tiene alrededor de 225-300, más preferiblemente alrededor de 230-290 residuos de aminoácidos de longitud, y más preferiblemente alrededor de 235-285, o 240-280 residuos de aminoácidos de longitud, y tiene alrededor del 34-65% de identidad, preferiblemente alrededor del 42-62%, y más preferiblemente alrededor del 46-56% o el 50-52% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la lisil oxidasa procesada (p. ej., residuos de aminoácidos 169-417 de SEQ ID NO:5). Por ejemplo, un dominio LOX puede encontrarse en huLOL (SEQ ID NO:6) en los aminoácidos 310-574; en huLor (SEQ ID NO:7) en los aminoácidos 481-751; en muLor-2 (SEQ ID NO:8) en los aminoácidos 464-733; y en huLor-2 (SEQ ID NO:2) en los aminoácidos 463-732. Los dominios LOX de huLOL, huLor, muLor-2, y huLor-2 se indican en negrita en la Figura 5.

En otro aspecto, un dominio LOX está involucrado en la función de la lisil oxidasa o de una proteína similar a la lisil oxidasa. Las funciones de la lisil oxidasa o de la proteína similar a la lisil oxidasa incluyen, por ejemplo, actividad aminotransferasa, oxidación de la peptidil lisina, desaminación oxidativa de la lisina, entrecruzamiento de los componentes de la matriz extracelular, unión del cobre, y/o metabolismo del cobre. Las funciones de la lisil oxidasa o de la proteína similar a la lisil oxidasa se describen en detalle, por ejemplo, en Kagan *et al.* en *Catalytic Properties and structural components of lysyl oxidase*, John Wiley & Sons (1995) págs. 100-121.

En otro aspecto más, un dominio LOX tiene al menos uno, preferiblemente dos, y más preferiblemente tres o cuatro residuos de histidina correspondientes a los residuos de histidina conservados de la lisil oxidasa que están involucrados en la unión del cobre. Por ejemplo, un dominio LOX de una secuencia de Lor-2 humana establecida en SEQ ID NO:2 (p. ej., residuos de aminoácidos 330-732 en SEQ ID NO:2) tiene cuatro residuos de histidina (p. ej., his604, his607, his609 e his611 de SEQ ID NO:2) que se corresponden con aquellos de la lisil oxidasa humana establecidos en SEQ ID NO:5.

Un dominio LOX en una proteína puede además estar incluido dentro de una región relacionada con la lisil oxidasa (“región relacionada con la LOX”). Una región relacionada con la LOX dentro de una proteína (p. ej., dentro de un miembro de la familia Lor-2) incluye una región proteica que tiene alrededor de 380-580, preferiblemente alrededor de 390-550, más preferiblemente alrededor de 400, 420, 450 ó 500 residuos de aminoácidos de longitud y tiene al menos 30-35%, 40-45%, 50-55%, 60-65%, 70-75%, 80-85%, ó 90-95% de homología con, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la LOX humana. Para identificar la presencia de una región relacionada con la LOX en un miembro de la familia Lor-2, la secuencia de aminoácidos del miembro de la familia de la proteína puede buscarse en la base de datos HMM, como se describió previamente. En un aspecto, una coincidencia con HMM de LOX teniendo una puntuación de al menos 100-110, preferiblemente al menos 120-130, más preferiblemente al menos 140-150, y más preferiblemente al menos 160 ó más es determinante de la presencia de una región relacionada con la LOX dentro de la proteína problema. Una búsqueda utilizando la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se llevó a cabo en la base de datos HMM resultando una coincidencia con un HMM de LOX sobre los aminoácidos 330-732 de SEQ ID NO: 2. (Puntuación de 166.6 en el perfil de HMM del dominio LOX Nº de Acceso PF01186). Regiones relacionadas con la LOX similares se identificaron en muLor-2 en los aminoácidos 318-733 de SEQ ID NO:8. (Puntuación de 162.8), en huLOL en los aminoácidos 1-574 de SEQ ID NO:6 (Puntuación de 382.2) y en huL en los aminoácidos 358-751 de

ES 2 320 622 T3

SEQ ID NO:7 (Puntuación de 146.8). En otro aspecto más, una región relacionada con la lisil oxidasa tiene al menos el 40-45%, 50-55%, 60-65%, 70-75%, 80-85%, ó 90-95% de homología con la secuencia de aminoácidos de un dominio LOX de una secuencia de Lor-2 humana establecida en SEQ ID NO:2 (p. ej., residuos de aminoácidos 330-732 en SEQ ID NO:2). Las regiones relacionadas con la lisil oxidasa de huLOL, huLor, muLor-2 y huLor-2 están subrayadas 5 en la Figura 5, ya que son los aminoácidos correspondientes a la lisil oxidasa procesada (p. ej., aminoácidos 169-417 de SEQ ID NO: 5).

Una proteína de la invención, preferiblemente un proteína Lor-2, puede contener una secuencia señal. Como se utiliza aquí, una “secuencia señal” se refiere a un péptido que contiene alrededor de 25 aminoácidos que se encuentran en 10 el extremo N-terminal de proteínas de secreción y que contiene un gran número de residuos de aminoácidos hidrofóbicos. Por ejemplo, una secuencia señal contiene al menos alrededor de 17-33 residuos de aminoácidos, preferiblemente alrededor de 20-30 residuos de aminoácidos; más preferiblemente alrededor de 24-26 residuos de aminoácidos, y más preferiblemente alrededor de 25 residuos de aminoácidos, y tiene al menos alrededor del 35-65%, preferiblemente alrededor del 38-50%, y más preferiblemente alrededor del 40-45% de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (p. ej., 15 Valina, Leucina, Isoleucina o Fenilalanina). Esta “secuencia señal”, también conocida en el estado de la técnica como “péptido señal”, sirve para dirigir una proteína que contiene esa secuencia hacia una bicapa lipídica. Por ejemplo, en un aspecto, una proteína Lor-2 contiene una secuencia señal que contiene aproximadamente los aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO:2.

Una proteína de la invención, preferiblemente una proteína Lor-2, puede codificar una proteína madura. Como se utiliza aquí, el término “proteína madura” se refiere a una proteína de la invención, preferiblemente una proteína Lor-2, de la cual el péptido señal ha sido escindido. En un aspecto ejemplar, una proteína Lor-2 madura contiene los 20 residuos de aminoácidos 26 a 753 de SEQ ID NO:2.

Los miembros de la familia Lor-2 pueden incluir al menos 1, 2, 3, 4, 5 ó más sitios de N-glicosilación. Los sitios 25 previstos de N-glicosilación se encuentran, por ejemplo, en los aminoácidos 111-114, 266-269, 390-393, 481-484, y 625-628 de SEQ ID NO:2.

Los miembros de la familia Lor-2 pueden además incluir al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó más sitios de fosforilación 30 de la Proteína Quinasa C (“PKC”, de las siglas en inglés). Los sitios previstos de fosforilación de la PKC se encuentran, por ejemplo, en los aminoácidos 97-99, 104-106, 221-223, 268-270, 352-354, 510-512, 564-566, y 649-651 de SEQ ID NO:2.

Los miembros de la familia Lor-2 pueden además incluir al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 6 más sitios de fosforilación de la Caseína quinasa II. Los sitios previstos de fosforilación de la Caseína quinasa II se 35 encuentran, por ejemplo, en los aminoácidos 31-34, 68-71, 115-118, 120-123, 135-138, 330-333, 352-355, 377-380, 392-395, 411-414, 424-427, 493-496, 527-530, y 617-620 de SEQ ID NO:2.

Los miembros de la familia Lor-2 pueden además incluir al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 40 16, 17, 18, 19, ó más sitios de N-miristoilación. Los sitios previstos de N-miristoilación se encuentran, por ejemplo, en los aminoácidos 13-18, 116-121, 130-135, 273-278, 312-317, 359-364, 378-383, 403-408, 443-448, 451-456, 463-468, 470-475, 489-494, 506-511, 515-520, 521-526, 626-631, 661-666, y 746-751 de SEQ ID NO:2.

Los miembros de la familia Lor-2 pueden además incluir al menos uno o más sitios de amidación. Un sitio 45 previsto de amidación se encuentra, por ejemplo, en los aminoácidos 117-180 de SEQ ID NO:2. Como se utiliza aquí, el sitio(s) tiene una secuencia consenso seleccionada de: N-{P}-[ST]-{P}, donde N es un sitio de glicosilación (véase documento PROSITE PS00001); [ST]-X-[RK], donde S o T es un sitio de fosforilación (véase documento PROSITE PS00005); [ST]-X (2)-[DE] donde S o T es un sitio de fosforilación (véase documento PROSITE PS00006); G-{EDRKHPFYW}X (2)-[STAGCN]-{P}, donde G es un sitio de N-miristoilación (véase PROSITE N° de Acceso PS00008); y X-G-[RK]-[RK], donde X es un sitio de amidación (véase documento PROSITE PS00009). Estos sitios se describen con más detalle en <http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/get-prodoc-entry?PDOC00001, PDOC00005, PDOC00006, PDOC00008, y PS00009>, respectivamente.

Las proteínas aisladas de la presente invención, preferiblemente proteínas Lor-2, se definen en las reivindicaciones 55 adjuntas. Pueden tener una secuencia de aminoácidos lo suficientemente homóloga con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o estar codificadas por una secuencia de nucleótidos que incluye una secuencia de nucleótidos lo suficientemente homóloga a SEQ ID NO:1. Como se utiliza aquí, el término “lo suficientemente homóloga” incluye una primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que contiene al menos un número mínimo de residuos de aminoácidos o nucleótidos equivalentes o idénticos (p. ej., un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral 60 similar) a una segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de manera que la primera y segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos comparten dominios o motivos estructurales comunes y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos o nucleótidos que comparten dominios estructurales comunes pueden tener al menos el 30%, 40% ó 50% de homología, preferiblemente el 55%, 60%, 65%, 70% ó 75% de homología, más preferiblemente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de homología a lo largo de 65 las secuencias de aminoácidos de los dominios y contienen al menos uno y preferiblemente dos dominios o motivos estructurales.

ES 2 320 622 T3

Además, las secuencias de aminoácidos o nucleótidos que comparten al menos el 30%, 40% ó 50% de homología, preferiblemente el 55%, 60%, 65%, 70% ó 75% de homología, más preferiblemente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de homología pueden compartir una misma actividad funcional.

- 5 Por consiguiente, otro aspecto de la invención muestra proteínas y polipéptidos Lor-2 aislados que tienen actividad Lor-2. Las proteínas preferidas son las proteínas Lor-2 que tienen al menos una secuencia señal, un dominio LOX, y al menos un patrón SRRD. Otras proteínas preferidas son proteínas Lor-2 que tienen al menos dos, tres o cuatro patrones SRRD. Otras proteínas preferidas son proteínas Lor-2 que tienen al menos una secuencia señal, un dominio LOX, y un dominio SRCR. Otras proteínas preferidas son proteínas Lor-2 que tienen al menos una secuencia señal, un dominio LOX, y al menos dos dominios SRCR. Otras proteínas preferidas son proteínas Lor-2 que tienen al menos una secuencia señal, un dominio LOX, y al menos tres dominios SRCR. Otras proteínas preferidas son proteínas Lor-2 que tienen al menos cuatro dominios SRCR.
- 10
- 15 La secuencia de nucleótidos del ADNc de Lor-2 humana aislado y la secuencia de aminoácidos prevista del polipéptido de Lor-2 humana se muestra en las Figuras 1 y 2 (SEQ ID NOs: 1, 2), respectivamente.

20 El ADNc de Lor-2 humana (establecido en SEQ ID NO:1), que tiene aproximadamente unos 2920 nucleótidos de longitud, codifica una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 83.166 kD (con la secuencia señal) y 84.404 kD (sin la secuencia señal) y que tiene aproximadamente 753 (con secuencia señal) (SEQ ID NO:2) y 728 residuos de aminoácidos (sin secuencia señal) de longitud. Se encontró un mensajero de Lor-2 de ~3 kb que se expresaba en la mayoría de los tejidos evaluados pero se expresaba más fuertemente en el corazón y en la placenta (se evaluaron al menos tejidos procedentes del corazón, el cerebro, la placenta, el pulmón, el hígado, el músculo esquelético, el riñón y el páncreas). Se ha observado también una alta expresión de Lor-2 en la línea celular de melanoma G361 y en la línea celular de adenocarcinoma de colon SW480 (se evaluaron al menos las líneas celulares G361, SW480, HL60, Hela 53, K562, Molty, Raji, y A549).

25

30 En un aspecto preferido, las proteínas Lor-2 de la invención tienen una secuencia de aminoácidos de al menos 600-900, preferiblemente alrededor de 650-850, más preferiblemente alrededor de 700-800, y aún más preferiblemente alrededor de 720-760, 728 ó 753 residuos de aminoácidos de longitud.

35 Como se utiliza de forma intercambiable aquí, la “actividad de Lor-2”, la “actividad biológica de Lor-2” o la “actividad funcional de Lor-2”, incluye una actividad ejercida por una proteína, polipéptido o molécula de ácido nucleico de Lor-2 como se determinó *in vivo*, *in vitro*, o *in situ*, de acuerdo con técnicas estándar. En un aspecto, una actividad de Lor-2 tiene una actividad directa, como una asociación con una molécula diana de Lor-2. Como se utiliza aquí, una “molécula diana” es una molécula a la que se une o con la que interactúa en la naturaleza la proteína Lor-2, de manera que se logra la función mediada por Lor-2. Una molécula diana de Lor-2 puede ser una proteína o polipéptido Lor-2 de la presente invención o una molécula que no sea Lor-2. Por ejemplo, una molécula diana de Lor-2 puede ser una molécula proteica que no sea Lor-2. De forma alternativa, una actividad de Lor-2 tiene una actividad indirecta, como la actividad mediada por la interacción de una proteína Lor-2 con una molécula diana de Lor-2 de manera que la molécula diana modula una cascada de actividad celular (p. ej., la interacción de una molécula Lor-2 con una molécula diana de Lor-2 puede modular la actividad de una molécula diana en una célula cardiaca).

40

45 En un aspecto preferido, una actividad de Lor-2 tiene al menos una o más de las siguientes actividades: (i) interacción de una proteína Lor-2 con una molécula diana de Lor-2; (ii) interacción de una proteína Lor-2 con una molécula diana de Lor-2, donde la diana de Lor-2 es un ligando; (iii) interacción de una proteína Lor-2 con una molécula diana de Lor-2, donde la diana de Lor-2 es un componente de la matriz extracelular (p. ej., colágeno o elastina); y (iv) modificación de una molécula diana de Lor-2 (p. ej., modificación post-traduccional).

50 En otro aspecto más, una actividad de Lor-2 es al menos una o más de las siguientes: (1) entrecruzamiento de un componente de la matriz extracelular; (2) regulación de la resorción o metabolismo óseo; (3) regulación del metabolismo del cobre; (4) modulación de la maduración, estabilización y/o degradación de los componentes de la matriz extracelular; (5) regulación de la señalización celular; y (6) regulación de la adhesión celular (p. ej., adhesión de una célula tumoral).

55 En otro aspecto de la invención, una molécula Lor-2 o preferiblemente, un modulador de Lor-2, es útil para regular, prevenir y/o tratar al menos una o más de las siguientes enfermedades o desórdenes: (1) enfermedades o desórdenes que implican un metabolismo del cobre deficiente (p. ej., el síndrome de Ehlers-Danlos tipo IX o el síndrome de Menkes); (2) desórdenes óseos (p. ej., osteoporosis u osteoartritis); (3) desórdenes fibróticos (p. ej., ateroesclerosis, fibrosis tisular y/u orgánica); (4) desórdenes proliferativos (p. ej., cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón y similares); (5) desórdenes vasculares (p. ej., isquemia, daño por isquemia-reperfusión); y (6) trauma cardiaco (p. ej., iatrogénico, accidental).

60 Una molécula Lor-2 o preferiblemente, un modulador de Lor-2, puede ser útil para la regulación, prevención y/o tratamiento de al menos una o más de las siguientes enfermedades o desórdenes: (1) hipertrofia cardiaca y cardiomiopatía; (2) patologías cardíacas; (3) hipertrofia miocárdica y lesiones cardiovasculares; (4) aneurisma de miocardio; (5) enfermedad cardiovascular aterosclerótica; (6) enfermedad fibrótica; (7) osteoporosis; (8) cáncer de próstata/metástasis; (9) senescencia celular/supresión tumoral; (10) progresión tumoral; (11) fibrosis hepática; (12) cicatrización de heridas; (13) hipertensión; (14) diabetes; (15) artritis; y (16) enfermedad ósea (p. ej., osteoporosis u osteoartritis).

ES 2 320 622 T3

Un modulador de Lor-2 es útil para la regulación (p. ej. inhibición) de la progresión tumoral hepática. Por ejemplo, Lor-2 puede ser secretada por una célula tumoral hepática facilitando la adhesión (p. ej., mejorando las propiedades adhesivas) de la célula. Por consiguiente, los moduladores de Lor-2 pueden utilizarse para afectar a las propiedades adhesivas de las células tumorales hepáticas (p. ej., a los tejidos colindantes).

5 Un modulador de Lor-2 puede ser útil para la regulación o prevención de la inmunosupresión por células tumorales. Por ejemplo, Lor-2 puede ser secretada por una célula tumoral, confiriendo a esa célula una ventaja para el crecimiento (p. ej., manteniendo el crecimiento, la diferenciación y fenotipo transformado de la célula tumoral). En esa situación, la Lor-2 secretada puede inhibir la citotoxicidad (p. ej., linfocitotoxicidad, por ejemplo, linfocitotoxicidad mediada por IL-2). Por consiguiente, la Lor-2 puede funcionar suprimiendo la generación y/o proliferación de las células linfocíticas (p. ej., células killer activadas por linfocitos).

Varios aspectos de la invención se describen con más detalle en las siguientes sub-secciones:

15 I. Moléculas de Ácido Nucleico Aisladas

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos como se define en las reivindicaciones adjuntas. Codifican proteínas Lor-2 o porciones biológicamente activas de las mismas, así como fragmentos de ácidos nucleicos para utilizar como sondas de hibridación para identificar los ácidos nucleicos que codifican Lor-2. Como se 20 utiliza aquí, el término “molécula de ácido nucleico” se entiende que incluye moléculas de ADN (p. ej., ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (p. ej., ARNm) y análogos de ADN o de ARN generados mediante el uso de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena simple o de cadena doble, pero preferiblemente es 25 ADN de cadena doble.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es la que está separada del ADN cromosómico, p. ej., otras moléculas 30 de ácidos nucleicos que están presentes en la fuente natural de ácidos nucleicos. Preferiblemente, un ácido nucleico “aislado” está libre de las secuencias que flanquean el ácido nucleico de forma natural (es decir, las secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido 35 nucleico. Por ejemplo, en varios aspectos, la molécula de ácido nucleico de Lor-2 aislada puede contener menos de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean la molécula de ácido nucleico de forma natural en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico. Además, una molécula de ácido 40 nucleico “aislada”, como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, p. ej., una molécula de ácido nucleico que tiene la 45 secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, o una parte de la misma, puede aislarse utilizando técnicas estándar de biología molecular y la información sobre la secuencia que se proporciona aquí. Por ejemplo, utilizando toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1, la secuencia de nucleótidos como sonda de hibridación, las moléculas de ácidos nucleicos de Lor-2 pueden aislarse utilizando técnicas de hibridación y de clonación estándar (p. ej., como se describe en Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^a ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Además, una molécula de ácido nucleico que abarque toda o parte de la secuencia SEQ ID NO:1 puede aislarse 50 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores (*primers*) de oligonucleótidos sintéticos diseñados en base a la secuencia de SEQ ID NO:1.

Un ácido nucleico de la invención puede amplificarse utilizando ADNc, ARNm o de forma alternativa, ADN 55 genómico, como molde y cebadores de oligonucleótidos apropiados de acuerdo con las técnicas estándar de amplificación por PCR. El ácido nucleico amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse mediante un análisis de secuencias de ADN. Además, los oligonucleótidos que se corresponden con las secuencias de nucleótidos de Lor-2 pueden prepararse mediante técnicas de síntesis estándar, p. ej., utilizando un sintetizador automático de ADN.

En un aspecto preferido, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1. La secuencia de SEQ ID NO:1 se corresponde con las regiones codificantes y 60 no codificantes del ADNc de Lor-2 humana. Este ADNc comprende secuencias que codifican la proteína Lor-2 humana (es decir, “la región codificante”, de los nucleótidos 143-2401) y las regiones no codificantes (es decir, de los nucleótidos 1-142 y de los nucleótidos 2402-2920).

En otro aspecto preferido, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que es la complementaria de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1 o una parte de alguna de estas secuencias de nucleótidos. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1 es aquella que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1 de manera tal que puede hibridar con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1 formando de ese modo una doble cadena estable.

ES 2 320 622 T3

En aún otro aspecto más preferido de la invención, una molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos el 89% es decir, 90-95%, ó 99%, ó más idéntica a las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO:1, o a las complementarias de las mismas.

5 Además, como se define en las reivindicaciones, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender sólo una parte de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO:1, por ejemplo un fragmento que pueda ser usado como sonda o cebador o un fragmento que codifique una parte de la proteína Lor-2. La secuencia de nucleótidos determinada a partir de la clonación del gen Lor-2 tiene en cuenta la generación de sondas y cebadores diseñados para utilizarse en la identificación y/o clonación de otros miembros de la familia Lor-2, así como de homólogos de Lor-2 de otras especies. La sonda/cebador típicamente comprende oligonucleótidos sustancialmente purificados.

10 El oligonucleótido típicamente comprende una región de la secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones restringidas de hibridación con al menos 12 ó 15, preferiblemente 18 ó 20, preferiblemente alrededor de 22 ó 25, más preferiblemente alrededor de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, ó 75 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido mostrada en SEQ ID NO:1 de una secuencia anti-sentido de SEQ ID NO:1, o de un mutante que se produzca de forma

15 natural de SEQ ID NO:1.

Las sondas basadas en la secuencia de nucleótidos de Lor-2 pueden utilizarse para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican las mismas proteínas o proteínas homólogas. En aspectos preferidos, la sonda además comprende un grupo de marcate unido a ésta, p. ej., el grupo de marcate puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor de una enzima. Estas sondas pueden utilizarse como parte de un kit para un test de diagnóstico para identificar las células o el tejido que exprese mal una proteína Lor-2, tal como la medición del nivel de un ácido nucleico que codifica Lor-2 en una muestra de células de un sujeto, p. ej., detectando los niveles de ARNm o determinando si un gen genómico de Lor-2 ha sido mutado o eliminado.

25 Un fragmento de ácido nucleico que codifica “una porción biológicamente activa de una proteína” puede prepararse mediante el aislamiento de una parte de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, que codifica un polipéptido que tiene actividad biológica de Lor-2 (las actividades biológicas de las proteínas Lor-2 se han descrito previamente), expresando la porción que codifica para la proteína Lor-2 (p. ej., mediante expresión recombinante *in vitro*) y evaluando la actividad de la porción que codifica para la proteína Lor-2.

30 La invención además abarca moléculas de ácidos nucleicos como se define en las reivindicaciones que difieren de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1 debido a la degeneración del código genético y por tanto codifican las mismas proteínas Lor-2 que aquellas codificadas por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2.

35 Además de las secuencias de nucleótidos de Lor-2 mostradas en SEQ ID NO:1, un experto medio en la materia se dará cuenta de que pueden existir polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas Lor-2 dentro de una población (p. ej., la población humana). Estos polimorfismos genéticos en los genes Lor-2 pueden existir entre individuos dentro de una misma población debido a la variación alélica natural. Como se utilizan aquí, los términos “gen” y “gen recombinante” se refieren a moléculas de ácidos nucleicos aisladas a partir de ADN cromosómico, el cual incluye un marco de lectura abierto que codifica una proteína Lor-2, preferiblemente una proteína Lor-2 de mamífero. Un gen incluye las secuencias codificantes de ADN, las secuencias no codificantes reguladoras, y los intrones. Como se utiliza aquí, un gen hace referencia a una molécula de ácido nucleico aislada, como se define aquí.

40 Las variantes alélicas de Lor-2 humana incluyen tanto las proteínas Lor-2 funcionales como las no funcionales. Las variantes alélicas funcionales son variantes de la secuencia de aminoácidos de la proteína Lor-2 humana que se producen de forma natural y que mantienen la habilidad de unir un ligando de Lor-2 y/o modular una función de Lor-2. Las variantes alélicas funcionales típicamente contendrán sólo sustituciones conservativas de uno o más aminoácidos de SEQ ID NO:2, o una sustitución, delección o inserción de residuos no críticos en regiones no críticas de la proteína.

45 Las variantes alélicas no funcionales son variantes de la secuencia de aminoácidos de la proteína Lor-2 humana que se producen de forma natural que no tienen la habilidad ni de unir un ligando de Lor-2 ni de modular una función de Lor-2. Las variantes alélicas no funcionales típicamente contendrán una sustitución no conservativa, una delección, o inserción o truncación prematura de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o una sustitución, inserción o delección en residuos críticos o en regiones críticas. La presente invención además proporciona ortólogos no humanos de la proteína Lor-2 humana dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los ortólogos de la proteína Lor-2 humana son proteínas que se han aislado de organismos no humanos y que poseen la misma capacidad de unir ligandos de Lor-2 y/o de modular una función de Lor-2 que la proteína Lor-2 humana. Los ortólogos de la proteína Lor-2 humana pueden ser identificados fácilmente ya que comprenden una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a la secuencia de SEQ ID NO:2.

50 Además, dentro del alcance de las reivindicaciones las moléculas de ácidos nucleicos que codifican otros miembros de la familia Lor-2 (p. ej., Lor-2-2), y que por lo tanto tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias de Lor-2 de SEQ ID NO:1 se entiende que están dentro del ámbito de la invención. Por ejemplo, un ADNc de rata puede identificarse basándose en la secuencia de nucleótidos de la Lor-2 humana. Además, las moléculas de ácidos

ES 2 320 622 T3

nucleicos que codifican proteínas Lor-2 de diferentes especies, y que por lo tanto tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias de Lor-2 de SEQ ID NO:1 se entiende que están dentro del ámbito de la invención.

Las moléculas de ácidos nucleicos que se corresponden con las variantes alélicas naturales y homólogos de los 5 ADNc de Lor-2 de la invención pueden ser aisladas basándose en su homología con los ácidos nucleicos divulgados aquí utilizando los ADNc divulgados aquí, o una parte de los mismos, como una sonda de hibridación de acuerdo con las técnicas estándar de hibridación bajo condiciones de hibridación restringentes.

Por consiguiente, en otro aspecto, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende un fragmento 10 de al menos 500 nucleótidos de un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1. En otro aspecto, el ácido nucleico tiene al menos 550, ó 600 nucleótidos de longitud. Como se utiliza aquí, el término “hibrida bajo condiciones restringentes” se pretende que describa unas condiciones de hibridación y lavado bajo las cuales las secuencias de nucleótidos de al menos el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ó más de homología con cualquier otra permanecen típicamente hibridadas con esa otra. Preferiblemente, las condiciones 15 son tales que secuencias de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, aún más preferiblemente al menos el 85% al 90%, más preferiblemente al menos el 95% de homología con cualquier otra permanece típicamente hibridada con esa otra. Estas condiciones restringentes son conocidas por un experto medio en la materia y pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989),6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferido, no limitante, de unas condiciones restringentes de hibridación es la 20 hibridación en cloruro sódico 6X/citrato sódico (SSC) a unos 45°C, seguida de uno o más lavados en SSC 0.2X, SDS 0.1% a 50°C, preferiblemente a 55°C, preferiblemente a 60°C y más preferiblemente a 65°C. Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención que hibrida bajo condiciones restringentes con la secuencia de SEQ ID NO:1 se corresponde con una molécula de ácido nucleico que se produce de forma natural. Como se utiliza aquí, una molécula de ácido nucleico que “se produce de forma natural” hace referencia a una molécula de 25 ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza (p. ej., codifica una proteína natural).

Además de las variantes alélicas que se producen de forma natural de las secuencias de Lor-2 que pueden existir en la población, un experto medio en la materia se dará cuenta de que se pueden introducir cambios mediante mutaciones 30 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, conduciendo así los cambios a la secuencia de aminoácidos de las proteínas Lor-2 codificadas, sin alterar la habilidad funcional de las proteínas Lor-2. Por ejemplo, pueden producirse sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos “no esenciales” en la secuencia de SEQ ID NO:1. Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que puede ser alterado a partir de la secuencia nativa (*wild-type*) de Lor-2 (p. ej., la secuencia de SEQ ID NO:2) sin alterar la actividad biológica, 35 mientras que un residuo de aminoácido “esencial” es requerido para que exista actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos que se conservan entre las proteínas Lor-2 de la presente invención, se prevé que sean especialmente no susceptibles a la alteración (p. ej., residuos de aminoácidos conservados entre las proteínas alineadas en la Figura 5). Además, los residuos de aminoácidos que se definen por los dominios SRCR son especialmente no 40 susceptibles a la alteración. Asimismo, los residuos aminoácidos adicionales que se conservan entre las proteínas Lor-2 de la presente invención y otros miembros de la superfamilia de la lisil oxidasa o de otras familias de proteínas que contienen LOX no es probable que sean susceptibles a la alteración.

Por consiguiente, dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas Lor-2 que contienen cambios en los residuos de aminoácidos 45 que no son esenciales para su actividad. Estas proteínas Lor-2 que difieren en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 todavía retienen la actividad biológica. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95%, p. ej., 98%, 99% ó más idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína Lor-2 homóloga a la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:2 puede crearse mediante la introducción de una o más sustituciones, adiciones o delecciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1, de forma que una o más sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos se introducen en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1 mediante técnicas estándar, 50 como la mutagénesis dirigida o la mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones conservativas de aminoácidos se producen en uno o más sitios previstos de residuos de aminoácidos no esenciales. Una “sustitución conservativa de aminoácido” es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares 55 están definidas en el estado de la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en el carbono beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial previsto en una proteína Lor-2 se reemplaza preferiblemente 60 con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. De forma alternativa, en otro aspecto, las mutaciones pueden introducirse de forma aleatoria a lo largo de toda o parte de la secuencia que codifica Lor-2, como las producidas por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse por actividad biológica 65 de Lor-2 para identificar los mutantes que retienen su actividad. A continuación de la mutagénesis de la secuencia

ES 2 320 622 T3

de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1, la proteína codificada puede expresarse recombinantemente y se puede determinar la actividad de la proteína.

Una proteína Lor-2 mutante puede ser analizada para la habilidad de (1) entrecruzar un componente de la matriz extracelular; (2) regular la resorción ósea; (3) regular el metabolismo del cobre; (4) modular la maduración y/o estabilizar los componentes de la matriz extracelular; (5) regular la señalización celular; (6) regular la adhesión celular; (7) regular los procesos celulares cardíacos; o (8) modular un desorden relacionado con Lor-2 como se define aquí.

Además de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteínas Lor-2 descritas más arriba, otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos aisladas que son antisentido de las mismas. Un ácido nucleico “antisentido” comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria del ácido nucleico “sentido” que codifica una proteína, p. ej., complementaria a la hebra codificante de una molécula de ADNc de doble hebra o complementaria a una secuencia de ARNm. De esta forma, un ácido nucleico antisentido puede unirse mediante puentes de hidrógeno al ácido nucleico sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una hebra codificante de Lor-2 completa, o sólo a una porción de la misma. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido de una “región codificante” de la hebra codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica Lor-2. El término “región codificante” hace referencia a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que son traducidos en residuos de aminoácidos (p. ej., la región codificante de Lor-2 humana se corresponde con los nucleótidos 143-2401 de SEQ ID NO:1). En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido de una “región no codificante” de la hebra codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica Lor-2. El término “región no codificante” hace referencia a las secuencias 5’ y 3’ que flanquean la región codificante que no se traducen en aminoácidos (es decir, también hace referencia a las regiones no traducidas 5’, que se corresponden con los nucleótidos 1-142 de SEQ ID NO:1, y 3’, que se corresponden con los nucleótidos 2402-2920 de SEQ ID NO:1).

Dadas las secuencias de la hebra codificante que codifica la Lor-2 divulgada aquí (p. ej., SEQ ID NO:1), los ácidos nucleicos antisentido de la invención pueden ser diseñados de acuerdo con las normas del emparejamiento de bases de Watson y Crick. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a toda la región codificante del ARNm de Lor-2, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es antisentido de sólo una parte del ARNm de Lor-2 como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un ácido nucleico antisentido de la invención puede construirse utilizando la síntesis química y reacciones de unión enzimática empleando procedimientos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (p. ej., un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente utilizando nucleótidos que se producen de forma natural o nucleótidos modificados de varias formas diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física de la doble cadena formada entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, p. ej., se pueden utilizar fosforotioato derivados y sustituciones de acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-clorouracil, 5-iodouracil, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetyl) uracil, 5-carboximetyl aminometil-2-tiouridina, 5-carboximetyl aminometil uracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetyluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-inetil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-oxiacético metilester, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. De forma alternativa, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente utilizando un vector de expresión en el que se sub-clone un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, un ARN transcrita a partir del ácido nucleico insertado estará en una orientación antisentido respecto al ácido nucleico de interés, descrito más ampliamente en las sub-secciones siguientes).

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención se administran típicamente a un sujeto o se generan *in situ* de manera que hibridan con o se unen a un ARNm celular y/o a un ADN genómico que codifica la proteína Lor-2 para inhibir así la expresión de la proteína, p. ej., mediante la inhibición de la transcripción y/o traducción. La hibridación puede suceder por complementariedad convencional de los nucleótidos para formar una doble cadena estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a dobles cadenas de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Un ejemplo de una ruta de administración de las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención incluye la inyección directa en un tejido. De forma alternativa, las moléculas de ácidos nucleicos antisentido de la invención pueden modificarse para que se dirijan a células seleccionadas y después administrarlas por vía sistémica. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas antisentido pueden modificarse de forma que se unan específicamente a receptores o antígenos expresados sobre la superficie de una célula seleccionada, p. ej., mediante la unión de las moléculas de ácidos nucleicos antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a los receptores de la superficie celular o a los antígenos. Las moléculas de ácidos nucleicos antisentido pueden también ser transportadas a las células utilizando los vectores descritos aquí. Para alcanzar una concentración intracelular suficiente de las moléculas antisentido, se prefieren los vectores construidos de manera que la molécula de ácido nucleico antisentido se sitúa bajo el control de un promotor fuerte poI II o poI III.

En otro aspecto más, la molécula de ácido nucleico antisentido de la invención es una molécula de ácido nucleico α -anómérico. Una molécula de ácido nucleico α -anómérico forma híbridos específicos de doble cadena con ARN complementario en los que, al contrario que las unidades β normales, las cadenas corren paralelas una a la otra (Gaultier

et al. (1987) Nucleic Acids. Res. 15: 6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido puede también comprender un 2'-o-metil ribonucleótido (Inoue *et al.* (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) o un análogo de ARN-ADN químérico (Inoue *et al.* (1987) FEBS Lett. 215:327-330). En otro aspecto más, un ácido nucleico antisentido de la invención es una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que son capaces de romper un ácido nucleico de cadena simple, como el ARNm, con el cual tengan una región complementaria. Así, las ribozimas (p. ej., las ribozimas de cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach (1988) Nature 334:585-591)) pueden utilizarse para romper catalíticamente transcritos de ARNm de Lor-2 para de esta forma inhibir la traducción del ARNm de Lor-2. Una ribozima que tenga especificidad por un ácido nucleico que codifique Lor-2 puede diseñarse basándose en la secuencia de nucleótidos del ADNc de Lor-2 aquí divulgado (es decir, SEQ ID NO:1). Por ejemplo, un derivado de un ARN de L-19 IVS de *Tetrahymena* puede construirse de manera que la secuencia de nucleótidos del sitio activo sea complementaria a la secuencia de nucleótidos que va a romperse en un ARNm que codifica Lor-2. Veáse, p. ej., Cech *et al.* Patente Estadounidense Nº 4,987,071; y Cech *et al.* Patente Estadounidense Nº 5,116,742. De forma alternativa, un ARNm de Lor-2 puede utilizarse para seleccionar un ARN catalítico que tenga un actividad ribonucleasa específica a partir de un pool de moléculas de ARN. Véase, p. ej., Bartel, D. y Szostak, J.W. (1993) Science 261: 1411-1418.

De forma alternativa, la expresión del gen Lor-2 puede inhibirse teniendo como diana secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora de Lor-2 (p. ej., el promotor y/o *enhancers* (potenciadores) de Lor-2) para formar estructuras de triple hélice que impiden la transcripción del gen Lor-2 en las células diana. Véase de forma general, Helene, C. (1991) Anticancer Drug Des. 6(6):569-84; Helene, C. *et al.* (1992) Ann. N.Y. Acad Sci. 660:27-36; y Maher, L.J. (1992) Bioassays 14(12):807-15.

En otro aspecto más, las moléculas de ácido nucleico de Lor-2 de la presente invención pueden modificarse en la base nitrogenada, los residuos de azúcar o en la cadena de fosfato para mejorar, p. ej., la estabilidad, hibridación, o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la desoxirribofosa fosfato de las moléculas de ácidos nucleicos puede modificarse para generar ácidos nucleicos peptídicos (véase Hyrup B. *et al.* (1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4 (1): 5-23). Como se utilizan aquí, los términos "ácidos nucleicos peptídicos" o "PNAs" hacen referencia a imitaciones de ácidos nucleicos, p. ej., imitación de ADN, en la que la desoxirribofosa fosfato se sustituye por un pseudopeptido y sólo se mantienen las cuatro nucleobases naturales. El esqueleto neutro de los PNAs se ha demostrado que permite la hibridación específica al ADN y ARN bajo condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de PNA puede llevarse a cabo utilizando protocolos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en Hyrup B. *et al.* (1996) más arriba; Perry-O'Keefe *et al.* PNAS 93: 14670-675.

Los PNAs de moléculas de ácidos nucleicos de Lor-2 pueden utilizarse en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Por ejemplo, los PNAs pueden utilizarse como agentes antisentido o antigénicos para la modulación específica de secuencia de la expresión génica, por ejemplo, induciendo la detención de la transcripción o la traducción o inhibiendo la replicación. Los PNAs de las moléculas de ácidos nucleicos de Lor-2 pueden también utilizarse en el análisis de mutaciones de un único par de bases en un gen (p. ej., anclaje por PCR dirigido a PNAs); como "enzimas de restricción artificiales" cuando se utilizan en combinación con otras enzimas, (p. ej., nucleasas S1 (Hyrup B. (1996) más arriba)); o como sondas o cebadores para la secuenciación del ADN o la hibridación (Hyrup B. *et al.* (1996) Más arriba; Perry-O'Keefe más arriba).

En otro aspecto, los PNAs de Lor-2 pueden modificarse (p. ej., para mejorar su estabilidad o adhesión celular), mediante la unión de grupos lipofílicos o de otros grupos ayudantes al PNA, mediante la formación de quimeras de PNA-ADN, o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de transporte de medicamentos conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, las quimeras de PNA-ADN de moléculas de ácidos nucleicos de Lor-2 pueden generarse de manera que combinen las propiedades ventajosas del PNA y del ADN. Estas quimeras permiten a las enzimas que reconocen el ADN (p. ej., ARNasa H y ADN polimerasas) interaccionar con la porción de ADN mientras que la porción de PNA proporcionará una alta afinidad de unión y especificidad. Las quimeras de PNA-ADN pueden ser ligadas utilizando ligandos de longitud adecuada seleccionados en términos de apilamiento de bases, número de uniones entre las nucleobases, y orientación (Hyrup B. (1996) más arriba). La síntesis de quimeras de PNA-ADN puede llevarse a cabo como se describe en Hyrup B. (1996) más arriba y Finn P.J. *et al.* (1996) Nucleic Acids Res. 24 (17): 3357-63. Por ejemplo, una cadena de ADN puede sintetizarse sobre un soporte sólido utilizando química estándar de emparejamiento con fosforamidita y los análogos de nucleósidos modificados, p. ej., 5'-(4-metoxitritil) amino-5'-desoxi-timidina fosforamidita, pueden utilizarse entre el PNA y el extremo 5' del ADN (Mag, M. *et al.* (1989) Nucleic Acid Res. 17: 5973-88). Los monómeros de PNA se emparejan entonces de manera escalonada para producir una molécula químérica con un segmento PNA 5' y un segmento ADN 3' (Finn P.J. *et al.* (1996) más arriba). De forma alternativa, las moléculas químéricas pueden sintetizarse con un segmento ADN 5' y un segmento PNA 3' (Petersen, K.H. *et al.* (1975) Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119-1124).

En otros aspectos, el oligonucleótido puede incluir otros grupos añadidos como péptidos (p. ej., para dirigirse hacia los receptores de la célula hospedadora *in vivo*), o agentes que faciliten el transporte a través de la membrana celular (véase, p. ej., Letsinger *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. US. 86:6553-6556; Lemaitre *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652; Publicación PCT Nº W088/09810, publicada el 15 de Diciembre, 1988) o la barrera hematoencefálica (véase, p. ej., Publicación PCT Nº W089/10134, publicada el 25 de Abril, 1988). Además, los oligonucleótidos pueden modificarse con agentes inductores de la hibridación por segmentación (Véase, p. ej., Krol *et al.* (1988) BioTechniques 6:958-976) o agentes intercalantes. (Véase, p. ej., Zon (1988) Pharm. Res. 5:539-549). Con este objetivo, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula (p. ej., un péptido, un agente in-

ductor de la hibridación por entrecruzamiento, un agente transportador, o un agente inductor de la hibridación por segmentación).

II. *Proteínas Lor-2 Aisladas y Anticuerpos Anti-Lor-2*

5 Un aspecto de la invención se refiere a proteínas Lor-2 aisladas, y porciones biológicamente activas de las mismas, así como fragmentos polipeptídicos adecuados para su uso como inmunógenos para obtener anticuerpos anti-Lor-2. En un aspecto, las proteínas Lor-2 nativas pueden aislarse a partir de células o tejidos mediante un esquema de 10 purificación apropiado utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas. En otro aspecto, las proteínas Lor-2 se producen mediante técnicas de ADN recombinante. De forma alternativa a la expresión recombinante, una proteína o polipéptido de Lor-2 puede sintetizarse químicamente utilizando técnicas estándar de síntesis de péptidos.

Una proteína “aislada” o “purificada” o una porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes provenientes de la célula o tejido del cual se deriva la proteína 15 Lor-2, o sustancialmente libre de precursores químicos o de otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. El lenguaje “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de la proteína Lor-2 en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de forma recombinante. En otro aspecto, el lenguaje “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de la proteína Lor-2 que tienen menos del 30% (en peso seco) de componentes que no son proteína Lor-2 (también referidos 20 aquí como una “proteína contaminante”), más preferiblemente menos del 20% de componentes que no son proteína Lor-2, aún más preferiblemente menos del 10% de componentes que no son proteína Lor-2, y más preferiblemente menos del 5% de componentes que no son proteína Lor-2. Cuando la proteína Lor-2 o la porción biológicamente activa de la misma se producen de forma recombinante, se prefiere también que esté sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, que el medio de cultivo represente menos del 20%, más preferiblemente menos del 10%, y más 25 preferiblemente menos del 5% del volumen de la preparación de proteína.

El lenguaje “sustancialmente libre de precursores químicos o de otros productos químicos” incluye preparaciones de proteína Lor-2 en las que la proteína se separa de los precursores químicos o de otros productos químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. En un aspecto, el lenguaje “sustancialmente libre de precursores 30 químicos o de otros productos químicos” incluye preparaciones de proteína Lor-2 que tienen menos del 30% (en peso seco) de precursores químicos o de productos químicos que no son Lor-2, más preferiblemente menos del 20% de precursores químicos o de productos químicos que no son Lor-2, aún más preferiblemente menos del 10% de precursores químicos o de productos químicos que no son Lor-2, y más preferiblemente menos del 5% de precursores químicos o de productos químicos que no son Lor-2.

35 Las porciones biológicamente activas de una proteína Lor-2 dentro del ámbito de las reivindicaciones incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína Lor-2, p. ej., la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2, incluyendo menos aminoácidos que las proteínas Lor-2 de longitud completa, y mostrando al menos una actividad de una proteína Lor-2. Típicamente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de 40 la proteína Lor-2. En otro aspecto, una porción biológicamente activa de una proteína Lor-2 comprende una secuencia señal y/o es secretada. En otro aspecto, una porción biológicamente activa de una proteína Lor-2 carece de una secuencia señal y/o es intracelular.

45 Se entiende que una porción biológicamente activa de una proteína Lor-2 preferida de la presente invención puede contener al menos uno de los dominios estructurales identificados anteriormente. Una porción biológicamente activa de una proteína Lor-2 más preferida puede contener al menos dos de los dominios estructurales identificados anteriormente. Además, otras porciones biológicamente activas, en las que otras regiones de la proteína se eliminan, pueden 50 prepararse mediante técnicas recombinantes y evaluarse para una o más actividades funcionales de la proteína Lor-2 nativa.

En un aspecto preferido, la proteína Lor-2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2. En otros aspectos, la proteína Lor-2 es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2, y mantiene la actividad funcional de una proteína que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2, 55 aunque difiera en la secuencia de aminoácidos debido a variaciones alélicas naturales o mutagénesis, como se describe en detalle en la sub-sección I de más arriba.

Por consiguiente, en otro aspecto, la proteína Lor-2 es una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95%, p. ej., 98%, 99%, ó más idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y mantiene la actividad funcional de las proteínas Lor-2 mostradas en SEQ ID NO:2.

60 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines comparativos óptimos (p. ej., se pueden introducir gaps en una o en ambas de una primera y segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para un alineamiento óptimo y las secuencias 65 no homólogas, pueden ser ignoradas por fines comparativos). En un aspecto preferido, la longitud de una secuencia de referencia alineada por fines comparativos es al menos el 30%, preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, aún más preferiblemente al menos el 60% y aún más preferiblemente al menos el 70%, 80%, ó 90% de la longitud de la secuencia de referencia (p. ej., cuando se alinea una segunda secuencia con la secuencia

ES 2 320 622 T3

de aminoácidos de Lor-2 de SEQ ID NO:2 que tiene 753 residuos de aminoácidos, al menos 300, preferiblemente al menos 400, más preferiblemente al menos 500, aún más preferiblemente al menos 600, y aún más preferiblemente al menos 650, 700 ó 753 residuos de aminoácidos están alineados). Se comparan entonces los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en 5 la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido con la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se utiliza aquí la “identidad” de aminoácido o de ácido nucleico es equivalente a “homología” de aminoácido o de ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias se calcula en función del número de posiciones idénticas que comparten las 10 secuencias, teniendo en cuenta el número de gaps, y la longitud de cada gap, cuya introducción es necesaria para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias puede lograrse utilizando un algoritmo matemático. En un aspecto preferido, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que ha 15 sido incorporado en el programa GAP del paquete de software CGC (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando o una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de gap de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. En otro aspecto más preferido, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el programa GAP del paquete de software CGC (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de gap de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. 20 En otro aspecto, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se determina utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) (disponible en <http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>), utilizando una matriz de peso de los residuos PAM120, una penalización por longitud de gap de 12 y una penalización de gap de 4.

25 Las secuencias de ácidos nucleicos y de la proteína de la presente invención pueden además utilizarse como una “secuencia problema” para llevar a cabo una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia u otras secuencias relacionadas. Estas búsquedas pueden realizarse utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas BLAST de nucleótidos pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para 30 obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos de Lor-2 de la invención. Las búsquedas BLAST de proteínas pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína Lor-2 de la invención. Para obtener alineamientos abiertos (*gapped*) con fines comparativos, se puede utilizar el programa Gapped BLAST como 35 se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden emplear los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

40 La invención también proporciona proteínas quiméricas o de fusión Lor-2. Como se utiliza aquí, una “proteína químérica” o “proteína de fusión” Lor-2 comprende un polipéptido Lor-2 unido operativamente a un polipéptido que no es Lor-2. Un “polipéptido Lor-2” hace referencia a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a Lor-2, mientras que un “polipéptido que no es Lor-2” hace referencia a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína que no es sustancialmente homóloga de la proteína Lor-2, p. ej., una proteína que es diferente de la proteína Lor-2 y que se deriva del mismo organismo o de otro diferente. Dentro 45 de una proteína de fusión Lor-2 el polipéptido de Lor-2 puede corresponderse con toda o con una parte de una proteína Lor-2. En un aspecto preferido, una proteína de fusión Lor-2 comprende al menos una porción biológicamente activa de una proteína Lor-2. En otro aspecto preferido, una proteína de fusión Lor-2 comprende al menos dos porciones biológicamente activas de una proteína Lor-2. Dentro de la proteína de fusión, el término “unido operativamente” se pretende que indique que el polipéptido Lor-2 y el polipéptido que no es Lor-2 están fusionados en fase el uno al otro. El polipéptido que no es Lor-2 puede estar fusionado al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del polipéptido 50 Lor-2.

55 Por ejemplo, en un aspecto, la proteína de fusión es un proteína de fusión GST-Lor-2 en la que las secuencias de Lor-2 se fusionan al extremo C-terminal de las secuencias de GST. Estas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de Lor-2 recombinante. En otro aspecto, la proteína de fusión es una proteína Lor-2 que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N-terminal. Por ejemplo, la secuencia señal de Lor-2 nativa murina (es decir, en los aminoácidos 1 a 25 de SEQ ID NO:2) puede ser eliminada y sustituida con una secuencia señal de otra proteína. En ciertas células hospedadoras (p. ej., células hospedadoras de mamífero), la expresión y/o secreción de Lor-2 puede incrementarse a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

60 Las proteínas de fusión Lor-2 de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas y administrarse a sujetos *in vivo*. Las proteínas de fusión Lor-2 pueden utilizarse para afectar la biodisponibilidad de una molécula diana de Lor-2. El uso de proteínas de fusión Lor-2 puede ser terapéuticamente útil para el tratamiento de desórdenes cardiovasculares (p. ej., fallo cardiaco congestivo). Además, las proteínas de fusión Lor-2 de la invención pueden utilizarse como inmunógenos para producir anticuerpos anti-Lor-2 en un sujeto, para purificar los ligandos de Lor-2 y 65 en ensayos de cribado para identificar moléculas que inhiban la interacción de Lor-2 con una molécula diana de Lor-2.

Preferiblemente, una proteína quimérica o de fusión Lor-2 de la invención se produce mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican para las diferentes secuencias de polipéptidos están ligados entre sí en fase de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo mediante el empleo de extremos romos o de extremos escalonados para la unión, de digestión con enzimas de restricción para proporcionar

- 5 los extremos apropiados, de relleno de los extremos cohesivos de forma apropiada, tratando con fosfatasa alcalina para evitar las uniones no deseadas, y realizando una unión enzimática. En otro aspecto, los genes de fusión pueden sintetizarse mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores automáticos de ADN. De forma alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores anclados que incrementan 10 los extremos sobresalientes complementarios entre dos fragmentos genéticos consecutivos que pueden posteriormente ser alineados y reamplificados para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992). Además, muchos vectores de expresión están disponibles comercialmente y ya codifican una molécula de fusión (p. ej., un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifique Lor-2 puede clonarse en ese vector de expresión de manera que la molécula de fusión se une en fase a la 15 proteína Lor-2.

- 15 La presente invención también se refiere a variantes de las proteínas Lor-2 dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas que funcionan como agonistas de Lor-2 (análogo) o como antagonistas de Lor-2. Las variantes de las proteínas Lor-2 pueden generarse mediante mutagénesis, p. ej., mutación específica puntual o truncamiento de una proteína Lor-2. Un agonista de las proteínas Lor-2 puede mantener sustancialmente las mismas, o una parte, de las actividades 20 biológicas de la forma natural de una proteína Lor-2. Un antagonista de una proteína Lor-2 puede inhibir una o más de las actividades de la forma natural de la proteína Lor-2 mediante, por ejemplo, la inhibición competitiva de la actividad proteasa de una proteína Lor-2. Así, se pueden obtener efectos biológicos específicos mediante el tratamiento con una variante de función limitada. En un aspecto, el tratamiento de un sujeto con una variante que tenga una parte de las 25 actividades biológicas de la forma natural de la proteína tiene menos efectos secundarios en un sujeto en comparación con el tratamiento con la forma natural de la proteína.

- En un aspecto, las variantes de una proteína Lor-2 que funcionan como agonistas de Lor-2 (análogo) o como antagonistas de Lor-2 pueden identificarse mediante cribado de combinación en librerías de mutantes, p. ej., mutantes truncados, de una proteína Lor-2 para la actividad de los agonistas o antagonistas de la proteína Lor-2. En un aspecto, 30 una librería variegada de variantes de Lor-2 se genera mediante mutagénesis de combinación a nivel del ácido nucleico y está codificada por una librería variegada de genes. Una librería variegada de variantes de Lor-2 puede producirse mediante, por ejemplo, la unión enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos dentro de secuencias génicas de manera que un grupo degenerado de potenciales secuencias Lor-2 es expresable como polipéptidos individuales, o de forma alternativa, como un grupo de grandes proteínas de fusión (p. ej., para presentación en fagos) que contienen 35 el grupo de secuencias Lor-2. Hay varios métodos que pueden ser utilizados para producir librerías de potenciales variantes de Lor-2 a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede llevarse a cabo en un sintetizador automático de ADN, y el gen sintético se une entonces a un vector de expresión apropiado. El uso de un grupo de genes degenerados permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el grupo potencial de secuencias Lor-2 de interés. Los métodos para sintetizar 40 oligonucleótidos degenerados se conocen en el estado de la técnica (véase, p. ej., Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477.

- Además, las librerías de fragmentos de secuencias que codifican una proteína Lor-2 pueden utilizarse para generar 45 una población variegada de fragmentos de Lor-2 para el cribado y posterior selección de variantes de una proteína Lor-2. En un aspecto, una librería de fragmentos de secuencias codificantes puede generarse mediante el tratamiento de un fragmento de doble cadena obtenido por PCR de una secuencia codificante de Lor-2 con una nucleasa bajo condiciones en las que ocurre sólo una mella (*nick*) por molécula, desnaturalizando la doble cadena de ADN, renaturalizando el ADN para formar la doble cadena de ADN que puede incluir pares de base sentido/antisentido provenientes de 50 diferentes productos con mellas (*nicked*), eliminando las porciones de cadena simple de las dobles cadenas reformadas mediante el tratamiento con la nucleasa S1, y uniendo la librería de fragmentos resultantes en un vector de expresión. Mediante este método, puede derivarse una librería de expresión que codifique el extremo N-terminal, y fragmentos internos de varios tamaños de la proteína Lor-2.

- 55 Se conocen varias técnicas en el estado de la técnica para el cribado de productos génicos de librerías de combinación creadas mediante mutaciones puntuales o truncamientos, y para el cribado de librerías de ADNc para productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Estas técnicas son adaptables para un cribado rápido de una librería de genes generada mediante mutagénesis de combinación de proteínas Lor-2. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para el cribado de grandes librerías de genes típicamente incluyen clonar la librería de genes en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la resultante 60 librería de vectores, y expresar los genes de combinación bajo condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilite el aislamiento del vector que codifique el gen cuyo producto se detecta. La mutagénesis de conjuntos recursivos (REM), una nueva técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en las librerías, puede utilizarse en combinación con los análisis de cribado para identificar las variantes de Lor-2 (Arkin y Yourvan (1992) *PNAS* 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331).

En un aspecto, el análisis basado en las células puede aprovecharse para analizar una librería variegada de Lor-2. Por ejemplo, una librería de vectores de expresión puede ser transfectada en una línea celular que normalmente sinteti-

ce y secrete Lor-2. Las células transfectadas se cultivan entonces de manera que Lor-2 y un mutante concreto de Lor-2 son secretados y puede detectarse el efecto de la expresión del mutante sobre la actividad de Lor-2 en el sobrenadante celular, p. ej., mediante alguno de los ensayos enzimáticos. El ADN plasmídico puede entonces recuperarse a partir de las células con el marcador de inhibición, o de forma alternativa, con el marcador de potenciación de la actividad Lor-2, y se caracterizan en detalle los clones individuales.

Una proteína Lor-2 aislada, o una porción o fragmento de la misma, puede utilizarse como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unan a Lor-2 utilizando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Pueden utilizarse como inmunógenos una proteína Lor-2 de longitud completa o, de forma alternativa, 10 los fragmentos de péptidos antigenicos de Lor-2. Los péptidos antigenicos de Lor-2 comprenden al menos 8 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2 y abarca un epítopo de Lor-2 de manera que el anticuerpo obtenido contra el péptido forma un complejo inmuno-específico con Lor-2. Preferiblemente, el péptido antigenico comprende al menos 10 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 15 residuos de aminoácidos, aún más preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácidos, y más preferiblemente al menos 30 15 residuos de aminoácidos.

Los epítopos preferidos incluidos en el péptido antigenico son regiones de Lor-2 que están localizadas en la superficie de la proteína, p. ej., regiones hidrofílicas, regiones hidrofóbicas, regiones alfa, regiones beta, regiones en espiral, regiones con giros, regiones flexibles, y antigenicidad como se muestra en la Figura 4. En un aspecto, un 20 péptido antigenico está incluido en los aminoácidos 49-56 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto, un péptido antigenico está incluido en los aminoácidos 291-305 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto más, un péptido antigenico está incluido en los aminoácidos 735-749 de SEQ ID NO:2.

Un inmunógeno de Lor-2 se utiliza típicamente para preparar anticuerpos mediante la inmunización de un sujeto 25 adecuado (p. ej., conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, la proteína Lor-2 expresada de forma recombinante o un polipéptido Lor-2 sintetizado químicamente. La preparación puede además incluir un adyuvante, como un adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto adecuado con una preparación inmunogénica de Lor-2 induce una respuesta de anticuerpos policlonales anti-Lor-2.

30 De esta forma, otro aspecto de la invención se refiere a anticuerpos anti-Lor-2. El término "anticuerpo" como se utiliza aquí hace referencia a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que específicamente se une con (inmunorreacciona con) un antígeno, como Lor-2. Ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de 35 inmunoglobulina incluyen los fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden generarse mediante el tratamiento del anticuerpo con una enzima como la pepsina. La invención proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen a Lor-2. El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se utiliza aquí, hace referencia a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de sitio de unión al antígeno 40 capaz de inmunorreaccionar con un epítopo en particular de Lor-2. Una composición de anticuerpos monoclonales típicamente muestra un afinidad de unión única para una proteína Lor-2 en particular con la que inmunorreacciona.

Los anticuerpos policlonales anti-Lor-2 pueden prepararse como se describe más arriba mediante la inmunización 45 de un sujeto adecuado con un inmunógeno de Lor-2. El título de anticuerpos anti-Lor-2 en el sujeto inmunizado puede ser monitorizado a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, como un ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando Lor-2 inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra Lor-2 pueden aislararse a partir del mamífero (p. ej., de la sangre) y además purificarlas mediante técnicas conocidas, como la cromatografía de proteína A para obtener la fracción IgG. Transcurrido un tiempo adecuado tras la inmunización, p. ej., cuando el título de anticuerpos anti-Lor-2 es el más elevado, las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, como la técnica del hibridoma originalmente 50 descrita por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497 (véase también, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *PNAS* 76:2927-31; y Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la más reciente técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol Today* 4:72), la técnica del hibridoma del VEB (Cole *et al.* (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) o las técnicas del trioma. La tecnología para producir hibridomas productores de anticuerpos monoclonales 55 se conoce ampliamente (véase, de forma general, R. H. Kenneth, en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; M. L. Gefter *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36).

De forma alternativa a la preparación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, se puede identificar 60 y aislar un anticuerpo monoclonal anti-Lor2 mediante el cribado de una librería combinatoria de inmunoglobulina recombinante (p. ej., una librería de anticuerpos presentadores de fagos) con Lor-2 para así aislar los miembros de la librería de inmunoglobulina que se unen a Lor-2. Los equipos necesarios para generar y cribar las librerías de presentadores de fagos están disponibles comercialmente (p. ej., el *Pharmacia Recombinant Phage Antibody System*, nº catálogo 27-9400-01; y el *Stratagene SurfZAP™ Phage Display Kit*, nº catálogo 240612). Además, ejemplos de métodos y reactivos especialmente útiles para su uso en generar y cribar librerías de presentadores de anticuerpos pueden 65 encontrarse, por ejemplo, en Ladner *et al.* Patente Estadounidense Nº 5,223,409; Kang *et al.* Publicación Internacional PCT Nº WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación Internacional PCT Nº WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación Internacional PCT Nº WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación Internacional PCT Nº WO 92/15679; Breitling *et al.*

Publicación Internacional PCT Nº WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación Internacional PCT Nº WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación Internacional PCT Nº WO 92/09197; Ladner *et al.* Publicación Internacional PCT Nº WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982; y McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348: 552-554.

Adicionalmente, los anticuerpos anti-Lor-2 recombinantes, como los anticuerpos monoclonales químéricos y humanizados, que comprenden tanto las porciones humanas como las no humanas, que pueden ser generados utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, están dentro del ámbito de la invención. Estos anticuerpos monoclonales químéricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo utilizando los métodos descritos en Robinson *et al.* Solicitud Internacional Nº PCT/US86/02269; Akira, *et al.* Solicitud de Patente Europea 184,187; Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171,496; Morrison *et al.* Solicitud de Patente Europea 173,494; Neuberger *et al.* Publicación Internacional PCT Nº WO 86/01533; Cabilly *et al.* Patente Estadounidense Nº 4,816,567; Cabilly *et al.* Solicitud de Patente Europea 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *PNAS* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *PNAS* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; y Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter, Patente Estadounidense 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534; y Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Un anticuerpo anti-Lor-2 (p. ej., anticuerpo monoclonal) puede utilizarse para aislar Lor-2 mediante técnicas estándar, como la cromatografía de afinidad o la inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-Lor-2 puede facilitar la purificación de Lor-2 nativa de las células y de la Lor-2 producida de forma recombinante expresada en las células hospedadoras. Además, un anticuerpo anti-Lor-2 puede utilizarse para detectar la proteína Lor-2 (p. ej., en un lisado celular o en un sobrenadante celular) para evaluar la abundancia y el patrón de expresión de la proteína Lor-2. Los anticuerpos anti-Lor-2 pueden utilizarse de forma diagnóstica para monitorizar los niveles de proteína en un tejido como parte de un procedimiento de evaluación clínica, p. ej., para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el emparejamiento (es decir, unión física) del anticuerpo con la sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidita/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelíferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de díclorotriazolamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente es el luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aquorina, y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S o ³H.

40 III. Vectores de Expresión Recombinantes y Células Hospedadoras

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica para una proteína Lor-2 (o una parte de la misma). Como se utiliza aquí, el término “vector” hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar a otro ácido nucleico al que se ha unido (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (p. ej., vectores no episomales de mamíferos) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en el interior de la célula hospedadora, y así se replican al mismo tiempo que el genoma de la célula hospedadora. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se han unido operativamente. A estos vectores se hace referencia aquí como “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante tienen a menudo la forma de los plásmidos. En la presente especificación “plásmido” y “vector” pueden utilizarse indiferenciadamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención se pretende que incluya estas otras formas de vectores de expresión, tales como los vectores virales (p. ej., retrovirus de replicación defectiva, adenovirus y virus asociados a adenovirus), que sirven para funciones equivalentes.

55 Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención de una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en la célula hospedadora, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en base a las células hospedadoras que se van a usar para la expresión, que están operativamente unidas a la secuencia del ácido nucleico que va a ser expresada. Dentro de un vector de expresión recombinante, “operativamente unido” se pretende que signifique que la secuencia de nucleótidos de interés se une a la secuencia(s) reguladora de manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (p. ej., en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora). El término “secuencia reguladora” se pretende que incluya promotores, *enhancers* y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación). Estas secuencias reguladoras se han descrito, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y aquellas que dirigen la expresión de una secuencia de nucleótidos sólo en ciertas células hospedadoras (p. ej., secuencias reguladoras específicas de tejido).

ES 2 320 622 T3

Se apreciará por un experto medio en la materia que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en el interior de las células hospedadoras para así producir proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificadas por los ácidos nucleicos aquí descritos (p. ej., proteínas Lor-2, formas mutantes de la proteína Lor-2, proteínas de fusión, etc.)

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la expresión de proteínas Lor-2 en células procariotas y eucariotas. Por ejemplo, las proteínas Lor-2 pueden expresarse en células bacterianas como *E. coli*, células de insectos (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levaduras o células de mamíferos. Las células hospedadoras adecuadas se discuten más ampliamente en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). De forma alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo utilizando las secuencias reguladoras del promotor del T7 y la polimerasa del T7.

La expresión de proteínas en procariotas se lleva a cabo comúnmente en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o de proteínas que no son de fusión. Los vectores que codifican proteínas de fusión añaden un número de aminoácidos a una proteína codificada en él, normalmente al extremo amino de la proteína recombinante. Estos vectores que codifican proteínas de fusión típicamente sirven para tres propósitos: 1) para incrementar la expresión de la proteína recombinante; 2) para incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) para ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en una purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión que codifican proteínas de fusión, se introduce un sitio de rotura proteolítica en el punto de unión de la molécula de fusión con la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la molécula de fusión posteriormente a la purificación de la proteína recombinante. Estas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el Factor Xa, la trombina y la enteroquinasa. Típicos vectores de expresión que codifican proteínas de fusión incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína E de unión a maltosa, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

Las proteínas de fusión purificadas pueden utilizarse en los ensayos de actividad de Lor-2 (p. ej., los ensayos directos o ensayos competitivos descritos en detalle más abajo), o para generar anticuerpos específicos para las proteínas Lor-2, por ejemplo. En un aspecto preferido, una proteína de fusión Lor-2 expresada en un vector de expresión retroviral de la presente invención puede utilizarse para infectar células de la médula ósea que son posteriormente trasplantadas en receptores irradiados. La patología de los sujetos receptores se examina una vez que haya pasado tiempo suficiente (p. ej., seis (6) semanas).

Ejemplos de vectores de expresión no inducibles que codifiquen para proteínas que no sean de fusión en *E. coli* adecuados incluyen pTcr (Amann *et al.*, (1988) Gene 69:301-315) y pET 11d (Studier *et al.*, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). La expresión de genes diana a partir del vector pTcr depende de la transcripción con la ARN polimerasa del hospedador a partir de un promotor híbrido trp-lac. La expresión de genes diana a partir del vector pET 11d depende de la transcripción a partir de un promotor de fusión del gen 10-lac del T7 mediado por una ARN polimerasa viral coexpresada (T7). Esta polimerasa viral es proporcionada por las cadenas hospedadoras BL21(DE3) o HMS 174(DE3) de un profago residente que alberga un gen gn1 del T7 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

Una estrategia para maximizar la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria hospedadora con una capacidad dañada de romper catalíticamente la proteína recombinante (Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácidos nucleicos del ácido nucleico que se inserta en el vector de expresión de manera que los codones individuales para cada aminoácido son aquellos utilizados preferencialmente en *E. coli* (Wada *et al.*, (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118). Esta alteración de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas estándar de síntesis de ADN.

En otro aspecto, el vector de expresión de Lor-2 es un vector de expresión de levaduras. Ejemplos de vectores de expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYEPSecl (Baldari, *et al.*, (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, (1987) Gene 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), y picZ (InVitrogen Corp, San Diego, CA).

De forma alternativa, las proteínas Lor-2 pueden expresarse en células de insecto utilizando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de expresión de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en cultivos de células de insecto (p. ej., células Sf 9) incluyen las series pAc (Smith *et al.* (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y las series pVL (Lucklow y Summers (1989) Virology 170:31-39).

En otro aspecto más, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero utilizando vectores de expresión de mamíferos. Ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) y pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987) EMBO J. 6:187-195). Cuando se utilizan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión son proporcionadas a menudo por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores frecuentemente utilizados se derivan de polioma, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus del

ES 2 320 622 T3

Simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^a, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

5 En otro aspecto, el vector de expresión recombinante de mamíferos es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico de forma preferente en un tipo de célula particular (p. ej., los elementos reguladores específicos de tejido se utilizan para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido se conocen en el estado de la técnica. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de la albúmina (específico del hígado; Pinkert *et al.* (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), los promotores específicos de las células linfoides (Calame y Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), en particular los promotores de los receptores de las células T (Winoto y Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) y las inmunoglobulinas (Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33:729-740; Queen y Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), promotores específicos de las neuronas (p. ej., el promotor del neurofilamento; Byrne y Ruddle (1989) *PNAS* 86:5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund *et al.* (1985) *Science* 230:912-916), promotores específicos de las glándulas mamarias (p. ej., promotor del suero de la leche; Patente Estadounidense Nº 4,873,316 y Publicación de la Solicitud Europea Nº 264.166). También se incluyen los promotores reguladores del desarrollo, por ejemplo los promotores hox (Kessel y Gruss (1990) *Science* 249:374-379) y el promotor de la α -fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

20 La invención además proporciona un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la invención clonada en el interior de un vector de expresión en una orientación antisentido. Esto es, la molécula de ADN está operativamente unida a una secuencia reguladora de forma que permite la expresión (mediante la transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido del ARNm de Lor-2. De las secuencias reguladoras operativamente unidas a un ácido nucleico clonado en una orientación antisentido pueden elegirse aquellas que dirijan la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en varios tipos de células, por ejemplo de los promotores virales y/o los *enhancers*, o secuencias reguladoras pueden elegirse aquellas de dirijan la expresión constitutiva, específica de tejido o específica de tipo celular del ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de plásmido recombinante, fagérido o virus atenuado en el que los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, la actividad de la cual puede ser determinada por el tipo de célula en la que el vector es introducido. Para una discusión de la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido, véase Weintraub, H. *et al.*, *Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a células hospedadoras en las que se introduce una molécula de ácido nucleico de Lor-2 de la invención, p. ej., una molécula de ácido nucleico de Lor-2 dentro de un vector de expresión recombinante o una molécula de ácido nucleico de Lor-2 que contiene secuencias que le permiten recombinarse de forma homóloga dentro de un sitio específico del genoma de la célula hospedadora. Los términos "células hospedadora" y "célula hospedadora recombinante" se utilizan aquí de manera indiferenciada. Se entiende que estos términos se refieren no sólo a la célula de un sujeto en particular, sino a la progenie o potencial progenie de esa célula. Ya que pueden ocurrir ciertas modificaciones en sucesivas generaciones debido a las mutaciones o a las influencias del 40 ambiente, esta progenie podría, de hecho, no ser idéntica a la célula parenteral, pero aún así estarían incluidas en el ámbito del término como se utiliza aquí.

45 Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, una proteína Lor-2 puede expresarse en células bacterianas como *E. coli*, células de insectos, levaduras o mamíferos (como las células de ovario de hámster chino (CHO) o las células COS). Otras células hospedadoras adecuadas son conocidas por un experto medio en la materia.

50 Un vector de ADN puede introducirse en el interior de células procariotas o eucariotas por medio de técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se utilizan aquí, los términos "transformación" y "transfección" se pretende que hagan referencia a varias técnicas conocidas para introducir un ácido nucleico exógeno (p. ej., ADN) dentro de una célula hospedadora, incluyendo la co-precipitación con fosfato cálcico o cloruro de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación. Métodos adecuados para transformar o 55 transfectar células hospedadoras pueden encontrarse en Sambrook, *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), y otros manuales de laboratorio.

60 Para una transfección estable de las células de mamífero, es sabido que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección que se utilice, sólo una pequeña parte de las células podrá integrar el ADN exógeno en su genoma. Para identificar y seleccionar las células que han integrado el ADN, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador de selección (p. ej., resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores de selección preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a drogas, como el G418, la higromicina y el metotrexato. Un ácido nucleico que codifica un marcador de selección puede introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que codifica una proteína Lor-2 o puede introducirse en un vector aparte. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante una selección 65 por drogas (p. ej., las células que han incorporado el gen del marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Una célula hospedadora de la invención, como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo, puede utilizarse para producir (es decir, expresar) una proteína Lor-2. De acuerdo con esto, la invención proporciona además métodos para producir proteína Lor-2 utilizando las células hospedadoras de la invención. En un aspecto, el método comprende cultivar la célula hospedadora de la invención (dentro de la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica la proteína Lor-2) en un medio adecuado de forma que se produzca la proteína Lor-2. En otro aspecto, el método además comprende aislar la proteína Lor-2 del medio o de la célula hospedadora.

Las células hospedadoras de la invención también pueden utilizarse para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, en un aspecto, una célula hospedadora de la invención es un oocito fertilizado o una célula madre embrionaria dentro de la cual se han introducido secuencias que codifican Lor-2. Estas células hospedadoras pueden utilizarse para crear animales transgénicos no humanos en los que se ha introducido en su genoma secuencias exógenas o animales recombinantes homólogos en los que se han alterado las secuencias endógenas de Lor-2. Estos animales son útiles para el estudio de la función y/o actividad de una proteína Lor-2 y para identificar y/o evaluar moduladores de la actividad de Lor-2. Como se utiliza aquí, un “animal transgénico” es un animal no humano, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un roedor como la rata o el ratón, en el que una o más células del animal incluyen un transgen. Otros ejemplos de animales transgénicos incluyen primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, gallinas, anfibios, etc. Un transgen es un ADN exógeno que se ha integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico y que permanecerá en el genoma del animal adulto, dirigiendo así la expresión de un producto codificado en ese gen en uno o más tipos celulares o de tejido del animal transgénico. Como se utiliza aquí, un “animal recombinante homólogo” en un animal no humano, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ratón, en el que un gen Lor-2 endógeno ha sido alterado mediante recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula de ADN exógeno introducida en una célula del animal, p. ej., una célula embrionaria del animal, de forma previa al desarrollo del animal.

Un animal transgénico puede crearse introduciendo un ácido nucleico que codifica Lor-2 en el pronúcleo masculino de un oocito fertilizado, p. ej., mediante microinyección, infección retroviral, y permitiendo al oocito desarrollarse en una hembra adoptiva pseudo-preñada. El ADNc que tiene la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO:1 puede introducirse como un transgen en el genoma de un animal no humano. De forma alternativa, un homólogo no humano de un gen Lor-2 humano, como un gen Lor-2 de ratón o de rata, puede utilizarse como transgen. De forma alternativa, un homólogo del gen Lor-2, como un gen Lor-2-1 puede aislarse en base a la hibridación de las secuencias de ADNc de Lor-2 mostradas en SEQ ID NO:1 Y utilizarse como un transgen. Las secuencias intrónicas y las señales de poliadenilación pueden también incluirse en el transgen para incrementar la eficiencia de la expresión del transgen. Una secuencia(s) reguladora específica de tejido puede estar operativamente unida a un transgen para dirigir la expresión de una proteína Lor-2 en unas células en concreto. Los métodos para generar animales transgénicos mediante la manipulación embrionaria y la microinyección, particularmente en animales como los ratones, ha llegado a ser algo convencional en el estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en la Patente Estadounidense N° 4,736,866 y 4,870,009, las dos solicitadas por Leder *et al.*, Patente Estadounidense N° 4,873,191 por Wagner *et al.* y en Hogan, B., *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Se utilizan métodos similares para la producción de otros animales transgénicos. Un animal transgénico parental puede identificarse basándose en la presencia de un transgen Lor-2 en su genoma y/o la expresión del ARNm Lor-2 en tejidos o células del animal. Un animal transgénico parental puede entonces utilizarse para engendrar otros animales que porten el transgen. Además, los animales transgénicos portadores de un transgen que codifica una proteína Lor-2 pueden a su vez engendrar otros animales transgénicos portadores de otros transgenes.

Para crear un animal homólogo recombinante, se prepara un vector que contiene al menos una porción de un gen Lor-2 en el cual se ha introducido una delección, adición o sustitución para así alterar, p. ej., afectar la funcionalidad, el gen Lor-2. El gen Lor-2 puede ser un gen humano, pero más preferiblemente, es un homólogo no humano de un gen Lor-2 humano (p. ej., un ADNc aislado mediante hibridación en condiciones restringentes con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1). Por ejemplo, un gen Lor-2 de ratón puede utilizarse para construir una molécula de ácido nucleico homóloga recombinante, p. ej., un vector, adecuado para alterar un gen Lor-2 endógeno en el genoma del ratón. En un aspecto preferido, la molécula de ácido nucleico homóloga recombinante se diseña de manera que, tras la recombinación homóloga, el gen Lor-2 endógeno se ve alterado funcionalmente (es decir, no volverá a codificar una proteína funcional; también se conoce como vector “knock out”). De forma alternativa, la molécula de ácido nucleico homóloga recombinante puede diseñarse de manera que, tras la recombinación homóloga, el gen Lor-2 endógeno es mutado o alterado de otra forma pero todavía codifica una proteína funcional (p. ej., la región reguladora por encima del promotor (*upstream*) puede alterarse para así alterar la expresión de la proteína Lor-2 endógena). En la molécula de ácido nucleico homóloga recombinante, la porción alterada del gen Lor-2 está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por una secuencia adicional de ácidos nucleicos del gen Lor-2 para permitir que ocurra la recombinación homóloga entre el gen Lor-2 exógeno portado por la molécula de ácido nucleico homóloga recombinante y un gen Lor-2 endógeno en una célula; p. ej., una célula madre embrionaria. La secuencia de ácidos nucleicos de Lor-2 adicional en los extremos tiene una longitud suficiente para que ocurra una recombinación homóloga exitosa con el gen endógeno. Típicamente, varias kilobases del ADN flanqueante (en los dos extremos 5' y 3') se incluyen en la molécula de ácido nucleico homóloga recombinante (véase, p. ej., Thomas, K.R. y Capecchi, M. R. (1987) Cell 51: 503 para una descripción de los vectores de recombinación homóloga). La molécula de ácido nucleico homóloga recombinante se introduce en una célula, p. ej., una línea de células madre embrionarias (p. ej., mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el gen Lor-2 introducido se recombinó de forma homóloga con el gen Lor-2 endógeno (véase, p. ej., Li, E. *et al.* (1992) Cell 69:915). Las células seleccionadas pueden entonces inyectarse en un blastocisto de un animal (p. ej., un ratón) para formar una agregación de quimeras (véase, p. ej., Bradley, A. en *Teratocarcinomas and Embryonic*

- Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152). Un embrión quimérico puede entonces implantarse en una hembra adoptiva pseudo-preñada y se lleva el embrión a término. La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales puede utilizarse para engendrar animales en los que todas las células del animal contengan el ADN recombinado de forma homóloga por la transmisión del transgen por la vía germinal. Los métodos para construir moléculas de ácidos nucleicos homólogas recombinantes, p. ej., vectores, o animales homólogos recombinantes se describen con detalle en Bradley, A. (1991) *Current Opinion in Biotechnology* 2: 823-829 y en la Publicación Internacional de PCT Nº WO 90/11354 por Le Mouellec *et al.*; WO 91/01140 por Smithies *et al.*; WO 92/0968 por Zijlstra *et al.*; y WO 93/04169 por Berns *et al.*
- 10 Los animales transgénicos no humanos pueden producirse de forma que contengan sistemas de selección que permitan regular la expresión del transgen. Un ejemplo de este sistema es el sistema recombinasa *cre/loxP* del bacteriófago P1. Para una descripción del sistema recombinasa *cre/loxP*, véase, p. ej., Lakso *et al.* (1992) *PNAS* 89:6232-6236. Otro ejemplo de un sistema recombinasa es el sistema recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman *et al.* (1991) *Science* 251:1351-1355). Si un sistema recombinasa *cre/loxP* se utiliza para regular la expresión de un transgen, se requiere que los animales contengan transgenes que codifiquen tanto para la recombinasa *Cre* como para una proteína seleccionada. Estos animales pueden proporcionarse a través de la construcción de animales transgénicos "dobles", p. ej., mediante el apareamiento de dos animales transgénicos, uno que contenga un transgen que codifica una proteína seleccionada y el otro que contenga un transgen que codifique una recombinasa.
- 15 20 Los clones de los animales transgénicos no humanos aquí descritos pueden también producirse de acuerdo con el método descrito en Wilmut, I. *et al.* (1997) *Nature* 385:810-813. En resumen, una célula, p. ej., una célula somática, del animal transgénico puede aislarse y ser inducida a que abandone el ciclo de crecimiento y entrar en fase G₀. De forma alternativa, una célula, p. ej., una célula madre embrionaria, de la masa celular interna de un embrión en desarrollo puede transformarse con un transgen preferido. De forma alternativa, una célula, p. ej., una célula somática, de una línea de cultivo celular puede transformarse con un transgen preferido y ser inducida a abandonar el ciclo de crecimiento y entrar en fase G₀. La célula puede entonces fusionarse, p. ej., a través del uso de impulsos eléctricos, a un oocito enucleado de mamífero. El oocito reconstruido se cultiva entonces de manera que se desarrolla en mórula o blastocisto y se transfiere después a una hembra adoptiva pseudo-preñada. Las crías nacidas de esta hembra adoptiva serán un clón del animal del que se aisló la célula donante del núcleo, p. ej., la célula somática.
- 25 30 IV. *Composiciones Farmacéuticas*
- Las moléculas de ácidos nucleicos de Lor-2, las proteínas Lor-2, y los anticuerpos anti-Lor-2 (a los que también se hace referencia aquí como "compuestos activos") de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Estas composiciones típicamente comprenden la molécula de ácido nucleico, la proteína o el anticuerpo y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí el lenguaje "excipiente farmacéuticamente aceptable" se pretende que incluya cualquiera o todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en el estado de la técnica. Excepto en el caso de que algún medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, está contemplado el uso de estos compuestos en las composiciones. Se pueden incorporar también compuestos activos adicionales en las composiciones.
- 35 40 Una composición farmacéutica de la invención está formulada para ser compatible con su ruta de administración prevista. Ejemplos de rutas de administración incluyen parenteral, p. ej., intravenosa, oral. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la administración parenteral pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como el agua para la inyección, solución salina, aceites fijadores, polietilén glicoles, glicerina, propilén glicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos como el alcohol bencílo o el metil parabeno; antioxidantes como el ácido ascórbico o el bisulfito sódico; agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones como los acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad como el cloruro sódico o la dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede guardarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados de cristal o de plástico.
- 45 50 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación en el momento de usar de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, excipientes adecuados incluyen suero salino fisiológico, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o tampón fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida hasta el punto de que sea fácilmente inyectada por la jeringa. Debe ser estable bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El excipiente puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilén glicol, y polietilén glicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse con varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como el manitol, sorbitol, cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

ES 2 320 622 T3

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (p. ej., una proteína Lor-2 o un anticuerpo anti-Lor-2) en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados más arriba, como sea necesario, seguido de una esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados más arriba. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación que producen un polvo con el ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional proveniente de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un excipiente comestible. Se pueden almacenar en cápsulas de gelatina o comprimirse en pastillas. Para el objetivo de la administración oral terapéutica, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas. Las composiciones orales pueden también prepararse utilizando un excipiente fluido para su uso como un enjuague bucal, donde el compuesto en el excipiente fluido se aplica oralmente y se agita y expectora o se traga. Pueden incluirse como parte de la composición agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener alguno de los siguientes ingredientes, o compuestos de similar naturaleza: un ligante como la celulosa microcristalina, la goma tragacanto o la gelatina; un excipiente como el almidón o la lactosa, un agente desintegrante como el ácido algínico, el Primogel o el almidón de maíz; un lubricante como el estearato magnésico o el Sterotes; un glidante como el dióxido de silicona coloidal; un agente endulzante como la sacarosa o la sacarina; o un aditivo como la menta; metil salicilato, o aditivo sabor de naranja.

En un aspecto, los compuestos activos se preparan con excipientes que protegerán el compuesto frente a la rápida eliminación del organismo, como aquellos que controlan la formulación de liberación, incluyendo implantes y sistemas de transporte microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, como el etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de estas formulaciones son conocidos por un experto medio en la materia. Los materiales también pueden obtenerse de forma comercial de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensões liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos virales) también pueden utilizarse como excipientes farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con los métodos conocidos por un experto medio en la materia, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense Nº 4,522,811.

Es especialmente ventajoso para formular composiciones orales o parenterales hacerlo en forma unitaria de dosis para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosis como se utiliza aquí hace referencia a unidades físicamente diferenciadas adecuadas para la dosificación unitaria del sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el excipiente farmacéutico necesario. La especificación para las formas unitarias de dosis de la invención se establecen y son directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico que se quiera alcanzar en particular, y las limitaciones inherentes en el estado de la técnica de la realización de composiciones como un componente activo para el tratamiento de los individuos.

La toxicidad y eficacia terapéutica de estos compuestos puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, p. ej., para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La tasa de dosis entre los efectos tóxicos y los terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la tasa LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que muestran grandes índices terapéuticos. Aunque que los compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos pueden ser utilizados, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de transporte que dirija estos compuestos al lugar del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, así, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de ensayos con cultivos celulares y estudios en animales pueden utilizarse para formular un rango de dosis para su uso en humanos. La dosis de estos compuestos se halla preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluye el ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosis empleada y la vía de administración utilizada. Para cada compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos con cultivos celulares. Una dosis puede ser formulada en modelos animales para lograr un rango de concentración en el plasma circulante que incluye el IC50 (es decir, la concentración del compuesto prueba que logra la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Esta información puede utilizarse para determinar con más precisión las dosis útiles en humanos. Deben medirse los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención pueden insertarse en vectores y utilizarse como vectores para la terapia génica. Los vectores para la terapia génica pueden ser transportados hasta un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase Patente Estadounidense Nº 5.328,470) o mediante inyección estereotáctica (véase, p. ej., Chen *et al.* (1994) PNAS 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector para la terapia génica puede incluir al vector para la terapia génica en un disolvente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se embebe el vector para la terapia génica. De forma alternativa, cuando el vector comple-

to transportador del gen puede producirse de forma intacta en las células recombinantes, p. ej., vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que produzcan el sistema transportador de genes.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un envase, paquete, o dispensador junto con las instrucciones de administración.

V. Usos y Métodos de la Invención

10 Las moléculas de ácidos nucleicos, la proteínas, las proteínas homólogas, y los anticuerpos aquí descritos puede utilizarse en uno o más de los siguientes métodos: a) análisis de cribado; b) medicina predictiva (p. ej., ensayos de diagnóstico, ensayos pronósticos, ensayos clínicos monitorizados, y farmacogenética); y c) métodos de tratamiento (p. ej., terapéutico y profiláctico).

15 Como se describe aquí, una proteína Lor-2 de la invención tiene una o más de las siguientes actividades: (i) interacción de una proteína Lor-2 con una molécula diana de Lor-2; (ii) interacción de una proteína Lor-2 con una molécula diana de Lor-2, donde la diana de Lor-2 es un ligando; (iii) interacción de una proteína Lor-2 con una molécula diana de Lor-2, donde la diana de Lor-2 es un componente de la matriz extracelular (p. ej., colágeno o elastina); y (iv) modificación de una molécula diana de Lor-2 (p. ej., modificación post-traduccional).

20 Además como se describe aquí, una proteína Lor-2 de la invención tiene una o más de las actividades arriba mencionadas y puede así utilizarse en, por ejemplo: (1) entrecruzamiento de un componente de la matriz extracelular; (2) regulación de la resorción ósea; (3) regulación del metabolismo del cobre; (4) modulación de la maduración y/o estabilización de los componentes de la matriz extracelular; (5) regulación de la señalización celular; (6) regulación de la adhesión celular; (7) regulación de los procesos celulares cardíacos; y (8) modulación de un desorden relacionado 25 con Lor-2 como se define aquí.

30 Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención pueden utilizarse, por ejemplo, para expresar la proteína Lor-2 (p. ej., mediante un vector de expresión recombinante en una célula hospedadora en aplicaciones de terapia génica), para detectar ARNm de Lor-2 (p. ej., en una muestra biológica) o una alteración genética en un gen Lor-2, y para modular la actividad de Lor-2, como se describe más adelante. Las proteínas Lor-2 pueden utilizarse para tratar desórdenes caracterizados por una producción insuficiente o excesiva de Lor-2 o de moléculas diana de Lor-2. Además, las proteínas Lor-2 pueden utilizarse para el cribado de moléculas diana de Lor-2 que se producen de forma natural, para el cribado de fármacos o compuestos que modulen la actividad de Lor-2, así como para tratar desórdenes caracterizados por una producción insuficiente o excesiva de proteína Lor-2 o tipos de proteínas Lor-2 que tengan una actividad 35 reducida o aberrante comparada con la proteína nativa Lor-2. Además, los anticuerpos anti-Lor-2 de la invención pueden utilizarse para detectar y aislar proteínas Lor-2, regular la biodisponibilidad de las proteínas Lor-2, y modular la actividad de Lor-2.

40 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención implica un método de uso (p. ej., un ensayo diagnóstico, un ensayo pronóstico, o un método de tratamiento profiláctico/ terapéutico) donde una molécula de la presente invención (p. ej., una proteína Lor-2, una ácido nucleico de Lor-2, o un modulador de Lor-2) se utiliza, por ejemplo, para diagnosticar, pronosticar y/o tratar una enfermedad y/o condición en la que alguna de las actividades anteriormente mencionadas (es decir, actividades (i) - (iv) y (1) - (7) en el párrafo anterior) está indicada. En otro aspecto, la presente invención implica un método de uso (p. ej., un ensayo diagnóstico, un ensayo pronóstico, o un método de tratamiento 45 profiláctico/terapéutico) donde una molécula de la presente invención (p. ej., una proteína Lor-2, una ácido nucleico de Lor-2, o un modulador de Lor-2) se utiliza, por ejemplo, para el diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de sujetos, preferiblemente un sujeto humano, en el que alguna de las actividades anteriormente mencionadas está patológicamente alterada. En un aspecto preferido, los métodos de uso (p. ej., un ensayo diagnóstico, un ensayo pronóstico, o un método de tratamiento profiláctico/ terapéutico) implican la administración a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, de una molécula de la presente invención (p. ej., una proteína Lor-2, un ácido nucleico de Lor-2, o un modulador de Lor-2) para el diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento terapéutico. En otro aspecto, los métodos de uso 50 (p. ej., un ensayo diagnóstico, un ensayo pronóstico, o un método de tratamiento profiláctico/ terapéutico) implican administrar a un sujeto humano una molécula de la presente invención (p. ej., una proteína Lor-2, una ácido nucleico de Lor-2, o un modulador de Lor-2).

55 A. Ensayos de Cribado

La invención proporciona un método (al que también se hace referencia aquí como "ensayo de cribado") para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o a evaluar (p. ej., péptidos, peptidomiméticos, 60 pequeñas moléculas u otros fármacos) que se unen a las proteínas Lor-2, tienen un efecto estimulador o inhibidor, por ejemplo, sobre la expresión de Lor-2 o sobre la actividad de Lor-2, o tienen un efecto estimulador o inhibidor, por ejemplo, sobre la actividad de una molécula diana de Lor-2.

En un aspecto, la invención proporciona análisis para el cribado de compuestos candidatos o a evaluar que son 65 moléculas diana de una proteína o polipéptido Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma. En otro aspecto, la invención proporciona análisis para el cribado de compuestos candidatos o a evaluar que se unen o modulan la actividad de una proteína o polipéptido Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma. Los compuestos a evaluar de la presente invención pueden obtenerse utilizando alguno de los numerosos enfoques de métodos en

ES 2 320 622 T3

librerías combinatorias conocidos en el estado de la técnica, incluyendo: librerías biológicas; librerías de fase sólida ordenada espacialmente en paralelo o de fase líquida; métodos para librerías sintéticas que requieren deconvolución; el método para librerías “una microesfera - un compuesto”; y métodos para librerías sintéticas que utilizan selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de la librería biológica se limita a librerías de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables en péptidos, oligómeros que no son péptidos o librerías de pequeñas moléculas de compuestos (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Ejemplos de métodos para la síntesis de librerías moleculares pueden encontrarse en el estado de la técnica, por ejemplo, en: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 1979; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann *et al.* (1994). *J. Med Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y en Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

Las librerías de compuestos pueden presentarse en solución (p. ej., Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), o sobre microesferas (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacterias (Ladner USP 5,223,409), esporas (Ladner USP '409), plásmidos (Cull *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner más arriba.).

En un aspecto, un ensayo es un ensayo basado en células en el que una célula que expresa una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un compuesto prueba y se determina la habilidad del compuesto prueba para modular la actividad de Lor-2. La determinación de la habilidad del compuesto prueba para modular la actividad de Lor-2 puede lograrse mediante la monitorización de la bioactividad de la proteína Lor-2 o de una porción biológicamente activa de la misma. La célula, por ejemplo, puede ser de origen mamífero o una célula de levadura. En un aspecto preferido, la célula es una célula tumoral (p. ej., una célula aislada/cultivada a partir de un tumor o una línea celular tumoral). La determinación de la habilidad del compuesto prueba para modular la actividad de Lor-2 puede lograrse, por ejemplo, mediante el emparejamiento de la proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma con un radioisótopo o un marcador enzimático de forma que la unión de la proteína Lor-2 o la porción biológicamente activa de la misma a su molécula diana afín puede determinarse mediante la detección de la proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma marcada en un complejo. Por ejemplo, los compuestos (p. ej., proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma) pueden marcarse con ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³H, bien directa o indirectamente, y el radioisótopo detectarse mediante conteo directo de la radioemisión o mediante conteo de destellos. De forma alternativa, los compuestos pueden marcarse enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y el marcaje enzimático puede detectarse mediante determinación de la conversión de un sustrato apropiado a producto.

También está dentro del campo de esta invención determinar la habilidad de un compuesto (p. ej., proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma) para interactuar con su molécula diana afín sin el marcaje de ninguno de sus componentes. Por ejemplo, un microfisiómetro puede utilizarse para detectar la interacción de un compuesto con su molécula diana afín sin el marcaje ni del compuesto ni del receptor. McConnell, H. M. *et al.* (1992) *Science* 257:1906-1912. Como se utiliza aquí, un “microfisiómetro” (p. ej., Cytosensor) es un instrumento analítico que mide la tasa a la que una célula acidifica su medio utilizando un sensor potenciométrico activado por luz (LAPS). Los cambios en esta tasa de acidificación pueden utilizarse como indicadores de la interacción entre el compuesto y el receptor.

En un aspecto preferido, el ensayo comprende el poner el contacto una célula que expresa una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma, con una molécula diana para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto a evaluar, y determinar la habilidad del compuesto prueba para modular la actividad de la proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma, donde determinar la habilidad de un compuesto prueba para modular la actividad de la proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma, comprende determinar la habilidad del compuesto prueba para modular una actividad biológica de la célula que expresa la proteína Lor-2 (p. ej., determinar la habilidad del compuesto prueba para modular una actividad relacionada con Lor-2 como se define aquí).

En otro aspecto preferido, el ensayo comprende el poner en contacto una célula que responde a una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma, con una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma, para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto prueba, y determinar la habilidad del compuesto prueba para modular la actividad de la proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma, donde determinar la habilidad del compuesto prueba para modular la actividad de la proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma comprende determinar la habilidad del compuesto prueba para modular una actividad biológica de la célula que responde a Lor-2 (p. ej., determinar la habilidad del compuesto prueba para modular una actividad relacionada con Lor-2 como se define aquí).

En otro aspecto, un ensayo es un ensayo basado en células que comprende poner en contacto una célula que expresa una molécula diana de Lor-2 con un compuesto prueba y determinar la habilidad del compuesto prueba para modular (p. ej., estimular o inhibir) la actividad de una molécula diana de Lor-2. La determinación de la habilidad del compuesto prueba para modular la actividad de una molécula diana de Lor-2 puede lograrse, por ejemplo, determinando la habilidad de la proteína Lor-2 para unirse o interaccionar con la molécula diana de Lor-2.

ES 2 320 622 T3

La determinación de la habilidad de la proteína Lor-2 para unirse o interaccionar con una molécula diana de Lor-2 puede lograrse mediante alguno de los métodos descritos anteriormente para determinar la unión directa. En un aspecto preferido, la determinación de la habilidad de la proteína Lor-2 para unirse o interaccionar con una molécula diana de Lor-2 puede lograrse determinando la actividad de la molécula diana. Por ejemplo, la actividad de la molécula diana puede determinarse detectando la defosforilación de una proteína fosforilada. Por ejemplo, la actividad de la molécula diana puede determinarse detectando la inducción de un mensajero celular secundario de la diana (es decir, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP_3 , etc.), detectando la actividad catalítica/enzimática de la diana sobre un sustrato adecuado, detectando la inducción de un gen reportero (que comprende un elemento regulador asociado a la diana unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, p. ej., luciferasa), o detectando una respuesta celular asociada a la diana.

En otro aspecto más, un ensayo de la presente invención es un ensayo libre de células en el que una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma (p. ej., una porción que comprende al menos uno, dos, tres o cuatro dominios SRCR) se pone en contacto con un compuesto prueba y se determina la habilidad del compuesto prueba para unirse a la proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma. La unión del compuesto prueba a la proteína Lor-2 puede determinarse bien directamente o indirectamente como se describe anteriormente (p. ej., compuestos prueba marcados, por ejemplo, compuestos prueba tritiados). En un aspecto preferido, el ensayo incluye poner en contacto la proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une a Lor-2 (p. ej., una molécula diana de Lor-2) para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto prueba, y determinar la habilidad del compuesto prueba para interaccionar con una proteína Lor-2, donde la determinación de la habilidad del compuesto prueba para interaccionar con una proteína Lor-2 comprende determinar la habilidad del compuesto prueba para unirse preferentemente a Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma al compararse con el compuesto conocido.

En otro aspecto, el ensayo es un ensayo libre de células en el que una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un compuesto prueba y se determina la habilidad del compuesto prueba para modular (p. ej., estimular o inhibir) la actividad de una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma. Por ejemplo, un ensayo libre de células de la presente invención puede caracterizar un dominio LOX o una región relacionada con LOX la cual se pone en contacto con un compuesto prueba y se determina la habilidad del compuesto prueba para modular la actividad enzimática de Lor-2. La determinación de la habilidad del compuesto prueba para modular la actividad de una proteína Lor-2 puede lograrse, por ejemplo, determinando la habilidad de la proteína Lor-2 para unirse a una molécula diana de Lor-2 mediante alguno de los métodos descritos más abajo para determinar la unión directa. La determinación de la habilidad de la proteína Lor-2 para unirse a una molécula diana de Lor-2 puede también lograrse utilizando una tecnología como el Análisis de Interacciones Biomoleculares (BIA) en tiempo real. Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63: 2338-2345 y Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705. Como se utiliza aquí, "BIA" es una tecnología para el estudio de interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin el marcaje de ninguno de los participantes (p. ej., BIACore). Los cambios en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR) pueden utilizarse como indicación de las reacciones en tiempo real entre las moléculas biológicas.

En un aspecto alternativo, la determinación de la habilidad del compuesto prueba para modular la actividad de una proteína Lor-2 puede lograrse determinando la habilidad de la proteína Lor-2 para modular más la actividad de un efecto de la cascada de señalización (*downstream*) (p. ej., un componente transcripcionalmente activo relacionado con la vía de señalización cardiovascular) de una molécula diana de Lor-2. Por ejemplo, puede determinarse la actividad de una molécula efectora sobre una diana apropiada o puede determinarse la unión del efecto a una diana apropiada como se ha descrito previamente.

En otro aspecto más, el ensayo libre de células incluye poner en contacto una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une a la proteína Lor-2 para formar una mezcla de ensayo; poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto prueba, y determinar la habilidad del compuesto prueba para interaccionar con la proteína Lor-2, donde determinar la habilidad del compuesto prueba para interaccionar con la proteína Lor-2 comprende determinar la habilidad de la proteína Lor-2 para unirse preferentemente a una molécula diana de Lor-2 o modular la actividad de un molécula diana de Lor-2.

Los ensayos libres de células de la presente invención son susceptibles de utilizarse tanto para las formas solubles y/o para las formas unidas a membrana de las proteínas aisladas (p. ej., proteínas Lor-2 o porciones biológicamente activas de las mismas o receptores a los que las dianas de Lor-2 se unen). En el caso de los ensayos libres de células en los que se utilice una forma unida a membrana de una proteína aislada (p. ej., un receptor de la superficie celular) sería deseable utilizar un agente solubilizante de manera que la forma unida a membrana de la proteína aislada se mantenga en solución. Ejemplos de estos agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos como el n-octilglucósido, n-dodecilmaltósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridécipoli(etylén glicol eter)_n, 3-[3-(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato (CHAPS), 3-[3-(3-colamidopropil)dimetillamonio]-2-hidroxi-1-propano sulfonato (CHAPSO), o N-dodecyl=N, N-dimetil-3-amonio-1-propano sulfonato.

En más de un aspecto de los métodos de ensayo mencionados anteriormente de la presente invención, sería deseable inmovilizar a Lor-2 o a su molécula diana para facilitar la separación de las formas que constituyen complejos a partir de las formas que nos los constituyen de una o ambas proteínas, así como tener en cuenta la automatización del ensayo.

La unión de un compuesto prueba a la proteína Lor-2, o la interacción de una proteína Lor-2 con una molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede lograrse en cualquier recipiente adecuado para contener a los reactivos. Ejemplos de estos recipientes incluyen placas *microtiter*, tubos de ensayo, y tubos de microcentrifuga. En un aspecto, puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite a una o a las dos proteínas que se unan a la matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/Lor-2 o las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/diana pueden ser absorbidas sobre microesferas de glutatión sefara (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas *microtiter* derivadas de glutatión, que son entonces combinadas con el compuesto prueba o con el compuesto prueba y la proteína diana no absorbida o la proteína Lor-2, y la mezcla incubada bajo condiciones propicias para la formación de complejos (p. ej., en condiciones fisiológicas de sales y pH). Tras la incubación, las microesferas o los pocillos de las placas *microtiter* se lavan para eliminar los compuestos que no se han unido, se inmoviliza la matriz en el caso de las microesferas, se determinan los complejos directa o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. De forma alternativa, los complejos pueden disociarse de la matriz, y determinar el nivel de unión o de actividad de Lor-2 utilizando técnicas estándar.

Otras técnicas para la inmovilización de proteínas sobre matrices pueden también utilizarse en los ensayos de cribado de la invención. Por ejemplo, tanto una proteína Lor-2 como una molécula diana de Lor-2 pueden inmovilizarse utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Las proteínas Lor-2 o las moléculas dianas biotiniladas pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando técnicas conocidas en el estado de la técnica (p. ej., kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizándose en los pocillos cubiertos de estreptavidina en las placas de 96 pocillos (Pierce Chemical). De forma alternativa, los anticuerpos reactivos con la proteína Lor-2 o las moléculas diana pero que no interfieren con la unión de la proteína a su molécula diana pueden derivatizarse a los pocillos de la placa, y las dianas no unidas o las proteínas Lor-2 pueden atraparse en los pocillos mediante conjugación con anticuerpos. Los métodos para detectar estos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados por GST, incluyen la inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos reactivos con la proteína Lor-2 o la molécula diana, así como ensayos enzimáticos de unión que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada con la proteína Lor-2 o la molécula diana.

En otro aspecto, los moduladores de la expresión de Lor-2 se identifican en un método en el que una célula se pone en contacto con un compuesto candidato y se determina la expresión del ARNm o la proteína Lor-2. El nivel de expresión del ARNm o de la proteína Lor-2 en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión del ARNm o de la proteína Lor-2 en ausencia del compuesto candidato. El compuesto candidato puede entonces identificarse como un modulador de la expresión de Lor-2 basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de un ARNm o de una proteína Lor-2 es mayor (mayor de forma estadísticamente significativa) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de la expresión del ARNm o de la proteína. De forma alternativa, cuando la expresión del ARNm o de la proteína Lor-2 es menor (menor de forma estadísticamente significativa) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la expresión del ARNm o de la proteína Lor-2. El nivel de expresión del ARNm o de la proteína Lor-2 en las células puede determinarse mediante los métodos aquí descritos para la detección del ARNm o la proteína Lor-2.

En otro aspecto más de la invención, las proteínas Lor-2 pueden utilizarse como "proteínas cebo" en un ensayo de doble híbrido o en un ensayo de triple híbrido (véase, p. ej., Patente Estadounidense N° 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) Cell 72:223-232; Madura *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) Oncogene 8: 1693-1696; y Brent WO94/10300), para identificar otras proteínas, que se unen o interaccionan con Lor-2 ("proteínas de unión a Lor-2" o "Lor-2-bp") y están implicadas en la actividad de Lor-2. Estas proteínas de unión a Lor-2 es probable que también estén implicadas en la propagación de señales por las proteínas Lor-2 o las dianas de Lor-2 como, por ejemplo, los elementos de la cascada de señalización de una vía de señalización mediada por Lor-2. De forma alternativa, estas proteínas de unión a Lor-2 es probable que sean inhibidores de Lor-2.

El sistema de doble híbrido se basa en la naturaleza modular de la mayoría de factores transcripcionales, que consiste en dominios separables de unión al ADN o de activación. En resumen, el ensayo utiliza dos constructos de ADN diferentes. En un constructo, el gen que codifica para una proteína Lor-2 se fusiona con un gen que codifica el dominio de unión al ADN de un factor de transcripción conocido (p. ej., GAL-4). En el otro constructo, una secuencia de ADN, proveniente de una librería de secuencias de ADN, que codifica una proteína no identificada ("presa" o "muestra") se fusiona con un gen que codifica para el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si la proteína "cebo" y la proteína "presa" son capaces de interaccionar, *in vivo*, formando un complejo dependiente de Lor-2, los dominios de unión al ADN y de activación del factor de transcripción están situados muy próximos el uno del otro. Esta proximidad permite la transcripción de un gen reportero (p. ej., LacZ) que está unido operativamente a un sitio de regulación transcripcional que responde al factor de transcripción. La expresión del gen reportero puede detectarse y las colonias celulares que contienen el factor transcripcional funcional pueden aislarse y utilizarse para obtener el gen clonado que codifica la proteína que interacciona con la proteína Lor-2.

Esta invención además se refiere a agentes novedosos identificados mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente y a procesos para producir estos agentes mediante el uso de estos ensayos. Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención incluye un compuesto o agente obtenido mediante un método que comprende poner en contacto una célula que expresa Lor-2 con un compuesto prueba y determinar la habilidad del compuesto prueba para unirse a, o modular la actividad de, o la expresión de la molécula diana de Lor-2. En otro aspecto, la invención incluye

un compuesto o agente obtenido mediante un método que comprende poner en contacto una célula que expresa una molécula diana de Lor-2 con un compuesto prueba y determinar la habilidad del compuesto prueba para unirse a, o modular la actividad de, o la expresión de una molécula diana de Lor-2.

- 5 En otro aspecto, la invención incluye un compuesto o agente obtenido mediante un método que comprende poner en contacto una molécula diana de Lor-2 con una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma, para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto prueba, y determinar la habilidad del compuesto prueba para interaccionar con, o modular la actividad de una molécula diana de Lor-2. En otro aspecto, la invención incluye un compuesto o agente obtenido mediante un método que comprende poner en contacto una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma con un compuesto prueba y determinar la habilidad del compuesto prueba para unirse a, o modular (p. ej., estimular o inhibir) la actividad de la proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma. En otro aspecto más, la presente invención incluye un compuesto o agente obtenido mediante un método que comprende poner en contacto una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une a la proteína Lor-2 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto prueba, y determinar la habilidad del compuesto prueba para interaccionar con, o modular la actividad de la proteína Lor-2.

Por consiguiente, está dentro del campo de la invención utilizar ampliamente un agente identificado como se describe aquí en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, un agente identificado como se describe aquí (p. ej., un agente modulador de Lor-2, una molécula de ácido nucleico de Lor-2 antisentido, un anticuerpo específico de Lor-2, o una pareja de unión de Lor-2) puede utilizarse en un modelo animal para determinar la eficacia, la toxicidad o los efectos secundarios del tratamiento con este agente. De forma alternativa, un agente identificado como se describe aquí puede utilizarse en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de este agente. Además, esta invención se refiere a usos de agentes novedosos identificados mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente como tratamientos como se describe aquí.

La presente invención también hace referencia a usos de agentes novedosos identificados mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento como se describe aquí. Por consiguiente, está dentro del campo de la presente invención el uso de estos agentes en el diseño, formulación, síntesis, fabricación y/o producción de un fármaco o una composición farmacéutica para utilizarse en el diagnóstico, pronóstico o tratamiento, como se describe aquí. Por ejemplo, en un aspecto, la presente invención incluye un método para sintetizar o producir un fármaco o una composición farmacéutica que hace referencia a la estructura y/o propiedades de un compuesto obtenido mediante uno de los ensayos de cribado descritos anteriormente. Por ejemplo, un fármaco o una composición farmacéutica pueden ser sintetizados basándose en la estructura y/o propiedades de un compuesto obtenido mediante un método en el que una célula que expresa Lor-2 (o una molécula diana de Lor-2) se pone en contacto con un compuesto prueba y se determina la habilidad del compuesto prueba para unirse a, o modular la actividad de, Lor-2 (o una molécula diana de Lor-2). En otro aspecto ejemplar, la presente invención incluye un método para sintetizar o producir un fármaco o una composición farmacéutica basándose en la estructura y/o propiedades de un compuesto obtenido mediante un método en el que una proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un compuesto prueba y se determina la habilidad del compuesto prueba para unirse a, o modular (p. ej., estimular o inhibir) la actividad de la proteína Lor-2 o una porción biológicamente activa de la misma.

En un aspecto preferido, la presente invención incluye un método o proceso para producir un fármaco, compuesto farmacéutico o composición farmacéutica que comprende identificar un compuesto o agente que modula (p. ej., activa, inhibe, imita, etc.) la expresión o actividad de una proteína Lor-2 o una molécula diana de Lor-2 y modificar el compuesto o agente de manera que se produzca un fármaco, compuesto farmacéutico o composición farmacéutica. En otro aspecto, la presente invención incluye un método o proceso para producir un fármaco, compuesto farmacéutico o composición farmacéutica que comprende identificar un compuesto o agente que modula (p. ej., activa, inhibe, imita, etc.) la expresión o la actividad de una proteína Lor-2 o una molécula diana de Lor-2, sintetizar el compuesto o agente así identificado y modificar el compuesto o agente de manera que se produzca un fármaco, compuesto farmacéutico o composición farmacéutica. La modificación del compuesto o agente así identificado puede incluir, por ejemplo, cambiar (p. ej., alterar o derivatizar) el compuesto o agente de manera que el compuesto o agente es más adecuado para la administración a un sujeto. Por ejemplo, el compuesto o agente puede modificarse de acuerdo con prácticas rutinarias de química médica para lograr una mayor estabilidad (p. ej., mayor vida media) hasta la administración, incrementar la solubilidad (p. ej., en un excipiente farmacéuticamente aceptable), mejorar la absorción, reducir los efectos secundarios, facilitar la administración, y otros. Los fármacos, compuestos farmacéuticos y composiciones farmacéuticas así formuladas se pretende que estén dentro del campo de la presente invención.

60 B. *Ensayos de Detección*

Las porciones o fragmentos de las secuencias de ADNc identificadas aquí (y las correspondientes secuencias genicas completas) pueden utilizarse de numerosas formas como reactivos polinucleótidos. Por ejemplo, estas secuencias pueden utilizarse para: (i) mapeo de sus respectivos genes sobre un cromosoma; y, así, localizar regiones genicas asociadas con enfermedades genéticas; (ii) identificar un individuo a partir de una muestra biológica (tipificación de tejidos); y (iii) ayudar en la identificación forense de una muestra biológica. Estas aplicaciones se describen en las sub-secciones siguientes.

1. Mapeo Cromosómico

Una vez que la secuencia (o una porción de la secuencia) de un gen ha sido aislada, esta secuencia puede utilizarse para el mapeo de la localización del gen en un cromosoma. Este proceso se llama mapeo cromosómico. Por 5 consiguiente, las porciones o fragmentos de las secuencias de nucleótidos de Lor-2, aquí descritas, pueden utilizarse para el mapeo de la localización de los genes Lor-2 en un cromosoma. El mapeo de las secuencias de Lor-2 en los cromosomas es un importante primer paso para correlacionar estas secuencias con genes asociados con enfermedades.

En resumen, los genes Lor-2 pueden ser mapeados en los cromosomas mediante la preparación de cebadores para 10 la PCR (preferiblemente, con una longitud de 15-20 pb) a partir de las secuencias de nucleótidos de Lor-2. El análisis computacional de las secuencias de Lor-2 puede utilizarse para predecir cebadores que no abarquen más que un exón en el ADN genómico, complicando así el proceso de amplificación. Estos cebadores pueden entonces utilizarse para el cribado por PCR de híbridos de células somáticas que contienen cromosomas individuales humanos. Sólo aquellos 15 híbridos que contengan el gen humano correspondiente a las secuencias de Lor-2 producirán un fragmento amplificado.

Los híbridos de células somáticas se preparan mediante la fusión de células somáticas de diferentes mamíferos (p. ej., células humanas y de ratón). Ya que los híbridos de células humanas y de ratón crecen y se dividen, pierden 20 gradualmente los cromosomas humanos de forma aleatoria, pero retienen los cromosomas de ratón. Mediante el uso de medios en los que las células de ratón no pueden crecer, porque carecen de una enzima en particular, pero en el que las células humanas sí pueden, el único cromosoma humano que contiene el gen que codifica para la enzima necesaria, será retenido. Mediante el uso de varios medios, se pueden establecer paneles de líneas celulares híbridas. Cada línea celular en un panel contiene bien un único cromosoma humano o bien un pequeño número de cromosomas humanos, y un juego completo de cromosomas de ratón, permitiendo el fácil mapeo de los genes individuales en cromosomas 25 humanos específicos. (D'Eustachio P. *et al.* (1983) *Science* 220: 919-924). Los híbridos de células somáticas que contienen sólo fragmentos de cromosomas humanos pueden producirse también mediante el uso de cromosomas humanos con translocaciones y delecciones.

El mapeo por PCR de híbridos de células somáticas es un procedimiento rápido para asignar una secuencia en concreto a un cromosoma en concreto. Se pueden asignar tres o más secuencias por día utilizando un único termociclador. 30 Utilizando las secuencias de nucleótidos de Lor-2 para diseñar oligonucleótidos cebadores, la sublocalización puede lograrse con paneles de fragmentos de cromosomas específicos. Otras estrategias de mapeo que puedan utilizarse de forma similar para el mapeo de una secuencia 9o, 1p, o 1v en su cromosoma incluyen la hibridación *in situ* (descrita en Fan, Y. *et al.* (1990) *PNAS*, 87:6223-27), el pre-cribado con cromosomas marcados seleccionados por citometría de flujo, y pre-selección mediante la hibridación a librerías de ADNc específicas de cromosomas.

35 La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de una secuencia de ADN en la dispersión cromosómica en metafase puede además utilizarse para proporcionar una localización cromosómica precisa en un paso. La dispersión cromosómica puede formarse utilizando células cuya división ha sido bloqueada en metafase mediante un compuesto químico como la colcemida que inhibe la formación del huso mitótico. Los cromosomas pueden tratarse brevemente con tripsina, y después teñirse con Giemsa. Un patrón de bandas oscuras y claras se desarrolla sobre cada cromosoma, de manera que los cromosomas pueden identificarse de forma individual. La técnica FISH puede utilizarse con una secuencia de ADN tan corta como unas 500 ó 600 bases. Sin embargo, los clones mayores de 1.000 bases tienen una alta probabilidad de unirse a una única localización cromosómica con suficiente intensidad de señal para una detección sencilla. Preferiblemente 1.000 bases, y más preferiblemente 2.000 bases serán suficientes para obtener buenos resultados en un periodo razonable de tiempo. Para una revisión de esta técnica, véase Verma *et al.*, *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques* (Pergamon Press, New York 1988).

40 Los reactivos para el mapeo cromosómico pueden utilizarse de forma individual para marcar un único cromosoma o un único sitio en ese cromosoma, o se pueden utilizar paneles de reactivos para marcar múltiples sitios y/o múltiples cromosomas. En realidad, se prefieren los reactivos que corresponden a regiones no codificantes de los genes para el mapeo. Es más probable que las secuencias codificantes se conserven entre familias de genes, incrementando así la oportunidad de hibridaciones cruzadas durante el mapeo cromosómico.

45 Una vez que una secuencia se ha mapeado en una localización cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma puede correlacionarse con los datos del mapa genético. (Estos datos se encuentran, por ejemplo, en McKusick, *Mendelian Inheritance in Man*, disponible on line a través de la librería *Johns Hopkins University Welch Medical Library*). La relación entre un gen y una enfermedad, mapeadas en la misma región cromosómica, pueden entonces identificarse a través de un análisis de ligamiento (co-herencia de genes físicamente adyacentes), descrito en, por ejemplo, Egeland, J. *et al.* (1987) *Nature*, 325: 783-787.

50 Además, se pueden determinar las diferencias en las secuencias de ADN entre individuos afectados y no afectados por una enfermedad asociada con el gen Lor-2. Si una mutación se observa en alguno o todos los individuos afectados pero no en los individuos no afectados, entonces la mutación es probable que sea un agente causal de esa enfermedad en concreto. La comparación de los individuos afectados y los no afectados generalmente implica buscar 55 primero alteraciones estructurales en los cromosomas, como delecciones o translocaciones que son visibles a partir de las dispersiones de cromosomas o detectables utilizando la PCR basada en esa secuencia de ADN. En última instancia, la secuenciación completa de los genes de varios individuos puede llevarse a cabo para confirmar la presencia de una mutación y para distinguir las mutaciones de los polimorfismos.

2. Tipificación de Tejidos

Las secuencias Lor-2 de la presente invención pueden también utilizarse para identificar individuos a partir de muestras biológicas mínimas. El ejército de Estados Unidos, por ejemplo, está considerando el uso de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para la identificación de su personal. En esta técnica, un ADN genómico de un individuo se digiere con una o más enzimas de restricción, y se sonda en un *Southern blot* para dar lugar a bandas de identificación únicas. Este método no sufre de las actuales limitaciones de las “placas de identificación” que pueden perderse, cambiarse, o robarse, haciendo más difícil la identificación positiva. Las secuencias de la presente invención son útiles como marcadores adicionales de ADN para los RFLP (descrito en la Patente Estadounidense Nº 5,272,057).

Además, las secuencias de la presente invención pueden utilizarse para proporcionar una técnica alternativa que determine la actual secuencia del ADN base por base de porciones seleccionadas del genoma de un individuo. Así, las secuencias de nucleótidos de Lor-2 aquí descritas pueden utilizarse para preparar dos cebadores para la PCR a partir de las secuencias de los extremos 5' y 3'. Estos cebadores pueden utilizarse para amplificar el ADN de un individuo y posteriormente secuenciarlo.

Los paneles de las correspondientes secuencias de ADN de los individuos, preparados de esta manera, pueden proporcionar identificaciones únicas de los individuos, ya que cada individuo tendrá un único juego de esas secuencias de ADN debido a las diferencias alélicas. Las secuencias de la presente invención pueden utilizarse para obtener estas secuencias de identificación a partir de los individuos y a partir de tejido. Las secuencias de nucleótidos de Lor-2 de la invención únicamente representan porciones del genoma humano. La variación alélica ocurre en algún grado en las regiones codificantes de estas secuencias, y en mayor grado en las regiones no codificantes. Se estima que la variación alélica entre individuos humanos se produce con una frecuencia de aproximadamente una vez cada 500 bases. Cada una de las secuencias aquí descritas puede, hasta cierto punto, utilizarse como un estándar frente al cual el ADN de un individuo puede compararse con el propósito de la identificación. Ya que un mayor número de polimorfismos se produce en las regiones no codificantes, se necesitan menos secuencias para diferenciar a los individuos. Las secuencias no codificantes de SEQ ID NO: 1 pueden proporcionar con facilidad la identificación positiva de individuos con un panel de quizá 10 a 1.000 cebadores en los que cada uno produce una secuencia no codificante amplificada de 100 bases. Si se utilizan secuencias codificantes para la predicción, como las de SEQ ID NO:1, un número más apropiado de cebadores para la identificación positiva de individuos sería 500-2.000.

Si un panel de reactivos derivados de las secuencias de nucleótidos de Lor-2 aquí descritas se utiliza para generar una base de datos para la identificación única de un individuo, esos mismos reactivos pueden utilizarse después para identificar tejido de ese individuo. Utilizando la base de datos para la identificación única, la identificación positiva del individuo, vivo o muerto, puede hacerse a partir de muestras extremadamente pequeñas de tejido.

3. Uso de Secuencias Parciales de Lor-2 en Biología Forense

Las técnicas de identificación basadas en el ADN pueden también utilizarse en biología forense. La biología forense es un campo científico que emplea la tipificación genética de pruebas biológicas encontradas en el escenario del crimen como un medio para la identificación positiva, por ejemplo, del autor de un crimen. Para hacer esta identificación, se utiliza la tecnología PCR para amplificar las secuencias de ADN obtenidas a partir de muestras biológicas muy pequeñas como tejidos, p. ej., pelo o piel, o fluidos corporales, p. ej., sangre, saliva, o semen encontrados en el escenario del crimen. La secuencia amplificada puede entonces compararse con una estándar, permitiendo así la identificación del origen de la muestra biológica.

Las secuencias de la presente invención pueden utilizarse para proporcionar reactivos polinucleotídicos, p. ej., cebadores para la PCR, dirigidos a loci específicos en el genoma humano, que pueden mejorar la fiabilidad de las identificaciones forenses basadas en el ADN, por ejemplo, proporcionando otro “marcador de identificación” (es decir, otra secuencia de ADN que es única para un individuo en concreto). Como se mencionó anteriormente, la actual información de secuencias de bases puede utilizarse para la identificación como una alternativa precisa a los patrones formados por los fragmentos generados por enzimas de restricción. Las secuencias dirigidas a las regiones no codificantes de SEQ ID NO:1 son particularmente apropiadas para este uso ya que el mayor número de polimorfismos se produce en las regiones no codificantes, haciendo más fácil la diferenciación de individuos utilizando esta técnica. Ejemplos de reactivos polinucleotídicos incluyen las secuencias de nucleótidos de Lor-2 o porciones de las mismas, p. ej., fragmentos derivados de las regiones no codificantes de SEQ ID NO:1 que tienen una longitud de al menos 20 bases, preferiblemente de al menos 30 bases.

Las secuencias de nucleótidos de Lor-2 aquí descritas pueden además utilizarse para proporcionar reactivos polinucleotídicos, p. ej., sondas marcadas o con posibilidad de marcarse que puedan utilizarse, por ejemplo, en una técnica de hibridación *in situ*, para identificar un tejido específico, p. ej., tejido cardiovascular. Esto puede ser muy útil en casos donde se le entrega a un patólogo forense un tejido de origen desconocido. Los paneles de estas sondas de Lor-2 pueden utilizarse para identificar tejidos por especies y/o tipo de órgano, p. ej., corazón.

De una manera similar, estos reactivos, p. ej., cebadores o sondas de Lor-2 pueden utilizarse para cribar cultivos de tejidos de contaminación (es decir, cribar por la presencia en una mezcla de diferentes tipos de células en cultivo).

C. Medicina Predictiva

La presente invención también hace referencia al campo de la medicina predictiva en el que los ensayos diagnósticos, los ensayos pronósticos, y los ensayos clínicos monitorizados se utilizan con fines pronósticos (predictivos) para así tratar a un individuo de forma profiláctica. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se relaciona con los ensayos diagnósticos para la determinación de la expresión de la proteína o el ácido nucleico de Lor-2 así como la actividad de Lor-2, en el contexto de una muestra biológica (p. ej., sangre, suero, células, tejido, p. ej., corazón) para así determinar si un individuo está afectado por un tumor hepático o un tumor hepático metastásico.

La invención también proporciona ensayos pronósticos (o predictivos) para determinar si un individuo corre el riesgo de desarrollar un desorden asociado con la proteína, la expresión del ácido nucleico o la actividad de Lor-2. Por ejemplo, las mutaciones en un gen Lor-2 pueden analizarse en una muestra biológica. De forma alternativa, la presencia de la expresión y/o actividad de Lor-2 pueden utilizarse para determinar si una persona corre el riesgo de tener un tumor o de tener metástasis tumorales. Estos ensayos pueden utilizarse con fines pronósticos o predictivos para así tratar de forma profiláctica a un individuo de forma previa a la aparición o la progresión de un desorden caracterizado o asociado con la proteína, la expresión del ácido nucleico o la actividad de Lor-2 (p. ej., progresión tumoral). En otro ejemplo, la invención proporciona métodos para determinar el potencial metastásico de un tumor.

Otro aspecto de la invención se refiere a monitorizar la influencia de agentes (p. ej., fármacos, compuestos) sobre la expresión o la actividad de Lor-2 en ensayos clínicos.

Estos y otros agentes se describen con más detalle en las siguientes secciones.

1. Ensayos Diagnósticos

Un método ejemplar para la detección de la presencia o ausencia de la proteína o el ácido nucleico de Lor-2 en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica a partir de un sujeto prueba y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o agente capaz de detectar la proteína o el ácido nucleico de Lor-2 (p. ej., ARNm, ADN genómico) que codifica la proteína Lor-2 de manera que la presencia de la proteína o el ácido nucleico de Lor-2 se detecta en la muestra biológica. Un agente preferido para la detección de ARNm o ADN genómico de Lor-2 es una sonda de ácido nucleico marcada capaz de hibridar con el ARNm o el ADN genómico de Lor-2. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico de Lor-2 con toda su longitud, como el ácido nucleico de SEQ ID NO:1, como un oligonucleótido de al menos 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente bajo condiciones restringentes al ARNm o ADN genómico de Lor-2. Se describen aquí otras sondas adecuadas para su uso en ensayos diagnósticos de la invención.

Un agente preferido para la detección de la proteína Lor-2 es un anticuerpo capaz de unirse a la proteína Lor-2, preferiblemente un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlónicos, o más preferiblemente, monoclonales. Puede utilizarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (p. ej., Fab o F(ab')₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, se pretende que abarque el marcapie directo de la sonda o el anticuerpo mediante la asociación (es decir, unión física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcapie indirecto de la sonda o anticuerpo mediante la reacción con otro reactivo que está marcado directamente. Ejemplos de marcapie indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y marcado en su extremo con una sonda de ADN con biotina de manera que puede detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente. El término "muestra biológica" se pretende que incluya tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como los tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Es decir, el método de detección de la invención puede utilizarse para detectar ARNm, proteína o ADN genómico de Lor-2 en una muestra biológica tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección del ARNm de Lor-2 incluyen las hibridaciones Northern y las hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de la proteína Lor-2 incluyen los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAs), los Western blots, la inmunoprecipitación y la inmuno fluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección del ADN genómico de Lor-2 incluyen las hibridaciones Southern blot. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de la proteína Lor-2 incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo anti-Lor-2 marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de imagen estándar.

En un aspecto, la muestra biológica contiene moléculas proteicas provenientes del sujeto prueba. De forma alternativa, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm provenientes del sujeto prueba o moléculas de ADN genómico provenientes del sujeto prueba. Las muestras biológicas preferidas son suero, o tejido cardiaco, aislado mediante métodos convencionales del sujeto. También son preferidas las muestras biológicas provenientes de tumores (p. ej., biopsias tumorales). Otras muestras biológicas preferidas incluyen tejido prostático, tejido hepático, tejido mamario, tejido del músculo esquelético, tejido cerebral, tejido del colon, tejido cardiaco, tejido ovárico, tejido renal, tejido pulmonar, tejido vascular, tejido aórtico, tejido tiroideo, tejido placentario, tejido intestinal, tejido cervical, tejido esplénico, tejido esofágico, tejido tímico, tejido amigdalino, nódulos linfáticos y células osteogénicas. Una muestra particularmente preferida es la proveniente de tejido mamario.

En otro aspecto, los métodos además implican obtener una muestra biológica control a partir de un sujeto control, poner en contacto la muestra control con un compuesto o agente capaz de detectar la proteína, el ARNm o el ADN

genómico de Lor-2, de manera que se detecta la presencia de la proteína, el ARNm o el ADN genómico de Lor-2 en la muestra biológica, y comparar la presencia de la proteína, el ARNm o el ADN genómico de Lor-2 en la muestra control con la presencia de la proteína, el ARNm o el ADN genómico en la muestra prueba. En un aspecto, los niveles elevados de la proteína, el ARNm o el ADN de Lor-2 (p. ej., ADNc o ADN genómico) en la muestra prueba comparados con la muestra control son determinantes o predictivos de una aberración relacionada con Lor-2 (p. ej., un desorden proliferativo de una enfermedad, por ejemplo, cáncer). Por ejemplo, unos niveles del doble de expresión de Lor-2 en la muestra prueba comparados con la muestra control pueden ser determinantes o predictivos de una aberración relacionada con Lor-2. Preferiblemente, unos niveles multiplicados por 5, por 10, por 100, por 500 ó por 1000 de la expresión de Lor-2 en la muestra prueba comparados con la muestra control pueden ser determinantes o predictivos de una aberración relacionada con Lor-2.

La invención también abarca kits para la detección de la presencia de Lor-2 en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto o agente marcado capaz de detectar la proteína o el ARNm de Lor-2 en una muestra biológica; los medios para la determinación de la cantidad de Lor-2 en la muestra; y los medios para la comparación de la cantidad de Lor-2 en la muestra con un estándar. El compuesto o agente puede estar envasado en un envase adecuado. El kit además puede comprender las instrucciones de uso del kit para detectar la proteína o el ácido nucleico de Lor-2.

2. Ensayos Pronósticos

Los métodos de diagnóstico aquí descritos pueden además utilizarse para identificar sujetos que tienen o corren el riesgo de desarrollar un tumor hepático o un tumor hepático metastásico asociado con una expresión o actividad de Lor-2 aberrante. Como se utiliza aquí, el término “aberrante” incluye una expresión o actividad de Lor-2 que se desvía de la expresión o actividad de Lor-2 nativa. La expresión o actividad aberrante incluye una expresión o actividad incrementada o reducida, así como una expresión o actividad que no sigue el patrón de expresión del desarrollo o el patrón de expresión subcelular de Lor-2 nativa. Por ejemplo, la expresión o actividad aberrante de Lor-2 se pretende que incluya los casos en los que una mutación en el gen Lor-2 causa que el gen Lor-2 esté sub-expresado o sobre-expresado y situaciones en las que esas mutaciones resultan en una proteína no funcional o en una proteína que no funciona de la manera de la nativa, p. ej., una proteína que no interacciona con un ligando de Lor-2 o una que interacciona con otro ligando que no sea el ligando de Lor-2.

Los ensayos aquí descritos, como los anteriores ensayos diagnósticos o los siguientes ensayos, pueden utilizarse para identificar sujetos que tienen o corren el riesgo de desarrollar una enfermedad o desorden asociado con la expresión o actividad de Lor-2 aberrante. Por ejemplo, en los ensayos aquí descritos, como los anteriores ensayos diagnósticos o los siguientes ensayos, pueden utilizarse para identificar a un sujeto que tiene o corre el riesgo de desarrollar un desorden asociado con la proteína, el ácido nucleico, la expresión o la actividad de Lor-2. Así, la presente invención proporciona un método para identificar una enfermedad o desorden asociado con la expresión o actividad de Lor-2 aberrante en la que se obtiene una muestra prueba a partir de un sujeto y se detecta la proteína o el ácido nucleico (p. ej., ARNm, ADN genómico) de Lor-2, donde la presencia de la proteína o el ácido nucleico de Lor-2 es diagnóstica para un sujeto que tiene o corre el riesgo de correr una enfermedad o desorden asociado con una expresión o actividad de Lor-2 aberrante. Como se utiliza aquí, una “muestra prueba” hace referencia a una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra prueba puede ser un fluido biológico (p. ej., suero), una muestra celular o de tejido (p. ej., de corazón).

Además, los ensayos pronósticos aquí descritos pueden utilizarse para determinar si a un sujeto se le puede administrar un agente (p. ej., un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, pequeña molécula, u otro fármaco candidato) para tratar una enfermedad o desorden asociado con una expresión o actividad de Lor-2 aberrante. Por ejemplo, estos métodos pueden utilizarse para determinar si un sujeto puede ser tratado de forma efectiva con un agente. Así, la presente invención proporciona métodos para determinar si un sujeto puede ser tratado de forma efectiva con un agente para un desorden asociado con una expresión o actividad de Lor-2 aberrante en el que se obtiene una muestra prueba y se detecta la actividad de la expresión o actividad de la proteína o el ácido nucleico de Lor-2 (p. ej., donde la abundancia de expresión o actividad de la proteína o el ácido nucleico de Lor-2 es diagnóstica para un sujeto al que se le puede administrar el agente para tratar un desorden asociado con una expresión o actividad de Lor-2 aberrante).

Los métodos de la invención también pueden utilizarse para detectar alteraciones genéticas en un gen Lor-2, determinando así si un sujeto con el gen alterado corre el riesgo de tener un desorden caracterizado por un desarrollo cardiovascular aberrante. En los aspectos preferidos, los métodos incluyen la detección, en una muestra de células del sujeto, de la presencia o ausencia de una alteración genética caracterizada por al menos una de las alteraciones que afectan la integridad de un gen que codifica una proteína Lor-2, o la expresión incorrecta del gen Lor-2. Por ejemplo, estas alteraciones genéticas pueden detectarse estableciendo la existencia de al menos una de las siguientes alteraciones: 1) una delección de uno o más nucleótidos de un gen Lor-2; 2) una adición de uno o más nucleótidos a un gen Lor-2; 3) una sustitución de uno o más nucleótidos de un gen Lor-2; 4) un reordenamiento cromosómico de un gen Lor-2; 5) una alteración en el nivel de ARNm transcrita de un gen Lor-2; 6) una modificación aberrante de un gen Lor-2, como la del patrón de metilación del ADN genómico; 7) la presencia de un patrón de *splicing* no nativo de un transcripto de ARN de un gen Lor-2; 8) un nivel no nativo de una proteína Lor-2; 9) una pérdida alélica de un gen Lor-2; y 10) una modificación post-traduccional inadecuada de una proteína Lor-2. Como se describe aquí, hay un gran número de técnicas de ensayo conocidas en el estado de la técnica que pueden utilizarse para detectar alteraciones en

un gen Lor-2. Una muestra biológica preferida es una muestra de tejido o de suero aislada por medios convencionales a partir de un sujeto.

En ciertos aspectos, la detección de la alteración implica el uso de una sonda/cebador en una reacción en cadena 5 de la polimerasa (PCR) (véase, p. ej., la Patente Estadounidense N° 4,683,195 y 4,683,202), como una PCR anclada o una PCR RACE, o, de forma alternativa, en una reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, p. ej., Landegran *et al.* (1988) *Science* 241:1077-1080; y Nakazawa *et al.* (1994) *PNAS* 91:360-364), la última de las cuales puede ser particularmente útil para la detección de mutaciones puntuales en el gen Lor-2 (véase Abravaya *et al.* (1995) *Nucleic 10 Acids Res.* 23:675-682). Este método puede incluir los pasos de recoger una muestra de células de un paciente, aislar 15 los ácidos nucleicos (p. ej., genómico, ARNm o ambos) a partir de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que hibriden específicamente con un gen Lor-2 bajo condiciones tales que se produce la hibridación y la amplificación del gen Lor-2 (si está presente), y detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detectar el tamaño del producto de amplificación y comparar la longitud con una muestra control. Se espera que sea conveniente el uso de la PCR y/o la LCR como un paso de amplificación preliminar conjuntamente con cualquiera de las otras técnicas utilizadas para la detección de mutaciones aquí descritas.

Los métodos alternativos de amplificación incluyen: replicación de secuencia autosostenida (Guatelli, J.C. *et al.*, 1990, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh, D.Y. *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta replicasa (Lizardi, P.M. *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6:1197), o 20 cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas conocidas por un experto medio en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácidos nucleicos si dichas moléculas están presentes en muy bajo número.

En un aspecto alternativo, las mutaciones el un gen Lor-2 a partir de una muestra de células pueden identificarse 25 mediante las alteraciones en los patrones de corte de las enzimas de restricción. Por ejemplo, se aísla ADN de la muestra y del control, de amplifica (de forma opcional), se digiere con una o más endonucleasas de restricción, y se determina el tamaño en longitud de los fragmentos mediante una electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias en los tamaños en longitud de los fragmentos entre el ADN de la muestra y el control indica las mutaciones en el 30 ADN de la muestra. Además, el uso de ribozimas específicas de secuencia (véase, p. ej., la Patente Estadounidense N° 5,498,531) puede utilizarse para medir la presencia de mutaciones específicas mediante el desarrollo o la pérdida de un sitio de corte de la ribozima.

En otros aspectos, las mutaciones genéticas en Lor-2 pueden identificarse mediante la hibridación de ácidos nucleicos de una muestra y control, p. ej., ADN o ARN, en matrices (*arrays*) de alta densidad que contienen cientos 35 o miles de sondas de oligonucleótidos (Cronin, M.T. *et al.* (1996) *Human Mutation* 7: 244-255; Kozal, M.J. *et al.* (1996) *Nature Medicine* 2: 753-759). Por ejemplo, las mutaciones genéticas en Lor-2 pueden identificarse en chips bidimensionales que contienen sondas de ADN generadoras de luminiscencia como se describe en Cronin, M.T. *et al.* más arriba. En resumen, una primera matriz de hibridación de las sondas puede utilizarse para buscar a través de largos tramos de ADN de una muestra y de un control para identificar cambios de bases entre las secuencias haciendo 40 matrices lineales de sondas de secuencias que se solapan. Este paso permite la identificación de mutaciones puntuales. Este paso se sigue de una segunda matriz de hibridación que permite la caracterización de mutaciones específicas utilizando matrices de sondas más pequeñas y especializadas complementarias a todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada matriz de mutación se compone de una serie de sondas paralelas, una complementaria al gen nativo y la otra complementaria al gen mutado.

45 En otro aspecto más, cualquiera de las reacciones de secuenciación conocidas en el estado de la técnica puede utilizarse para secuenciar directamente el gen Lor-2 y detectar mutaciones comparando la secuencia del Lor-2 de la muestra con la correspondiente secuencia nativa (control). Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen aquellas basadas en técnicas desarrolladas por Maxim y Gilbert ((1977) *PNAS* 74:560) o Sanger ((1977) *PNAS* 74:5463). También está contemplado que cualquiera de los procedimientos de secuenciación automáticos puede utilizarse cuando se llevan a cabo los ensayos diagnósticos ((1995) *Biotechniques* 19: 448), incluyendo la secuenciación por espectrometría de masas (véase, p. ej., Publicación Internacional de la PCT N°. WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162; y Griffin *et al.* (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159).

55 Otros métodos para la detección de mutaciones en el gen Lor-2 incluyen métodos en los que la protección frente a los agentes segmentantes se utiliza para detectar errores de emparejamiento de bases en los heterodúplex de ARN/ARN o ARN/ADN (Myers *et al.* (1985) *Science* 230: 1242). En general, el estado de la técnica del “corte de los errores de emparejamiento” comienza proporcionando heterodúplex formados mediante la hibridación de ARN o ADN (marcados) que contienen la secuencia nativa de Lor-2 con ARN o ADN potencialmente mutante obtenido 60 a partir de una muestra de tejido. Los dúplex de doble cadena se tratan con un agente que corta las regiones de una hebra del dúplex de manera que existirán debido a errores de emparejamiento de bases entre las hebras control y las de la muestra. Por ejemplo, los dúplex de ARN/ADN puede tratarse con una ARNasa y los dúplex de ADN/ADN o ARN/ADN pueden tratarse con hidroxilamina o tetraóxido de osmio y con piperidina para digerir las regiones con errores de emparejamiento. Tras la digestión de las regiones con errores de emparejamiento, el material resultante se 65 separa entonces por tamaño sobre geles desnaturizantes de poliacrilamida para determinar el lugar de la mutación. Véase, por ejemplo, Cotton *et al.* (1988) *Proc. Natl Acad Sci USA* 85:4397; Saleeba *et al.* (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. En un aspecto preferido, el ADN o ARN control puede marcarse para la detección.

En otro aspecto más, la reacción de corte de los errores de emparejamiento emplea una o más proteínas que reconocen los pares de bases con errores de emparejamiento en el ADN de doble cadena (conocidas como enzimas “reparadoras del ADN”) en sistemas definidos para la detección y mapeo de mutaciones puntuales en los ADNc de Lor-2 obtenidos de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* corta las A en los errores de emparejamiento G/A y la timidina ADN glicosilasa de las células HeLa corta las T en los errores de emparejamiento G/T (Hsu *et al.* (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). De acuerdo con un aspecto ejemplar, una sonda basada en una secuencia de Lor-2, p. ej., la secuencia de Lor-2 nativa, se hibrida con una ADNc u otro producto de ADN proveniente de una célula(s) prueba. El dúplex se trata con una enzima reparadora de los errores de emparejamiento del ADN, y los productos de la ruptura, si los hay, pueden detectarse a partir de protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense Nº 5,459,039.

En otros aspectos, las alteraciones en la movilidad electroforética podrán utilizarse para identificar mutaciones en los genes Lor-2. Por ejemplo, un polimorfismo conformacional de hebra simple (SSCP) puede utilizarse para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y nativos (Orita *et al.* (1989) *Proc Natl Acad Sci USA*: 86:2766, véase también Cotton (1993) *Mutat Res* 285:125-144; y Hayashi (1992) *Genet Anal Tech Appl* 9:73-79). Los fragmentos de ADN de hebra simple de los ácidos nucleicos de Lor-2 de la muestra y del control serán desnaturalizados y se dejará que se renaturalicen. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos de cadena simple varía de acuerdo a la secuencia, la resultante alteración en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un único cambio de base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede mejorarse utilizando ARN (mejor que ADN), en el que la estructura secundaria es más sensible a cambios en la secuencia. En un aspecto preferido, el presente método utiliza el análisis de heterodíplex para separar moléculas de heterodíplex de doble cadena basándose en los cambios en la movilidad electroforética (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet* 7:5).

En otro aspecto más, se analiza el movimiento de fragmentos mutantes o nativos en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente desnaturalizante utilizando una electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) (Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). Cuando se utiliza el DGGE como método de análisis, el ADN se modificará para asegurarse de que no está completamente desnaturalizado, por ejemplo, mediante la adición de una abrazadera de GC de aproximadamente 40pb de ADN rico en GC con un alto punto de fusión por PCR. En otro aspecto adicional, se utiliza un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente de desnaturalización para identificar las diferencias entre la movilidad del ADN control y el de la muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) *Biophys Chem* 265:12753).

Ejemplos de otras técnicas para la detección de mutaciones puntuales incluyen, pero no se limitan a, la hibridación selectiva de nucleótidos, la amplificación selectiva, o la extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, los cebadores de oligonucleótidos pueden prepararse de manera que la mutación conocida se coloca de forma central y se hibrida entonces con una ADN diana bajo condiciones que permiten la hibridación sólo si se encuentra un emparejamiento perfecto (Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163); Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 86:6230). Estos oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan para amplificar el ADN diana o un número de diferentes mutaciones por PCR cuando los oligonucleótidos se unen a la membrana de hibridación e hibridan con el ADN diana marcado.

De forma alternativa, la tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación selectiva por PCR puede utilizarse junto a la presente invención. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (de manera que la amplificación depende de la hibridación diferencial) (Gibbs *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) o en el extremo terminal 3' de un cebador donde, bajo condiciones adecuadas, se puede prevenir el error de emparejamiento, o reducir la extensión de la polimerasa (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238). Además, puede ser deseable introducir un sitio de restricción novedoso en la región de la mutación para crear un sitio de detección basado en el corte (Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). Se espera que en ciertos aspectos la amplificación pueda también llevarse a cabo utilizando la Taq ligasa para la amplificación (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:189). En estos casos, el ligamiento se producirá sólo si hay un emparejamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia 5' haciendo posible la detección de la presencia de una mutación conocida en un sitio específico mediante la búsqueda de la presencia o ausencia de amplificación.

Los métodos aquí descritos pueden llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico prefabricados que comprenden al menos una de las sondas de ácidos nucleicos o de los reactivos anticuerpos descritos aquí, que pueden ser convenientemente utilizados, p. ej., en el contexto clínico para diagnosticar pacientes que muestren síntomas o tengan un historial familiar de una dolencia o enfermedad relacionada con el gen Lor-2.

Además, cualquier tipo de célula o tejido en el que se exprese Lor-2 puede utilizarse en los ensayos diagnósticos aquí descritos.

3. Monitorización de los Efectos Durante los Ensayos Clínicos

La monitorización de la influencia de agentes (p. ej., fármacos, compuestos) sobre la expresión o actividad de una proteína Lor-2 (p. ej., modulación de la función cardiovascular) puede aplicarse no sólo en el cribado básico de fármacos, sino también en los ensayos clínicos. Por ejemplo, la efectividad de un agente determinada mediante un ensayo de cribado como se describe aquí para incrementar la expresión génica o los niveles de proteínas Lor-2, o la sobreregulación de la actividad de Lor-2, puede monitorizarse en ensayos clínicos con sujetos que presenten

una disminución de la expresión génica o de los niveles de proteínas Lor-2, o un descenso en la regulación de la actividad de Lor-2. De forma alternativa, la efectividad de un agente determinada mediante un ensayo de cribado para disminuir la expresión génica o los niveles de proteínas Lor-2, o la reducción de la regulación de la actividad de Lor-2, puede monitorizarse en ensayos clínicos con sujetos que muestren un incremento en la expresión génica o en los niveles de proteínas Lor-2, o una sobreregulación de la actividad de Lor-2. En estos ensayos clínicos, la expresión o la actividad de un gen Lor-2, y preferiblemente, de otros genes que han estado implicados en, por ejemplo, un desorden del desarrollo pueden utilizarse como "lectores" o marcadores del fenotipo de una célula en concreto.

Por ejemplo, y sin que sirva de limitación, pueden identificarse genes, incluyendo Lor-2, que se modulan en células mediante el tratamiento con un agente (p. ej., un compuesto, fármaco o pequeña molécula) que modula la actividad de Lor-2 (p. ej., identificada en un ensayo de cribado como se describe aquí). Así, para estudiar el efecto de los agentes sobre los desórdenes cardiovasculares, por ejemplo, en ensayos clínicos, se pueden aislar las células y preparar y analizar el ARN para los niveles de expresión de Lor-2 y otros genes implicados en un desorden cardiovascular. Los niveles de expresión génica (es decir, un patrón de expresión génica) pueden cuantificarse mediante análisis de Northern blot o RT-PCR, como se describe aquí, o de forma alternativa midiendo la cantidad de proteína producida, mediante uno de los métodos aquí descritos, o midiendo los niveles de actividad de Lor-2 o de otros genes. De esta forma, el patrón de expresión génica puede servir como un marcador, indicativo de la respuesta fisiológica de las células al agente. Por consiguiente, este estado de respuesta puede determinarse antes, y en varios puntos durante el tratamiento del individuo con el agente.

En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un método para monitorizar la efectividad del tratamiento de un sujeto con un agente (p. ej., un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, pequeña molécula, u otro fármaco candidato identificado mediante los ensayos de cribado aquí descritos) que comprende los pasos de (i) obtención de una muestra antes de la administración a partir de un sujeto de forma previa a la administración del agente; (ii) detección del nivel de expresión de una proteína, ARNm, o ADN genómico de Lor-2 en la muestra antes de la administración; (iii) obtención de una o más muestras después de la administración al sujeto; (iv) detección del nivel de expresión o de actividad de la proteína, el ARNm, o el ADN genómico de Lor-2 en las muestras tras la administración; (v) comparación del nivel de expresión o actividad de la proteína, el ARNm, o el ADN genómico de Lor-2 en la muestra obtenida antes de la administración con la proteína, el ARNm, o el ADN genómico de Lor-2 en la muestra o muestras obtenidas tras la administración; y (vi) alteración de la administración del agente al sujeto como corresponda. Por ejemplo, la administración elevada del agente puede ser deseable para incrementar la expresión o actividad de Lor-2 a niveles mayores que los detectados, es decir, para incrementar la efectividad del agente. De forma alternativa, la administración disminuida del agente puede ser deseable para reducir la expresión o actividad de Lor-2 a niveles menores que los detectados, es decir, para reducir la efectividad del agente. Según este aspecto, la expresión o actividad de Lor-2 puede utilizarse como indicador de la efectividad de un agente, incluso en ausencia de una respuesta fenotípica observable.

C. Métodos de Tratamiento

La presente invención proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos para el tratamiento de un sujeto que corre el riesgo (o es susceptible) de tener un tumor hepático o un tumor hepático metastásico.

Respecto a los métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento, estos tratamientos pueden estar hechos a medida o modificarse específicamente, basándose en el conocimiento a partir del campo de la farmacogenómica. La "farmacogenómica", como se utiliza aquí, hace referencia a la aplicación de tecnologías genómicas como la secuenciación genética, genética estadística, y análisis de la expresión génica, para fármacos en el desarrollo clínico y en el mercado. Más específicamente, el término hace referencia al estudio de cómo los genes de un paciente determinan su respuesta a un fármaco (p. ej., el "fenotipo de respuesta a un fármaco" o el "genotipo de respuesta a un fármaco" de un paciente). Así, otro aspecto de la invención proporciona métodos para hacer tratamientos a medida profilácticos o terapéuticos para un individuo bien con las moléculas Lor-2 de la presente invención o bien con los moduladores de Lor-2 según el genotipo de respuesta al fármaco de ese individuo. La farmacogenómica permite a un clínico o médico dirigir tratamientos profilácticos o terapéuticos a los pacientes que más se beneficiarán del tratamiento y evitar el tratamiento de pacientes que experimentarán efectos secundarios relacionados con la toxicidad del fármaco.

1. Métodos Profilácticos

En un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir en un sujeto un tumor hepático o un tumor hepático metastásico, mediante la administración a un sujeto de Lor-2 o de un agente que module la expresión de Lor-2 o al menos una de las actividades de Lor-2. Los sujetos que corren el riesgo de tener una enfermedad que está causada o se ve contribuida por una expresión o actividad aberrante de Lor-2 pueden identificarse mediante, por ejemplo, algunos o una combinación de los ensayos diagnósticos o pronósticos como se describe aquí. La administración de un agente profiláctico puede producirse de forma previa a la manifestación de los síntomas característicos de una aberrancia de Lor-2, de manera que se previene una enfermedad o desorden o, de forma alternativa, se retrasa su progresión. Dependiendo del tipo de aberrancia de Lor-2, por ejemplo, un agente Lor-2, agonista de Lor-2 o antagonista de Lor-2 puede utilizarse para el tratamiento del sujeto. El agente apropiado puede determinarse basándose en los ensayos de cribado aquí descritos. Los métodos profilácticos de la presente invención se discutirán en más detalle en las siguientes sub-secciones.

2. Métodos Terapéuticos

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos de modulación de la expresión o actividad de Lor-2 con fines terapéuticos. Por consiguiente, en un aspecto ejemplar, el método modulador de la invención implica poner en contacto 5 una célula con Lor-2 o un agente que modula una o más de las actividades de la actividad de la proteína Lor-2 asociada con la célula. Un agente que modula la actividad de la proteína Lor-2 puede ser un agente como se describe aquí, como un ácido nucleico o un proteína, una molécula diana que se produzca de forma natural de una proteína Lor-2, un anticuerpo de Lor-2, un agonista o antagonista de Lor-2, un peptidomimético de un agonista o antagonista de Lor-2, u otra pequeña molécula. En un aspecto, el agente estimula una o más actividades de Lor-2. Ejemplos de estos 10 agentes estimuladores incluyen la proteína Lor-2 activa y una molécula de ácido nucleico que codifica Lor-2 que ha sido introducido en la célula. En otro aspecto, el agente inhibe una o más de las actividades de Lor-2. Ejemplos de estos agentes inhibidores incluyen las moléculas de ácido nucleico de Lor-2 antisentido, anticuerpos anti-Lor-2, e 15 inhibidores de Lor-2. Estos métodos moduladores pueden llevarse a cabo *in vitro* (p. ej., mediante el cultivo de la célula con el agente), *in vivo* (p. ej., mediante la administración del agente a un sujeto), o de forma alternativa *in situ* (p. ej., en el lugar de la lesión o herida). Como tal, la presente invención proporciona métodos de tratamiento de un individuo afligido con un tumor hepático o un tumor hepático metastásico.

En un aspecto, el método implica administrar un agente (p. ej., un agente identificado mediante un ensayo de cribado descrito aquí), o una combinación de agentes que modulan (p. ej., sobreexpresan o inhiben) la expresión o 20 actividad de Lor-2. En otro aspecto, el método implica administrar una proteína o un ácido nucleico de Lor-2 como tratamiento para compensar una expresión o actividad de Lor-2 reducida o aberrante.

La estimulación de la actividad de Lor-2 es deseable en situaciones en las que Lor-2 está inhibida de forma anómala y/o en las que una actividad de Lor-2 incrementada es probable que tenga un efecto beneficioso. Por ejemplo, 25 la estimulación de la actividad de Lor-2 es deseable en situaciones en las que Lor-2 está inhibida y/o en las que una actividad de Lor-2 incrementada es probable que tenga un efecto beneficioso. Asimismo, la inhibición de la actividad de Lor-2 es deseable en situaciones en las que Lor-2 está sobreexpresada de forma anómala y/o en las que una actividad de Lor-2 disminuida es probable que tenga un efecto beneficioso.

3. Farmacogenómica

Las moléculas Lor-2 de la presente invención, así como los agentes, o moduladores que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad de Lor-2 (p. ej., la expresión del gen Lor-2) como se identifica en un ensayo de cribado descrito aquí, pueden administrarse a individuos para tratar (de forma profiláctica o terapéutica) desórdenes 35 asociados a una actividad de Lor-2 aberrante (p. ej., desórdenes proliferativos, por ejemplo, cáncer). Conjuntamente con este tratamiento, puede tenerse en cuenta la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre el genotipo de un individuo y la respuesta de ese individuo a un compuesto externo o fármaco). Las diferencias en el metabolismo de los tratamientos pueden conducir a toxicidad severa o a fallo terapéutico por la alteración de la relación entre dosis 40 y concentración sanguínea del medicamento farmacológicamente activo. Así, un clínico o un médico puede considerar aplicar el conocimiento obtenido en estudios farmacogenómicos relevantes para determinar si administrar una molécula de Lor-2 o un modulador de Lor-2 así como adaptar la dosis y/o el régimen de tratamiento con una molécula de Lor-2 o un modulador de Lor-2.

La farmacogenómica se ocupa de las variaciones hereditarias clínicamente significativas en respuesta a fármacos 45 debido a una disposición al fármaco alterada y a una acción anómala en las personas afectadas. Véase, p. ej., Eichelbaum, M., Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996, 23(10-11):983-985 y Linder, M.W., Clin Chem, 1997, 43(2):254-266. En general, se pueden diferenciar dos tipos de condiciones farmacogenómicas. Las condiciones genéticas transmitidas como un factor individual que alteran la forma en que los fármacos actúan en el cuerpo (acción del fármaco alterada) 50 o las condiciones genéticas transmitidas como factores individuales que alteran la forma en que el cuerpo actúa sobre los fármacos (metabolismo del fármaco alterado). Estas condiciones farmacogenómicas pueden ocurrir bien como un raro defecto genético o como polimorfismos que ocurren de forma natural. Por ejemplo, la deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzimopatía hereditaria frecuente en la que la principal complicación clínica es la hemólisis tras la ingestión de fármacos oxidantes (antimaláricos, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y el consumo de habas.

55 Un enfoque farmacogenómico para identificar genes que predigan la respuesta a un fármaco, conocido como “asociación genómica amplia”, depende fundamentalmente de un mapa de alta resolución del genoma humano que consta de los marcadores relacionados con genes ya conocidos (p. ej., un mapa de marcadores de genes bialélicos que consta de 60,000-100,000 sitios polimórficos o variables en el genoma humano, cada uno de los cuales tiene dos variantes). Estos mapas genéticos de alta resolución pueden compararse con un mapa del genoma de cada uno de los pacientes que en un número estadísticamente significativo participan en un ensayo farmacológico de Fase II/III para identificar marcadores asociados con una particular respuesta observada al fármaco o efecto secundario. De forma alternativa, este mapa de alta resolución puede generarse a partir de una combinación de algunos de los 10 millones de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) conocidos en el genoma humano. Como se utiliza aquí, un “SNP” es una alteración frecuente que ocurre en una única base de un nucleótido en un tramo de ADN. Por ejemplo, un SNP puede producirse una vez por cada 1000 bases de ADN. Un SNP puede estar implicado en el proceso de una enfermedad, sin embargo, la gran mayoría pueden no estar asociados. Dado un mapa genético basado en la incidencia de estos SNPs, los individuos pueden agruparse en categorías genéticas dependiendo de un patrón en concreto de SNPs en

sus genomas individuales. De esta manera, los regímenes de tratamiento pueden adaptarse a los grupos de individuos genéticamente similares, teniendo en cuenta rasgos que pueden ser comunes entre estos individuos genéticamente similares.

5 De forma alternativa, un método denominado el “enfoque del gen candidato”, puede utilizarse para identificar genes que predigan la respuesta a un fármaco. De acuerdo con este método, si se conoce un gen que codifica una diana de los fármacos (p. ej., una proteína Lor-2 o un receptor de Lor-2 de la presente invención), todas las variantes comunes de ese gen pueden ser bastante fácilmente identificadas en la población y puede determinarse si tener una versión del gen frente a otra se asocia con una respuesta al fármaco concreta.

10 Como aspecto ilustrativo, la actividad de las enzimas metabolizantes de fármacos es un importante determinante tanto de la intensidad como de la duración de la acción del fármaco. El descubrimiento de polimorfismos genéticos de las enzimas metabolizantes de fármacos (p. ej., N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y las enzimas del citocromo P450, CYP2D6 y CYP2C19) ha proporcionado una explicación de por qué algunos pacientes no obtienen los efectos esperados por los fármacos o muestran una respuesta al fármaco exagerada y seria toxicidad tras tomar la dosis estándar y segura de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizador rápido (EM) y el metabolizador lento (PM). La prevalencia del PM es diferente entre diferentes poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica para CYP2D6 es altamente polimórfico y se han identificado varias mutaciones en PM, conduciendo todo ello a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores lentos de CYP2D6 y CYP2C19 con bastante frecuencia experimentan una respuesta al fármaco exagerada y efectos secundarios cuando reciben dosis estándar. Si un metabolito es la fracción terapéuticamente activa, los PM no muestran ninguna respuesta terapéutica, como se demostró para el efecto analgésico de la codeína mediado por su metabolito formado por el CYP2D6, la morfina. En el otro extremo están los llamados metabolizadores ultrarrápidos quienes no responden a dosis estándar. Recientemente, se han identificado las bases moleculares del metabolismo ultrarrápido, que se debe a la amplificación génica de CYP2D6.

30 De forma alternativa, un método denominado el “perfil de expresión génica”, puede utilizarse para identificar genes que predigan la respuesta al fármaco. Por ejemplo, la expresión génica de un animal medicado con un fármaco (p. ej., una molécula de Lor-2 o un modulador de Lor-2 de la presente invención) puede dar una indicación de si las vías de señalización del gen relacionadas con la toxicidad se han activado.

35 La información generada a partir de más de uno de los enfoques farmacogenómicos anteriores puede utilizarse para determinar la dosis y los regímenes de tratamiento apropiados para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o a la selección de fármacos, puede evitar reacciones adversas o fallo terapéutico y así mejorar la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trate a un sujeto con una molécula de Lor-2 o un modulador de Lor-2, como un modulador identificado mediante uno de los ensayos de cribado ejemplares que se describen aquí.

40 Esta invención está ilustrada con más detalle mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplo 1

Identificación y caracterización de ADNc de LOR-2 humana

45 En este ejemplo, se describe la identificación y caracterización del gen que codifica Lor-2 humana (es decir, la proteína 2 relacionada con la lisil oxidasa (del inglés, *Lysyl Oxidase Related-2*), también conocida como la Proteína-18 Secretada en el Miocardio (del inglés, *Myocardium Secreted Protein-18* o “MSP-18”).

Aislamiento del ADNc de Lor-2 humana

50 La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento del gen humano que codifica Lor-2. Lor-2 humana se aisló a partir de una librería de ADNc que se preparó a partir de tejido obtenido de sujetos que sufren un fallo cardiaco congestivo. En resumen, una muestra de tejido cardiaco se obtuvo de una biopsia de una mujer de 42 años de edad que sufrió un fallo congestivo cardiaco. El ARNm se aisló a partir del tejido cardiaco y se preparó una librería de ADNc a partir del mismo utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica (descritos en, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989). Utilizando un programa que identifica la presencia de péptidos señal (Nielsen, H. *et al.* (1997) *Protein Engineering* 10:1-6), se aisló un clon positivo.

55 La secuencia del clon positivo se determinó y se encontró que contenía un marco de lectura abierto. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Lor-2 humana comprende alrededor de 2920 ácidos nucleicos, y tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 y establecida en SEQ ID NO:1. La proteína codificada por este ácido nucleico comprende alrededor de 753 aminoácidos, y tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 y establecida en SEQ ID NO:2.

ES 2 320 622 T3

Análisis de Lor-2 humana

Una búsqueda BLAST (Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403) de las secuencias de nucleótidos y de la proteína Lor-2 humana reveló que Lor-2 es similar a las siguientes moléculas proteicas: una proteína relacionada con la lisil oxidasa humana (Nº de Acceso U89942) que tiene aproximadamente el 56.9% de identidad sobre los aminoácidos 33-752 (SEQ ID NO:2); y una segunda proteína relacionada con la lisil oxidasa murina; (Nº de Acceso AF053368) que tiene aproximadamente el 92.6% de identidad sobre los aminoácidos 1-753, (p. ej., sobre la longitud completa) de Lor-2 (SEQ ID NO:2). (Las identidades se calcularon utilizando el algoritmo LALIGN de Huang and Miller (1991) *Adv. Appl. Math.* 12:373-381).

Se prevé que la proteína Lor-2 tenga un péptido señal en los residuos de aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO:2. Por consiguiente, una proteína Lor-2 madura se prevé que incluirá los residuos de aminoácidos 26-753 de SEQ ID NO:2. Lor-2 se prevé también que tenga 5 sitios de N-glicosilación, 8 sitios de fosforilación de la proteína quinasa ("PKC"), 14 sitios de fosforilación de la proteína caseína quinasa II, 19 sitios de N-miristoilación, y 1 sitio de amidación. Los sitios previstos de N-glicosilación se encuentran, por ejemplo, en los aminoácidos 111-114, 266-269, 390-393, 481-484, y 625-628 de SEQ ID NO:2. Los sitios previstos de fosforilación PKC se encuentran, por ejemplo, en los aminoácidos 97-99, 104-106, 221-223, 268-270, 352-354, 510-512, 564-566, y 649-651 de SEQ ID NO:2. Los sitios previstos de fosforilación de la caseína quinasa II se encuentran, por ejemplo, en los aminoácidos 31-34, 68-71, 115-118, 120-123, 135-138, 330-333, 352-355, 377-380, 392-395, 411-414, 424-427, 493-496, 527-530, y 617-620 de SEQ ID NO:2. Los sitios previstos de N-miristoilación se encuentran, por ejemplo, en los aminoácidos 13-18, 116-121, 130-135, 273-278, 312-317, 359-364, 378-383, 403-408, 443-448, 451-456, 463-468, 470-475, 489-494, 506-511, 515-520, 521-526, 626-631, 661-666, y 746-751 de SEQ ID NO:2. Un sitio previsto de amidación se encuentra, por ejemplo, en los aminoácidos 117-180 de SEQ ID NO:2.

Además, Lor-2 tiene 4 dominios de receptores ricos en cisteína tipo *scavenger* en los residuos de aminoácidos 51-145, 183-282, 310-407, y 420-525 de SEQ ID NO:2. El tercer dominio de receptores ricos en cisteína tipo *scavenger* incluye un patrón de dominio repetido de los receptores *speract* en los residuos de aminoácidos 312-349 de SEQ ID NO:2. Además, Lor-2 tiene un dominio lisil oxidasa en los residuos 330-732 de SEQ ID NO:2. (Véase, por ejemplo, la figura 5). Dentro del dominio lisil oxidasa de Lor-2, existe un fragmento que tiene una homología significativa con la región de unión a cobre de la lisil oxidasa putativa, denominada la "garra de unión al cobre". Un patrón de consenso PROSITE que describe la garra de unión al cobre es como sigue: W-E-W-H-S-C-H-Q-H-YH (SEQ ID NO:9) (véase también la documentación PROSITE PDOC00716 y Krebs y Krawetz (1993) *Biochem. Biophys. Acta* 1202:7-12). Los residuos de aminoácidos 601-701 de Lor-2 humana (SEQ ID NO:2) tienen un ~73% de identidad con esta secuencia de consenso (8/11 residuos) incluyendo cada una de las cuatro histidinas conservadas, tres de las cuales se cree que son ligandos del cobre residiendo dentro de un complejo de coordinación octaédrico de lisil oxidasa.

El análisis de la estructura primaria y secundaria de la proteína, como se muestra en la Figura 4, se llevó a cabo de la siguiente manera: regiones alfa, de giros, beta y helicoidales, algoritmo de Garnier-Robson (Garnier *et al.* (1978) *J Mol Biol* 120:97); regiones alfa, beta y de giros, algoritmo de Chou-Fasman (Chou y Fasman (1978) *Adv in Enzymol Mol* 47:45-148); gráficos de hidrofilidad e hidrofobicidad, algoritmo de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle (1982) *J Mol Biol* 157:105-132); regiones anfípáticas alfa y anfípáticas beta, algoritmo de Eisenberg (Eisenberg *et al.* (1982) *Nature* 299:371-374); regiones flexibles, algoritmo de Karplus-Schulz (Karplus y Schulz (1985) *Naturwiss-sens-Chafen* 72:212-213); índice antigenígenico, algoritmo de Jameson-Wolf (Jameson y Wolf (1988) *CABIOS* 4:121-136); gráfico probabilidad de localización superficial, algoritmo de Emini (Emini *et al.* (1985) *J Virol* 55:836-839).

Predicción de la localización cromosómica de Lor-2 - Mapeo Electrónico

Para predecir la localización cromosómica de Lor-2, se utilizó la secuencia de nucleótidos de Lor-2 de SEQ ID NO:1 para cuestionar, utilizando el programa BLAST (Altschul S.F. *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410) con una longitud de palabra de 12 y utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62, una base de datos de secuencias de nucleótidos humanas originadas a partir de moléculas de nucleótidos (p. ej., secuencias EST, secuencias STS y similares) que se habían mapeado en el genoma humano. Se encontró que las secuencias de nucleótidos que se habían mapeado previamente en el cromosoma 2 humano cerca del marcador D2S145 (p. ej., teniendo los Nº de Acceso AA191602 y R55706) tenían una alta identidad de secuencia con las porciones de la secuencia de nucleótidos de Lor-2 (secuencia 3' UTR) indicando que Lor-2 dirigía a la misma localización cromosómica. Además, se prevé que las variantes alélicas de Lor-2 indicarán la misma localización cromosómica y las especies ortólogas de Lor-2 indicarán sintenia en los loci con el locus de Lor-2 humana.

Confirmación y análisis de la localización cromosómica de Lor-2 - Mapeo por PCR

El gen hLor-2 se mapeó en el cromosoma 2 humano (es decir, 2p11-p13), que presenta sintenia con el cromosoma 6 de ratón, mediante tipificado por PCR del panel de híbridos de radiación Genebridge (G4) (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La tipificación del ADN y la comparación con los datos del mapa de híbridos de radiación en el *Whitehead Institute Center for Genome Research* (WICGR) relacionó fuertemente el gen hLor-2 con una región en el cromosoma 2 humano entre WI-5987 (13.9cR) y GCT1B4 (16.7cR).

Los cebadores de huLor-2 utilizados en los estudios de mapeo por PCR fueron: hacia delante - GCTTACCAA GAAACCCATGTCAGC (SEQ ID NO:11) y el reverso - GGCAGTTAGTCAGGTGCTGC (SEQ ID NO:12). Los estudios de mapeo de híbridos de radiación se llevaron a cabo como sigue: las reacciones de PCR de los paneles de híbridos de radiación, GeneBridge (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) se montaron por duplicado utilizando un 5 programa automático de ensamblaje por PCR sobre un TECAN Genesis. Cada reacción consta de: 5 μ l de ADN molde (10 ng/ μ l), 1.5 μ l de tampón 10xPCR, 1.2 μ l dNTPs (2.5 mM), 1.15 μ l del cebador hacia delante (6.6 μ M), 1.15 μ l 10 del cebador reverso (6.6 μ M0), y 5 μ l 1:75 de Taq platino. Las reacciones se termociclaron en un Perkin-Elmer 9600 durante 10 minutos a 95°C (para la Taq platino), [95°C 40 seg., 52°C 40 seg., 72°C, 50 seg.] 35X, 72°C, 5 minutos, mantener a 4°C. Los productos resultantes de la PCR se corrieron en un gel al 2% de agarosa y se visualizaron en una 10 caja de luz UV.

Los híbridos positivos por el panel Genebridge 4 se presentaron en el *Whitehead Genome Center* para la ubicación en relación con un mapa de la estructura.

15 El mapeo de Lor-2 humana en las proximidades cercanas de genes conocidos incluyendo la actina, gamma 2, músculo liso, entérico (“ACTG2”), nucleolisina TIA1, semaforina W (“SEMAW”), disferlina (“DYSF”), proteína de acoplamiento 1 (“DOK1”), glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa 1 (“GFPT”), el gen KIAA0331, desoxiguano-sina quinasa (“DGUOK”), el gen TSC501, el factor de iniciación de la traducción eucariótico, subunidad 10 (“EIF3S 1”), receptor de la taquinina 1 (“TACR1”), activador tisular del plasminógeno (“PLAT”) y fosfatasa de especificidad 20 dual 11 (“DUSP11”). Mutaciones y/o loci cercanos relacionados con la enfermedad incluyen el síndrome de Alstrom (“ALMS 1”), un síndrome que se hereda de forma autosómica recesiva caracterizado por una degeneración retinal, obesidad, diabetes mellitus, sordera neurógena, disfunción hepática, y en algunos casos, cardiomiopatía de aparición tardía (véase, p. ej., Alstrom *et al.* (1959) *Acta Psychiat. Neurol. Scand.* 34 (suppl. 129):1-35; Alter y Moshang (1993) *Am. J. Dis. Child.* 147:97-99; Awazu *et al.* (1997) *Am. J. Med. Genet.* 69:13-16; Aynaci *et al.* (1995) (Letter) *Clin. Genet.* 48:164-166; Charles *et al.* (1990) *J. Med. Genet.* 27:590-592; Cohen y Kisch (1994) *Israel J. Med Sci.* 30:234-236; Collin *et al.* (1997) *Hum. Molec. Genet.* 6:213-219; Collin *et al.* (1999) (Letter) *Clin. Genet.* 55:61-62; Connolly *et al.* (1991) *Am. J. Med. Genet.* 40:421-424; Goldstein y Fialkow (1973) *Medicine* 52:53-71; Macari *et al.* (1998) *Hum. Genet.* 103:658-661; Marshall *et al.* (1997) *Am. J. Med. Genet.* 73:150-161; Michaud *et al.* (1996) *J. Pediat.* 128:225-229; Millay *et al.* (1986) *Am. J. Ophthal.* 102:482-490; Rudiger *et al.* (1985) *Hum. Genet.* 69:76-78; Russell-Eggett *et al.* (1998) *Ophthalmology* 105:1274-1280; Tremblay *et al.* (1993) *Am. J. Ophthal.* 115:657-665; Warren *et al.* (1987) *Am. Heart J.* 114:1522-1524 y Weinstein *et al.* (1969) *New Eng. J. Med.* 281:969-977), fisura orofacial (“OFC2”) (véase p. ej., Carinci *et al.* (1995) (Letter) *Am. J. Hum. Genet.* 56:337-339; Pezzetti *et al.* (1998) *Genomics* 50:299-305 y Scapoli *et al.* (1997) *Genomics* 43:216-220) y enfermedad de Parkinson 3 (véase, p. ej., Di 25 Rocco *et al.* (1996) *Adv. Neurol.* 69:3-11 y Gasser *et al.* (1998) *Nature Genet.* 18:262-265). Información adicional sobre el síndrome de Alstrom, la fisura orofacial 2 y la enfermedad de Parkinson 3 puede encontrarse recogida bajo los N° de Acceso 203800, 602966 y 602404, respectivamente, en la base de datos *Online Mendelian Inheritance in Man* (“OMIM™”) localizada en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>, y cuyos contenidos se incorporan aquí mediante referencia.

40 Además, la localización sintética en el cromosoma 6 de ratón está cerca de la susceptibilidad al teratoma de ovario 1 (“Ots 1”), interrupción de la corticosterona en las células de la corteza adrenal (“Cor”), proteína cerebral 1 (“Brp1”), antígeno linfocitario 36 (“Ly36”), proteína principal hepática 1 (“Lyp1”), folia cerebelosa deficiente (“cdf”), degeneración neuromotora 2 (“mnd2”), truncado (“tc”) y decoloración (“fe”). De particular interés son los vecinos de Lor-2, Ots-1 y Cor, habiéndose postulado que ambos juegan algún papel en la susceptibilidad tumoral. El locus Ots-1 se 45 identificó mediante análisis de ligamiento de ratones hembra LT/Sv, una cepa caracterizada por su anormalmente alta incidencia de teratomas de ovario espontáneos, los cuales son extremadamente raros en otras cepas de ratón. Se identificó Ots-1 como el principal locus individual que incrementa la frecuencia de teratomas de manera semidominante (Lee *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:590-593). Asimismo, el locus Cor se identificó que estaba asociado con el fenotipo 50 de la cepa de ratón AJ (una cepa susceptible a muchas neoplasias y agentes infecciosos, presumiblemente debido a una deficiencia en las actividades profilácticas de los glucocorticoides endógenos (p. ej., costicosterona adrenocorticoide (“CS”)) (Thaete *et al.* (1990) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194:97-102). Por consiguiente, al menos dos loci en las proximidades de Lor-2 de ratón en el cromosoma 6 están asociadas con la susceptibilidad tumoral. Puede encontrarse 55 información adicional respecto a los loci Ots-1 y Cor en los N° de Acceso MGI:85864 y MGI:58993, respectivamente, en la base de datos *Mouse Genomics Informatics* localizada en <http://www.informatics.jax.org>, cuyos contenidos se incorporan aquí mediante referencia. Asimismo, la información referente al locus cdf, el locus mnd2 y el gen Lor-2 de ratón (es decir, el ortólogo de ratón de Lor-2 humana) puede encontrarse recogida bajo los N° de Acceso MGI:86274, MGI:97039 y MGI:1337004, respectivamente. Otros marcadores adicionales (p. ej., marcadores EST, marcadores STS y similares) se encuentran en la Figura 6, así como las distancias relativas entre los marcadores.

60 Distribución tisular del ARNm de Lor-2

Se utilizaron métodos estándar de biología molecular (Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold 65 Spring Harbor, NY, 1989) para construir librerías de ADNc en vectores plasmídicos a partir de múltiples tejidos humanos. Se aislaron y secuenciaron los clones individuales de ADNc a partir de cada librería y sus secuencias de nucleótidos se introdujeron en una base de datos. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1 se utilizó para buscar en la base de datos de la librería específica de tejido la secuencia de nucleótidos del clon de ADNc utilizando el programa BLAST (Altschul S.F. *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410) con una longitud de palabra de 12 y

utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62. Se encontraron secuencias de nucleótidos idénticas a porciones de la secuencia de nucleótidos de Lor-2 de SEQ ID NO:1 en librerías de ADNc originadas a partir de células endoteliales humanas, nódulo linfático, hueso, corazón, neurona, y testículos. Las secuencias de ácidos nucleicos de Lor-2, y los fragmentos de las mismas, las proteínas codificadas por estas secuencias, y los fragmentos de las mismas, así como los moduladores del gen o la actividad de la proteína Lor-2 pueden ser útiles para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades que implican los tejidos en los que se expresa el ARNm de Lor-2. Asimismo, cuando se llevó a cabo un análisis similar utilizando la secuencia de Lor-2 de SEQ ID NO:1 para buscar en bases de datos de secuencias de nucleótidos disponibles públicamente (p. ej., bases de datos DBEST) utilizando el BLAST, las secuencias que tenían una alta homología con la región 3' no traducida de Lor-2 se identificaron en una librería normalizada de placenta de Soares y en librerías normalizadas de testículos de Soares, células B y pulmón.

Después, se llevó a cabo la hibridación Northern blot con sondas de ARN bajo condiciones estándar y se lavaron bajo condiciones restringentes, es decir, 0.2 X SSC a 65°C. Se marcó radiactivamente una sonda de ADN con ³²P-dCTP utilizando el kit Prime-It (Stratagene, La Jolla, CA) según las instrucciones del proveedor. Los filtros que contienen ARNm de varios tejidos y líneas celulares se marcaron con sondas en la solución de hibridación ExpressHyb (Clontech) y se lavaron bajo condiciones de alta restricción según las recomendaciones del fabricante.

Sobre un blot de ARNm humano que contiene ARNm del corazón, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, y páncreas, se detectó un transcripto de ARNm de Lor-2 (~3.0 kb) en todos los tejidos evaluados pero se detectó con mayor intensidad en corazón y placenta. Además, el ARNm de Lor-2 se expresaba intensamente en la línea celular de melanoma G361 y en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon SW480 (comparado con la expresión en las líneas celulares HL60, HeLa53, K562, Molty, Raji, y SW480) (la línea celular SW480 expresa un transcripto de 2.4 kb). Los transcriptos de 5 kb y 2 kb se detectaron también, evidenciando posibles variantes de *splicing* de Lor-2.

La evaluación de un mayor panel de tejidos humanos reveló los siguientes niveles de expresión. Los niveles de expresión se normalizaron para la expresión de beta 2.

30

TABLA I

Expresión de Lor-2 humana en Tejidos normales

35

Fuente del Tejido	Expresión huLor-2	Expresión Beta 2	Expresión Relativa*
Nódulo Linfático (MPI 79)	30.550	18.170	10.78
Nódulo Linfático (NDR 173)	29.930	19.190	33.59
Corazón (PIT 272)	26.145	18.170	57.06
Corazón (PIT 273)	29.375	19.110	46.85
Pulmón (MPI 131)	29.650	19.480	50.04
Pulmón (NDR 185)	27.165	17.050	51.96
Riñón (MPI 58)	30.695	20.790	60.13
Bazo (MPI 360)	27.005	17.150	62.25
Músculo Esquelético (MPI 38)	29.480	20.400	106.15
Hígado Fetal (MPI 425)	30.065	20.520	75.85

60

65

ES 2 320 622 T3

5	Hígado Fetal (MPI 133)	31.570	23.550	221.32
10	Amígdala (MPI 37)	29.480	17.890	18.64
15	Colon (MPI 383)	30.045	19.830	48.50
20	Cerebro (MPI 422)	30.525	22.220	181.65
25	Hígado (MPI 75)	32.935	20.940	14.07
30	Hígado (MPI 365)	31.060	18.770	11.35
35	Hígado (MPI 339)	33.985	20.740	5.92
40	Hígado (MPI 154)	32.000	19.970	13.74
45	Hígado (NDR 206)	33.750	20.370	5.41
50	Hígado (PIT 260)	32.705	18.970	4.23
	CD14	26.945	17.190	66.49
	Granulocitos	30.825	19.240	18.77
	NHLH (latente)	36.595	19.920	1.10
	NHLH (activo)	35.570	19.760	1.00
	Fibrosis Hepática (MPI 447)	29.320	18.300	27.67
	Fibrosis Hepática (NDR 190)	36.495	24.180	22.55
	Fibrosis Hepática (NDR 191)	30.105	19.770	44.63
	Fibrosis Hepática (NDR 192)	33.415	22.410	27.95
	Fibrosis Hepática (NDR 193)	30.795	19.830	28.74
	Fibrosis Hepática (NDR 204)	33.360	21.580	16.34
	Fibrosis Hepática (NDR 126)	31.900	21.180	34.18
	Fibrosis Hepática (NDR 113)	29.175	18.510	36.51
	Fibrosis Hepática (NDR 79)	30.870	20.390	40.22
	Fibrosis Hepática (NDR 112)	31.955	21.770	49.52
	Fibrosis Hepática (NDR 225)	30.645	20.350	45.89
	Fibrosis Hepática (NDR 141)	33.045	22.250	32.45
	*NHLH utilizada como muestra de referencia			

Después, los niveles de expresión de Lor-2 se midieron en varios tejidos y muestras celulares utilizando el procedimiento Taqman™. El procedimiento Taíman™ es una técnica de PCR cuantitativa a tiempo real para detectar ARNm. La reacción de RT-PCR aprovecha la actividad nucleasa 5' de la ADN Polimerasa AmpliTaq Gold™ para romper una sonda TaqMan™ durante la PCR. En resumen, el ADNc se genera a partir de las muestras de interés y sirve como material para comenzar la amplificación por PCR. Además de los cebadores específicos del gen 5' y 3', se incluye en la reacción una sonda de oligonucleótidos específica del gen (complementaria a la región que se va a amplificar) (es decir, la sonda Taqman™). La sonda TaqMan™ incluye el oligonucleótido con un tinte indicador fluorescente covalentemente unido al extremo 5' de la sonda (como FAM (6-carboxifluoresceina), TET (6-carboxi-4,7,2',7-tetraclorofluoresceina), JOE (6-carboxi-4,5-dicloro-2,7-dimetoxifluoresceina), o VIC) y un tinte extintor de la fluorescencia (quencher) (TAMRA (6-carboxi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina) en el extremo 3' de la sonda.

Durante la reacción de la PCR, la rotura de la sonda separa el tinte indicador y el tinte extintor, resultando en una fluorescencia incrementada del indicador. La acumulación de los productos de la PCR se detecta directamente mediante la monitorización del incremento de fluorescencia del tinte indicador. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del tinte indicador al tinte extintor resulta en la supresión de la fluorescencia del indicador. Durante la PCR, si la diana de interés está presente, la sonda híbrida específicamente entre los sitios de los cebadores hacia delante y reverso. La

ES 2 320 622 T3

actividad nucleolítica 5'-3' de la ADN Polimerasa AmpliTaq™ Gold rompe la sonda entre el tinte indicador y extintor sólo si la sonda hibrida con la diana. Los fragmentos de la sonda se desplazan entonces de la diana, y continúa la polymerización de la hebra. El extremo 3' de la sonda se bloquea para prevenir la extensión de la sonda durante la PCR. Este proceso se produce en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial de producto.

5

TABLA II

Expresión de Lor-2 humana 3' UTR en Tejidos Normales Humanos

Fuente del Tejido	Expresión Relativa*	Fuente del Tejido	Expresión Relativa*
Próstata	2.5	Aorta	11.8
Próstata	10.9	Testículos	16.4
Hígado	2.4	Testículos	21.7
Hígado	2.5	Tiroides	4.4
Mama	26.7	Tiroides	7.2
Mama	59.3	Placenta	73.3
Músculo Esquelético	13.4	Placenta	61.8
Músculo Esquelético	5.5	Riñón Fetal	87.7
Cerebro	12.6	Hígado Fetal	10.0
Cerebro	12.7	Hígado Fetal	64.7
Colon	7.2	Corazón Fetal	14.4
Colon	3.4	Corazón Fetal	70.8
Corazón	1.8	Osteoblastos (indif.)	207.9
Corazón	1.8	Osteoblastos (dif.)	128.0
Ovario	1.8	Intestino Delgado	7.9
Ovario	1.4	Cérvix	86.5
Riñón	1.0	Bazo	6.3
Riñón	2.3	Esófago	2.4
Pulmón	1.8	Timo	1.4
Pulmón	4.2	Amígdala	1.7
Vena	57.5	Nódulo Linfático	3.1
Vena	16.1		

* Riñón utilizado como muestra de referencia

60

La mayor expresión se observó en osteoblastos, cérvix, riñón y placenta en el panel de tejidos normales humanos evaluado.

65

ES 2 320 622 T3

Ejemplo 2

Expresión del ARNm de LOR-2 en muestras clínicas tumorales y en líneas celulares de xenoinjertos

5 En este ejemplo, se utilizó la RT-PCR para detectar la presencia de ARNm de Lor-2 en varias muestras de tejido tumoral y metastásico para comparar con las muestras de tejido normal. La RT-PCR se utilizó también para detectar la presencia de ARNm de Lor-2 en varias líneas celulares de xenoinjertos. En el tejido mamario, se detectó el ARNm de Lor-2 en 0/1 muestras de tejido normal comparado con las 3/4 muestras clínicas tumorales tras 30 ciclos de PCR.
10 En las líneas celulares de xenoinjertos aisladas a partir de tejido mamario, el ARNm de Lor-2 se detectó en 1/1 muestras del normal y en 3/3 de las líneas celulares de xenoinjertos (líneas celulares MCF7, ZR75 y T47D). En el tejido pulmonar, el ARNm de Lor-2 se detectó en 0/2 muestras de tejido normal comparado con las 2/8 muestras de tejido tumoral. En las líneas celulares de xenoinjertos aisladas a partir de tejido pulmonar, el ARNm se detectó en 0/5
15 líneas celulares de xenoinjertos tras 30 ciclos de PCR. En un segundo experimento llevado a cabo con tejido pulmonar, el ARNm se detectó en 2/2 muestras normales y 8/8 muestras de tejido tumoral, así como en 5/5 líneas celulares de xenoinjertos (líneas celulares A549, H69, H125, H322 y H460) tras 35 ciclos de PCR. En tejido hepático, el ARNm de Lor-2 se detectó en 2/2 muestras normales tras 35 ciclos de PCR. Estos datos revelan que existe una correlación entre los tumores y la expresión de Lor-2, al menos en el tejido mamario y pulmonar.

20 Para investigar más a fondo este hallazgo, se midieron los niveles de ARNm de Lor-2 mediante PCR cuantitativa utilizando el procedimiento Taqman™ descrito anteriormente. El procedimiento se llevó a cabo con ADNc generado a partir de varias muestras de carcinoma y se comparó con su muestra homóloga de tejido normal. En 5/7 carcinomas de mama, se observó una sobre-regulación de 2-86 veces comparado con 2/4 muestras de tejido normal mamario. Asimismo, en 4/7 carcinomas de pulmón, se observó una sobre-regulación de 2-17 veces comparado con 3/4 muestras de tejido normal pulmonar. Los niveles relativos de ARNm de Lor-2 detectados en varias muestras de tejido normal, 25 tumoral y metastásico se muestran en la Tabla III.

TABLA III

Expresión de Lor-2 humana - Análisis Taqman del Panel Oncológico

	Fuente del Tejido	Expresión Relativa*		Fuente del Tejido	Expresión Relativa*
35	Mama N	46.85		Colon N	48.50
40	Mama N	18.96		Colon N	4.94
	Mama N	1.00		Colon N	10.09
45	Mama N	11.75		Colon N	4.94
	Mama T	86.52		Colon T	10.78
50	Mama T	37.27		Colon T	10.89
	Mama T	25.72		Colon T	17.39
55	Mama T	60.76		Colon T	10.82
	Mama T	19.84		Colon T	9.09
	Mama T	22.24		Colon T	26.63
	Mama T	16.26		Met. Hígado	10.93

60

65

	Pulmón N	9.32		Met. Hígado	10.30
	Pulmón N	3.34		Met. Hígado	12.25
5	Pulmón N	1.65		Met. Hígado	12.91
	Pulmón N	3.84		Hígado N	4.30
10	Pulmón T	4.26		Hígado N	3.69
	Pulmón T	7.39		Hígado N	3.48
15	Pulmón T	9.13		Hígado N	5.41
	Pulmón T	12.08			
	Pulmón T	6.48			
20	Pulmón T	17.27			
	Pulmón T	28.15			

Estos datos revelan una sobre-regulación significativa del ARNm de Lor-2 al menos en los carcinomas de mama y de pulmón. Además, había una sobre-regulación significativa de la expresión de Lor-2 en las muestras metastásicas comparada con las normales. Dado que el ARNm para Lor-2 se expresa en varios tumores, con una sobre-regulación significativa en las muestras de carcinoma en comparación con las muestras normales, se cree que la inhibición de la actividad de Lor-2 podría inhibir la progresión tumoral afectando las propiedades adhesivas de las células tumorales a los tejidos circundantes.

30 Ejemplo 3

Expresión de la proteína LOR-2 recombinante en células bacterianas

35 En este ejemplo, Lor-2 se expresa como un polipéptido recombinante fusionado a la glutatión-S-transferasa (GST) en *E. coli* y el polipéptido de fusión se aísla y caracteriza. Específicamente, Lor-2 se fusiona a la GST y este polipéptido de fusión se expresa en *E. coli*, p. ej., la cepa PEB 199. La expresión de la proteína de fusión GST-Lor-2 en PEB 199 se induce con IPTG. El polipéptido de fusión recombinante se purifica a partir de los lisados de bacterias en bruto de la cepa PEB 199 inducida mediante cromatografía de afinidad en microesferas de glutatión. Utilizando un análisis electroforético en gel de poliacrilamida del polipéptido purificado a partir de los lisados de bacterias, se determina el peso molecular del polipéptido de fusión resultante.

40 Ejemplo 4

45 *Expresión de la proteína LOR-2 recombinante en células COS*

50 Para expresar el gen Lor-2 en células COS, se utiliza el vector pcDNA/Amp de Invitrogen Corporation (San Diego, CA). Este vector contiene un origen de replicación de SV40, un gen de resistencia a la ampicilina, un origen de replicación de *E. coli*, un promotor de CMV seguido de una región polilinker, y un intrón de SV40 y un sitio de poliadenilación. Se clona un fragmento de ADN que codifique la proteína Lor-2 completa y un marcador (*tag*) HA (Wilson *et al.* (1984) Cell 37:767) o un marcador FLAG fusionado dentro del marco de lectura en su extremo 3' del fragmento en la región polilinker del vector, de ese modo de coloca la expresión de la proteína recombinante bajo el control del promotor de CMV.

55 Para construir el plásmido, la secuencia de ADN de Lor-2 se amplifica mediante PCR utilizando dos cebadores. El cebador 5' contiene el sitio de restricción de interés seguido por aproximadamente veinte nucleótidos de la secuencia codificante de Lor-2 comenzando a partir del codón de iniciación; la secuencia del extremo 3' contiene secuencias complementarias al otro sitio de restricción de interés, un codón de terminación de la traducción, el epítopo HA o el epítopo FLAG y los últimos 20 nucleótidos de la secuencia codificante de Lor-2. El fragmento amplificado por PCR y el vector pCDNA/Amp se digieren con las enzimas de restricción apropiadas y el vector se defosforila utilizando la enzima CIAP (New England Biolabs, Beverly, MA). Preferiblemente los dos sitios de restricción elegidos son diferentes de aquellos en los que se ha insertado Lor-2 en la orientación correcta. La mezcla de ligación se transforma en células de *E. coli* (pueden usarse cepas HB101, DH5 α , SURE, disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA), el cultivo transformado se plaquea en placas con medio de ampicilina, y se seleccionan las colonias resistentes. El ADN del plásmido se aísla a partir de los transformantes y se examina mediante análisis de restricción para la presencia del fragmento correcto.

ES 2 320 622 T3

Las células COS son posteriormente transfectadas con el ADN del plásmido Lor-2-*pcDNA/Amp* utilizando los métodos de co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE dextrano, lipofección, o electroporación. Otros métodos adecuados para transfectar las células hospedadoras pueden encontrarse en Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor 5 Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. La expresión del polipéptido de Lor-2 se detecta mediante radiomarcado (puede utilizarse ^{35}S -metionina o ^{35}S -cisteína, disponibles en NEN, Boston, MA) e inmunoprecipitación (Harlow, E. y Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988) utilizando un anticuerpo monoclonal específico para HA. En resumen, las 10 células se marcan durante 8 horas con ^{35}S -metionina (o ^{35}S -cisteína). Se recogen entonces los medios de cultivo y las células se lisan utilizando detergentes (tampón RIPA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 50 mM Tris, pH 7.5). Tanto el lisado de células como los medios de cultivo se precipitan con un anticuerpo específico para HA. Los polipéptidos precipitados se analizan entonces mediante SDS-PAGE.

De forma alternativa, el ADN que contiene la secuencia codificante de Lor-2 se clona directamente en el polilinker 15 del vector *pCDNA/Amp* utilizando sitios de restricción apropiados. El plásmido resultante se transfecta en células COS de la forma descrita anteriormente, y se detecta la expresión del polipéptido de Lor-2 mediante radiomarcado e inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo monoclonal específico para Lor-2.

20 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante es para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido un especial cuidado en la recopilación de las referencias, algunos errores u omisiones pueden no haberse excluido y la EPO no se hace responsable de este extremo.

25 Documentos de patente citados en la descripción

- US 4987071 A, Cech [0093]
- 30 • US 5116742 A, Cech [0093]
- WO 8809810 A [0098]
- 35 • WO 8910134 A [0098]
- US 5223409 A, Ladner [0123] [0167]
- WO 9218619 A, Kang [0123]
- 40 • WO 9117271 A, Dower [0123]
- WO 9220791 A, Winter [0123]
- 45 • WO 9215679 A, Markland [0123]
- WO 9301288 A, Breitling [0123]
- WO 9201047 A, McCafferty [0123]
- 50 • WO 9209197 A, Garrard [0123]
- WO 9002809 A [0123]
- US 8602269 W [0124]
- 55 • EP 184187 A [0124]
- EP 171496 A [0124]
- 60 • EP 173494 A [0124]
- WO 8601533 A, Neuberger [0124]
- US 4816567 A, Cabilly [0124]
- 65 • EP 125023 A [0124]
- US 5225539 A, Winter [0124]

ES 2 320 622 T3

- US 4873316 A [0136]
- EP 264166 A [0136]
- 5 • US 4736866 A [0144]
- US 4870009 A, Leder [0144]
- 10 • US 4873191 A, Wagner [0144]
- WO 9011354 A, Le Mouellec [0145]
- 15 • WO 9101140 A, Smithies [0145]
- WO 920968 A, Zijlstra [0145]
- WO 9304169 A, Berns [0145]
- 20 • US 4522811 A [0153]
- US 5328470 A [0157]
- US 5283317 A [0182]
- 25 • WO 9410300 A [0182]
- US 5272057 A [0198]
- US 4683195 A [0219]
- 30 • US 4683202 A [0219]
- US 5498531 A [0221]
- 35 • WO 9416101 A [0223]
- US 5459039 A [0225]
- US 60117580 B [0277]
- 40 • US 09276400 B [0277]
- US 09448076 B [0277]

45 Literatura no patente citada en la descripción

- **SMITH-MUNGO; KAGAN.** *Matrix Biol.*, 1998, vol. 16, 387-398 [0001]
- **KAMAN.** *Biology of Extracellular Matrix*. *Academic Press*, 1986, 321-389 [0001]
- 50 • **BYERS** *et al.* *New Engl. J. Med.*, 1980, vol. 303, 61-65 [0001]
- **ROYCE** *et al.* *Biochemistry J.*, 1980, vol. 192, 579-586 [0001]
- 55 • **KUIVANIEMI** *et al.* *J. Clin. Invest.*, 1982, vol. 69, 730-733 [0001]
- **KUIVANIEMI** *et al.* *Amer. J. Human. Genet.*, 1985, vol. 37, 798-808 [0001]
- 60 • **PELTONEN** *et al.* *Biochemistry*, 1983, vol. 22, 6156-6163 [0001]
- **ROWE** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 252, 939-942 [0001]
- **STARCHER** *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, vol. 78, 706-712 [0001]
- 65 • **DANKS** *et al.* *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. *McGraw-Hill*, 1983, 1251-1268 [0001]
- **KENYON** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 18435-18437 [0002]

ES 2 320 622 T3

- **KIM** *et al. J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 7176-7182 [0002]
- **KIM** *et al. J. Cell Biochem.*, 1999, vol. 72, 181-188 [0002]
- 5 • **SAITO** *et al. J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 8157-8160 [0003]
- **DOOLITTLE**. *Trends Biochem. Sci.*, 1985, vol. 10, 233-237 [0003]
- 10 • **KRIEGER** *et al. Molecular Structures of Receptors*. 1986, 210-231 [0003]
- **SUDHOFF** *et al. Science*, 1985, vol. 228, 815-822 [0003]
- 15 • **DECITRE** *et al. Lab Invest.*, 1998, vol. 78, 143-151 [0004]
- **PEYROL** *et al. Am. J. Pathol.*, 1997, vol. 150, 497-507 [0004]
- **REN** *et al. Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 1285-1290 [0004]
- **GARNIER** *et al. J Mol Biol*, 1978, vol. 120, 97 [0028]
- 20 • **CHOU; FASMAN**. *Adv in Enzymol Mol*, 1978, vol. 47, 45-148 [0028] [0255]
- **KYTE; DOOLITTLE**. *J Mol Biol*, 1982, vol. 157, 105-132 [0028] [0255]
- 25 • **EISENBERG** *et al. Nature*, 1982, vol. 299, 371-374 [0028] [0255]
- **KARPLUS; SCHULZ**. *Naturwissens-Chafen*, 1985, vol. 72, 212-213 [0028] [0255]
- 30 • **JAMESON; WOLF**. *CABIOS*, 1988, vol. 4, 121-136 [0028] [0255]
- **EMINI** *et al. J Virol*, 1985, vol. 55, 836-839 [0028] [0255]
- **COHN J.N.** *et al. American Family Physician*, 1998, vol. 57, 1901-04 [0031]
- 35 • **FREEMAN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, vol. 87, 8810-8814 [0035]
- **DANGOTT** *et al. PNAS U.S.A.*, 1989, vol. 86, 2128-2132 [0038]
- **FREEMAN** *et al. PNAS U.S.A.*, 1990, vol. 87, 8810-8814 [0038]
- 40 • **KREBS** *et al. Biochem. Biophys. Acta.*, 1993, vol. 1202, 7-12 [0040]
- **KREBS** *et al. Biochem. Biophys. Acta.*, 1993, vol. 12-2, 7-12 [0040]
- 45 • **WANG** *et al. Science*, 1996, vol. 273, 1078-1084 [0040]
- **KAGAN** *et al. Catalytic Properties and structural components of lysyl oxidase*. *John Wiley & Sons*, 1995, 100-121 [0042]
- 50 • **SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0068] [0135] [0262] [0275]
 - Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons*, 1989, 6.3.1-6.3.6 [0083]
 - **GAULTIER** *et al. Nucleic Acids. Res.*, 1987, vol. 15, 6625-6641 [0092]
- 55 • **INOUE** *et al. Nucleic Acids Res*, 1987, vol. 15, 6131-6148 [0092]
- **INOUE** *et al. FEBS Lett.*, 1987, vol. 215, 327-330 [0092]
- 60 • **HASELHOFF; GERLACH**. *Nature*, 1988, vol. 334, 585-591 [0093]
- **BARTEL, D.; SZOSTAK, J.W.** *Science*, 1993, vol. 261, 1411-1418 [0093]
- 65 • **HELENE, C.** *Anticancer Drug Des.*, 1991, vol. 6 (6), 569-84 [0094]
- **HELENE, C.** *et al. Ann. N.Y. Acad Sci.*, 1992, vol. 660, 27-36 [0094]

- **MAHER**, L.J. *Bioassays*, 1992, vol. 14 (12), 807-15 [0094]
- **HYRUP** B. *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996, vol. 4 (1), 5-23 [0095]
- 5 • **PERRY-O'KEEFE** *et al.* *PNAS*, vol. 93, 14670-675 [0095]
- **FINN** P.J. *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1996, vol. 24 (17), 3357-63 [0097]
- 10 • **MAG**, M. *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1989, vol. 17, 5973-88 [0097]
- **PETERSER**, K.H. *et al.* *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 1975, vol. 5, 1119-11124 [0097]
- 15 • **LETSINGER** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 1989, vol. 86, 6553-6556 [0098]
- **LEMAITRE** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 648-652 [0098]
- 20 • **KROL** *et al.* *BioTechniques*, 1988, vol. 6, 958-976 [0098]
- **ZON**. *Pharm. Res.*, 1988, vol. 5, 539-549 [0098]
- 25 • **NEEDLEMAN**; **WUNSCH**. *J. Mol. Biol*, 1970, 444-453 [0107]
- **E. MEYERS**; **W. MILLER**. *CABIOS*, 1989, vol. 4, 11-17 [0107]
- 30 • **ALTSCHUL** *et al.* *J. Mol. Biol*, 1990, vol. 215, 403-10 [0108]
- **ALTSCHUL** *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1997, vol. 25 (17), 3389-3402 [0108]
- Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons*, 1982 [0112]
- 35 • **NARANG**, S.A. *Tetrahedron*, 1983, vol. 39, 3 [0114]
- **ITAKURA** *et al.* *Annu. Rev. Biochem*, 1984, vol. 53, 323 [0114]
- 40 • **ITAKURA** *et al.* *Science*, 1984, vol. 198, 1056 [0114]
- **IKE** *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1983, vol. 11, 477 [0114]
- **ARKIN**; **YOURVAN**. *PNAS*, 1992, vol. 89, 7811-7815 [0116]
- 45 • **DELGRAVE** *et al.* *Protein Engineering*, 1993, vol. 6 (3), 327-331 [0116]
- **KOHLER**; **MILSTEIN**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0122]
- 50 • **BROWN** *et al.* *J. Immunol*, 1981, vol. 127, 539-46 [0122]
- **BROWN** *et al.* *J. Biol. Chem*, 1980, vol. 255, 4980-83 [0122]
- **YEH** *et al.* *PNAS*, 1976, vol. 76, 2927-31 [0122]
- 55 • **YEH** *et al.* *Int. J. Cancer*, 1982, vol. 29, 269-75 [0122]
- **KOZBOR** *et al.* *Immunol Today*, 1983, vol. 4, 72 [0122]
- **COLE** *et al.* *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc, 1985, 77-96 [0122]
- 60 • **R. H. KENNETH**. *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*. Plenum Publishing Corp, 1980 [0122]
- **E. A. LERNER**. *Yale J. Biol. Med*, 1981, vol. 54, 387-402 [0122]
- **M. L. GEFTER** *et al.* *Somatic Cell Genet.*, 1977, vol. 3, 231-36 [0122]
- 65 • **FUCHS** *et al.* *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 1370-1372 [0123]
- **HAY** *et al.* *Hum. Antibod. Hybridomas*, 1992, vol. 3, 81-85 [0123]
- **HUSE** *et al.* *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0123]

ES 2 320 622 T3

- **GRIFFITHS** *et al. EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0123]
- **HAWKINS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0123]
- 5 • **CLARKSON** *et al. Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0123]
- **GRAM** *et al. PNAS*, 1992, vol. 89, 3576-3580 [0123]
- 10 • **GARRAD** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 1373-1377 [0123]
- **HOOGENBOOM** *et al. Nuc. Acid Res.*, 1991, vol. 19, 4133-4137 [0123]
- 15 • **BARBAS** *et al. PNAS*, 1991, vol. 88, 7978-7982 [0123]
- **MCCAFFERTY** *et al. Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0123]
- **BETTER** *et al. Science*, 1988, vol. 240, 1041-1043 [0124]
- 20 • **LIU** *et al. PNAS*, 1987, vol. 84, 3439-3443 [0124]
- **LIU** *et al. J. Immunol.*, 1987, vol. 139, 3521-3526 [0124]
- **SUN** *et al. PNAS*, 1987, vol. 84, 214-218 [0124]
- 25 • **NISHIMURA** *et al. Canc. Res.*, 1987, vol. 47, 999-1005 [0124]
- **WOOD** *et al. Nature*, 1985, vol. 314, 446-449 [0124]
- 30 • **SHAW** *et al. J. Natl. Cancer Inst.*, 1988, vol. 80, 1553-1559 [0124]
- **MORRISON**, S. L. *Science*, 1985, vol. 229, 1202-1207 [0124]
- **OI** *et al. BioTechniques*, 1986, vol. 4, 214 [0124]
- 35 • **JONES** *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 552-525 [0124]
- **VERHOEYAN** *et al. Science*, 1988, vol. 239, 1534 [0124]
- **BEIDLER** *et al. J. Immunol.*, 1988, vol. 141, 4053-4060 [0124]
- 40 • **GOEDDEL**. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology. *Academic Press*, 1990, vol. 185 [0127] [0128]
- **JOHNSON**, K.S. *Gene*, 1988, vol. 67, 31-40 [0129]
- 45 • **AMANN** *et al. Gene*, 1988, vol. 69, 301-315 [0131]
- **STUDIER** *et al.* Gene Expression Technology: Methods in Enzymology. *Academic Press*, 1990, vol. 185, 60-89 [0131]
- 50 • **GOTTESMAN**, S. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology. *Academic Press*, 1990, vol. 185, 119-128 [0132]
- **WADA** *et al. Nucleic Acids Res*, 1992, vol. 20, 2111-2118 [0132]
- 55 • **BALDARI** *et al. Embo J.*, 1987, vol. 6, 229-234 [0133]
- **KURJAN**; **HERSKOWITZ**. *Cell*, 1982, vol. 30, 933-943 [0133]
- 60 • **SCHULTZ** *et al. Gene*, 1987, vol. 54, 113-123 [0133]
- **SMITH** *et al. Mol. Cell Biol.*, 1983, vol. 3, 2156-2165 [0134]
- **LUCKLOW**. *Virology*, 1989, vol. 170, 31-39 [0134]
- 65 • **SEED**, B. *Nature*, 1987, vol. 329, 840 [0135]
- **KAUFMAN** *et al. EMBO J.*, 1987, vol. 6, 187-195 [0135]

- **PINKERT** *et al. Genes Dev.*, 1987, vol. 1, 268-277 [0136]
- **CALAME; EATON**. *Adv. Immunol.*, 1988, vol. 43, 235-275 [0136]
- 5 • **WINOTO; BALTIMORE**. *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 729-733 [0136]
- **BANERJI** *et al. Cell*, 1983, vol. 33, 729-740 [0136]
- 10 • **QUEEN; BALTIMORE**. *Cell*, 1983, vol. 33, 741-748 [0136]
- **BYRNE; RUDDLE**. *PNAS*, 1989, vol. 86, 5473-5477 [0136]
- 15 • **EDLUND** *et al. Science*, 1985, vol. 230, 912-916 [0136]
- **KESSEL; GRUSS**. *Science*, 1990, vol. 249, 374-379 [0136]
- 20 • **CAMPES; TILGHMAN**. *Genes Dev.*, 1989, vol. 3, 537-546 [0136]
- *Reviews - Trends in Genetics*, 1986, vol. 1 (1) [0137]
- 25 • **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0140]
- **HOGAN**, B. *Manipulating the Mouse Embryo*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1986 [0144]
- 30 • **THOMAS, K.R.; CAPECCHI, M. R.** *Cell*, vol. 51, 503 [0145]
- **LI, E.** *et al. Cell*, 1992, vol. 69, 915 [0145]
- 35 • **BRADLEY, A.** *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. *IRL*, 1987, 113-152 [0145]
- **BRADLEY, A.** *Current Opinion in Biotechnology*, 1991, vol. 2, 823-829 [0145]
- **LAKSO** *et al. PNAS*, 1992, vol. 89, 6232-6236 [0146]
- 40 • **O'GORMAN** *et al. Science*, 1991, vol. 251, 1351-1355 [0146]
- **WILMUT, I.** *et al. Nature*, 1997, vol. 385, 810-813 [0147]
- **CHEN** *et al. PNAS*, 1994, vol. 91, 3054-3057 [0157]
- 45 • **LAM, K.S.** *Anticancer Drug Des.*, 1997, vol. 12, 145 [0165]
- **DEWITT** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, vol. 90, 1979 [0166]
- **ERB** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 11422 [0166]
- 50 • **ZUCKERMANN** *et al. J. Med Chem.*, vol. 37, 2678 [0166]
- **CHO** *et al. Science*, 1993, vol. 261, 1303 [0166]
- **CARRELL** *et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, vol. 33, 2059 [0166]
- 55 • **CARELL** *et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, vol. 33, 2061 [0166]
- **GALLOP** *et al. J. Med. Chem.*, 1994, vol. 37, 1233 [0166]
- **HOUGHTEN**. *Biotechniques*, 1992, vol. 13, 412-421 [0167]
- 60 • **LAM**. *Nature*, 1991, vol. 354, 82-84 [0167]
- **FODOR**. *Nature*, 1993, vol. 364, 555-556 [0167]
- **CULL** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, vol. 89, 1865-1869 [0167]
- 65 • **SCOTT; SMITH**. *Science*, 1990, vol. 249, 386-390 [0167]
- **DEVLIN**. *Science*, 1990, vol. 249, 404-406 [0167]

ES 2 320 622 T3

- **CWIRLA** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, vol. 87, 6378-6382 [0167]
- **FELICI**. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 301-310 [0167]
- 5 • **MCCONNELL**, H. M. *et al. Science*, 1992, vol. 257, 1906-1912 [0169]
- **SJOLANDER**, S.; **URBANICZKY**, C. *Anal. Chem.*, 1991, vol. 63, 2338-2345 [0175]
- 10 • **SZABO** *et al. Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1995, vol. 5, 699-705 [0175]
- **ZERVOS** *et al. Cell*, 1993, vol. 72, 223-232 [0182]
- 15 • **MADURA** *et al. J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 12046-12054 [0182]
- **BARTEL** *et al. Biotechniques*, 1993, vol. 14, 920-924 [0182]
- 20 • **IWABUCHI** *et al. Oncogene*, 1993, vol. 8, 1693-1696 [0182]
- **D'EUSTACHIO** P. *et al. Science*, 1983, vol. 220, 919-924 [0192]
- 25 • **FAN**, Y. *et al. PNAS*, 1990, vol. 87, 6223-27 [0193]
- **VERMA** *et al. Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques. Pergamon Press*, 1988 [0194]
- 30 • **EGELAND**, J. *et al. Nature*, 1987, vol. 325, 783-787 [0196]
- **LANDEGRAN** *et al. Science*, 1988, vol. 241, 1077-1080 [0219]
- 35 • **NAKAZAWA** *et al. PNAS*, 1994, vol. 91, 360-364 [0219]
- **ABRAVAYA** *et al. Nucleic Acids Res*, 1995, vol. 23, 675-682 [0219]
- 40 • **GUATELLI**, J.C. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 1874-1878 [0220]
- **KWOH**, D.Y. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 1173-1177 [0220]
- 45 • **LIZARDI**, P.M. *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 1197 [0220]
- **CRONIN**, M.T. *et al. Human Mutation*, 1996, vol. 7, 244-255 [0222]
- 50 • **KOZAL**, M.J. *et al. Nature Medicine*, 1996, vol. 2, 753-759 [0222]
- **MAXIM**; **GILBERT**. *PNAS*, 1977, vol. 74, 560 [0223]
- 55 • **SANGER**. *PNAS*, 1977, vol. 74, 5463 [0223]
- *Biotechniques*, 1995, vol. 19, 448 [0223]
- **COHEN** *et al. Adv. Chromatogr.*, 1996, vol. 36, 127-162 [0223]
- 50 • **GRIFFIN** *et al. Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1993, vol. 38, 147-159 [0223]
- **MYERS** *et al. Science*, 1985, vol. 230, 1242 [0224]
- 55 • **COTTON** *et al. Proc. Natl Acad Sci USA*, 1988, vol. 85, 4397 [0224]
- **SALEEBA** *et al. Methods Enzymol*, 1992, vol. 217, 286-295 [0224]
- 60 • **HSU** *et al. Carcinogenesis*, 1994, vol. 15, 1657-1662 [0225]
- **ORITA**. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 1989, vol. 86, 2766 [0226]
- **COTTON**. *Mutat Res*, 1993, vol. 285, 125-144 [0226]
- 65 • **HAYASHI**. *Genet Anal Tech Appl*, 1992, vol. 9, 73-79 [0226]
- **KEEN**. *Trends Genet*, 1991, vol. 7, 5 [0226]

- **MYERS** *et al. Nature*, 1985, vol. 313, 495 [0227]
- **ROSENBAUM; REISSNER**. *Biophys Chem*, 1987, vol. 265, 12753 [0227]
- 5 • **SAIKI** *et al. Nature*, 1986, vol. 324, 163 [0228]
- **SAIKI** *et al. Proc. Natl Acad. Sci USA*, 1989, vol. 86, 6230 [0228]
- 10 • **GIBBS** *et al. Nucleic Acids Res*, 1989, vol. 17, 2437-2448 [0229]
- **PROSSNER**. *Tibtech*, 1993, vol. 11, 238 [0229]
- 15 • **GASPARINI** *et al. Mol. Cell Probes*, 1992, vol. 6, 1 [0229]
- **BARANY**. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 1991, vol. 88, 189 [0229]
- 20 • **EICHELBAUM, M.** *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1996, vol. 23 (10-11), 983-985 [0242]
- **LINDER, M.W.** *Clin Chem*, 1997, vol. 43 (2), 254-266 [0242]
- 25 • Molecular Cloning A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0250]
- **NIELSEN, H.** *et al. Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 1-6 [0250]
- 30 • **ALTSCHUL** *et al. J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403 [0252]
- **HUANG; MILLER**. *Adv. Appl. Math.*, 1991, vol. 12, 373-381 [0252]
- **KREBS; KRAWETZ**. *Biochem. Biophys. Acta*, 1993, vol. 1202, 7-12 [0254]
- 35 • **GAMIER** *et al. J Mol Biol*, 1978, vol. 120, 97 [0255]
- **ALTSCHUL S.F.** *et al. J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0256] [0262]
- **ALSTROM** *et al. Acta Psychiat. Neurol. Scand.*, 1959, vol. 34, 1-35 [0260]
- 40 • **ALTER; MOSHANG**. *Am. J. Dis. Child.*, 1993, vol. 147, 97-99 [0260]
- **AWAZU** *et al. Am. J. Med. Genet.*, 1997, vol. 69, 13-16 [0260]
- 45 • **AYNACI** *et al. (Letter) Clin. Genet.*, 1995, vol. 48, 164-166 [0260]
- **CHARLES** *et al. J. Med Genet.*, 1990, vol. 27, 590-592 [0260]
- **COHEN; KISCH**. *Israel J. Med Sci.*, 1994, vol. 30, 234-236 [0260]
- 50 • **COLLIN** *et al. Hum. Molec. Genet.*, 1997, vol. 6, 213-219 [0260]
- **COLLIN** *et al. (Letter) Clin. Genet.*, 1999, vol. 55, 61-62 [0260]
- **CONNOLLY** *et al. Am. J. Med. Genet.*, 1991, vol. 40, 421-424 [0260]
- 55 • **GOLDSTEIN; FIALKOW**. *Medicine*, 1973, vol. 52, 53-71 [0260]
- **MACARI** *et al. Hum. Genet.*, 1998, vol. 103, 658-661 [0260]
- **MARSHALL** *et al. Am. J. Med. Genet.*, 1997, vol. 73, 150-161 [0260]
- 60 • **MICHAUD** *et al. J. Pediat.*, 1996, vol. 128, 225-229 [0260]
- **MILLAY** *et al. Am. J. Ophthal.*, 1986, vol. 102, 482-490 [0260]
- **RUDIGER** *et al. Hum. Genet.*, 1985, vol. 69, 76-78 [0260]
- 65 • **RUSSELL-EGGITT** *et al. Ophthalmology*, 1998, vol. 105, 1274-1280 [0260]
- **TREMBLAY** *et al. Am. J. Ophthal.*, 1993, vol. 115, 657-665 [0260]

ES 2 320 622 T3

- **WARREN** *et al. Am. Heart J.*, 1987, vol. 114, 1522-1524 [0260]
- **WEINSTEIN** *et al. New Eng. J. Med.*, 1969, vol. 281, 969-977 [0260]
- 5 • **CARINCI** *et al. (Letter) Am. J. Hum. Genet.*, 1995, vol. 56, 337-339 [0260]
- **PEZZETTI** *et al. Genomics*, 1998, vol. 50, 299-305 [0260]
- 10 • **SCAPOLI** *et al. Genomics*, 1997, vol. 43, 216-220 [0260]
- **DI ROCCO** *et al. Adv. Neurol.*, 1996, vol. 69, 3-11 [0260]
- **GASSER** *et al. Nature Genet.*, 1998, vol. 18, 262-265 [0260]
- 15 • **LEE** *et al. Cancer Res.*, 1997, vol. 57, 590-593 [0261]
- **THAETE** *et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1990, vol. 194, 97-102 [0261]
- 20 • **WILSON** *et al. Cell*, 1984, vol. 37, 767 [0273]
• **HARLOW**, E.; **LANE**, D. Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1988 [0275]

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 320 622 T3

REIVINDICACIONES

1. Molécula aislada de ácido nucleico adecuada para su uso en el diagnóstico del cáncer hepático metastásico seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 89% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, o a la complementaria de la misma;
- 10 b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 95% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, o a la complementaria de la misma;
- c) una molécula de ácido nucleico que comprende un fragmento de al menos 500 nucleótidos de un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, o la complementaria de la misma;
- 15 d) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- 20 e) una molécula de ácido nucleico que codifica un fragmento de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, donde el fragmento comprende al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- f) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, o la complementaria de la misma; y
- 25 g) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

30 2. Vector que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

3. Célula hospedadora que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

4. Polipéptido aislado adecuado para su uso en el diagnóstico del cáncer hepático metastásico seleccionado del grupo que consiste en:

- 35 a) un fragmento de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, donde el fragmento comprende al menos 250 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:2;
- 40 b) un polipéptido que está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 89% idéntica a un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1;
- c) un polipéptido que está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 95% idéntica a un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1;
- 45 d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; y
- 50 e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

55 5. Un anticuerpo o una porción inmunológicamente activa del mismo que se une de forma selectiva a un polipéptido de la reivindicación 4.

6. El anticuerpo o la porción inmunológicamente activa del mismo de la reivindicación 5 que es seleccionado del grupo que consiste en:

- 60 a) anticuerpos policlonales;
- b) anticuerpos monoclonales;
- c) fragmentos F(ab); o
- 65 d) fragmentos F(ab')2.

ES 2 320 622 T3

7. El anticuerpo o la porción inmunológicamente activa del mismo de la reivindicación 5 ó 6 que es seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 a) anticuerpos humanizados;
- b) anticuerpos humanos; o
- c) anticuerpos químéricos.

10 8. El anticuerpo o la porción inmunológicamente activa del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 que está unido a una sustancia detectable.

15 9. El anticuerpo o la porción inmunológicamente activa del mismo de la reivindicación 8 donde la sustancia detectable es seleccionada del grupo que consiste en:

- 20 a) enzimas;
- b) grupos prostéticos;
- c) materiales fluorescentes;
- d) materiales luminiscentes;
- 25 e) materiales bioluminiscentes; o
- f) materiales radiactivos.

30 10. Método para producir un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- b) un fragmento de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 donde el fragmento comprende al menos 250 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:2; y
- c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 3 bajo condiciones en las que se exprese la molécula de ácido nucleico.

40 11. Método para detectar la presencia de un polipéptido de la reivindicación 4 en una muestra que comprende:

- 45 a) poner en contacto la muestra con un compuesto que se une selectivamente al polipéptido; y
- b) determinar si el compuesto se une al polipéptido en la muestra para así detectar la presencia de un polipéptido de la reivindicación 4 en la muestra.

50 12. Kit que comprende un compuesto que se une selectivamente a un polipéptido de la reivindicación 4 y las instrucciones para su uso.

55 13. Método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 en una muestra que comprende:

- a) poner en contacto la muestra con una sonda o cebador de ácido nucleico que hibrida selectivamente a la molécula de ácido nucleico; y
- b) determinar si la sonda o el cebador de ácido nucleico se une a la molécula de ácido nucleico en la muestra para así detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 en la muestra.

60 14. El método de la reivindicación 13, donde la muestra comprende moléculas de ARNm y se pone en contacto con una sonda de ácido nucleico.

65 15. El método de la reivindicación 13, donde la muestra se aísla de una muestra seleccionada a partir de tejido hepático.

ES 2 320 622 T3

16. El método de la reivindicación 13, donde la muestra es una muestra tumoral.
17. Método para el diagnóstico de un sujeto con un tumor hepático metastásico que comprende:
 - 5 poner en contacto una muestra de tumor hepático del sujeto con un agente capaz de detectar una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o un polipéptido de la reivindicación 4;
 - 10 determinar la cantidad de una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o polipéptido de la reivindicación 4 expresada en la muestra tumoral; y
 - 15 elaborar un diagnóstico basado en la cantidad de molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o polipéptido de la reivindicación 4 expresada en la muestra tumoral.
18. Método para determinar el potencial metastásico de un tumor hepático de un sujeto que comprende:
 - 20 poner en contacto una muestra tumoral del sujeto con un agente capaz de detectar una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o un polipéptido de la reivindicación 4;
 - 25 determinar la cantidad de molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o polipéptido de la reivindicación 4 expresada en la muestra tumoral; y
 - 30 elaborar una determinación basada en la cantidad de molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o polipéptido de la reivindicación 4 expresada en la muestra tumoral.
19. Método pronóstico que comprende:
 - 35 poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un agente capaz de detectar una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o un polipéptido de la reivindicación 4;
 - 40 determinar la cantidad de molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o polipéptido de la reivindicación 4 expresada en la muestra biológica; y
 - 45 elaborar un pronóstico para el cáncer hepático metastásico basado en la cantidad de molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o polipéptido de la reivindicación 4 expresada en la muestra tumoral.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17, 18 ó 19 que además comprende:
 - 50 comparar la cantidad de una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o un polipéptido de la reivindicación 4 expresada en la muestra biológica o tumoral respecto una muestra control; y
 - 55 elaborar el diagnóstico, determinación o pronóstico basado en la cantidad de molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o polipéptido de la reivindicación 4 expresada en la muestra biológica o tumoral comparada con la muestra control.
21. Kit que comprende un compuesto que hibrida selectivamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 y las instrucciones para su uso.
- 50 22. Uso de una molécula de ácido nucleico antisentido de la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o un anticuerpo específico para el polipéptido de la reivindicación 4 en la fabricación de un medicamento para regular las metástasis del tumor hepático en un individuo.
- 55 23. Uso según la reivindicación 22, donde la molécula de ácido nucleico antisentido es un inhibidor de la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o el anticuerpo es un inhibidor del polipéptido de la reivindicación 4.
- 60 24. Uso de una molécula de ácido nucleico antisentido de la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o un anticuerpo específico para el polipéptido de la reivindicación 4 en la fabricación de un medicamento para inhibir la progresión de un tumor hepático en un individuo.

FIG. 1A

CGTCCGCCAC GCGTCCGGAC TAGTTCTAGA TCGCGAGCGG CCGCCCTTT
 TTTTTTTTT TTGGAAGTCC TAGGACTGAT CTCCAGGACC AGCACTCTC
 TCCCAGCCCT TAGGGTCCCTG CTCGGCCAAG GCCTTCCCTG CC ATG CGA
 CCT GTC AGT GTC TGG CAG TGG AGC CCC TGG GGG CTG CTG CTG
 TGC CTG CTG TGC AGT TCG TGC TTG GGG TCT CCG TCC CCT TCC
 ACG GGC CCT GAG AAG AAG GCC GGG AGC CAG GGG CTT CGG TTC
 CGG CTG GCT GGC TTC CCC AGG AAG CCC TAC GAG GGC CGC GTG
 GAG ATA CAG CGA GCT GGT GAA TGG GGC ACC ATC TGC GAT GAT
 GAC TTC ACG CTG CAG GCT GCC CAC ATC CTC TGC CGG GAG CTG
 GGC TTC ACA GAG GCC ACA GGC TGG ACC CAC AGT GCC AAA TAT
 GGC CCT GGA ACA GGC CGC ATC TGG CTG GAC AAC TTG AGC TGC
 AGT GGG ACC GAG CAG AGT GTG ACT GAA TGT GCC TCC CGG GGC
 TGG GGG AAC AGT GAC TGT ACG CAC GAT GAG GAT GCT GGG GTC
 ATC TGC AAA GAC CAG CGC CTC CCT GGC TTC TCG GAC TCC AAT
 GTC ATT GAG GTA GAG CAT CAC CTG CAA GTG GAG GAG GTG CGA
 ATT CGA CCC GCC GTT GGG TGG GGC AGA CGA CCC CTG CCC GTG
 ACG GAG GGG CTG GTG GAA GTC AGG CTT CCT GAC GGC TGG TCG
 CAA GTG TGC GAC AAA GGC TGG AGC GCC CAC AAC AGC CAC GTG
 GTC TGC GGG ATG CTG GGC TTC CCC AGC GAA AAG AGG GTC AAC
 GCG GCC TTC TAC AGG CTG CTA GCC CAA CGG CAG CAA CAC TCC
 TTT GGT CTG CAT GGG GTG GCG TGC GTG GGC ACG GAG GCC CAC
 CTC TCC CTC TGT TCC CTG GAG TTC TAT CGT GCC AAT GAC ACC
 GCC AGG TGC CCT GGG GGG GGC CCT GCA GTG GTG AGC TGT GTG
 CCA GGC CCT GTC TAC GCG GCA TCC AGT GGC CAG AAG AAG CAA
 CAA CAG TCG AAG CCT CAG GGG GAG GCC CGT GTC CGT CTA AAG
 GGC GGC GCC CAC CCT GGA GAG GGC CGG GTA GAA GTC CTG AAG
 GCC AGC ACA TGG GGC ACA GTC TGT GAC CGC AAG TGG GAC CTG
 CAT GCA GCC AGC GTG GTG TGT CGG GAG CTG GGC TTC GGG AGT
 GCT CGA GAA GCT CTG AGT GGC GCT CGC ATG GGG CAG GGC ATG
 GGT GCT ATC CAC CTG AGT GAA GTT CGC TGC TCT GGA CAG GAG
 CTC TCC CTC TGG AAG TGC CCC CAC AAG AAC ATC ACA GCT GAG
 GAT TGT TCA CAT AGC CAG GAT GCC GGG GTC CGG TGC AAC CTA
 CCT TAC ACT GGG GCA GAG ACC AGG ATC CGA CTC AGT GGG GGC
 CGC AGC CAA CAT GAG GGG CGA GTC GAG GTG CAA ATA GGG GGA

FIG. 1B

CCT GGG CCC CTT CGC TGG GGC CTC ATC TGT GGG GAT GAC TGG
 GGG ACC CTG GAG GCC ATG GTG GCC TGT AGG CAA CTG GGT CTG
 GGC TAC GCC AAC CAC GGC CTG CAG GAG ACC TGG TAC TGG GAC
 TCT GGG AAT ATA ACA GAG GTG GTG ATG AGT GGA GTG CGC TGC
 ACA GGG ACT GAG CTG TCC CTG GAT CAG TGT GCC CAT CAT GGC
 ACC CAC ATC ACC TGC AAG AGG ACA GGG ACC CGC TTC ACT GCT
 GGA GTC ATC TGT TCT GAG ACT GCA TCA GAT CTG TTG CTG CAC
 TCA GCA CTG GTG CAG GAG ACC GCC TAC ATC GAA GAC CGG CCC
 CTG CAT ATG TTG TAC TGT GCT GCG GAA GAG AAC TGC CTG GCC
 AGC TCA GCC CGC TCA GCC AAC TGG CCC TAT GGT CAC CGG CGT
 CTG CTC CGA TTC TCC CAG ATC CAC AAC CTG GGA CGA GCT
 GAC TTC AGG CCC AAG GCT GGG CGC CAC TCC TGG GTG TGG CAC
 GAG TGC CAT GGG CAT TAC CAC AGC ATG GAC ATC TTC ACT CAC
 TAT GAT ATC CTC ACC CCA AAT GGC ACC AAG GTG GCT GAG GGC
 CAC AAA GCT AGT TTC TGT CTC GAA GAC ACT GAG TGT CAG GAG
 GAT GTC TCC AAG CGG TAT GAG TGT GCC AAC TTT GGA GAG CAA
 GGC ATC ACT GTG GGT TGC TGG GAT CTC TAC CGG CAT GAC ATT
 GAC TGT CAG TGG ATT GAC ATC ACG GAT GTG AAG CCA GGA AAC
 TAC ATT CTC CAG GTT GTC ATC AAC CCA AAC TTT GAA GTA GCA
 GAG AGT GAC TTT ACC AAC AAT GCA ATG AAA TGT AAC TGC AAA
 TAT GAT GGA CAT AGA ATC TGG GTG CAC AAC TCC CAC ATT GGT
 GAT GCC TTC AGT GAA GAG GCC AAC AGG AGG TTT GAA CGC TAC
 CCT GGC CAG ACC AGC AAC CAG ATT ATC TAAGTGCCAC TGCCCTCTGC
 AAACCACCAAC TGGCCCTAA TGGCAGGGT CTGAGGTGC CATTACCTCA
 GGAGCTTACC AAGAAACCCA TGTCAGCAAC CGCACTCATC AGACCATGCA
 CTATGGATGT GGAAGTGTCA AGCAGAAGTT TTCACCCCTCC TTCAGAGGCC
 AGCTGTCAGT ATCTGTAGCC AAGCATGGGA ATCTTGCTC CCAGGCCAG
 CACCGAGCAG AACAGACCAG AGCCCACCAAC ACCACAAAGA GCAGCACCTG
 ACTAACTGCC CACAAAAGAT GGCAAGCAGCT CATTCTCTTT AATAGGAGGT
 CAGGATGGTC AGCTCCAGTA TCTCCCTAA GTTTAGGGGG ATACAGCTTT
 ACCTCTAGCC TTTGGTGGG GGAAAAGATC CAGCCCTCCC ACCTCATTT
 TTACTATAAT ATGTTGCTAG GTATAATTTT ATTTTATATA AAAAGTGT
 CTGTGATTCT TCAGAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA

FIG. 2A

ATG CGA CCT GTC AGT GTC TGG CAG TGG AGC CCC TGG GGG CTG CTG
CTG TGC CTG CTG TGC AGT TCG TGC TTG GGG TCT CCG TCC CCT TCC
ACG GGC CCT GAG AAG AAG GCC GGA GCC AGG GGC TTC GGT TCC GGC
TGG CTG GCT TCC CCA GGA AGC CCT ACG AGG GCC GCG TGG AGA TAC
AGC GAG CTG GTG AAT GGG GCA CCA TCT GCG ATG ATG ACT TCA CGC
TGC AGG CTG CCC ACA TCC TCT GCG GGA GCT GGG CTT CAC AGA GGC
CAC AGG CTG GAC CCA CAG TGC CAA ATA TGG CCC TGG AAC AGG CCG
CAT CTG GCT GGA CAA CTT GAG CTG CAG TGG GAC CGA GCA GAG TGT
GAC TGA ATG TGC CTC CCG GGG CTG GGG GAA CAG TGA CTG TAC CAC
GAT GAG GAT GCT GGG GTC ATC TGC AAA GAC CAG CGC CTC CCT GGC
TTC TCG GAC TCC AAT GTC ATT GAG GTA GAG CAT CAC CTG CAA GTG
GAG GAG GTG CGA ATT CGA CCC GCC GTT GGG TGG GGC AGA CGA CCC
CTG CCC GTG ACG GAG GGG CTG GTG GAA GTC AGG CTT CCT GAC GGC
TGG TCG CAA GTG TGC GAC AAA GGC TGG AGC GCC CAC AAC AGC CAC
GTG GTC TGC GGG ATG CTG GGC TTC CCC AGC GAA AAG AGG GTC AAC
GCG GCC TTC TAC AGG CTG CTA GCC CAA CGG CAG CAA CAC TCC TTT
GGT CTG CAT GGG GTG GCG TGC GTG GGC ACG GAG GCC CAC CTC TCC
CTC TGT TCC CTG GAG TTC TAT CGT GCC AAT GAC ACC GCC AGG TGC
CCT GGG GGG GGC CCT GCA GTG GTG AGC TGT GTG CCA GGC CCT GTC
TAC GCG GCA TCC AGT GGC CAG AAG AAG CAA CAA CAG TCG AAG CCT
CAG GGG GAG GCC CGT GTC CGT CTA AAG GGC GGC GCC CAC CCT GGA
GAG GGC CGG GTA GAA GTC CTG AAG GCC AGC ACA TGG GGC ACA GTC
TGT GAC CGC AAG TGG GAC CTG CAT GCA GCC AGC GTG GTG TGT CGG
GAG CTG GGC TTC GGG AGT GCT CGA GAA GCT CTG AGT GGC GCT CGC
ATG GGG CAG GGC ATG GGT GCT ATC CAC CTG AGT GAA GTT CGC TGC
TCT GGA CAG GAG CTC TCC CTC TGG AAG TGC CCC CAC AAG AAC ATC
ACA GCT GAG GAT TGT TCA CAT AGC CAG GAT GCC GGG GTC CGG TGC
AAC CTA CCT TAC ACT GGG GCA GAG ACC AGG ATC CGA CTC AGT GGG
GGC CGC AGC CAA CAT GAG GGG CGA GTC GAG GTG CAA ATA GGG GGA
CCT GGG CCC CTT CGC TGG GGC CTC ATC TGT GGG GAT GAC TGG GGG
ACC CTG GAG GCC ATG GTG GCT AGG CAA CTG GGT CTG GGC TAC
GCC AAC CAC GGC CTG CAG GAG ACC TGG TAC TGG GAC TCT GGG AAT

FIG. 2B

ATA ACA GAG GTG GTG ATG AGT GGA GTG CGC TGC ACA GGG ACT GAG
CTG TCC CTG GAT CAG TGT GCC CAT CAT GGC ACC CAC ATC ACC TGC
AAG AGG ACA GGG ACC CGC TTC ACT GCT GGA GTC ATC TGT TCT GAG
ACT GCA TCA GAT CTG TTG CTG CAC TCA GCA CTG GTG CAG GAG ACC
GCC TAC ATC GAA GAC CGG CCC CTG CAT ATG TTG TAC TGT GCT GCG
GAA GAG AAC TGC CTG GCC AGC TCA GCC CGC TCA GCC AAC TGG CCC
TAT GGT CAC CGG CGT CTG CTC CGA TTC TCC TCC CAG ATC CAC AAC
CTG GGA CGA GCT GAC TTC AGG CCC AAG GCT GGG CGC CAC TCC TGG
GTG TGG CAC GAG TGC CAT GGG CAT TAC CAC AGC ATG GAC ATC TTC
ACT CAC TAT GAT ATC CTC ACC CCA AAT GGC ACC AAG GTG GCT GAG
GGC CAC AAA GCT AGT TTC TGT CTC GAA GAC ACT GAG TGT CAG GAG
GAT GTC TCC AAG CGG TAT GAG TGT GCC AAC TTT GGA GAG CAA GGC
ATC ACT GTG GGT TGC TGG GAT CTC TAC CGG CAT GAC ATT GAC TGT
CAG TGG ATT GAC ATC ACG GAT GTG AAG CCA GGA AAC TAC ATT CTC
CAG GTT GTC ATC AAC CCA AAC TTT GAA GTA GCA GAG AGT GAC TTT
ACC AAC AAT GCA ATG AAA TGT AAC TGC AAA TAT GAT GGA CAT AGA
ATC TGG GTG CAC AAC TGC CAC ATT GGT GAT GCC TTC AGT GAA GAG
GCC AAC AGG AGG TTT GAA CGC TAC CCT GGC CAG ACC AGC AAC CAG
ATT ATC TAA

FIG. 3

MRPVSVWQNS PWGLLLCLLC SSCLGSPSPS TGPEKKAGSQ GLRFRLAGFP
RKPYEGRVEI QRAGEWGTIC DDDFTLQAAH ILCRELGFTE ATGWTHSAKY
GPGTGRIWLD NLSCSGTEQS VTECASRGWG NSDCTHDEDA GVICKDQRLP
GFSDSNVIEV EHHLQVEEVR IRPAVGWGRRLPVT EGVRLPDGWSQV
CDKGWSAHNS HVVCGMLGFP SEKRVNAAFY RLLAQROQHS FGLHGVACVG
TEAHLSLCSL EFYRANDTAR CPGGGPAVVS CVPGPVYAAAS SGOKKKQQQSK
PQGEARVRLK GGAHPGEGRV EVLKASTWGT VCDRKWDLHA ASVVCRELGF
GSAREALSGA RMGQGMGAIH LSEVRCSGQE LSLWKCPhKN ITAEDCSHSQ
DAGVRCNL PY TGAETRIRLS GGRSQHEGRV EVQIGGPGPL RWGLICGDDW
GTLEAMVACR QLGLGYANHG LQETWYWDSG NITEVVMMSGV RCTGTELSLD
QCAHHGTHIT CKRTGTRFTA GVICSETASD LLLHSALVQE TAYIEDRPLH
MLYCAAEEENC LASSARSANW PYGHRRLLRF SSQIHNLGRA DFRPKAGRHS
WVWHECHGHY HSMDIPTHYD ILTPNGTKVA EGHKASFCL DTECQEDVSK
RYECANFGEQ GITVGCWDLY RHDIDCQWID ITDVKPGNYI LQVVINPNFE
VAESDFTNNA MKCNCKYDGH RIWVHNCHIG DAFSEEANRR FERYPGQTSN
QII

FIG. 4

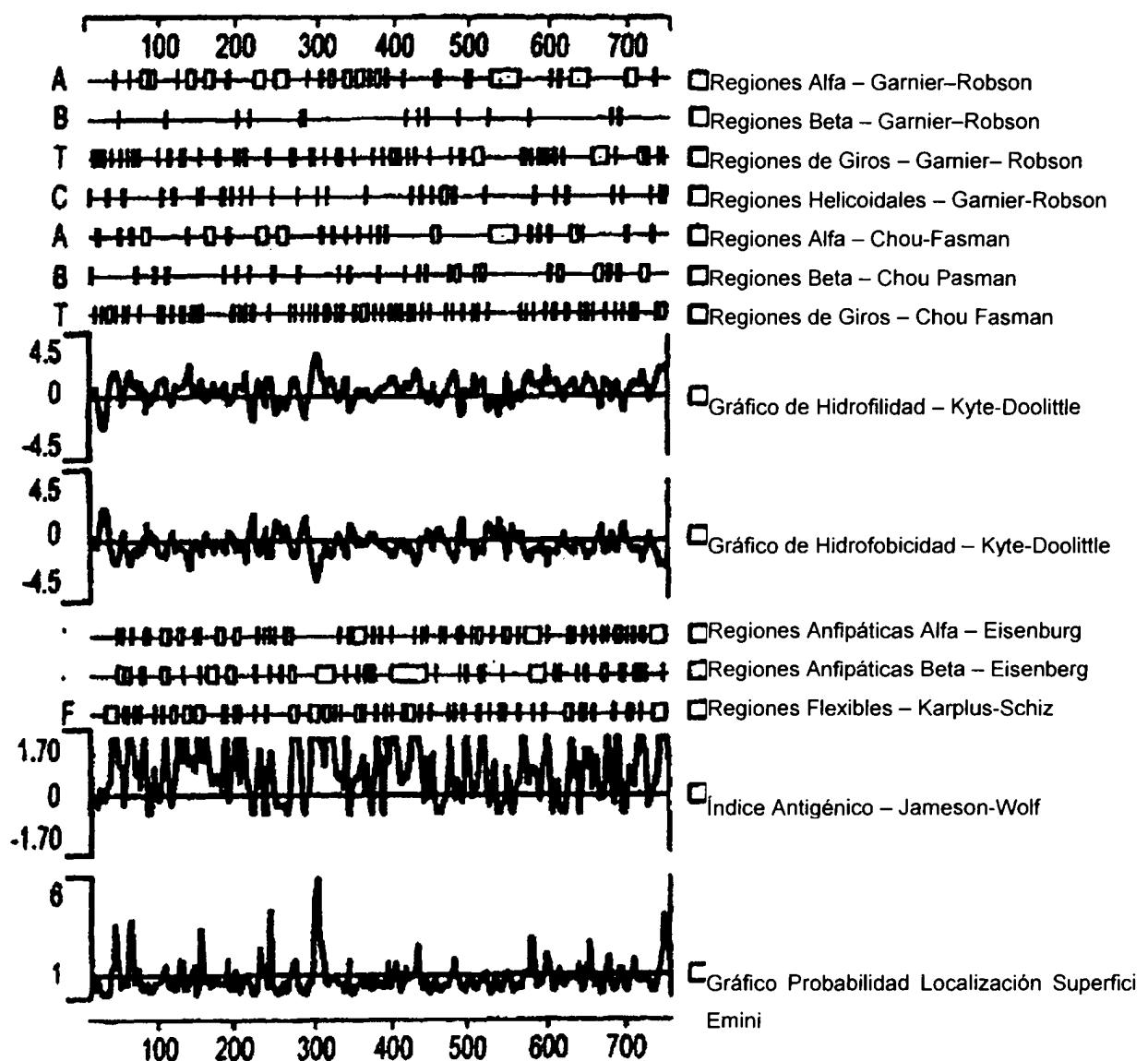


FIG. 5A

1	MRFA-----WTVLLLGPLQ-----	-----LCALVHCA -----PAPPAGQQQP-----	-----	60
LOX	MALA-----RGSRQLGALV-----	-----WGACLCVLYH-----	-----GQQAQ-----	
hulOL	MERPLCSCSHLCSCCLAMLLSPLSLAQYDSWPHYPEYHQOQAPANVAKIQLRL			
hulOr	M-RAVSVWYCCPWNGLLLHCL-C-----	-----SFSVGSPPSPS- -----ISPEKKVGSQGLRFRL		
mulOr-2	M-RPVSVWQWSPWGLLL--CLLC-----	-----SSCLGSPPSPS-TGPEKKAGSQGLRFRL		
hulOr-2				
61	-----PREPPAAPGAWRQQIQIOWENN-GQVFSL-----	-----LSLGSOY-----	-----	
LOX	-----P-GQGSDPARWRQLIQMENN-GQVYSL-----	-----LNSGSEXYVPA-----	-----GPQRSESSSSR	
hulOL	-----AGQKRKHSEGRVVEVYDQWVGTVCDDDFSIHAIAHVVCRELGYVEAKSWTASSSYGKGEGGP			
hulOr	-----AGFPRKPYEGRVIEQRAGEWGTICDDDFTLQAAHVLCRELGFTEATGWTHSAKYGPGTGR			
mulOr-2	-----AGFPRKPYEGRVIEQRAGEWGTICDDDFTLQAAHVLCRELGFTEATGWTHSAKYGPGTGR			
hulOr-2				
121	-----QHQRRRRDPGAA-----	-----VPG-----	-----AANASAQQPRTP	
LOX	-----VLLA-----GAPQAAQQRSHGSPPRRQAPS,LP-----	-----LPG-----	-----RVGSDTVRGQARHP	
hulOL	-----IWLDNLHCTGNNEATLAACTSGNGVTDCKHTEDVGVVCSDKRIPGFKFDNSLINVQENLN			
hulOr	-----IWLDNLSCRGTEGVTECASRGWGNSDCTHDEDAGVICKDQRLPGF-----	-----SDSNVIEVEH-Q		
mulOr-2	-----IWLDNLSCSGTEQSvTECASRGWGNSDCTHDEDAGVICKDQRLPGF-----	-----SDSNVIEVEH-H		
hulOr-2				
181	-----ILL--IRD-----N-----	-----RTAAG-----	-----RTRTAGSSGVTAG-----	
LOX	-----FGFGQVPDF-----	-----NWREVAVG DSTGMLARTSVS-----	-----QQRHGGSASSVSAS-AFAST-	
hulOL	-----IQVEDIRIRAILSTYRKRTPVMEGYVEVKEGKTVKQICDKHNTAKNSRVRVCGMFGFPGER			
hulOr	-----LQVEEVRLRPAVEMGRRPLPVTEGLVEVRLPEGWSQVCDKGWSAARNSHVVCGLMLGFPGEK			
mulOr-2	-----LQVEEVRLRPAVGMGRRPLPVTEGLVEVRLPDGWSQVCDKGWSAARNSHVVCGLMLGFPSEK			
hulOr-2				
240				

FIG. 5B

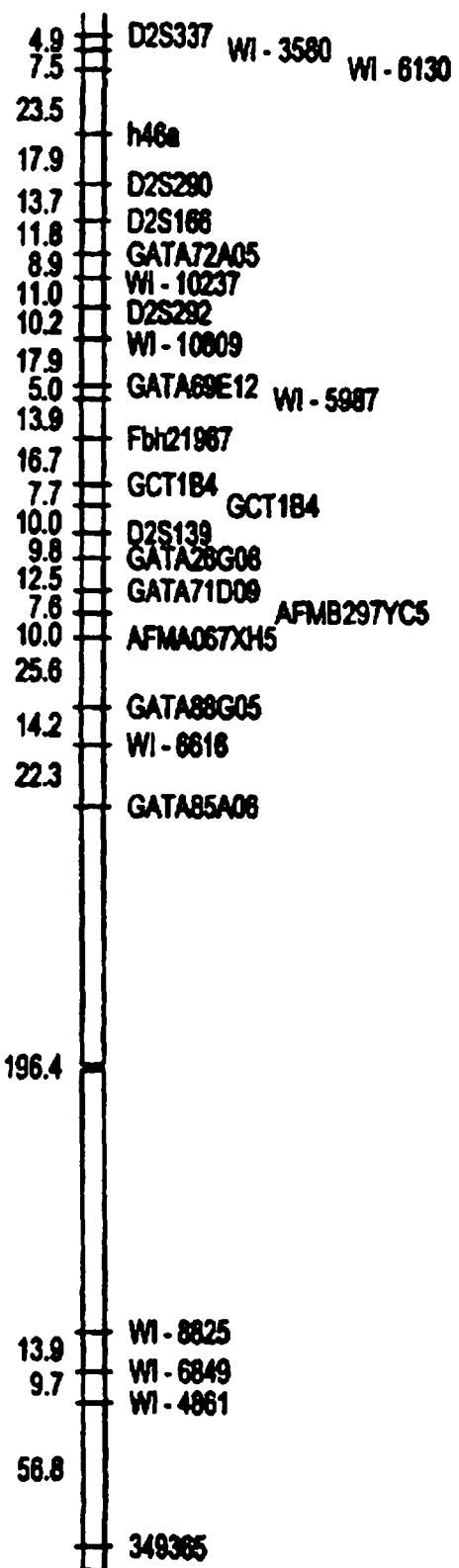
241	300	360	420	480
LOX	-RP-RPTARHWF-----	REAGPSR----AENQTAPEVPAL-----	PS-----	YK----YSDDNPYNNYDTYERPRPG-----
hulOL	YRQ-QPSYPQQFPY-----	YRPAGGGV-----GAGAAVASAGVI-----	R-----	YK-----
hulOr	TYNTKVKMFASRKRKORYWPFSMDCTGTEAHISSCKLGPOVSLSDPMKNVTCENGLPAVVS	CVPGQVFSPDGPSRFRKAYKPE-QPLVRLRGAYIIGEGRVEVLKAGTWGTVCDDRKWDLVS	RYEEYGGGEELPEYPPQG-----	GLDRRYXSHSLYSEGTPGFZ--QAXPDPCPEAMQAECCDPLCXPYANP--PPEAXGPP
mulOr-2	RVNMAFYRMLAQQKHOHSFGLHSVACVGTEAHLISLCSLE--FYRANDTTRCSGGNPAVVS	CVLGPLYATFTGQKKQQHSKPOGEARVRVLKGGAHOGEGRVEVLKAGTWGTVCDDRKWDLQA	TYPAPERPTVPPPPPO-----	DAGVRCTNP-AMGLQKKLRLNGGRNPYEGRVEVLVERNGSLVNGMVCQNWGIVEAMVVC
hulOr-2	RVNAAFYRLLAQQQHSFGLHGVAACVGTEAHLISLCSLE--FYRANDTARCPGGGPAAVVS	CVPGPVYAASSGQKKQQQSKPQGEARVRVLKGGAHPGEGRVEVLKASTWGTVCDRKWDLHA	ESVRCSSQEPSLWRCPSKNITAEDCSHSQ-----	DAGVRCLNP-YTGAETRIRLSGGRSQHEGRVEQIGGPGPLRWGLICGDDWGTLTEAMVAC
301				
LOX	REAGPSR----AENQTAPEVPAL-----	REAGPSR----AENQTAPEVPAL-----	PS-----	PS-----
hulOL	YDQGFVY-----YRPAGGGV-----GAGAAVASAGVI-----	YDQGFVY-----YRPAGGGV-----GAGAAVASAGVI-----	R-----	YDQGFVY-----YRPAGGGV-----GAGAAVASAGVI-----
hulOr	CVPGQVFSPDGPSRFRKAYKPE-QPLVRLRGAYIIGEGRVEVLKAGTWGTVCDDRKWDLVS	CVPGQVFSPDGPSRFRKAYKPE-QPLVRLRGAYIIGEGRVEVLKAGTWGTVCDDRKWDLVS	RYEEYGGGEELPEYPPQG-----	CVPGQVFSPDGPSRFRKAYKPE-QPLVRLRGAYIIGEGRVEVLKAGTWGTVCDDRKWDLVS
mulOr-2	CVLGPLYATFTGQKKQQHSKPOGEARVRVLKGGAHOGEGRVEVLKAGTWGTVCDDRKWDLQA	CVLGPLYATFTGQKKQQHSKPOGEARVRVLKGGAHOGEGRVEVLKAGTWGTVCDDRKWDLQA	TYPAPERPTVPPPPPO-----	CVLGPLYATFTGQKKQQHSKPOGEARVRVLKGGAHOGEGRVEVLKAGTWGTVCDDRKWDLQA
hulOr-2	CVPGPVYAASSGQKKQQQSKPQGEARVRVLKGGAHPGEGRVEVLKASTWGTVCDRKWDLHA	CVPGPVYAASSGQKKQQQSKPQGEARVRVLKGGAHPGEGRVEVLKASTWGTVCDRKWDLHA	ESVRCSSQEPSLWRCPSKNITAEDCSHSQ-----	CVPGPVYAASSGQKKQQQSKPQGEARVRVLKGGAHPGEGRVEVLKASTWGTVCDRKWDLHA
361				
LOX	RVDGMVGDD-----	RVDGMVGDD-----	PS-----	PS-----
hulOL	RA-----	RA-----	RA-----	RA-----
hulOr	ASVVCRELGFGEAKAVTGSRLGGIGPIHNLNEIQCTGNEKSIIIDCKFNA-ESQGCNHEE	ASVVCRELGFGEAKAVTGSRLGGIGPIHNLNEIQCTGNEKSIIIDCKFNA-ESQGCNHEE	RYEEYGGGEELPEYPPQG-----	RYEEYGGGEELPEYPPQG-----
mulOr-2	ASVVCRELGFGTREALSGARMGQGMGAIIHSEVRCSGQEPSLWRCPSKNITAEDCSHSQ	ASVVCRELGFGTREALSGARMGQGMGAIIHSEVRCSGQEPSLWRCPSKNITAEDCSHSQ	TYPAPERPTVPPPPPO-----	TYPAPERPTVPPPPPO-----
hulOr-2	ASVVCRELGFGEAKAVTGSRLGGIGPIHNLNEIQCTGNEKSIIIDCKFNA-ESQGCNHEE	ASVVCRELGFGEAKAVTGSRLGGIGPIHNLNEIQCTGNEKSIIIDCKFNA-ESQGCNHEE	ESVRCSSQEPSLWRCPSKNITAEDCSHSQ-----	ESVRCSSQEPSLWRCPSKNITAEDCSHSQ-----
421				
LOX	GRYR-----	GRYR-----	PS-----	YK----YSDDNPYNNYDTYERPRPG-----
hulOL	GLDRRYXSHSLYSEGTPGFZ--QAXPDPCPEAMQAECCDPLCXPYANP--PPEAXGPP	GLDRRYXSHSLYSEGTPGFZ--QAXPDPCPEAMQAECCDPLCXPYANP--PPEAXGPP	RA-----	GLDRRYXSHSLYSEGTPGFZ--QAXPDPCPEAMQAECCDPLCXPYANP--PPEAXGPP
hulOr	DAGVRCTNP-AMGLQKKLRLNGGRNPYEGRVEVLVERNGSLVNGMVCQNWGIVEAMVVC	DAGVRCTNP-AMGLQKKLRLNGGRNPYEGRVEVLVERNGSLVNGMVCQNWGIVEAMVVC	RYEEYGGGEELPEYPPQG-----	DAGVRCTNP-AMGLQKKLRLNGGRNPYEGRVEVLVERNGSLVNGMVCQNWGIVEAMVVC
mulOr-2	DAGVRCLNP-YTGAETRIRLSGGRSQHEGRVEQIGGPGPLRWGLICGDDWGTLTEAMVAC	DAGVRCLNP-YTGAETRIRLSGGRSQHEGRVEQIGGPGPLRWGLICGDDWGTLTEAMVAC	TYPAPERPTVPPPPPO-----	DAGVRCLNP-YTGAETRIRLSGGRSQHEGRVEQIGGPGPLRWGLICGDDWGTLTEAMVAC
hulOr-2	DAGVRCLNP-YTGAETRIRLSGGRSQHEGRVEQIGGPGPLRWGLICGDDWGTLTEAMVAC	DAGVRCLNP-YTGAETRIRLSGGRSQHEGRVEQIGGPGPLRWGLICGDDWGTLTEAMVAC	ESVRCSSQEPSLWRCPSKNITAEDCSHSQ-----	DAGVRCLNP-YTGAETRIRLSGGRSQHEGRVEQIGGPGPLRWGLICGDDWGTLTEAMVAC

FIG. 5C

FIG. 5D

ES 2 320 622 T3

FIG. 6 Estadísticas de los híbridos de radiación, p=0,0001



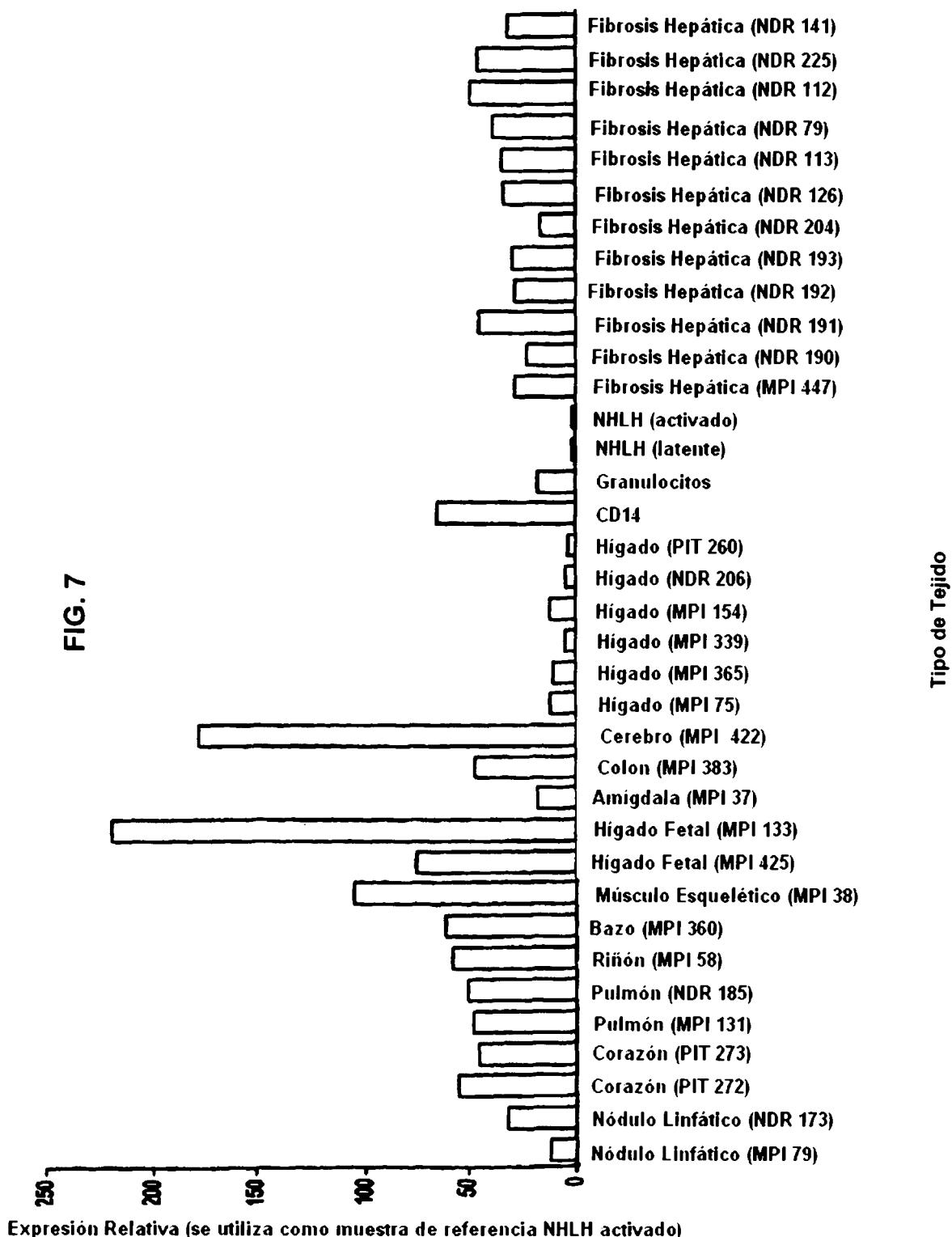
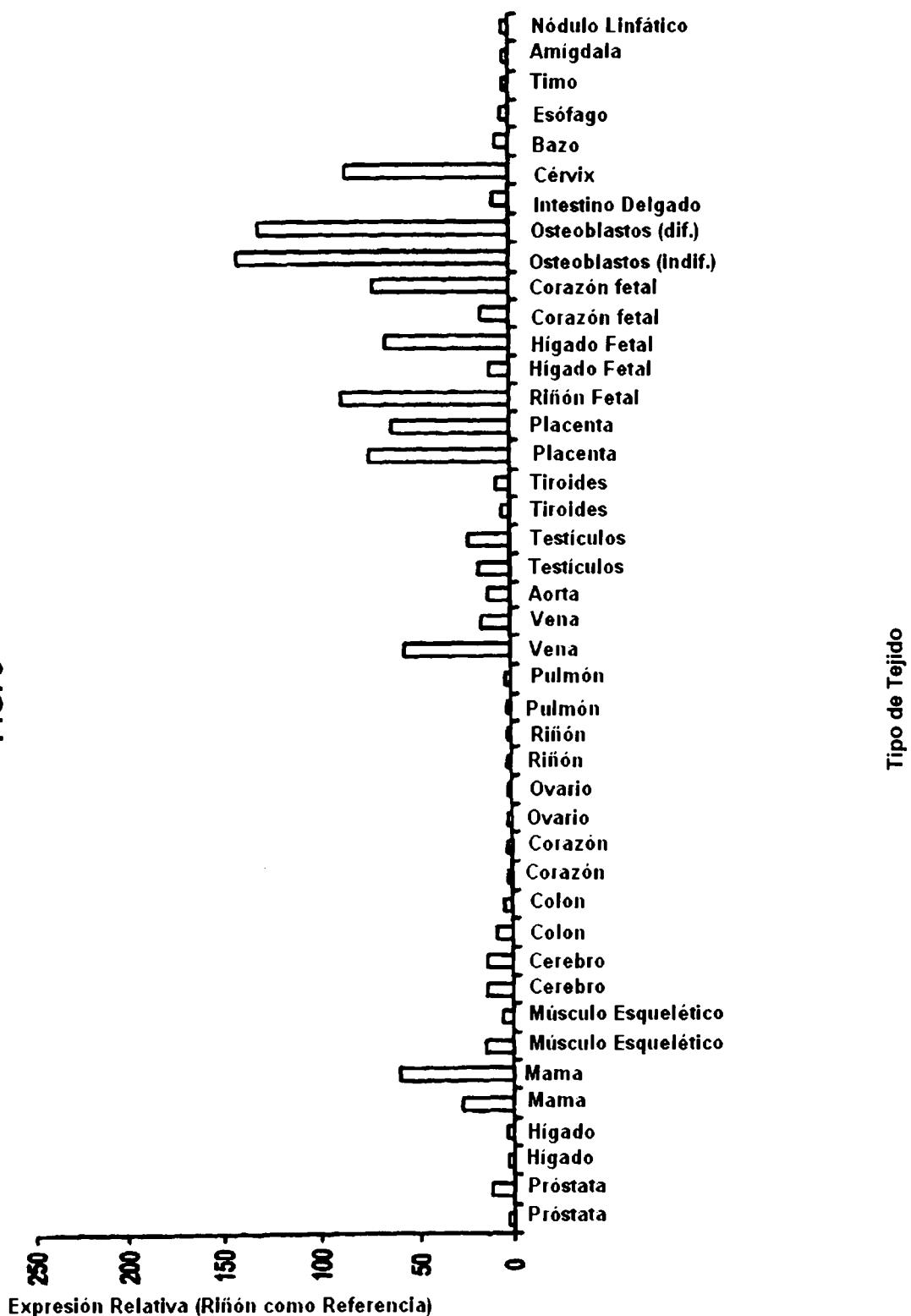
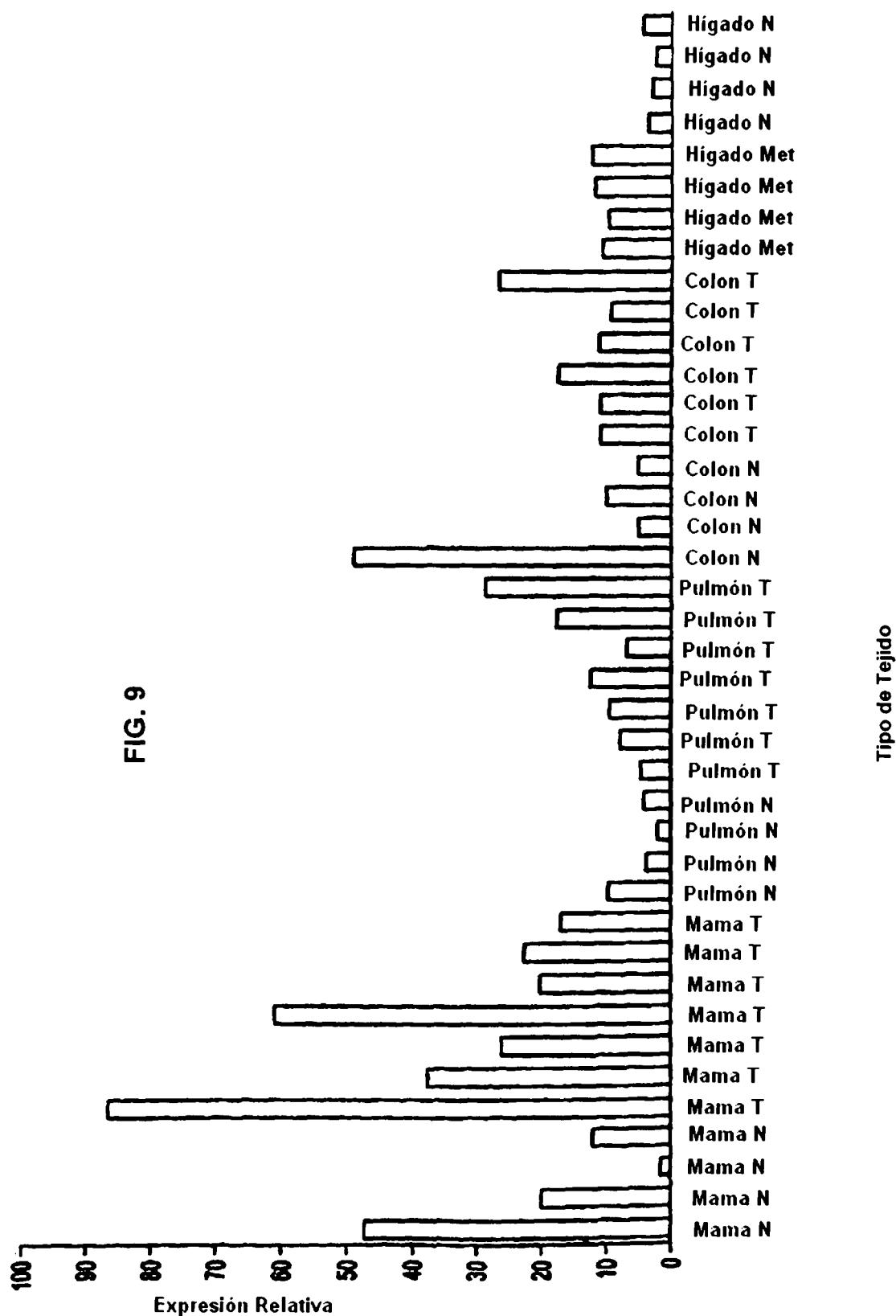


FIG. 8



ES 2 320 622 T3



ES 2 320 622 T3

LISTA DE SECUENCIAS

ES 2 320 622 T3

	Glu	Ile	Gln	Arg	Ala	Gly	Glu	Trp	Gly	Thr	Ile	Cys	Asp	Asp	Asp	Phe	
	60						65				70						
5	acg	ctg	cag	gct	gcc	cac	atc	ctc	tgc	cgg	gag	ctg	ggc	ttc	aca	gag	412
	Thr	Leu	Gln	Ala	Ala	His	Ile	Leu	Cys	Arg	Glu	Leu	Gly	Phe	Thr	Glu	
	75						80			85					90		
10	gcc	aca	ggc	tgg	acc	cac	agt	gcc	aaa	tat	ggc	cct	gga	aca	ggc	cgc	460
	Ala	Thr	Gly	Trp	Thr	His	Ser	Ala	Lys	Tyr	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Arg	
	95						100			105							
15	atc	tgg	ctg	gac	aac	ttg	agc	tgc	agt	ggg	acc	gag	cag	agt	gtg	act	508
	Ile	Trp	Leu	Asp	Asn	Leu	Ser	Cys	Ser	Gly	Thr	Glu	Gln	Ser	Val	Thr	
	110						115			120							
20	gaa	tgt	gcc	tcc	cg	ggc	tgg	ggg	aac	agt	gac	tgt	acg	cac	gat	gag	556
	Glu	Cys	Ala	Ser	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	Ser	Asp	Cys	Thr	His	Asp	Glu	
	125						130			135							
25	gat	gct	ggg	gtc	atc	tgc	aaa	gac	cag	cgc	ctc	cct	ggc	ttc	tcg	gac	604
	Asp	Ala	Gly	Val	Ile	Cys	Lys	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Gly	Phe	Ser	Asp	
	140						145			150							
30	tcc	aat	gtc	att	gag	gta	gag	cat	cac	ctg	caa	gtg	gag	gtg	cga		652
	Ser	Asn	Val	Ile	Glu	Val	Glu	His	His	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Val	Arg	
	155				160		165			170							
35	att	cga	ccc	gcc	gtt	ggg	tgg	ggc	aga	cga	ccc	ctg	ccc	gtg	acg	gag	700
	Ile	Arg	Pro	Ala	Val	Gly	Trp	Gly	Arg	Arg	Pro	Leu	Pro	Val	Thr	Glu	
	175				180		185										
40	ggg	ctg	gtg	gaa	gtc	agg	ctt	cct	gac	ggc	tgg	tcg	caa	gtg	tgc	gac	748
	Gly	Leu	Val	Glu	Val	Arg	Leu	Pro	Asp	Gly	Trp	Ser	Gln	Val	Cys	Asp	
	190			195		200											
45	aaa	ggc	tgg	agc	gcc	cac	aac	agc	cac	gtg	gtc	tgc	ggg	atg	ctg	ggc	796
	Lys	Gly	Trp	Ser	Ala	His	Asn	Ser	His	Val	Val	Cys	Gly	Met	Leu	Gly	
	205		210		215												
50	ttc	ccc	agc	gaa	agg	gtc	aac	gcg	gcc	ttc	tac	agg	ctg	cta	gcc		844
	Phe	Pro	Ser	Glu	Lys	Arg	Val	Asn	Ala	Ala	Phe	Tyr	Arg	Leu	Leu	Ala	
	220		225		230												
55	caa	cg	caa	cac	tcc	ttt	ggt	ctg	cat	ggg	gtg	gog	tgc	gtg	ggc		892
	Gln	Arg	Gln	Gln	His	Ser	Phe	Gly	Leu	His	Gly	Val	Ala	Cys	Val	Gly	
	235		240		245		250										
60	acg	gag	gcc	cac	ctc	tcc	ctc	tgt	tcc	ctg	gag	ttc	tat	cgt	gcc	aat	940
	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Ser	Leu	Cys	Ser	Leu	Glu	Phe	Tyr	Arg	Ala	Asn	
	255		260		265												
65	gac	acc	gcc	agg	tgc	cct	ggg	ggg	ggc	cct	gca	gtg	gtg	agc	tgt	gtg	988
	Asp	Thr	Ala	Arg	Cys	Pro	Gly	Gly	Gly	Pro	Ala	Val	Val	Ser	Cys	Val	
	270		275		280												
70	cca	ggc	cct	gtc	tac	gog	gca	tcc	agt	ggc	cag	aag	caa	caa	cag		1036

ES 2 320 622 T3

	Pro Gly Pro Val Tyr Ala Ala Ser Ser Gly Gln Lys Lys Gln Gln Gln			
	285	290	295	
5	tcg aag cct cag ggg gag gcc cgt gtc cgt cta aag ggc ggc gac cac		1084	
	Ser Lys Pro Gln Gly Glu Ala Arg Val Arg Leu Lys Gly Gly Ala His			
	300	305	310	
10	cct gga gag ggc cgg gta gaa gtc ctg aag gcc agc aca tgg ggc aca		1132	
	Pro Gly Glu Gly Arg Val Glu Val Leu Lys Ala Ser Thr Trp Gly Thr			
	315	320	325	330
15	gtc tgt gac cgc aag tgg gac ctg cat gca gcc agc gtg gtg tgt cgg		1180	
	Val Cys Asp Arg Lys Trp Asp Leu His Ala Ala Ser Val Val Cys Arg			
	335	340	345	
20	gag ctg ggc ttc ggg agt gct cga gaa gct ctg agt ggc gct cgc atg		1228	
	Glu Leu Gly Phe Gly Ser Ala Arg Glu Ala Leu Ser Gly Ala Arg Met			
	350	355	360	
25	ggg cag ggc atg ggt gct atc cac ctg agt gaa gtt cgc tgc tct gga		1276	
	Gly Gln Gly Met Gly Ala Ile His Leu Ser Glu Val Arg Cys Ser Gly			
	365	370	375	
30	cag gag ctc tcc ctc tgg aag tgc ccc cac aag aac atc aca gct gag		1324	
	Gln Glu Leu Ser Leu Trp Lys Cys Pro His Lys Asn Ile Thr Ala Glu			
	380	385	390	
35	gat tgt tca cat agc cag gat gcc ggg gtc cgg tgc aac cta cct tac		1372	
	Asp Cys Ser His Ser Gln Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Leu Pro Tyr			
	395	400	405	410
	act ggg gca gag acc agg atc cga ctc agt ggg ggc cgc agc caa cat		1420	
	Thr Gly Ala Glu Thr Arg Ile Arg Leu Ser Gly Gly Arg Ser Gln His			
	415	420	425	
40	gag ggg cga gtc gag gtg caa ata ggg gga cct ggg ccc ctt cgc tgg		1468	
	Glu Gly Arg Val Glu Val Gln Ile Gly Gly Pro Gly Pro Leu Arg Trp			
	430	435	440	
45	ggc ctc atc tgt ggg gat gac tgg ggg acc ctg gag gcc atg gtg gcc		1516	
	Gly Leu Ile Cys Gly Asp Asp Trp Gly Thr Leu Glu Ala Met Val Ala			
	445	450	455	
50	tgt agg caa ctg ggt ctg ggc tac gac aac cac ggc ctg cag gag acc		1564	
	Cys Arg Gln Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Asn His Gly Leu Gln Glu Thr			
	460	465	470	
55	tgg tac tgg gac tct ggg aat ata aca gag gtg gtg atg agt gga gtg		1612	
	Trp Tyr Trp Asp Ser Gly Asn Ile Thr Glu Val Val Met Ser Gly Val			
	475	480	485	490
	cgc tgc aca ggg act gag ctg tcc ctg gat cag tgt gcc cat cat ggc		1660	
	Arg Cys Thr Gly Thr Glu Leu Ser Leu Asp Gln Cys Ala His His Gly			
	495	500	505	
60	acc cac atc acc tgc aag agg aca ggg acc cgc ttc act gct gga gtc		1708	

ES 2 320 622 T3

	Thr His Ile Thr Cys Lys Arg Thr Gly Thr Arg Phe Thr Ala Gly Val		
	510	515	520
5	atc tgt tct gag act gca tca gat ctg ttg ctg cac tca gca ctg gtg Ile Cys Ser Glu Thr Ala Ser Asp Leu Leu Leu His Ser Ala Leu Val	525	530
	535		
10	cag gag acc gcc tac atc gaa gac cgg ccc ctg cat atg ttg tac tgt Gln Glu Thr Ala Tyr Ile Glu Asp Arg Pro Leu His Met Leu Tyr Cys	540	545
	550		
15	gct gcg gaa gag aac tgc ctg gcc agc tca gcc cgc tca gcc aac tgg Ala Ala Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Ser Ala Arg Ser Ala Asn Trp	555	560
	565		570
20	ccc tat ggt cac cgg cgt ctg ctc cga ttc tcc tcc cag atc cac aac Pro Tyr Gly His Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn	575	580
	585		
	ctg gga cga gct gac ttc agg ccc aag gct ggg cgc cac tcc tgg gtg Leu Gly Arg Ala Asp Phe Arg Pro Lys Ala Gly Arg His Ser Trp Val	590	595
	600		
25	tgg cac gag tgc cat ggg cat tac cac agc atg gac atc ttc act cac Trp His Glu Cys His Gly His Tyr His Ser Met Asp Ile Phe Thr His	605	610
	615		
30	tat gat atc ctc acc cca aat ggc acc aag gtg gct gag ggc cac aaa Tyr Asp Ile Leu Thr Pro Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys	620	625
	630		
35	gct agt ttc tgt ctc gaa gac act gag tgt cag gag gat gtc tcc aag Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Glu Cys Gln Glu Asp Val Ser Lys	635	640
	645		650
40	cgg tat gag tgt gcc aac ttt gga gag caa ggc atc act gtg ggt tgc Arg Tyr Glu Cys Ala Asn Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Val Gly Cys	655	660
	665		
45	tgg gat ctc tac cgg cat gac att gac tgt cag tgg att gac atc acg Trp Asp Leu Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr	670	675
	680		
	685		690
	695		
50	gat gtg aag cca gga aac tac att ctc cag gtt gtc atc aac cca aac Asp Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Gln Val Val Ile Asn Pro Asn	700	705
	710		
55	ttt gaa gta gca gag agt gac ttt acc aac aat gca atg aaa tgt aac Phe Glu Val Ala Glu Ser Asp Phe Thr Asn Asn Ala Met Lys Cys Asn	715	720
	725		730
60	tgc aaa tat gat gga cat aga atc tgg gtg cac aac tgc cac att ggt Cys Lys Tyr Asp Gly His Arg Ile Trp Val His Asn Cys His Ile Gly	735	740
	745		
	750		
	755		
	760		
	765		
	770		
	775		
	780		
	785		
	790		
	795		
	800		
	805		
	810		
	815		
	820		
	825		
	830		
	835		
	840		
	845		
	850		
	855		
	860		
	865		
	870		
	875		
	880		
	885		
	890		
	895		
	900		
	905		
	910		
	915		
	920		
	925		
	930		
	935		
	940		
	945		
	950		
	955		
	960		
	965		
	970		
	975		
	980		
	985		
	990		
	995		
	1000		

ES 2 320 622 T3

	Asp Ala Phe Ser Glu Glu Ala Asn Arg Arg Phe Glu Arg Tyr Pro Gly		
	735	740	745
5	cag acc agc aac cag att atc taagtccac tgccctctgc aaaccaccac	2431	
	Gln Thr Ser Asn Gln Ile Ile		
	750		
10	tggccctaa tggcaggggt ctgaggctgc cattacctca ggagcttacc aagaaaccca	2491	
	tgtcagcaac cgcactcatc agaccatgca ctatggatgt ggaactgtca agcagaagtt	2551	
15	ttcacccctcc ttcagagggc agctgtcagt atctgttagcc aagcatggga atctttgttc	2611	
	ccagggccag caccgagcag aacagaccag agcccaccac accacaaaga gcagcacctg	2671	
	actaactgcc cacaaaagat ggcagcagct cattttttt aataggaggt caggatggc	2731	
20	agctccagta tctccctaa gtttaggggg atacagcttt acctctagcc ttttgggg 2791		
	ggaaaaagtc cagccctccc acctcattttt ttactataat atgttgctag gtataatttt	2851	
	attttatata aaaagtgttt ctgtgattct tcagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2911	
25	aaaaaaaa	2920	

30	<210> 2		
	<211> 753		
	<212> PRT		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
35	<400> 2		

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

ES 2 320 622 T3

5	Trp Gly Asn Ser Asp Cys Thr His Asp Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys	130	135	140	
10	Lys Asp Gln Arg Leu Pro Gly Phe Ser Asp Ser Asn Val Ile Glu Val	145	150	155	160
15	Glu His His Leu Gln Val Glu Glu Val Arg Ile Arg Pro Ala Val Gly	165	170	175	
20	Trp Gly Arg Arg Pro Leu Pro Val Thr Glu Gly Leu Val Glu Val Arg	180	185	190	
25	Leu Pro Asp Gly Trp Ser Gln Val Cys Asp Lys Gly Trp Ser Ala His	195	200	205	
30	Asn Ser His Val Val Cys Gly Met Leu Gly Phe Pro Ser Glu Lys Arg	210	215	220	
35	Val Asn Ala Ala Phe Tyr Arg Leu Leu Ala Gln Arg Gln Gln His Ser	225	230	235	240
40	Phe Gly Leu His Gly Val Ala Cys Val Gly Thr Glu Ala His Leu Ser	245	250	255	
45	Leu Cys Ser Leu Glu Phe Tyr Arg Ala Asn Asp Thr Ala Arg Cys Pro	260	265	270	
50	Gly Gly Gly Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro Gly Pro Val Tyr Ala	275	280	285	
55	Ala Ser Ser Gly Gln Lys Lys Gln Gln Ser Lys Pro Gln Gly Glu	290	295	300	
60	Ala Arg Val Arg Leu Lys Gly Gly Ala His Pro Gly Glu Gly Arg Val	305	310	315	320
65	Glu Val Leu Lys Ala Ser Thr Trp Gly Thr Val Cys Asp Arg Lys Trp	325	330	335	
70	Asp Leu His Ala Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly Phe Gly Ser	340	345	350	
75	Ala Arg Glu Ala Leu Ser Gly Ala Arg Met Gly Gln Gly Met Gly Ala	355	360	365	
80	Ile His Leu Ser Glu Val Arg Cys Ser Gly Gln Glu Leu Ser Leu Trp	370	375	380	
85	Lys Cys Pro His Lys Asn Ile Thr Ala Glu Asp Cys Ser His Ser Gln	385	390	395	400
90	Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Glu Thr Arg	405	410	415	
95	Ile Arg Leu Ser Gly Gly Arg Ser Gln His Glu Gly Arg Val Glu Val	420	425	430	

ES 2 320 622 T3

Gln Ile Gly Gly Pro Gly Pro Leu Arg Trp Gly Leu Ile Cys Gly Asp
 435 440 445
 Asp Trp Gly Thr Leu Glu Ala Met Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Leu
 5 450 455 460
 Gly Tyr Ala Asn His Gly Leu Glu Thr Trp Tyr Trp Asp Ser Gly
 465 470 475 480
 10 Asn Ile Thr Glu Val Val Met Ser Gly Val Arg Cys Thr Gly Thr Glu
 485 490 495
 Leu Ser Leu Asp Gln Cys Ala His His Gly Thr His Ile Thr Cys Lys
 15 500 505 510
 Arg Thr Gly Thr Arg Phe Thr Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Thr Ala
 515 520 525
 20 Ser Asp Leu Leu Leu His Ser Ala Leu Val Gln Glu Thr Ala Tyr Ile
 530 535 540
 Glu Asp Arg Pro Leu His Met Leu Tyr Cys Ala Ala Glu Glu Asn Cys
 25 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Ser Ala Arg Ser Ala Asn Trp Pro Tyr Gly His Arg Arg
 565 570 575
 30 Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Leu Gly Arg Ala Asp Phe
 580 585 590
 Arg Pro Lys Ala Gly Arg His Ser Trp Val Trp His Glu Cys His Gly
 595 600 605
 35 His Tyr His Ser Met Asp Ile Phe Thr His Tyr Asp Ile Leu Thr Pro
 610 615 620
 Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu
 40 625 630 635 640
 Asp Thr Glu Cys Gln Glu Asp Val Ser Lys Arg Tyr Glu Cys Ala Asn
 45 645 650 655
 Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Val Gly Cys Trp Asp Leu Tyr Arg His
 660 665 670
 Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Lys Pro Gly Asn
 50 675 680 685
 Tyr Ile Leu Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala Glu Ser
 55 690 695 700
 Asp Phe Thr Asn Asn Ala Met Lys Cys Asn Cys Lys Tyr Asp Gly His
 705 710 715 720
 Arg Ile Trp Val His Asn Cys His Ile Gly Asp Ala Phe Ser Glu Glu
 60 725 730 735
 Ala Asn Arg Arg Phe Glu Arg Tyr Pro Gly Gln Thr Ser Asn Gln Ile
 65 740 745 750
 Ile

ES 2 320 622 T3

<210> 3

<211> 2262

<212> DNA

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

10 atgcgacctg tcagtgtctg gcagtggagc ccctggggc tgctgctgtg cctgctgtgc 60
 agttegtgct tgggggtctcc gtcccccttcc acggggccctg agaagaaggc cgggagccag 120
 gggcttcggt tccggctggc tggcttcccc aggaagccct acgagggccg cgtggagata 180
 cagecgagctg gtgaatgggg caccatetgc gatgatgact tcacgctgca ggctgcccac 240
 atccctctgcc gggagctggg cttcacagag gccacaggct ggacccacag tgccaaatata 300
 ggccctggaa caggccgcat ctggctggac aacttgagct gcagtgggac cgagcagagt 360
 gtgactgaat gtgcctcccg gggctggggg aacagtgact gtacgcacga tgaggatgt 420
 ggggtcatct gcaaagacca ggccttcctt ggcttctcg actccatgt cattgaggta 480
 gagcatcacc tgcaagtggc ggaggtgcga attcgacccg ccgttgggtg gggcagacga 540
 ccccctgccccg tgacggaggg gctgggtggaa gtcaggcttc ctgacggctg gtcgcacgtg 600
 tgcgacaaaag gctggagcgc ccacaacacg cacgtggctc gggggatgt 660
 agcgaaaaaga gggtcaacgc ggccttctac aggctgtctg cccaaacggca gcaacactcc 720
 tttggtctgc atgggggtggc gtgcgtggc acggaggccc accttcctt ctgtttccctg 780
 gagttctatac gtgcctatgc caccgcctagg tgccctgggg gggggccctgc agtgggtgacg 840
 tgtgtgccag gcccgtctc cgcggcatcc agtggccaga agaagcaaca acagtcgaag 900
 cctcagggggg aggccccgtgt ccgtctaaag ggcggccccc accctggaga gggccgggtta 960
 gaagtccctga aggccagcac atggggcaca gtctgtgacc gcaagtggga cctgcacatgca 1020
 gccagcgtgg tgggtcgaaa gctgggtttc gggagtgtct gagaagctct gaggggcgct 1080
 cgcatggggc agggcatggg tgctatccac ctgagtgaag ttgcgtgttc tggacaggag 1140
 ctctccctct ggaagtgcacc ccacaagaac atcacagctg aggattgttc acatagccag 1200
 gatgcgggggg tccgggtgcaaa cctacacccatc actggggcag agaccaggat ccgactcagt 1260

55

60

65

ES 2 320 622 T3

5 gggggccgca gccaaacatga ggggcgagtc gaggtgcaaa tagggggacc tggggccctt 1320
cgctggggcc tcatctgtgg ggatgactgg gggaccctgg aggccatggt ggcctgttagg 1380
caactgggtc tgggctacgc caaccacggc ctgcaggaga cctggtaactg ggactctggg 1440
aatataacag aggtgggtgat gagtggagtg cgctgcacag ggactgagct gtccctggat 1500
10 cagtgtgccc atcatggcac ccacatcacc tgcaagagga cagggaccccg cttcaactgtc 1560
ggagtcatct gttctgagac tgcacatcgat ctgttgcgc actcagcact ggtgcaggag 1620
15 acggcctaca tcgaagacccg gccccctgcac atgttgcact gtgctgcgga agagaactgc 1680
ctggccagct cagcccgctc agccaaactgg ccctatggtc acggcgctc gctccgattc 1740
tcctcccaga tccacaaacct gggacgagct gacttcaggc ccaaggctgg gogccactcc 1800
20 tgggtgtggc acgagtgcaca tgggcattac cacagcatgg acatcttcac tcactatgat 1860
atcctcaccc caaatggcac caaggtggct gagggccaca aagctagttt ctgtctcgaa 1920
25 gacactgagt gtcaggagga tgtctccaag cggtatgagt gtgccaactt tggagagcaa 1980
ggcatcaactg tgggttgctg ggatctctac cggcatgaca ttgactgtca gtggattgac 2040
atcacggatg tgaagccagg aaactacatt ctccaggttg tcatcaaccc aaactttgaa 2100
30 gtagcagaga gtgactttac caacaatgca atgaaatgta actgcaaata tgatggacat 2160
agaatctggg tgcacaaactg ccacattggt gatgccttca gtgaagaggc caacaggagg 2220
35 tttgaacgct accctggcca gaccagcaac cagattatct aa 2262

<210> 4

<211> 38

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: patrón SRRD (secuencia consenso)

220

<223> Xaa en las posiciones 2-6, 8, 9, 11-16, 19, 20, 22-33, y 35-37 es cualquier aminoácido

$\varepsilon_0 <400> 4$

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

55 Trp Gly Xaa Xaa Cys Xaa Xaa

60 Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Gly
35

<210> 5

<211> 417

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 320 622 T3

<400> 5

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

50

55

60

65

ES 2 320 622 T3

	Gln	Tyr	Gly	Leu	Pro	Asp	Leu	Val	Ala	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Gln	Ala
	210						215					220				
5	Ser	Thr	Tyr	Val	Gln	Lys	Met	Ser	Met	Tyr	Asn	Leu	Arg	Cys	Ala	Ala
	225						230				235				240	
10	Glu	Glu	Asn	Cys	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Arg	Ala	Asp	Val	Arg	Asp
							245			250				255		
15	Tyr	Asp	His	Arg	Val	Leu	Leu	Arg	Phe	Pro	Gln	Arg	Val	Lys	Asn	Gln
							260			265				270		
20	Gly	Thr	Ser	Asp	Phe	Leu	Pro	Ser	Arg	Pro	Arg	Tyr	Ser	Trp	Glu	Trp
							275			280				285		
25	His	Ser	Cys	His	Gln	His	Tyr	His	Ser	Met	Asp	Glu	Phe	Ser	His	Tyr
							290			295				300		
30	Asp	Leu	Leu	Asp	Ala	Asn	Thr	Gln	Arg	Arg	Val	Ala	Glu	Gly	His	Lys
							305			310				315		
35	Ala	Ser	Phe	Cys	Leu	Glu	Asp	Thr	Ser	Cys	Asp	Tyr	Gly	Tyr	His	Arg
							325			330				335		
40	Arg	Phe	Ala	Cys	Thr	Ala	His	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Cys	Tyr
							340			345				350		
45	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Asp	Ile	Asp	Cys	Gln	Trp	Ile	Asp	Ile	Thr	Asp
							355			360				365		
50	Val	Lys	Pro	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Lys	Val	Ser	Val	Asn	Pro	Ser	Tyr
							370			375				380		
55	Leu	Val	Pro	Glu	Ser	Asp	Tyr	Thr	Asn	Asn	Val	Val	Arg	Cys	Asp	Ile
							385			390				395		
60	Arg	Tyr	Thr	Gly	His	His	Ala	Tyr	Ala	Ser	Gly	Cys	Thr	Ile	Ser	Pro
							405			410				415		
65	Tyr															
	<210> 6															
	<211> 574															
	<212> PRT															
	<213> <i>Homo sapiens</i>															

ES 2 320 622 T3

<400> 6

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

ES 2 320 622 T3

Ala Tyr Pro Asp Pro Gly Pro Glu Ala Ala Gln Ala His Gly Gly Asp
 290 295 300
 5 Pro Arg Leu Gly Trp Tyr Pro Pro Tyr Ala Asn Pro Pro Pro Glu Ala
 305 310 315 320
 Tyr Gly Pro Pro Arg Ala Leu Glu Pro Pro Tyr Leu Pro Val Arg Ser
 10 325 330 335
 Ser Asp Thr Pro Pro Gly Gly Glu Arg Asn Gly Ala Gln Gln Gly
 340 345 350
 15 Arg Leu Ser Val Gly Ser Val Tyr Arg Pro Asn Gln Asn Gly Arg Gly
 355 360 365
 Leu Pro Asp Leu Val Pro Asp Pro Asn Tyr Val Gln Ala Ser Thr Tyr
 20 370 375 380
 Val Gln Arg Ala His Leu Tyr Ser Leu Arg Cys Ala Ala Glu Glu Lys
 25 385 390 395 400
 Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Pro Glu Ala Thr Asp Tyr Asp Val
 405 410 415
 Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln Gly Thr Ala
 30 420 425 430
 Asp Phe Leu Pro Asn Arg Pro Arg His Thr Trp Glu Trp His Ser Cys
 35 435 440 445
 His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr Asp Leu Leu
 450 455 460
 Asp Ala Ala Thr Gly Lys Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe
 40 465 470 475 480
 Cys Leu Glu Asp Ser Thr Cys Asp Phe Gly Asn Leu Lys Arg Tyr Ala
 45 485 490 495
 Cys Thr Ser His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr Asp Thr Tyr
 50 500 505 510
 Asn Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Gln Pro
 55 515 520 525
 Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val His Val Asn Pro Lys Tyr Ile Val Leu
 55 530 535 540
 Glu Ser Asp Phe Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asn Ile His Tyr Thr
 60 545 550 555 560
 Gly Arg Tyr Val Ser Ala Thr Asn Cys Lys Ile Val Gln Ser
 565 570

<210> 7
 65 <211> 774
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 320 622 T3

<400> 7

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

60

65

ES 2 320 622 T3

Arg Tyr Trp Pro Phe Ser Met Asp Cys Thr Gly Thr Glu Ala His Ile
 260 265 270
 Ser Ser Cys Lys Leu Gly Pro Gln Val Ser Leu Asp Pro Met Lys Asn
 5 275 280 285
 Val Thr Cys Glu Asn Gly Leu Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro Gly
 10 290 295 300
 Gln Val Phe Ser Pro Asp Gly Pro Ser Arg Phe Arg Lys Ala Tyr Lys
 305 310 315 320
 Pro Glu Gln Pro Leu Val Arg Leu Arg Gly Gly Ala Tyr Ile Gly Glu
 15 325 330 335
 Gly Arg Val Glu Val Leu Lys Asn Gly Glu Trp Gly Thr Val Cys Asp
 340 345 350
 20 Asp Lys Trp Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly
 355 360 365
 Phe Gly Ser Ala Lys Glu Ala Val Thr Gly Ser Arg Leu Gly Gln Gly
 25 370 375 380
 Ile Gly Pro Ile His Leu Asn Glu Ile Gln Cys Thr Gly Asn Glu Lys
 30 385 390 395 400
 Ser Ile Ile Asp Cys Lys Phe Asn Ala Glu Ser Gln Gly Cys Asn His
 405 410 415
 Glu Glu Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Thr Pro Ala Met Gly Leu Gln
 35 420 425 430
 Lys Lys Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg Asn Pro Tyr Glu Gly Arg Val
 40 435 440 445
 Glu Val Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser Leu Val Trp Gly Met Val Cys
 45 450 455 460
 Gly Gln Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala Met Val Val Cys Arg Gln Leu
 465 470 475 480
 Gly Leu Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe Gln Glu Thr Trp Tyr Trp His
 50 485 490 495
 Gly Asp Val Asn Ser Asn Lys Val Val Met Ser Gly Val Lys Cys Ser
 500 505 510
 Gly Thr Glu Leu Ser Leu Ala His Cys Arg His Asp Gly Glu Asp Val
 55 515 520 525
 Ala Cys Pro Gln Gly Gly Val Gln Tyr Gly Ala Gly Val Ala Cys Ser
 60 530 535 540
 Glu Thr Ala Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr
 545 550 555 560
 Thr Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu
 65 565 570 575

ES 2 320 622 T3

580 585 590

5 Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln
595 600 605

10 Ser Asp Phe Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp
610 615 620

15 Cys His Arg His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu
625 630 635 640

20 Leu Asn Leu Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe
645 650 655

25 Cys Leu Glu Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu
660 665 670

30 Cys Ala Asn Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met
675 680 685

35 Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Pro
690 695 700

40 Pro Gly Asp Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val
705 710 715 720

45 Ala Glu Ser Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr
725 730 735

50 Asp Gly His Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe
740 745 750

55 Ser Glu Glu Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn
755 760 765

60 Asn Gln Leu Ser Pro Gln
770

<210> 8

<211> 754

50 <212> PRT

<213> Proteína relacionada con la lisil oxidasa murina

55

60

65

ES 2 320 622 T3

<400> 8

Met Arg Ala Val Ser Val Trp Tyr Cys Cys Pro Trp Gly Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu His Cys Leu Cys Ser Phe Ser Val Gly Ser Pro Ser Pro Ser Ile
20 25 30

10 Ser Pro Glu Lys Lys Val Gly Ser Gln Gly Leu Arg Phe Arg Leu Ala
35 40 45

15 Gly Phe Pro Arg Lys Pro Tyr Glu Gly Arg Val Glu Ile Gln Arg Ala
50 55 60

Gly Glu Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Asp Phe Thr Leu Gln Ala Ala
65 70 75 80

20 His Val Leu Cys Arg Glu Leu Gly Phe Thr Glu Ala Thr Gly Trp Thr
85 90 95

25 His Ser Ala Lys Tyr Gly Pro Gly Thr Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asn
100 105 110

Leu Ser Cys Arg Gly Thr Glu Gly Ser Val Thr Glu Cys Ala Ser Arg
115 120 125

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 320 622 T3

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

50

55

60

65

ES 2 320 622 T3

Thr Ala Arg Glu Ala Leu Ser Gly Ala Arg Met Gly Gln Gly Met Gly
 355 360 365

5 Ala Ile His Leu Ser Glu Val Arg Cys Ser Gly Gln Glu Pro Ser Leu
 370 375 380

10 Trp Arg Cys Pro Ser Lys Asn Ile Thr Ala Glu Asp Cys Ser His Ser
 385 390 395 400

15 Gln Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Leu Pro Tyr Thr Gly Val Glu Thr
 405 410 415

20 Lys Ile Arg Leu Ser Gly Gly Arg Ser Arg Tyr Glu Gly Arg Val Glu
 420 425 430

25 Val Gln Ile Gly Ile Pro Gly His Leu Arg Trp Gly Leu Ile Cys Gly
 435 440 445

Asp Asp Trp Gly Thr Leu Glu Ala Met Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly
 450 455 460

30 Leu Gly Tyr Ala Asn His Gly Leu Gln Glu Thr Trp Tyr Trp Asp Ser
 465 470 475 480

35 Gly Asn Val Thr Glu Val Val Met Ser Gly Val Arg Cys Thr Gly Ser
 485 490 495

Glu Leu Ser Leu Asn Gln Cys Ala His His Ser Ser His Ile Thr Cys
 500 505 510

40 Lys Lys Thr Gly Thr Arg Phe Thr Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Thr
 515 520 525

Ala Ser Asp Leu Leu Leu His Ser Ala Leu Val Gln Glu Thr Ala Tyr
 530 535 540

45 Ile Glu Asp Arg Pro Leu His Met Leu Tyr Cys Ala Ala Glu Glu Asn
 545 550 555 560

Cys Leu Ala Ser Ser Ala Arg Ser Ala Asn Trp Pro Tyr Gly His Arg
 565 570 575

50 Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Leu Gly Arg Ala Asp
 580 585 590

55 Phe Arg Pro Lys Ala Gly Arg His Ser Trp Val Trp His Glu Cys His
 595 600 605

Gly His Tyr His Ser Met Asp Ile Phe Thr His Tyr Asp Ile Leu Thr
 610 615 620

60 Pro Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu
 625 630 635 640

ES 2 320 622 T3

Glu Asp Thr Glu Cys Gln Glu Asp Val Ser Lys Arg Tyr Glu Cys Ala
645 650 655

5 Asn Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Val Gly Cys Tyr Asp Leu Tyr Arg
 660 665 670

10 His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Lys Pro Gly
675 680 685

Asn Tyr Ile Leu Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala Glu
690 695 700

15 Ser Asp Phe Thr Asn Asn Ala Met Lys Cys Asn Cys Lys Tyr Asp Gly
705 710 715 720

20 His Arg Ile Trp Val His Asn Cys His Ile Gly Asp Ala Phe Ser Glu
725 730 735

25 Glu Ala Asn Arg Arg Phe Glu Arg Tyr Pro Gly Gln Thr Ser Asn Gln
 740 745 750

Ile Val

30 *ε210> 0*

211 11

212 RBT

25 <213> Secuencia Artificial

-220-

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia consenso de la “garra de cobre” (*copper talon*)

40 <400> 9

Trp Glu Trp His Ser Cys His Gln His Tyr His
1 5 10

45

<210> 10

<211> 451

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 320 622 T3

<400> 10

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

ES 2 320 622 T3

	Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Asp Arg Gly Pro Thr Gly
	275 280 285
5	Glu Ser Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Leu
	290 295 300
10	Lys Gly Asp Arg Gly Ala Ile Gly Phe Pro Gly Ser Arg Gly Leu Pro
	305 310 315 320
	Gly Tyr Ala Gly Arg Pro Gly Asn Ser Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly
	325 330 335
15	Glu Lys Gly Ser Gly Asn Thr Leu Thr Pro Phe Thr Lys Val Arg Leu
	340 345 350
20	Val Gly Gly Ser Gly Pro His Glu Gly Arg Val Glu Ile Leu His Ser
	355 360 365
	Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Arg Trp Glu Val Arg Val Gly
	370 375 380
25	Gln Val Val Cys Arg Ser Leu Gly Tyr Pro Gly Val Gln Ala Val His
	385 390 395 400
30	Lys Ala Ala His Phe Gly Gln Gly Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asn Glu
	405 410 415
	Val Phe Cys Phe Gly Arg Glu Ser Ser Ile Glu Glu Cys Lys Ile Arg
	420 425 430
35	Gln Trp Gly Thr Arg Ala Cys Ser His Ser Glu Asp Ala Gly Val Thr
	435 440 445
40	Cys Thr Leu
	450

<210> 11

45 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 11

55 gcttaccaag aaacccatgt cagc

24

<210> 12

60 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

ES 2 320 622 T3

<400> 12

ggcagtttagt caggtgctgc

20

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65