



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 247**

51 Int. Cl.:
C12N 9/02 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04739941 .5**
96 Fecha de presentación : **16.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1644493**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Regulación de una quinasa, "Quinasa regulada en EPOC" (Quinasa RC).**

30 Prioridad: **27.06.2003 EP 03014688**
02.03.2004 EP 04004818

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2010

73 Titular/es: **Axikin Pharmaceuticals, Inc.**
10835 Road to the Cure, Suite 200
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Watanabe, Shinichi;**
Encinas, Jeffrey;
Kondo, Shinichi y
Bacon, Kevin

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 347 247 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

Regulación de una quinasa, "Quinasa regulada en EPOC" (Quinasa RC).

5 **Campo técnico de la invención**

La invención hace referencia al área de la regulación de la actividad quinasa. Más concretamente, la invención hace referencia a la regulación de una quinasa humana novedosa, Quinasa Regulada en la EPOC (Quinasa RC). La invención describe que el gen de la Quinasa RC es expresado en exceso en pacientes con EPOC y es útil como marcador diagnóstico y diana para su tratamiento. Se describen los métodos para predecir, diagnosticar y pronosticar así como para prevenir y tratar la EPOC mediante el uso de la Quinasa RC. También se describen los métodos para predecir, diagnosticar y pronosticar así como prevenir y tratar otras dolencias en las cuales la Quinasa RC está desregulada o en las cuales la modulación o la intensificación de la actividad de la Quinasa RC pueden modificar el progreso de la enfermedad. La modulación de la actividad de la Quinasa RC puede afectar a diferentes enfermedades tales como, EPOC, asma, cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedades inflamatorias, y enfermedades cardiovasculares.

Antecedentes de la invención

La señalización intracelular regula una variedad de funciones biológicas importantes. Un método común utilizado por las células para conducir las señales es la fosforilación de proteínas. Con el fin de transmitir señales, las enzimas activadas denominadas proteína quinasas anclan grupos fosfato a moléculas aguas abajo de una cascada de señalización y de ese modo, dependiendo del tipo de molécula, regulan su actividad enzimática, su localización subcelular, su interacción con otras moléculas, su forma, o su vida media. Una familia importante de proteína quinasas implicadas en este tipo de transmisión de la señal son las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Widmann, C. *et al.*, *Physiol. Rev.* 79(1):143-80, 1999). Debido a que las MAPK son a su vez reguladas por la fosforilación, a menudo son miembros de sistemas de liberación de fósforo complejos dentro de las células que implican a otras quinasas. Por ejemplo, una MAPK puede ser fosforilada por quinasas MAPK (MKK), que a su vez pueden ser fosforiladas por quinasas de quinasas MAPK (MKKK). Semejante sistema de liberación de fósforo puede servir para amplificar una señal, determinar la especificidad de una señal, y permitir la regulación en diferentes puntos de la cascada de señalización. Se ha descubierto que las MAPK, MKK y MKKK juegan papeles en una gran variedad de actividades celulares, incluyendo la expresión génica, la mitosis, la proliferación, el movimiento celular, el metabolismo y la muerte celular programada. Debido a las funciones importantes de las enzimas de la familia de las proteína quinasas tales como MAPK, MKK y MKKK, existe la necesidad en la técnica de identificar nuevas quinasas de la ruta de MAPK y métodos de regulación de estas nuevas quinasas para efectos terapéuticos.

En el documento WO 2002/33099 se describe un polinucleótido que codifica una quinasa PKIN-6 con una expresión disminuida en la EPOC, donde el polinucleótido tiene un cierto grado de identidad de secuencia comparado con los polinucleótidos de la presente invención. En el documento WO 2003/018786 se describe un polinucleótido que codifica una serina-treonina quinasa adecuada para el tratamiento de la EPOC, donde el polinucleótido no tiene un grado relevante de identidad de secuencia comparado con los polinucleótidos de la presente invención.

Compendio de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar reactivos y métodos de regulación de la quinasa RC humana. Estos y otros objetos de la invención son proporcionados por una o más de las realizaciones descritas más abajo.

Una realización de la invención es un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la Quinasa RC, serina/treonina quinasa, con una expresión aumentada en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica seleccionado del grupo que consiste en

- 50 a) un polinucleótido que codifica un polipéptido de la Quinasa RC que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - 55 secuencias de aminoácidos que son idénticas al menos en 75% a
 - la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 o 12; y
 - la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 o 12.
- 60 b) un polinucleótido que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6; y
- c) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se aparta de las secuencias de polinucleótidos especificadas en los apartados a) a b) debido a la degeneración del código genético.

65 Otra realización de la invención es un polipéptido de la Quinasa RC esencialmente purificado codificado por uno de los polinucleótidos anteriores.

ES 2 347 247 T3

Los polipéptidos de Quinasa RC de la presente invención son adecuados para composiciones preventivas, predictivas, diagnósticas, pronósticas y terapéuticas novedosas y para usos en la EPOC. Puesto que los niveles de expresión de la Quinasa RC aumentan en la enfermedad, su producto génico es una diana particularmente útil para los métodos de tratamiento así como para métodos diagnósticos y de supervisión clínica.

5

Asimismo se describen en la presente memoria composiciones preventivas, predictivas, diagnósticas, pronósticas y terapéuticas novedosas y sus usos para la EPOC basadas en derivados, fragmentos, análogos y homólogos del gen de la Quinasa RC.

10 La presente invención hace referencia adicionalmente a métodos para detectar la desregulación de la Quinasa RC en la EPOC a nivel de ADN y ARN.

La presente invención hace referencia adicionalmente a un método *in vitro* para la predicción, diagnosis o prognosis de enfermedades respiratorias o EPOC mediante la detección de un gen de Quinasa RC o un ácido nucleico genómico de Quinasa RC que está alterado en la EPOC.

15

En una realización se puede detectar la expresión del gen de la Quinasa RC con matrices.

En una realización adicional, la expresión del gen puede ser detectada como técnicas de lectura de fluorescencia directas basadas en cuentas tales como las proporcionadas por Luminex Corporation (Documento US 6.268.222).

20

La invención hace referencia a un método de escrutinio para agentes que disminuyen la actividad de un polipéptido de la Quinasa RC o un polipéptido de la Quinasa RC esencialmente purificado codificado por un polinucleótido como se ha descrito más arriba, que comprende las etapas de (a): poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido codificado por cualquier polinucleótido como se ha descrito más arriba; y (b) detectar la unión del compuesto de ensayo al polipéptido, donde el compuesto de ensayo que se une al polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad de dicho polipéptido.

25

La invención también hace referencia a un método de escrutinio para agentes que regulan la actividad de un polipéptido de la Quinasa RC, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido de la Quinasa RC codificado por cualquier polinucleótido como se ha descrito más arriba; y (b) detectar la actividad de fosforilación del polipéptido de la Quinasa RC, donde el compuesto de ensayo que aumenta la actividad del polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para incrementar la actividad del polipéptido de la Quinasa RC, y donde el compuesto de ensayo que disminuye la actividad del polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad del polipéptido de la Quinasa RC.

30

35

La invención también hace referencia a un método de escrutinio para agentes que regulan la actividad de una Quinasa RC, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido de la Quinasa RC codificado por cualquier polinucleótido como se ha descrito más arriba y MKK4; y (b) detectar la fosforilación por el polipéptido de la Quinasa RC de MKK4, donde el compuesto de ensayo que aumenta la fosforilación por el péptido de la Quinasa RC de MKK4 se identifica como un agente terapéutico potencial para incrementar la actividad del polipéptido de la Quinasa RC, y donde el compuesto de ensayo que disminuye la fosforilación por el polipéptido de la Quinasa RC de MKK4 se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad del polipéptido de la Quinasa RC.

40

45

La invención también se refiere a un método de escrutinio de agentes que disminuyen la actividad del polipéptido de la Quinasa RC, que comprende poner en contacto un compuesto de ensayo con cualquier polinucleótido como se ha descrito antes y detectar la unión del compuesto de ensayo al polinucleótido, donde el compuesto de ensayo que se une al polinucleótido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad del polipéptido de la Quinasa RC.

50

Adicionalmente, la invención se refiere a un método para reducir la actividad de la Quinasa RC, que comprende poner en contacto una célula fuera del organismo humano o animal con un reactivo que se une específicamente a cualquier polinucleótido como se ha descrito antes o cualquier polipéptido de la Quinasa RC como se ha descrito antes, donde el reactivo es una ribozima, un oligonucleótido antisentido o un anticuerpo, por medio del cual se reduce la actividad de la Quinasa RC.

55

De este modo la invención proporciona polipéptidos de SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 que se puede utilizar para identificar compuestos que pueden actuar, por ejemplo, como reguladores o moduladores tales como agonistas y antagonistas, agonistas parciales, agonistas inversos, activadores, co-activadores e inhibidores del polipéptido que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Por consiguiente, la invención proporciona reactivos y métodos para regular un polipéptido que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 en la EPOC. La regulación puede ser una regulación al alza o a la baja. Los reactivos que modulan la expresión, la estabilidad o la cantidad de polinucleótido que comprende un polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o la actividad del polipéptido que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o un polipéptido

60

65

ES 2 347 247 T3

codificado por un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 puede ser una proteína, un péptido, un peptidomimético, un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico (p. ej., ácido nucleico peptídico, ácido nucleico bloqueado) o una molécula pequeña. Los métodos que modulan la expresión, estabilidad o cantidad de un polinucleótido que comprende un polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o la actividad del polipéptido que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 pueden ser los enfoques de terapias de sustitución génica, antisentido, ribozimas, interferencia por ARN y ácidos nucleicos tríplex.

En la presente memoria se describen anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido completo o parcial que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 para su uso en la predicción, prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la EPOC.

En la presente memoria se describe el uso de un reactivo que se une específicamente a un polinucleótido que comprende un polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o un polipéptido que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la EPOC.

En la presente memoria se describe el uso de un reactivo que modula la actividad o estabilidad de un polipéptido que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o la expresión, cantidad o estabilidad de un polinucleótido que comprende un polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la EPOC.

En la presente memoria se describe una composición farmacéutica que incluye un reactivo que se une específicamente a un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o un polipéptido que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En la presente memoria se describe una composición farmacéutica que incluye un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o que codifica un polipéptido que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12.

En la presente memoria se describe un reactivo que altera el nivel de expresión en una célula de un polinucleótido que comprende el polinucleótido de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o que codifica un polipéptido que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12, o una secuencia complementaria a esta, se identifica proporcionando una célula, tratando la célula con un reactivo de ensayo, determinando el nivel de expresión en la célula de un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o que codifica un polipéptido que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o una secuencia complementaria a esta, y comparando el nivel de expresión del polinucleótido en las células tratadas con el nivel de expresión del polinucleótido en una célula no tratada, donde un cambio en el nivel de expresión del polinucleótido en la célula tratada con respecto al nivel de expresión del polinucleótido en la célula no tratada es indicativo de un agente que altera el nivel de expresión del polinucleótido en una célula.

En la presente memoria se describe una composición farmacéutica que comprende un reactivo identificado mediante este método.

Los polipéptidos de Quinasa RC de la presente invención son adecuados para su uso en una composición farmacéutica que incluye un polipéptido que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o que está codificado por un polinucleótido que comprende el polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

La invención también hace referencia al uso de un método de escrutinio, comprendiendo dicho método las etapas de

(a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7; y

(b) detectar la unión de dicho compuesto de ensayo a un polipéptido del apartado (a),

para la identificación de compuestos útiles en el tratamiento de la EPOC.

Adicionalmente, la invención hace referencia al uso de un método de escrutinio, comprendiendo dicho método las etapas de

(a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, y

(b) detectar una actividad de un polipéptido del apartado (a),

para la identificación de compuestos útiles en el tratamiento de la EPOC.

5

En la presente memoria se describe una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido que incluye una secuencia que hibrida en condiciones restrictivas con un polinucleótido que comprende un polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 y que codifica un polipéptido que muestra la misma función biológica que la Quinasa RC, o que codifica un polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden incluir adicionalmente proteínas de fusión que comprenden un polipéptido que comprende un polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o uno de sus fragmentos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

Breve descripción de los dibujos

15 La Fig. 1 muestra los primeros 20 genes regulados al alza en tejido pulmonar de pacientes con EPOC determinados mediante análisis con micromatrices. La multiplicidad del incremento en la expresión de estos genes en comparación con la expresión media en el tejido pulmonar de sujetos normales se muestra en la columna del extremo derecho. Se demuestra que la Quinasa RC tiene una expresión incrementada 4,58 veces en la EPOC en comparación con lo normal, y se clasifica como la 18^a entre los aproximadamente 10.000 genes representados sobre la micromatriz.

20

La Fig. 2 muestra los niveles de expresión relativa para la Quinasa RC humana obtenida a partir de experimentos con micromatrices utilizando diferentes muestras de pulmón normales o con EPOC.

25 La Fig. 3 muestra la confirmación mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de expresión relativos de la Quinasa RC en pulmón normal y con EPOC. Los resultados, generados en el mismo grupo de tejidos y utilizados en análisis con micromatrices, se corresponden bien con los resultados del experimento con micromatrices mostrado en la figura 2.

30 La Fig. 4 muestra los perfiles de expresión en la RT-PCR cuantitativa de la Quinasa RC humana en diferentes tejidos.

La Fig. 5 muestra los perfiles de expresión en la RT-PCR cuantitativa de la Quinasa RC humana en diferentes células inmunitarias relacionadas, líneas celulares de pulmón primarias, y líneas celulares inmortalizadas.

35 La Fig. 6 muestra cambios en el nivel de expresión de la Quinasa RC humana en la línea celular HEK293 en respuesta al tratamiento con diferentes estímulos que causan crecimiento celular o estrés celular. La expresión de la Quinasa RC está regulada al alza después de la estimulación con KCl 95 mM.

40 La Fig. 7 muestra cambios en el nivel de expresión de la Quinasa RC humana en las líneas celulares Jurkat y Daudi en respuesta al tratamiento con diferentes estímulos que ocasionan crecimiento celular o estrés celular. Tanto las células Jurkat como Daudi muestran regulación al alza de la expresión de la Quinasa RC después de la estimulación con KCl 95 mM, y las células Jurkat muestran regulación al alza de la expresión de la Quinasa RC después de la estimulación con H₂O₂ 500 μM.

45 La Fig. 8 muestra la actividad fosforilante de la Quinasa RC humana sobre diferentes Quinasas de Quinasas MAP sometidas a ensayo como sustratos. La Quinasa RC fue capaz de fosforilarse a sí misma y a MKK4, pero mostró solamente una actividad minoritaria frente a MKK6 y no mostró actividad detectable contra MEK2. Se preparó la Quinasa RC mediante inmunoprecipitación de los productos lisados de los transfectantes de Quinasa RC, después se añadió a una mezcla de sustrato y ATP-[P³³]. La actividad de fosforilación fue detectada mediante autorradiografía después de la incubación y separación por tamaños sobre SDS-PAGE. Como controles, se utilizaron producto inmunoprecipitado de un vector-transfectante vacío y producto inmunoprecipitado inactivado con calor de un transfectante de Quinasa RC.

50 La Fig. 9 muestra la capacidad de la Quinasa RC humana para inducir la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB. Se transfectó un vector de expresión de la Quinasa RC o un vector vacío en células HEK293 junto con constructos de genes informadores de luciferasa para los factores de transcripción AP-1, NFAT, NFκB, y el promotor de tipo TATA. La actividad luciferasa (expresada en unidades de luz relativa (ULR) en comparación con la producción de luciferasa de fondo del promotor de tipo TATA) se midió 48 horas después de la transfección.

60 La Fig. 10 muestra el aumento de producción de interleuquina-8 en células HEK293 transfectadas con el constructo de expresión de la Quinasa RC. Se midieron los niveles de proteína IL-8 en el medio de cultivo mediante un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada 48 horas después de la transfección de un vector vacío o un constructo de expresión de la Quinasa RC.

65 La Fig. 11 muestra una ilustración que indica el papel de la Quinasa RC en un sistema de fosfoliberación de quinasa MAP. La Quinasa RC es activada en respuesta a la señalización mediada por receptores, estrés, mitógenos, u otros estímulos, o su expresión es regulada al alza en respuesta a tales estímulos. Como resultado, la MKK4 y posiblemente otros sustratos son fosforilados, conduciendo eventualmente a la activación de los factores de transcripción NFκB y

ES 2 347 247 T3

AP-1. Los factores de transcripción contribuyen en ese caso a la regulación al alza de la expresión de la IL-8 y otros mediadores inflamatorios, contribuyendo a la inflamación y otras patologías relacionadas con la EPOC.

Descripción detallada de la invención

5 La “Quinasa RC” según se utiliza en la presente memoria hace referencia al polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12, así como a sus derivados, fragmentos, análogos, y homólogos, o a los polipéptidos codificados por el polinucleótido del SEQ ID NO: 1 así como a sus derivados, fragmentos, análogos y homólogos.

10 El SEQ ID NO: 1 muestra la variante 1 de la secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la Quinasa RC. Esta variante tiene 3719 pb de longitud, con un marco de lectura abierto que se extiende desde las bases 1-3679 de la secuencia. El SEQ ID NO: 2 muestra la variante 2 de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de la Quinasa RC. Esta variante tiene 3338 pb de longitud, con un marco de lectura abierto que se extiende desde las bases 1-3243 de la secuencia. El SEQ ID NO: 3 muestra la variante 3 de la secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la Quinasa RC. Esta variante tiene 3510 pb de longitud, con un marco de lectura abierto que se extiende desde las bases 1-3415 de la secuencia. El SEQ ID NO: 4 muestra la variante 4 de la secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la Quinasa RC. Esta variante tiene 4058 pb de longitud, con un marco de lectura abierto que se extiende desde las bases 1-4018 de la secuencia. El SEQ ID NO: 5 muestra la variante 5 de la secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la Quinasa RC. Esta variante tiene 1460 pb de longitud, con un marco de lectura abierto que se extiende desde las bases 1-1420 de la secuencia. El SEQ ID NO: 6 muestra la variante 6 de la secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la Quinasa RC. Esta variante tiene 1604 pb de longitud, con un marco de lectura abierto que se extiende desde las bases 1-1564 de la secuencia. El SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADN del SEQ ID NO: 1. El SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADN del SEQ ID NO: 2.

25 El SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADN del SEQ ID NO: 3. El SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADN del SEQ ID NO: 4. El SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADN del SEQ ID NO: 5. El SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADN del SEQ ID NO: 6.

30 Además, la actividad de una Quinasa RC novedosa, concretamente una Quinasa RC humana, es un descubrimiento de la presente invención. La Quinasa RC humana contiene un único dominio quinasa S_TKc (proteínas Serina/Treonina quinasa, dominio catalítico), comenzando aproximadamente a 268 residuos aminoácido del extremo carboxi del SEQ ID NO: 7, 8, 10 o 12 y abarcando aproximadamente 256 residuos. Dos de las variantes de la Quinasa RC Humana, SEQ ID NO: 9 y 11, han perdido parte de este dominio quinasa. El dominio quinasa de la Quinasa RC Humana es altamente homólogo a los dominios quinasa de otras enzimas de tipo quinasa conocidas. La Quinasa RC humana mostrada en el SEQ ID NO: 7, 8, 10 o 12 es idéntico en 44% y similar en 67% a lo largo de 287 aminoácidos (dominio quinasa) a la proteína del moho deslizante *Dictiotelium discoideum* identificado por el Núm. de Acceso GenBank AAC97114 y anotado como “quinasa alfa MEK”. De un modo similar, la Quinasa RC humana mostrada en el SEQ ID NO: 7, 8, 10, o 12 es idéntica en 47% y similar en 67% a lo largo de 276 aminoácidos (dominio quinasa) a la proteína de *Nicotiana tabacum*, tabaco común, identificada mediante el Núm. de Acceso GenBank A48084 y anotada como “homólogo NPK1 de proteína quinasa STE11”, y es idéntica en 46% y similar en 63% a lo largo de 291 aminoácidos (dominio quinasa) a la proteína humana identificada mediante el Núm. de Acceso GenBank NP_002392 y anotada como “MAP/ERK quinasa quinasa 3; MAPKKK3”.

45 La secuencia codificante para los SEQ ID NOS: 7-12 se muestra en los SEQ ID NOS: 1-6 respectivamente. El gen que contiene estas secuencias codificantes está localizado en el cóntigo genómico del cromosoma 2 humano identificado con el núm. de acceso de GenBank NT_005058, y está dividido en al menos 11 exones que abarcan más de 61.000 bases del genoma. Si los 11 exones más 3' están marcados como exones C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, y M, respectivamente, leyendo en orden a lo largo del gen de 5' a 3', se describen seis variantes de empalme alternativas por medio de la invención como sigue. El SEQ ID NO: 1 describe una variante de empalme que utiliza todos los exones excepto los exones E, G, y H. El SEQ ID NO: 2 describe una variante de empalme que utiliza todos los exones excepto una porción del exón L. El SEQ ID NO: 3 describe una variante de empalme que utiliza todos los exones excepto los exones E y una porción de L. El SEQ ID NO: 4 describe una variante de empalme que utiliza todos los exones excepto el exón E. El SEQ ID NO: 5 describe una variante de empalme que utiliza todos los exones excepto los exones E, J, y una porción de L. El SEQ ID NO: 6 describe una variante de empalme que utiliza todos los exones excepto los exones E, y J.

60 Se ha anotado previamente un único exón que contiene la mayor parte del dominio catalítico de quinasa como “proteína FLJ23074 hipotética”, un gen con un producto proteico y una función desconocidos.

65 La quinasa RC tiene la capacidad de fosforilar otros polipéptidos de Quinasa RC, MKK4 y MKK6. Tomado junto con el hecho de la importancia de la señalización de MAPK, la modificación de la actividad de la quinasa RC puede dar la oportunidad de remediar la EPOC, el asma, el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, las enfermedades inflamatorias, y enfermedades cardiovasculares.

Polipéptidos

Los polipéptidos de la Quinasa RC de acuerdo con la invención comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o una de sus variantes biológicamente activas, como se define más abajo. Un polipéptido de la Quinasa RC de la invención puede ser por lo tanto una porción de una molécula de Quinasa RC, una molécula de Quinasa RC completa, o una proteína de fusión que comprende toda o una parte de una molécula de Quinasa RC. La invención también se refiere a un polipéptido de la Quinasa RC esencialmente purificado codificado por un polinucleótido como se ha descrito antes.

10 *Variantes Biológicamente Activas*

Las variantes de Quinasa RC que son biológicamente activas, esto es, conservan una actividad Quinasa RC, también son polipéptidos de Quinasa RC. Preferiblemente, las variantes de Quinasa RC de origen natural o no natural tienen secuencias de aminoácidos que son idénticas al menos aproximadamente en un 50%, preferiblemente aproximadamente idénticas en un 70, 75, 90, 96, o 98% a una secuencia de aminoácidos mostrada en los SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12. El porcentaje de identidad entre una supuesta variante de Quinasa RC y una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 se determina mediante métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48:603 (1986), y Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1992). En resumen, se alinean dos secuencias de aminoácidos para optimizar las puntuaciones de los alineamientos utilizando una penalización por apertura del espacio de 10, una penalización por extensión del espacio de 1, y una matriz de puntuación "BLOSSUM62" de Henikoff & Henikoff, 1992.

Los expertos en la técnica aprecian que se encuentran disponibles muchos algoritmos establecidos para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un método de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria y la secuencia de aminoácidos de una supuesta variante. El algoritmo FASTA es descrito por Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), y por Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990). En resumen, FASTA caracteriza primero la similitud de secuencia identificando las regiones compartidas por la secuencia problema (p. ej., SEQ ID NO: 2) y una secuencia de ensayo que tiene o bien la densidad más elevada de identidades (si la variable $ktup$ es 1) o pares de identidades (si $ktup = 2$), sin considerar las sustituciones, inserciones, o deleciones de aminoácidos conservativas. Las diez regiones con la densidad más elevada de identidades se vuelven a puntuar después comparando la similitud de todos los aminoácidos emparejados utilizando una matriz de sustitución de aminoácidos, y los extremos de las regiones se "recortan" para incluir solamente aquellos residuos que contribuyen a la puntuación más elevada. Si hay varias regiones con puntuaciones mayores que el valor de "corte" (calculado mediante una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia, el valor $ktup$), las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si las regiones se pueden unir para formar un alineamiento aproximado con espacios. Finalmente, las regiones de puntuación más elevada de las dos secuencias de aminoácidos se alinean utilizando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444 (1970); Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787 (1974)), que permite inserciones y deleciones de aminoácidos. Los parámetros preferidos para el análisis FASTA son: $ktup = 1$; penalización de apertura del espacio = 10, penalización de extensión del espacio = 1, y matriz de sustitución = BLOSSUM62. Estos parámetros se pueden introducir en un programa FASTA modificando las filas de la matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990).

También se puede utilizar FASTA para determinar la identidad de secuencia de moléculas de ácido nucleico utilizando una razón como se ha descrito antes. Para las comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor $ktup$ puede oscilar entre uno y seis, preferiblemente entre tres y seis, muy preferiblemente tres, con los demás parámetros ajustados por defecto.

Las variaciones en el porcentaje de identidad se pueden deber, por ejemplo, a sustituciones, inserciones, o deleciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se definen como reemplazos de aminoácidos uno por uno. Son de naturaleza conservativa cuando el aminoácido conservativo tiene propiedades estructurales y/o químicas similares. Los ejemplos de reemplazos conservativos son las sustituciones de una leucina por una isoleucina o una valina, de un aspartato por un glutamato, o de una treonina por una serina.

Las inserciones o deleciones de aminoácidos son cambios en una secuencia de aminoácidos. Típicamente entran en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. Las pautas para la determinación de qué residuos aminoácido pueden ser sustituidos, insertados, o suprimidos sin abolir la actividad biológica o inmunológica se pueden encontrar utilizando programas de ordenador bien conocidos en la técnica, tales como el soporte lógico DNASTAR. Se puede determinar fácilmente si un cambio de aminoácido da como resultado un polipéptido de la Quinasa RC biológicamente activo analizando la unión a fibronectina o la actividad Quinasa RC, como es sabido en la técnica y descrito, por ejemplo, en el Ejemplo 2.

Proteínas de Fusión

Las proteínas de fusión son útiles para generar anticuerpos contra las secuencias de aminoácidos de la Quinasa RC y para utilizarlas en diferentes sistemas de análisis. Por ejemplo, se pueden utilizar proteínas de fusión para identificar proteínas que interaccionan con porciones de un polipéptido de la Quinasa RC, incluyendo su sitio activo. Para este fin se pueden utilizar métodos tales como la cromatografía de afinidad de proteínas o análisis basados en genotecas

ES 2 347 247 T3

para interacciones proteína-proteína, tales como los sistemas de dos híbridos de levadura o de presentación en fagos. Tales métodos son bien conocidos en la técnica y también se pueden utilizar como escrutinio de fármacos.

Una proteína de fusión de Quinasa RC comprende dos segmentos de proteína fusionados entre sí por medio de un enlace peptídico. Los aminoácidos contiguos para su uso en una proteína de fusión se pueden seleccionar entre la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o entre una de sus variantes biológicamente activas, tales como las descritas antes. Preferiblemente, una proteína de fusión comprende un dominio quinasa y/o un sitio de unión a ATP de la Quinasa RC humana. El primer segmento de proteína también puede comprender una Quinasa RC completa.

El segundo segmento de proteína puede ser una proteína completa o un fragmento de proteína o polipéptido. Las proteínas utilizadas comúnmente en la construcción de proteínas de fusión incluyen β -galactosidasa, β -glucuronidasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteínas autofluorescentes, incluyendo la proteína fluorescente azul (BFP), glutatión-S-transferasa (GST), luciferasa, peroxidasa de rábano picante (HRP), y cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). Adicionalmente, se utilizan etiquetas epitópicas en las construcciones de proteínas de fusión, incluyendo etiquetas de histidina (His), etiquetas FLAG, etiquetas de hemaglutininas de influenza (HA), etiquetas Myc, etiquetas VSV-G, y etiquetas de tiorredoxina (Trx). Otras construcciones de fusión pueden incluir la proteína de unión a maltosa (MBP), etiqueta S, fusiones Lex-dominio de unión a ADN (DBD), fusiones GAL4-dominio de unión a ADN, y fusiones con proteína BP16 del virus del herpes simplex (HSV). También se puede diseñar una proteína de fusión para que contenga un sitio de escisión localizado entre la secuencia que codifica el polipéptido de la Quinasa RC y la secuencia de proteína heteróloga, de manera que se puede escindir el polipéptido de la Quinasa RC y purificarlo a partir del radical heterólogo.

Se puede sintetizar químicamente una proteína de fusión, como es sabido en la técnica. Preferiblemente, una proteína de fusión se produce conectando covalentemente dos segmentos de proteína o mediante procedimientos convencionales en la técnica de la biología molecular. Se pueden utilizar métodos de ADN recombinante para preparar proteínas de fusión, por ejemplo, elaborando un constructo de ADN que comprende secuencias codificantes de la Quinasa RC descritas en la presente memoria en un marco de lectura apropiado con nucleótidos que codifican el segundo segmento de proteína y que expresan el constructo de ADN en una célula anfitriona, como es sabido en la técnica. Se encuentran disponibles muchos kits para construir proteínas de fusión de compañías tales como Promega Corporation (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA), CLONTECH (Mountain View, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA), y Quantum Biotechnologies (Montreal, Canadá; 1-888-DNA-KITS).

Identificación de Especies Homólogas

Se pueden obtener especies homólogas de Quinasa RC humana utilizando polinucleótidos de Quinasa RC (descritos más abajo) para elaborar sondas o cebadores adecuados para escrutar genotecas de expresión de ADNc de otras especies, tales como ratones, monos, o levaduras, identificar los ADNc que codifican homólogos de Quinasa RC, y expresar los ADNc como es sabido en la técnica.

Polinucleótidos

Un polinucleótido de Quinasa RC puede ser de hebra sencilla o doble y comprende una secuencia codificante o el complemento de una secuencia codificante para un polipéptido de la Quinasa RC. Se muestra una secuencia codificante parcial de un polinucleótido de Quinasa RC en el SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6; las secuencias codificantes de la Quinasa RC también están contenidas en la secuencia genómica mostrada en el SEQ ID NO: 3, desde los nucleótidos 11885 a 12023 y desde los nucleótidos 10564 a 10693.

Las secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican polipéptidos de la Quinasa RC humana, así como las secuencias de nucleótidos homólogas que son idénticas al menos aproximadamente en 50%, preferiblemente aproximadamente en 75, 90, 96, o 98% a las secuencias de nucleótidos de las secuencias codificantes de la Quinasa RC mostradas en los SEQ ID NO: 1 y 3 también son polinucleótidos de Quinasa RC. El porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de dos polinucleótidos se determina utilizando programas de ordenador tales como ALIGN que emplean el algoritmo FASTA, utilizando una búsqueda de espacios afines con una penalización de apertura del espacio de -12 y una penalización de extensión del espacio de -2. Las moléculas de ADN complementarias (ADNc), los homólogos de especie, y las variantes de polinucleótidos de Quinasa RC que codifican polipéptidos de Quinasa RC biológicamente activos también son polinucleótidos de Quinasa RC.

La invención hace referencia a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la Quinasa RC, una serina/treonina quinasa, con una expresión incrementada en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polinucleótido que codifica un polipéptido de la Quinasa RC, cuyo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) secuencias de aminoácidos que son idénticas al menos en 75% a la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12; y

ES 2 347 247 T3

- (ii) una secuencia de aminoácidos como se representa en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12.
- (b) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6; y
- 5 (c) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se aparta de las secuencias de especificadas en los apartados (a) a (b) debido a la degeneración del código genético.

Identificación de Variantes y Homólogos

10 Las variantes y homólogos de los polinucleótidos de la Quinasa RC descritos antes también son polinucleótidos de Quinasa RC. Típicamente, las secuencias de polinucleótidos de Quinasa RC homólogas pueden ser identificadas mediante hibridación de los polinucleótidos candidato con los polinucleótidos de la Quinasa RC conocidos en condiciones restrictivas, como es sabido en la técnica. Por ejemplo, utilizando las siguientes condiciones de lavado - 2X SSC (NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M, pH 7,0), SDS al 0,1%, temperatura ambiente dos veces, 30 minutos cada una; después 2X SSC, SDS al 0,1%, 50°C una vez, 30 minutos, después 2X SSC, temperatura ambiente dos veces, 10 minutos cada una - se pueden identificar secuencias homólogas que contienen a lo sumo aproximadamente 25-30% de emparejamientos erróneos de pares de bases. Más preferiblemente, las hebras de ácido nucleico homólogas contienen 15-25% de emparejamientos erróneos de pares de bases, incluso más preferiblemente 5-15% de emparejamientos erróneos de pares de bases.

20 Las especies homólogas de polinucleótidos de Quinasa RC descritas en la presente memoria pueden ser identificadas elaborando sondas o cebadores adecuados y escrutando genotecas de expresión de ADNc de otras especies, tales como ratones, monos, o levaduras. Las variantes humanas de polinucleótidos de Quinasa RC pueden ser identificadas, por ejemplo, escrutando genotecas de expresión de ADNc humano. Es bien sabido que la T_m de un ADN de doble hebra disminuye 1-1,5°C cada 1% de descenso en la homología (Bonner *et al.*, *J. Mol. Biol.* 81, 123 (1973)). Las variantes de polinucleótidos de Quinasa RC humana o los polinucleótidos de Quinasa RC de otras especies pueden ser identificados por lo tanto, por ejemplo, hibridando un supuesto polinucleótido de Quinasa RC homólogo con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o una secuencia codificante de serina proteasa de tipo efrina del SEQ ID NO: 3 para formar un híbrido de ensayo. La temperatura de fusión del híbrido de ensayo se compara con la temperatura de fusión de un híbrido que comprende polinucleótidos de Quinasa RC que tienen secuencias de nucleótidos perfectamente complementarias, y se calcula el número o porcentaje de emparejamientos erróneos de pares de bases en el híbrido de ensayo.

35 Las secuencias de nucleótidos que hibridan con los polinucleótidos de Quinasa RC o sus complementos siguiendo la hibridación restrictiva y/o las condiciones de lavado también son polinucleótidos de Quinasa RC. Las condiciones de lavado restrictivas son bien conocidas y comprendidas en la técnica y se describen, por ejemplo, por Sambrook *et al.*, en MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed., 1989, en las paginas 9.50-9.51.

40 Típicamente, para las condiciones de hibridación restrictivas se debe elegir una combinación de temperatura y concentración de sal que sea de aproximadamente 12-20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido en estudio. La T_m de un híbrido entre un polinucleótido de Quinasa RC que tiene una secuencia codificante descrita en la presente memoria y una secuencia de polinucleótidos que es idéntica al menos aproximadamente en 50, preferiblemente 75, 90, 96, o 98% a esa secuencia de nucleótidos se puede calcular, por ejemplo, utilizando la ecuación de Bolton y McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48 1390 (1962):

$$45 \quad T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\%G+C) - 0,63(\%\text{formamida}) - 600/\ell,$$

50 donde ℓ = la longitud del híbrido en pares de bases.

Las condiciones de lavado restrictivas incluyen, por ejemplo, 4X SSC a 65°C, o formamida al 50%, 4X SSC a 42°C, o 0,5X SSC, SDS al 0,1% a 65°C. Las condiciones de lavado muy restrictivas incluyen, por ejemplo, 0,2X SSC a 65°C.

55 Preparación de Polinucleótidos

Se puede aislar un polinucleótido de Quinasa RC de origen natural libre de otros componentes celulares tales como componentes de membrana, proteínas, y lípidos. Los polinucleótidos pueden ser elaborados por una célula y aislados utilizando mecanismos de purificación de ácidos nucleicos convencionales, sintetizados utilizando una técnica de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o sintetizados utilizando un sintetizador automático. Los métodos para el aislamiento de polinucleótidos son rutinarios y son conocidos en la técnica. Se puede utilizar cualquiera de tales técnicas para obtener un polinucleótido para obtener polinucleótidos de Quinasa RC aislados. Por ejemplo, se pueden utilizar enzimas de restricción y sondas para aislar fragmentos de polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos de la Quinasa RC. Los polinucleótidos aislados están en preparaciones que están libres o libres al menos en 70, 80, o 90% de otras moléculas.

Las moléculas de ADNc de la Quinasa RC se pueden elaborar con mecanismos de biología molecular convencionales, utilizando ARNm de Quinasa RC como molde. Las moléculas de ADNc de Quinasa RC pueden replicar después utilizando mecanismos de biología molecular conocidos en la técnica y descritos en manuales tales como *Sambrook et al.* (1989). Se puede utilizar una técnica de amplificación, tal como la PCR, para obtener copias adicionales de polinucleótidos de Quinasa RC, utilizando ADN genómico o ADNc como molde.

Alternativamente, se puede utilizar la química sintética para sintetizar polinucleótidos de Quinasa RC. La degeneración del código genético permite sintetizar secuencias de nucleótidos alternativas que codificarán un polipéptido de la Quinasa RC que tenga, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o una variante biológicamente activa de esa secuencia.

Obtención de Polinucleótidos Completos

La secuencia parcial del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o su complemento se puede utilizar para identificar el correspondiente gen completo del cual derivan. Las secuencias parciales se pueden someter a traslado de muescas o a marcaje del extremo con P³² utilizando polinucleótido quinasa empleando métodos de marcaje conocidos por los expertos en la técnica (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis *et al.*, eds., Elsevier Press, N.Y., 1986). Se puede escrutar directamente una genoteca de lambda preparada a partir de tejido humano con las secuencias marcadas de interés o se puede convertir la genoteca en masa (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037) para facilitar el escrutinio de la colonia bacteriana (véase *Sambrook et al.*, 1989, pág. 1.20).

Ambos métodos son bien conocidos en la técnica. En resumen, los filtros con colonias bacterianas que contienen la genoteca en pBluescript o céspedes bacterianos que contienen placas de lambda se desnaturalizan, y el ADN se fija a los filtros. Los filtros se hibridan con la sonda marcada utilizando condiciones de hibridación descritas por Davis *et al.*, 1986. Las secuencias parciales, clonadas en lambda o pBluescript, se pueden utilizar como controles positivos para evaluar la unión de fondo y para ajustar la hibridación y las restricciones de lavado necesarias para una identificación certera de los clones. Las radiografías resultantes se comparan con placas duplicadas de colonias o placas; cada mancha expuesta corresponde a una colonia o placa positiva. Las colonias o placas se seleccionan y expanden, y el ADN se aísla a partir de las colonias para su análisis y secuenciación adicionales.

Los clones de ADNc positivos se analizan para determinar la cantidad de secuencia adicional que contienen utilizando la PCR con un cebador de la secuencia parcial y otro cebador del vector. Los clones con un producto de la PCR vector-inserto más grande que la secuencia parcial original se analizan mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN para determinar si contienen un inserto del mismo tamaño o similar al tamaño del ARNm determinado a partir del Análisis de transferencia Northern.

Una vez que se identifican uno o más clones de ADNc solapantes, se puede determinar la secuencia completa de los clones, por ejemplo tras la digestión con exonucleasa III (McCombie *et al.*, *Methods* 3, 3340, 1991). Se generan una serie de clones por delección, cada uno de los cuales es secuenciado. Las secuencias solapantes resultantes se ensamblan en una única secuencia contigua de alta redundancia (normalmente tres a cinco secuencias solapantes en cada posición de nucleótidos), dando como resultado una secuencia final muy acertada.

Se pueden utilizar diferentes métodos basados en la PCR para prolongar las secuencias de ácido nucleico que codifican las porciones descritas de la Quinasa RC humana para detectar las secuencias aguas arriba tales como promotores y elementos reguladores. Por ejemplo, la PCR de sitios de restricción utiliza cebadores universales para recuperar la secuencia desconocida adyacente a un locus conocido (Sarkar, *PCR Methods Applic* 2, 318-322, 1993). El ADN genómico es amplificado primero en presencia de un cebador para una secuencia conectora y un cebador específico para la región conocida. Las secuencias amplificadas se someten después a una segunda ronda de PCR con el mismo cebador conector y otro cebador específico interno con respecto al primero. Los productos de cada ronda de PCR se transcriben con una ARN polimerasa apropiada y se secuencian utilizando una transcriptasa inversa. La PCR inversa también se puede utilizar para amplificar o prolongar secuencias utilizando cebadores divergentes basados en una región conocida (Triglia *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16, 8186, 1988). Los cebadores pueden ser diseñados utilizando un soporte lógico disponible en el mercado, tal como el soporte lógico de Análisis de Cebadores OLIGO 4.06 (National Biosciences Inc. Plymouth, Minn.), para que tengan 22-30 nucleótidos de longitud, para que tenga un contenido de GC del 50% o más, y para que hibride con la secuencia diana a temperaturas de aproximadamente 68-72°C. El método utiliza diferentes enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en una región conocida de un gen. El fragmento se circulariza después mediante ligación intramolecular y se utiliza como un molde para la PCR.

Otro método que se puede utilizar es la PCR de captura, que implica la amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en un ADN cromosómico artificial humano y de levadura (Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic. I*, 111-119, 1991). En este método, se utilizan múltiples digestiones con enzimas de restricción y ligaciones para colocar una secuencia de doble hebra diseñada en un fragmento desconocido de la molécula de ADN antes de realizar la PCR.

Otro método que se puede utilizar para recuperar secuencias desconocidas es el de Parker *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19, 3055-3060, 1991. Adicionalmente, se pueden utilizar la PCR, los cebadores anidados, y las genotecas PRO-MOTERFINDER (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) para desplazarse sobre el ADN genómico. Este proceso evita la necesidad de escrutar genotecas y es útil para descubrir empalmes intrón/exón.

ES 2 347 247 T3

Cuando se escruta en busca de ADNc completos, es preferible utilizar genotecas que hayan sido seleccionadas por tamaño para incluir ADNc más grandes. Asimismo, son preferibles genotecas cebadas al azar, ya que contienen más secuencias que contienen las regiones 5' de los genes. El uso de una genoteca cebada al azar puede ser especialmente preferible para situaciones en las que una genoteca de oligo d(T) no proporciona un ADNc completo. Las genotecas genómicas pueden ser útiles para la prolongación de la secuencia en regiones reguladoras no transcritas 5'.

Se pueden utilizar sistemas de electroforesis capilar disponibles en el mercado para analizar el tamaño o para conformar la secuencia de nucleótidos de los productos de la PCR o de la secuenciación. Por ejemplo, la secuenciación capilar puede emplear polímeros verticales para la separación electroforética, cuatro colorantes fluorescentes diferentes (uno para cada nucleótido) que son activados por láser, y la detección de las longitudes de onda emitidas mediante una cámara con un dispositivo acoplado a la carga. La intensidad de luz de salida se puede convertir en señal eléctrica utilizando el soporte lógico apropiado (p. ej., GENOTYPER y Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), y todo el proceso desde la carga de las muestras hasta el análisis por ordenador y la presentación de los datos electrónicos puede ser controlado por ordenador. La electroforesis capilar es especialmente preferible para la secuenciación de pequeñas porciones de ADN que podrían estar presentes en cantidades limitadas en una muestra concreta.

Obtención de Polipéptidos

Se pueden obtener los polipéptidos de Quinasa RC, por ejemplo, mediante purificación de células humanas, mediante expresión de polinucleótidos de Quinasa RC, o mediante síntesis química directa.

Purificación de Proteínas

Los polipéptidos de Quinasa RC se pueden purificar a partir de células, incluyendo células que han sido transfectadas con constructos de expresión de Quinasa RC. Las células de riñón, pulmón fetal, testículo, células B, epitelio pulmonar adulto, y células de leucemia linfática crónica son fuentes particularmente útiles de polipéptidos de Quinasa RC. Un polipéptido de la Quinasa RC purificado se separa de otros componentes que normalmente se asocian con el polipéptido de la Quinasa RC en la célula, tales como ciertas proteínas, carbohidratos, o lípidos, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no están limitados a, cromatografía de exclusión por tamaños, fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, y electroforesis en gel preparativa. Una preparación de polipéptidos de Quinasa RC purificados es pura al menos en 80%; preferiblemente, las preparaciones son puras en 90%, 95%, o 99%. La pureza de las preparaciones se puede evaluar por medios conocidos en la técnica, tales como la electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS. La actividad enzimática de las preparaciones purificadas se puede analizar, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2.

Expresión de Polinucleótidos

Para expresar un polipéptido de Quinasa RC, se puede insertar un polinucleótido de Quinasa RC en un vector de expresión que contiene los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada. Se pueden utilizar los métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de polipéptidos de Quinasa RC y los elementos de control de la transcripción y la traducción apropiados. Estos métodos incluyen las técnicas de ADN recombinante *in vitro*, la técnicas sintéticas, y la recombinación genética *in vivo*. Tales técnicas son descritas, por ejemplo, por Sambrook *et al.* (1989) y Ausubel *et al.*, en CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. 1989.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vector de expresión/anfitrión para que contengan y expresen secuencias codificantes de un polipéptido de la Quinasa RC. Estos incluyen, pero no están limitados a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, plásmidos, o vectores de expresión de ADN cosmídico; levadura transformada con vectores de expresión de levadura, sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (p. ej., baculovirus), sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (p. ej., plásmidos Ti o pBR322), o sistemas de células animales.

Los elementos de control o las secuencias reguladoras son aquellas regiones no traducidas del vector -intensificadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3'- que interactúan con las proteínas celulares del anfitrión para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su fuerza y su especificidad. Dependiendo del sistema vector y del anfitrión utilizado, se puede utilizar cualquiera de los numerosos elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden utilizar promotores inducibles tales como el promotor lacZ híbrido del fagémido BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, Calif.) o el plásmido pSPORT1 (Life Technologies) y similares. Se puede utilizar el promotor de la polihedrina de baculovirus en células de insecto. Se pueden clonar en el vector promotores o intensificadores derivados de genomas de células vegetales (p. ej., choque térmico, RUBISCO, y genes de las proteínas de almacenamiento) o de virus de plantas (p. ej., promotores virales o secuencias líder). En sistemas de células de mamífero, son preferibles promotores de genes de mamífero o de virus de mamífero. Si es necesario generar una línea celular que contiene múltiples copias de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la Quinasa RC, se pueden utilizar vectores basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.

Sistemas de Expresión Bacterianos y de Levadura

En los sistemas bacterianos, se pueden seleccionar numerosos vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido de la Quinasa RC. Por ejemplo, cuando se necesita una gran cantidad de polipéptido de la Quinasa RC para la inducción de anticuerpos, se pueden utilizar vectores que dirigen un elevado nivel de expresión de las proteínas de fusión que son fácilmente purificadas. Tales vectores incluyen, pero no están limitados a, vectores de clonación y de expresión en *E. coli* multifuncionales tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia que codifica el polipéptido de la Quinasa RC puede ser ligada en el vector en marco con secuencias para la Met amino terminal y los 7 restos siguientes de β -galactosidasa de manera que se produzca una proteína híbrida. Se pueden utilizar vectores pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, 1989) o vectores pGEX (Promega, Madison, Wis) para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción a cuentas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas elaboradas en tales sistemas pueden ser diseñadas para incluir sitios de escisión para proteasa de heparina, trombina, o Factor Xa de manera que el polipéptido clonado de interés pueda ser liberado del radical GST a voluntad.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden utilizar numerosos vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como el factor alfa, la alcohol oxidasa, y PGH. Para las revisiones, véanse Ausubel *et al.*, (1989) y Grant *et al.*, *Methods Enzymol.* 153, 516-544, 1987.

Sistemas de Expresión en Plantas e Insectos

Si se utilizan vectores de expresión de plantas, la expresión de las secuencias que codifican polipéptidos de Quinasa RC puede ser dirigida por uno cualquiera de numerosos promotores. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV junto con o combinados con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu *EMBO J.* 6, 307-311, 1987). Alternativamente, se pueden utilizar promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de los promotores RUBISCO o de choque térmico (Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3, 1671-1680, 1984; Broglie *et al.*, *Science* 224, 838-843, 1984; Winter *et al.*, *Results Proble. Cell Differ.* 17, 85-105, 1991). Estos constructos pueden ser introducidos en células de plantas mediante transformación de ADN directa o mediante transfección mediada por patógenos. Tales técnicas se describen en numerosas revisiones disponibles en general (véase, por ejemplo, Hobbs o Murray, in McGraw Hill YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, Nueva York, págs. 191-196, 1992).

También se puede utilizar un sistema de insecto para expresar un polipéptido de la Quinasa RC. Por ejemplo, en uno de tales sistemas se utiliza el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes foráneos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican los polipéptidos de la Quinasa RC pueden ser clonados en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y colocados bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción satisfactoria de los polipéptidos de la Quinasa RC volverá inactivo el gen de la polihedrina y producirá virus recombinantes carentes de la proteína de la cubierta. Después se pueden utilizar los virus recombinantes para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que se pueden expresar los polipéptidos de la Quinasa RC (Engelhard *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, 1994).

Sistemas de Expresión en Mamífero

Se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión basados en virus en células anfitrionas de mamífero. Por ejemplo, si se utiliza un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican los polipéptidos de la Quinasa RC se pueden ligar en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Se puede utilizar la inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral para obtener un virus viable que sea capaz de expresar un polipéptido de la Quinasa RC en células anfitrionas infectadas (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659, 1984). Además, se pueden utilizar intensificadores de la transcripción, tales como el intensificador del virus de Sarcoma de Rous (RSV), para incrementar la expresión en células anfitrionas de mamífero.

Asimismo se pueden utilizar cromosomas artificiales humanos (HAC) para liberar fragmentos más grandes de ADN que pueden estar contenidos o ser expresados en un plásmido. Los HAC de 6M y 10M se construyen y liberan en las células vía métodos convencionales (p. ej., liposomas, polímeros amínicos policatiónicos, o vesículas).

Las señales de iniciación específicas también se pueden utilizar para lograr una traducción más eficaz de secuencias codificantes de polipéptidos de Quinasa RC. Tales señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que las secuencias que codifican un polipéptido de la Quinasa RC, su codón de iniciación, y las secuencias aguas arriba están insertadas en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control de la transcripción y la traducción adicionales. No obstante, en los casos en los que solamente se inserta una secuencia codificante, o uno de sus fragmentos, se deben proporcionar señales de control de la traducción exógenas (incluyendo el codón de iniciación ATG). El codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción del inserto completo. Los elementos traducciónales y los codones de iniciación exógenos pueden ser de diferentes orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión se puede lograr mediante

la inclusión de intensificadores que son apropiados para el sistema celular concreto que se utiliza (véase Scharf *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125-162, 1994).

5 La invención hace referencia a un vector de expresión que contiene cualquier polinucleótido de acuerdo con la invención.

Células Anfitrionas

10 Se puede seleccionar una cepa de células anfitrionas por su capacidad para modular la expresión de la secuencia insertada o para procesar un polipéptido de la Quinasa RC expresado de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no están limitadas a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. También se puede utilizar el procesamiento post-traduccional que escinde una forma "prepro" del polipéptido para facilitar una inserción, plegamiento y/o función correctos. Se encuentran disponibles diferentes células anfitrionas que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para las actividades post-traduccionales (p. ej., CHO, HeLa, MDCK, HEK293, y WI38) de la Matriz de Cultivos Tipo Americana (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) y se pueden seleccionar para asegurar una modificación y un procesamiento correctos de la proteína foránea.

20 Se prefiere la expresión estable para la producción de elevado rendimiento, a largo plazo de proteínas recombinantes. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente polipéptidos de Quinasa RC pueden ser transformadas utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación virales y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable en el mismo vector o en uno separado. Después de la introducción en el vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan con éxito las secuencias de la Quinasa RC introducidas. Los clones resistentes de las células transformadas establemente pueden hacerse proliferar utilizando las técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

30 Se puede utilizar cualquiera de los numerosos sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero no están limitados a, la timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler *et al.*, *Cell* 11, 223-32, 1977) y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell* 22, 817-23, 1980). Los genes que se pueden emplear en células *tk⁺* o *aprt⁺*, respectivamente. Asimismo, se pueden utilizar antimetabolitos, antibióticos, o resistencia a herbicidas como base para la selección. Por ejemplo, *dhfr* confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-70, 1980); *npt* confiere resistencia a los aminoglicósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14, 1981); y *als* y *pat* confieren resistencia a clorosulfuron y fosfotricin acetiltransferasa, respectivamente 5 (Murray, 1992 más arriba. Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo *trpB*, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o *hisD*, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047-51, 1988). Se pueden utilizar marcadores visibles tales como antocianinas, 13-glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, para identificar transformantes y cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable 10 atribuible a un sistema vector específico (Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, 1995).

Detección de la Expresión de los Polipéptidos

45 La invención hace referencia a un método para la detección de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la Quinasa RC de acuerdo con la invención en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas:

- (a) hibridar cualquier polinucleótido de la invención a un material de ácido nucleico de una muestra biológica, formando de ese modo un complejo de hibridación; y
- 50 (b) detectar dicho complejo de hibridación.

55 La invención también hace referencia al método descrito antes, donde antes de la hibridación, el material de ácido nucleico de la muestra biológica es amplificado.

60 La invención también hace referencia a un método para la detección de un polinucleótido de la invención o un polipéptido de Quinasa RC de la invención que comprende poner en contacto una muestra biológica con un reactivo que interacciona específicamente con el polinucleótido o el polipéptido, donde el reactivo es una ribozima, un oligonucleótido antisentido o un anticuerpo.

La invención también hace referencia a un kit de diagnóstico para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos antes.

65 Aunque la presencia de la expresión de un gen marcador sugiere que el polinucleótido de Quinasa RC también está presente, se puede necesitar la confirmación de su presencia y expresión. Por ejemplo, si una secuencia que codifica un polipéptido de la Quinasa RC es insertada en una secuencia de un gen marcador, las células transformadas que contienen las secuencias que codifican un polipéptido de la Quinasa RC pueden ser identificadas por la ausencia de función del gen marcador. Alternativamente, se puede colocar un gen marcador en tándem con una secuencia

codificante de un polipéptido de la Quinasa RC bajo el control de un único promotor. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección indica normalmente la expresión del polinucleótido de la Quinasa RC.

Alternativamente, las células anfitrionas que contienen un polinucleótido de la Quinasa RC y que expresan un polipéptido de la Quinasa de RC pueden ser identificadas por una variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no están limitados a, hibridaciones ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de bioanálisis de proteínas o inmunoanálisis que incluyen tecnologías basadas en membranas, soluciones, o chips para la detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos o proteínas.

La presencia de una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la Quinasa RC puede ser detectada mediante hibridación o amplificación de ADN-ADN o ADN-ARN utilizando sondas o fragmentos o fragmentos de polinucleótidos que codifican un polipéptido de la Quinasa de RC. Los análisis basados en la amplificación de ácido nucleico implican el uso de oligonucleótidos seleccionados entre las secuencias que codifican un polipéptido de la Quinasa RC para detectar los transformantes que contienen un polinucleótido de la Quinasa RC.

Se conocen en la técnica una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de un polipéptido de la Quinasa RC, utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el polipéptido. Los ejemplos incluyen análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se puede utilizar un inmunoanálisis basado en anticuerpos monoclonales, de dos sitios utilizando anticuerpos monoclonales reactivos para dos epítopos que no interfieren de un polipéptido de la Quinasa RC, o se puede emplear un análisis de unión competitiva. Estos y otros análisis son descritos por Hampton *et al.*, en *SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL*, APS Press, St. Paul, Minn., 1990) y Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, 1983).

Una amplia variedad de marcas y técnicas de conjugación son conocidas por los expertos en la técnica y pueden ser utilizadas en diferentes análisis de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir sondas de hibridación o PCR marcadas para detectar secuencias relacionadas con los polinucleótidos que codifican polipéptidos de Quinasa RC incluyen oligomarcaje, traslado de muescas, marcaje terminal, o amplificación por PCR utilizando un nucleótido marcado. Alternativamente, las secuencias que codifican un polipéptido de la Quinasa RC pueden ser clonadas en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Tales vectores son conocidos en la técnica, se encuentran disponibles en el mercado, y se pueden utilizar para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de nucleótidos marcados y una ARN polimerasa apropiada, tal como T7, T3, o SP6. Estos procedimientos se pueden llevar a cabo utilizando una variedad de kits disponibles en el mercado (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, y US Biochemical). Las moléculas informadoras o marcas adecuadas que se pueden utilizar para facilitar la detección incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas, y similares.

La invención hace referencia a un método para producir un polipéptido de la Quinasa RC de la invención, donde el método comprende las siguientes etapas: (a) cultivar la célula anfitriona de la invención en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido del cultivo de células anfitrionas.

Expresión y Purificación de los Polipéptidos

Las células anfitrionas transformadas con secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de la Quinasa RC pueden ser cultivadas en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína a partir del cultivo celular. El polipéptido producido por una célula transformada puede ser secretado o contenido intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o del vector utilizados. Como comprenderán los expertos en la técnica los vectores de expresión que contienen polinucleótidos que codifican polipéptidos de Quinasa RC pueden ser diseñados para que contengan secuencias señal que dirijan la secreción de los polipéptidos de Quinasa RC a través de una membrana celular procariótica o eucariótica.

Se pueden utilizar otras construcciones para acoplar una secuencia codificante de un polipéptido de la Quinasa RC a una secuencia de nucleótidos codificante de un dominio polipeptídico que facilite la purificación de las proteínas solubles. Semejantes dominios facilitadores de la purificación incluyen, pero no están limitados a, péptidos quelantes metálicos tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, proteína A, dominios que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). La inclusión de secuencias conectoras escindibles tales como aquellas específicas para el Factor Xa o la enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre los dominios de purificación y el polipéptido de la Quinasa RC puede ser utilizada para facilitar la purificación. Uno de tales vectores de expresión proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido de la Quinasa RC y 6 residuos histidina precediendo a una tiorredoxina o un sitio de escisión de enteroquinasa. Los residuos histidina facilitan la purificación sobre IMAC (cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados como describen Porath *et al.*, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281, 1992), si bien el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido de la Quinasa RC de la proteína de fusión. Los vectores que contienen proteínas de fusión son descritos por Kroll *et al.*, *DNA Cell Biol.* 12, 441-453, 1993).

Síntesis Química

Las secuencias que codifican un polipéptido de la Quinasa RC pueden ser sintetizadas, en su totalidad o en parte, utilizando métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, 1980; Horn *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232, 1980). Alternativamente, un polipéptido de la Quinasa RC por si mismo puede ser producido utilizando métodos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, los polipéptidos de Quinasa RC pueden ser producidos mediante síntesis peptídica directa utilizando técnicas en fase sólida (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Roberge *et al.*, *Science* 269, 202-204, 1995). La síntesis de proteínas se puede realizar utilizando técnicas manuales o automatizadas. La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, utilizando el Sintetizador Peptídico 431 A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Los diferentes fragmentos de los polipéptidos de la Quinasa RC pueden ser sintetizados por separado y combinados utilizando métodos químicos para producir una molécula completa.

El péptido recién sintetizado puede ser purificado sustancialmente mediante cromatografía líquida de alta resolución preparativa (p. ej., Creighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman y Co., Nueva York, N.Y., 1983). La composición de un polipéptido de la Quinasa RC sintético puede ser confirmada mediante análisis o secuenciación de aminoácidos (p. ej., el procedimiento de degradación de Edman; véase Creighton, más arriba). Adicionalmente, se puede alterar cualquier porción de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la Quinasa RC durante la síntesis directa y/o combinarlas utilizando métodos químicos con secuencias de otras proteínas para producir un polipéptido variante o una proteína de fusión.

Producción de Polipéptidos Alterados

Como comprenderán los expertos en la técnica, puede resultar ventajoso producir secuencias de nucleótidos codificantes de polipéptidos de Quinasa RC que posean codones no naturales. Por ejemplo, se pueden seleccionar los codones preferidos por un anfitrión procariótico o eucariótico concreto para incrementar la tasa de expresión de proteína o para producir un transcrito de ARN que tenga propiedades deseables, tales como una vida media que sea más larga que la de un transcrito generado a partir de una secuencia de origen natural.

Las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria pueden ser diseñadas utilizando métodos generalmente conocidos en la técnica para alterar las secuencias codificantes de polipéptidos de Quinasa RC por una variedad de razones, incluyendo la modificación de la clonación, el procesamiento, y/o la expresión del producto génico. Se pueden utilizar el barajado de ADN mediante fragmentación al azar y re-ensamblaje mediante PCR del los fragmentos génicos y los oligonucleótidos sintéticos para diseñar las secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, se puede utilizar la mutagénesis dirigida al sitio para insertar nuevos sitios de restricción, alterar los patrones de glicosilación, cambiar la preferencia codónica, producir variantes de empalme, introducir mutaciones, etcétera.

Anticuerpos

Se puede generar cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica para que se una específicamente a un epítipo de un polipéptido de la Quinasa RC. "Anticuerpo" según se utiliza en la presente memoria incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, así como sus fragmentos, tales como Fab, F(ab')₂, y Fv, que son capaces de unirse a un epítipo de un polipéptido de la Quinasa RC. Típicamente, se requieren al menos 6, 8, 10, o 12 aminoácidos contiguos para formar un epítipo. No obstante, los epítipos que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, p. ej., al menos 15, 25, o 50 aminoácidos.

Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de un polipéptido de la Quinasa RC puede ser utilizado terapéuticamente, así como en análisis inmunoquímicos, incluyendo pero no limitados a transferencias Western, ELISA, radioinmunoanálisis, análisis inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones, u otros análisis inmunoquímicos conocidos en la técnica. Se pueden utilizar diferentes inmunoanálisis para identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada. Son bien conocidos en la técnica numerosos protocolos para la unión competitiva o los análisis inmunoradiométricos. Tales inmunoanálisis implican típicamente la medición de la formación de complejos entre un inmunógeno y un anticuerpo que se une específicamente al inmunógeno.

Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la Quinasa RC proporciona una señal de detección al menos 5, 10, o 20 veces superior que una señal de detección proporcionada con otras proteínas cuando se utilizan en un análisis inmunoquímico. Preferiblemente, los anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de Quinasa RC no detectan otras proteínas en análisis inmunoquímicos y pueden inmunoprecipitar un polipéptido de la Quinasa RC a partir de una solución.

Se pueden utilizar polipéptidos de Quinasa RC para inmunizar un mamífero, tal como un ratón, rata, conejo, cobaya, mono, o ser humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, se puede conjugar un polipéptido de la Quinasa RC a una proteína portadora, tal como albúmina de suero bovino, tiroglobulina, y hemocianina de lapa ojo de cerradura. Dependiendo de las especies anfitrionas, se pueden utilizar diferentes coadyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Tales coadyuvantes incluyen, pero no están limitados a, coadyuvante de Freund, geles minerales (p. ej., hidróxido de aluminio), y sustancias tensioactivas (p. ej., lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa ojo de cerradura, y dinitrofenol). Entre los coadyuvantes utilizados en seres humanos, son especialmente útiles BCG (*bacilos Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un polipéptido de la Quinasa RC pueden ser preparados utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, pero no están limitadas a, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de células B humanas, y la técnica de hibridoma de EBV (Kohler *et al.*, *Nature* 256, 495-497, 1985; Kosbor *et al.*, *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Cole *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984).

Además, se pueden utilizar las técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos”, el empalme de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con una especificidad antigénica y una actividad biológica apropiadas (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature* 312, 604-608, 1984; Takeda *et al.*, *Nature* 314, 452-454, 1985). Los anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos también pueden ser “humanizados” para evitar que un paciente monte una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo cuando éste se utiliza terapéuticamente. Tales anticuerpos pueden tener secuencias suficientemente similares a los anticuerpos humanos para ser utilizados directamente en la terapia o pueden requerir alteración de unos pocos residuos clave. Las diferencias en la secuencia entre los anticuerpos de roedor y las secuencias humanas pueden ser minimizadas reemplazando los residuos que difieren de los de las secuencias humanas mediante mutagénesis dirigida al sitio de residuos individuales o mediante enjaretado de las regiones determinantes de la complementariedad completas. Alternativamente, se pueden producir anticuerpos humanizados utilizando métodos recombinantes, como se describe en el documento GB2188638B. Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de la Quinasa RC pueden contener sitios de unión al antígeno que están parcialmente o totalmente humanizados, como se describe en el documento U.S. 5.565.332.

Alternativamente, los mecanismos descritos para la producción de anticuerpos de cadena sencilla se pueden adaptar utilizando métodos conocidos en la técnica para producir anticuerpos de cadena sencilla que se unen específicamente a polipéptidos de Quinasa RC. Los anticuerpos con una especificidad relacionada, pero de distinta composición idio-típica, pueden ser generados mediante barajado de cadenas de genotecas de inmunoglobulinas combinatorias al azar (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991).

También se pueden construir anticuerpos de cadena sencilla utilizando un método de amplificación de ADN, tal como PCR, utilizando el ADNc del hibridoma como molde (Thirion *et al.*, 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11). Los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser mono- o bi-específicos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. La construcción de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos, tetravalentes es ilustrada, por ejemplo, por Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63. La construcción de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos, bivalentes es ilustrada por Mallender y Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.

Se puede construir una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de cadena sencilla utilizando la síntesis de nucleótidos manual o automatizada, clonar en un constructo de expresión utilizando métodos de ADN recombinante convencionales, e introducir en una célula para expresar la secuencia codificante, como se describe más abajo. Alternativamente, se pueden producir anticuerpos de cadena sencilla directamente utilizando, por ejemplo, la tecnología de los fagos filamentosos. Verhaar *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls *et al.*, 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91.

Los anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de Quinasa RC también pueden ser producidos induciendo la producción *in vivo* en la población de linfocitos o escrutando genotecas de inmunoglobulinas o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describe en la literatura (Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833-3837, 1989; Winter *et al.*, *Nature* 349, 293-299, 1991).

Se pueden construir otros tipos de anticuerpos y utilizarlos terapéuticamente en los métodos de la invención. Por ejemplo, se pueden construir anticuerpos quiméricos como se describe en el documento WO 93/03151. Asimismo se pueden preparar proteínas de unión que derivan de inmunoglobulinas y que son multivalentes y multiespecíficas, tales como los “fragmentos bivalentes” descritos en el documento WO 94/13804.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden purificar mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser purificados por afinidad mediante su pase a lo largo de una columna a la cual está unido un polipéptido de la Quinasa RC. Los anticuerpos unidos se pueden hacer eluir después de la columna utilizando un tampón con una concentración de sal elevada.

Oligonucleótidos Antisentido

Los oligonucleótidos antisentido son secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de ADN o ARN específica. Una vez introducidos en una célula, los nucleótidos complementarios se combinan con las secuencias naturales producidas por la célula para formar complejos y bloquear la transcripción o la traducción. Preferiblemente, un oligonucleótido antisentido tiene al menos 11 nucleótidos de longitud, pero puede tener al menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 o más nucleótidos de longitud. También se pueden utilizar secuencias más largas. Se pueden proporcionar moléculas de oligonucleótidos antisentido en un constructo de ADN e introducirlas en una célula como se ha descrito antes para disminuir el nivel de productos génicos de Quinasa RC en la célula.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o una combinación de ambos. Los oligonucleótidos pueden ser sintetizados manualmente o mediante un sintetizador automatizado, conectando covalentemente el extremo 5' de un nucleótido con el extremo 3' de otro nucleótido con enlaces internucleótido no fosfodiéster tales como alquilfosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, alquilfosfonotioatos, alquilfosfonatos, fosforamidatos, ésteres fosfato, carbamatos, acetamidato, ésteres carboximéticos, carbonatos, y triésteres fosfato. Véanse, Brown, *Meth. Mol. Biol.* 20, 1-8, 1994; Sonveaux, *Meth. Mol. Biol.* 26, 1-72; 1994; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-583, 1990.

Se pueden obtener modificaciones de la expresión del gen de la Quinasa RC diseñando oligonucleótidos antisentido que formen complejos para el control, 5', o regiones reguladoras del gen de la Quinasa RC. Se prefieren los oligonucleótidos derivados del sitio de inicio de la transcripción, p. ej., entre las posiciones -10 y +10 desde el sitio de inicio. De un modo similar, se puede lograr la inhibición utilizando la metodología del emparejamiento de bases en una "triple hélice". El emparejamiento en una triple hélice es útil debido a que causa la inhibición de la capacidad de la doble hélice para abrirse suficientemente para la unión de las polimerasas, los factores de transcripción, o las chaperonas. Los avances terapéuticos utilizando ADN tríplex han sido descritos en la literatura (p. ej., *Gee et al.*, en Huber y Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994). También se puede diseñar un oligonucleótido antisentido para bloquear la traducción del ARNm evitando que el transcrito se una a los ribosomas.

No se requiere una complementariedad precisa para la formación satisfactoria de dúplex entre un oligonucleótido antisentido y la secuencia complementaria de un polinucleótido de Quinasa RC. Los oligonucleótidos antisentido que comprenden, por ejemplo, 2, 3, 4, o 5 o más tramos de nucleótidos contiguos que son complementarios exactamente a un polinucleótido de Quinasa RC, separados cada uno por un tramo de nucleótidos contiguos que no son complementarios a nucleótidos de Quinasa RC adyacente, pueden proporcionar una especificidad de búsqueda para el ARNm de la Quinasa RC. Preferiblemente, cada tramo de nucleótidos contiguos complementarios tiene al menos 4, 5, 6, 7, u 8 o más nucleótidos de longitud. Las secuencias intermedias no complementarias tienen preferiblemente 1, 2, 3, o 4 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica puede utilizar fácilmente el punto de fusión calculado de un par antisentido-efector para determinar el grado de emparejamiento erróneo que será tolerado entre un oligonucleótido antisentido concreto y una secuencia de polinucleótido de la Quinasa RC concreta.

Se pueden modificar los oligonucleótidos antisentido sin afectar a su capacidad para hibridarse con un polinucleótido de la Quinasa RC. Estas modificaciones pueden ser internas o en uno o ambos extremos de la molécula antisentido. Por ejemplo, se pueden modificar las conexiones fosfato internucleósido añadiendo radicales colesterilo o diamina con un número variable de residuos carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal. Las bases y/o azúcares modificados, tales como arabinosa en lugar de ribosa, o un oligonucleótido 3',5'-sustituido en el que el grupo hidroxilo 3' o el grupo fosfato 5' están sustituidos, también pueden ser empleados en un oligonucleótido antisentido modificado. Estos oligonucleótidos modificados se pueden preparar mediante métodos bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Agrawal *et al.*, *Trends Biotechnol.* 10, 152-158, 1992; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-584, 1990; Uhlmann *et al.*, *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539-3542, 1987.

Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN con actividad catalítica. Véase, p. ej., Cech, *Science* 236, 1532-1539; 1987; Cech, *Ann. Rev. Biochem.* 59, 543-568; 1990, Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 605-609; 1992, Couture y Stinchcomb, *Trends Genet.* 12, 510-515, 1996. Las ribozimas se pueden utilizar para inhibir la función génica escindiendo una secuencia de ARN, como es sabido en la técnica (p. ej., Haseloff *et al.*, Patente de los Estados Unidos 5.641.673). El mecanismo de acción de las ribozimas implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima al ARN diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Los ejemplos incluyen las moléculas de ribozima con un motivo en cabeza de martillo diseñadas que pueden catalizar específicamente y eficazmente la escisión endonucleolítica de secuencias de nucleótidos específicas.

La secuencia codificante de un polinucleótido de Quinasa RC se puede utilizar para generar ribozimas que se unan específicamente al ARNm transcrito a partir del polinucleótido de Quinasa RC. Se han desarrollado métodos de diseño y construcción de ribozimas que pueden escindir otras moléculas de ARN en trans de una manera muy específica de la secuencia y son conocidos en la técnica (véase Haseloff *et al.*, *Nature* 334, 585-591, 1988). Por ejemplo, la actividad de escisión de las ribozimas se puede dirigir a ARN específicos diseñando una región de "hibridación" discreta en la ribozima. La región de hibridación contiene una secuencia complementaria al ARN diana y de este modo hibrida específicamente con la diana (véase, por ejemplo, Gerlach *et al.*, EP 321.201).

Los sitios de escisión de ribozimas específicos dentro de una diana de ARN de la Quinasa RC se identifican inicialmente mediante barrido de la molécula de ARN en busca de sitios de escisión de ribozima que incluyen las siguientes secuencias: GUA, GUU, y GUC. Una vez identificadas, las secuencias cortas de ARN de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del ARN diana de la Quinasa RC que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar en busca de rasgos estructurales secundarios que pueden inutilizar la diana. La idoneidad de las dianas candidato también puede ser evaluada sometiendo a ensayo la accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios utilizando análisis de protección de ribonucleasa. Se pueden utilizar secuencias complementarias más largas para incrementar la afinidad de la secuencia de hibridación por la diana. Las regiones de hibridación y escisión de la ribozima pueden estar relacionadas integralmente; de este modo, tras la hibridación al ARN diana

de la Quinasa RC a través de las regiones complementarias, la región catalítica de la ribozima puede escindir la diana.

Se pueden introducir las ribozimas en células como parte de un constructo de ADN. Se pueden utilizar métodos mecánicos, tales como microinyección, transfección mediada por liposomas, electroporación, o precipitación con fosfato de calcio, para introducir un constructo de ADN que contiene ribozima en células en las que se desea disminuir la expresión de la Quinasa RC. Alternativamente, si se desea que las células conserven establemente el constructo de ADN, este puede ser suministrado en un plásmido y mantenido como un elemento separado o integrado en el genoma de las células, como es sabido en la técnica. El constructo de ADN puede incluir elementos reguladores de la transcripción, tales como un elemento promotor, un intensificador o un elemento UAS, y una señal terminadora de la transcripción, para controlar la transcripción de ribozimas en las células.

Como ilustran Haseloff *et al.*, Patente de los Estados Unidos 5.641.673, se pueden diseñar ribozimas de manera que se produzca la expresión de la ribozima en respuesta a factores que inducen la expresión de un gen diana. También se pueden diseñar ribozimas para proporcionar un nivel adicional de regulación, de manera que se produzca la destrucción del ARNm de la Quinasa RC solamente cuando tanto una ribozima como un gen diana son inducidos en las células.

Métodos de Escrutinio

La invención proporciona métodos para identificar moduladores, esto es, compuestos candidato o de ensayo que se unen a los polipéptidos o polinucleótidos de la Quinasa RC y/o tienen un efecto estimulador o inhibidor, por ejemplo, sobre la expresión o la actividad del polipéptido o polinucleótido de la Quinasa RC, con el fin de regular la señalización a través de un sistema de fosfoliberación de la quinasa MAP, regular la producción de mediadores inflamatorios, y regular la degradación de la matriz extracelular. El descenso de señalización a través del sistema de fosfoliberación de la quinasa MAP y el descenso de producción de mediadores inflamatorios son útiles para prevenir la inflamación no deseada, la proliferación celular, la diferenciación celular, la producción de citoquinas, o la apoptosis. El aumento de señalización por medio del sistema de fosfoliberación de quinasa MAP y el aumento de producción de mediadores inflamatorios son útiles para intensificar la reparación de los tejidos dañados, intensificar la resistencia a agentes irritantes o toxinas, o incrementar la resistencia a la infección. La disminución de la degradación extracelular es útil para prevenir la lesión o los cambios irreversibles en las microestructuras del pulmón y evitar o suprimir la metastasización de células malignas. Se puede desear un aumento de la degradación de la matriz extracelular, por ejemplo, en los trastornos evolutivos caracterizados por niveles inapropiadamente bajos de degradación de la matriz extracelular o en la regeneración.

La invención proporciona análisis para escrutar compuestos de ensayo que se unen a o modulan la actividad de un polipéptido de la Quinasa RC o un polinucleótido de la Quinasa RC. Un compuesto de ensayo se une preferiblemente a un polipéptido o polinucleótido de la Quinasa RC. Más preferiblemente, un compuesto de ensayo disminuye la actividad Quinasa RC de un polipéptido de la Quinasa RC o la expresión de un polinucleótido de la Quinasa RC en al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, o 100% con respecto a la ausencia de compuesto de ensayo.

La invención comprende un método de escrutinio para agentes que disminuyen la actividad de un polipéptido de la Quinasa RC de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido codificado por cualquier polinucleótido de la invención; y (b) detectar la unión del compuesto de ensayo al polipéptido, donde el compuesto de ensayo que se une al polipéptido se identifica como agente terapéutico potencial para disminuir la actividad de dicho polipéptido.

Adicionalmente, la invención abarca un método de escrutinio de agentes que regulan la actividad de un polipéptido de la Quinasa RC, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido de la Quinasa RC codificado por cualquier polinucleótido de la invención; y (b) detectar la actividad de fosforilación del polipéptido de la Quinasa RC, donde el compuesto de ensayo que incrementa la actividad del polipéptido es identificado como un agente terapéutico potencial para incrementar la actividad del polipéptido de la Quinasa RC, y donde el compuesto de ensayo que disminuye la actividad del polipéptido es identificado como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad del polipéptido de la Quinasa RC.

La invención también hace referencia a un método de escrutinio de agentes que regulan la actividad de una Quinasa RC, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido de la Quinasa RC codificado por cualquier polinucleótido de la invención como se ha descrito antes y MKK4; y (b) detectar la fosforilación por el polipéptido de la Quinasa RC de MKK4, donde un compuesto de ensayo que incrementa la fosforilación por el polipéptido de la Quinasa RC de MKK4 es identificado como agente terapéutico potencial para incrementar la actividad del polipéptido de la Quinasa RC, y donde el compuesto de ensayo que disminuye la fosforilación por el polipéptido de la Quinasa RC de MKK4 se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad del polipéptido de la Quinasa RC. Asimismo, la invención abarca un método de escrutinio de agentes que disminuyen la actividad del polipéptido de la Quinasa RC, que comprende poner en contacto un compuesto de ensayo con cualquier polinucleótido de la invención y detectar la unión del compuesto de ensayo al polinucleótido, donde el compuesto de ensayo que se une al polinucleótido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad del polipéptido de la Quinasa RC.

Compuestos de Ensayo

Los compuestos de ensayo pueden ser agentes farmacológicos ya conocidos en la técnica o pueden ser compuestos que no se sabía previamente que tenían actividad farmacológica alguna. Los compuestos pueden ser de origen natural o diseñados en el laboratorio. Pueden ser aislados de microorganismos, animales, o plantas y pueden ser producidos recombinantemente, o sintetizados mediante métodos químicos conocidos en la técnica. Si se desea, se pueden obtener compuestos de ensayo utilizando cualquiera de los numerosos métodos de genotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados a, genotecas biológicas, genotecas en fase sólida o en fase de disolución paralelas espacialmente dirigibles, métodos de genotecas sintéticas que requieren desconvolución, el método de la genoteca “una cuenta-un compuesto”, y los métodos sintéticos que utilizan la selección mediante cromatografía de afinidad. El enfoque de la genoteca biológica está limitado a genotecas de polipéptidos, mientras los otros cuatro enfoques son aplicables a genotecas de compuestos polipeptídicos, oligómeros no peptídicos, o moléculas pequeñas. Véase Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

Los métodos para la síntesis de genotecas moleculares son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann *et al.* *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho *et al.*, *Science* 261, 1303, 1993; Carrell *et al.*, *Agew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994). Las genotecas de compuestos se pueden presentar en disolución (véase, p. ej., Houghten, *BioTechniques* 13, 412-421, 1992), o sobre cuentas (Lam, *Nature* 354, 82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364, 555-556, 1993), bacterias o esporas (Ladner, Patente de los Estados Unidos 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1865-1869, 1992), o fagos (Scott y Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin, *Science* 249, 404-406, 1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6387-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; y Ladner, Patente de los Estados Unidos 5.223.409).

Escrutinio de Alto Rendimiento

Se pueden escrutar compuestos de ensayo en busca de su capacidad para unirse a polipéptidos o polinucleótidos de Quinasa RC o para afectar a la actividad de la Quinasa RC o a la expresión del gen de la Quinasa RC utilizando un escrutinio de elevado rendimiento. Utilizando un escrutinio de elevado rendimiento, se pueden someter a ensayo muchos compuestos discretos en paralelo de manera que se puede escrutar rápidamente un gran número de compuestos de ensayo. Las técnicas más ampliamente establecidas utilizan placas de microtitulación de 96 pocillos. Los pocillos de las placas de microtitulación requieren típicamente volúmenes de análisis que oscilan entre 50 y 500 μ l. Además de las placas, se encuentran disponibles en el mercado muchos aparatos, materiales, pipeteadores, robots, lavadores de placas, y lectores de placa que se ajustan al formato de 96 pocillos.

Alternativamente, se pueden utilizar “análisis sin formato”, o análisis que no tienen barrera física entre las muestras. Por ejemplo, un análisis que utiliza células pigmentadas (melanocitos) en un análisis homogéneo simple para genotecas de péptidos combinatorios es descrito por Jayawickrene *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19, 1614-18 (1994). Las células se colocan en agarosa en placas de petri, después se colocan las cuentas que llevan los compuestos combinatorios sobre la superficie de agarosa. Los compuestos combinatorios se liberan parcialmente de los compuestos de las cuentas. Los compuestos activos pueden ser visualizados como zonas pigmentadas oscuras porque, como los compuestos difunden localmente en la matriz de gel, los compuestos activos hacen que las células cambien de color.

Otro ejemplo de análisis sin formato es descrito por Chelsky. “Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches”, referido en el First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (7-10 Nov., 1995). Chelsky colocó un análisis de enzima homogénea simple para anhidrasa carbónica en el interior del gel de agarosa de manera que la enzima del gel pudiera causar un cambio de color en todo el gel. Después de eso, se colocaron las cuentas que portaban los compuestos combinatorios a través de un fotoconector en el interior del gel y los compuestos fueron parcialmente liberados por luz UV. Los compuestos que inhibían la enzima se observaron como zonas locales de inhibición que tenían menos cambio de color.

Otro ejemplo más es descrito por Salmon *et al.*, *Molecular Diversity* 2, 57-63 (1996). En este ejemplo, se escrutaron genotecas combinatorias en busca de compuestos que tenían efectos citotóxicos sobre células cancerosas en crecimiento en agar.

Otro método de escrutinio de elevado rendimiento es descrito por Beutel *et al.*, Patente de los Estados Unidos 5.976.813. En este método, se colocan las muestras de ensayo sobre una matriz porosa. Uno o más componentes del análisis se colocan después dentro, sobre la superficie, o en la base de una matriz tal como un gel, una lámina de plástico, un filtro, u otra forma de soporte sólido fácilmente manipulado. Cuando las muestras se introducen en la matriz porosa difunden suficientemente lentamente, de manera que se pueden realizar los análisis sin que las muestras de ensayo circulen a la vez.

Análisis de Unión

Para los análisis de unión, el compuesto de ensayo es preferiblemente una molécula pequeña que se une a y ocupa el sitio activo o un dominio de fibronectina del polipéptido de la Quinasa RC, haciendo de ese modo inaccesible el sitio activo o el dominio de fibronectina al sustrato de manera que se evita la actividad biológica normal. Los ejemplos

de tales moléculas pequeñas incluyen, pero no están limitados a, péptidos pequeños o moléculas de tipo péptido. En los análisis de unión, el compuesto de ensayo o el polipéptido de la Quinasa RC pueden comprender una marca detectable, tal como una marca fluorescente, radioisotópica, quimioluminiscente, o enzimática, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa. La detección de un compuesto de ensayo que está unido al polipéptido de la Quinasa RC se puede completar después, por ejemplo, mediante recuento directo de radioemisión, mediante recuento del centelleo, o determinando la conversión de un sustrato apropiado en un producto detectable.

Alternativamente, la unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido de la Quinasa RC se puede determinar sin marcar ninguno de los interaccionantes. Por ejemplo, se puede utilizar un microfisiómetro para detectar la unión de un compuesto de ensayo con un polipéptido diana. Un microfisiómetro (p. ej., Cytosensor[®]) es un instrumento analítico que mide la tasa a la cual una célula acidula su entorno utilizando un sensor potenciométrico dirigible por luz (LAPS). Los cambios en la tasa de acidulación se pueden utilizar como indicador de la interacción entre un compuesto de ensayo y un polipéptido de la Quinasa RC. (McConnell *et al.*, *Science* 257, 1906-1912, 1992).

La determinación de la capacidad de un compuesto de ensayo para unirse a un polipéptido de la Quinasa RC también se puede completar utilizando una tecnología tal como el Análisis de Interacción Biomolecular en tiempo real (BIA). Sjolander & Urbaiczky, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345, 1991), y Szabo *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705, 1995. El BIA es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interaccionantes (p. ej., BIAcore[®]). Se pueden utilizar los cambios en los fenómenos ópticos, resonancia de plasmón superficial (RPS), como indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

En otro aspecto más de la invención, se puede utilizar un polipéptido de la Quinasa RC como “proteína cebo” en un análisis de dos híbridos o en un análisis de tres híbridos (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos 5.283.317; Zervos *et al.*, *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054, 1993; Bartel *et al.*, *BioTechniques* 14, 920-924, 1993; Iwabuchi *et al.*, *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; y Brent documento WO94/10300, para identificar otras proteínas que se unen o interaccionan con el polipéptido de la Quinasa RC y modulan su actividad.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consiste en dominios de unión al ADN y de activación separables. En resumen, el análisis utiliza dos constructos de ADN diferentes. Por ejemplo, en un constructo un polipéptido que codifica un polipéptido de la Quinasa RC se fusiona a un polinucleótido que codifica el dominio de unión a ADN de un factor de transcripción conocido (p. ej., GAL-4). En el otro constructo, una secuencia de ADN que codifica una proteína no identificada (“presa” o “muestra”) se fusiona a un polinucleótido que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas “cebo” y “presa” son capaces de interaccionar *in vivo* para formar un complejo dependiente de proteína, los dominios de unión al ADN y de activación del factor de transcripción se ponen en íntima proximidad. Esta proximidad permite la transcripción de un gen informador (p. ej., LacZ), que está conectado operablemente a un sitio regulador de la transcripción sensible al factor transcripcional. La expresión del gen informador se puede detectar, y las colonias celulares que contienen el factor de transcripción funcional pueden ser aisladas y utilizadas para obtener la secuencia de ADN que codifica la proteína que interacciona con el polipéptido de la Quinasa RC.

Puede ser deseable inmovilizar el polipéptido (o polinucleótido) de la Quinasa RC o el compuesto de ensayo para facilitar la separación de las formas unidas de las no unidas de uno o ambos interaccionantes, así como acomodar la automatización del análisis. De este modo, el polipéptido (o polinucleótido) de la Quinasa RC o el compuesto de ensayo se pueden unir a un soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados incluyen, pero no están limitados a, portas de vidrio o plástico, placas para el cultivo de tejidos, pocillos de microtitulación, tubos, chips de silicio, o partículas tales como cuentas (incluyendo, pero no limitados a, cuentas de látex, poliestireno, o vidrio). Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para anclar el polipéptido (o polinucleótido) de la Quinasa RC o compuesto de ensayo a un soporte sólido, incluyendo el uso de conexiones covalentes y no covalentes, absorción pasiva, o pares de radicales de unión anclados respectivamente al polipéptido o compuesto de ensayo y al soporte sólido. Los compuestos de ensayo se unen preferiblemente al soporte sólido en una matriz, de manera que la localización de los compuestos de ensayo individuales se pueda rastrear. La unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido (o polinucleótido) de Quinasa RC se puede completar en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo, y tubos de microcentrífuga.

En una realización, un polipéptido de la Quinasa RC es una proteína de fusión que comprende un dominio que permite que el polipéptido de la Quinasa RC se una a un soporte sólido. Por ejemplo, las proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa pueden ser adsorbidas sobre cuentas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que después se combinan con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y el polipéptido de la Quinasa RC no adsorbido; después se incuba la mezcla en condiciones que conducen a la formación de un complejo (p. ej., condiciones fisiológicas para la sal y el pH). Después de la incubación, las cuentas o placas de microtitulación se lavan para separar cualquier componente no unido. La unión de los interaccionantes se puede determinar directamente o indirectamente, como se ha descrito antes. Alternativamente, los complejos se pueden disociar del soporte sólido antes de determinar la unión.

También se pueden utilizar otras técnicas para inmovilizar polipéptidos o polinucleótidos sobre un soporte sólido en los análisis de escrutinio de la invención. Por ejemplo, se puede inmovilizar o bien un polipéptido (o polinucleótido) de la Quinasa RC o bien un compuesto de ensayo utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Se pueden preparar polipéptidos de Quinasa RC o compuestos de ensayo biotinilados a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida)

ES 2 347 247 T3

utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica (p. ej., kit de biotilación, Pierce Chemicals, Rockford, III) e inmovilizarlos en los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido o polinucleótido de la Quinasa RC, o un compuesto de ensayo, pero que no interfieren con el sitio de unión deseado, tal como el sitio activo o un dominio de fibronectina del polipéptido de la Quinasa RC, pueden ser derivatizados a los pocillos de la placa. La diana o proteína no unidas se pueden atrapar en los pocillos mediante conjugación con anticuerpos.

Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos antes para los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido (o polinucleótidos) de la Quinasa RC o al compuesto de ensayo, análisis unidos a enzimas que cuentan con la detección de la actividad del polipéptido de la Quinasa RC, y electroforesis en gel SDS en condiciones no reductoras.

El escrutinio de los compuestos de ensayo que se unen a un polipéptido o polinucleótido de la Quinasa RC también se puede llevar a cabo en una célula intacta. Cualquier célula que comprende un polinucleótido o polipéptido de la Quinasa RC puede ser utilizada en un sistema de análisis basado en células. Un polinucleótido de la Quinasa RC puede tener un origen natural en la célula o puede ser introducido utilizando técnicas tales como las descritas antes. Se puede utilizar o bien un cultivo primario o bien una línea celular establecida, incluyendo líneas celulares neoplásicas tales como líneas celulares de cáncer de colon HCT116, DLD1, HT29, Caco2, SW837, SW480, y RKO, líneas celulares de cáncer de mama 21-PT, 21-MT, MDA-468, SK-BR3, y BT-474, la línea celular de cáncer de pulmón A549, y la línea celular de glioblastoma H392. Una célula intacta se pone en contacto con un compuesto de ensayo. Se determina la unión del compuesto de ensayo a un polipéptido o polinucleótido de la Quinasa RC como se ha descrito antes, después de lisar la célula para liberar el complejo del polipéptido de la Quinasa RC-compuesto de ensayo.

Análisis con Enzima

Se pueden someter a ensayo compuestos de ensayo en busca de su capacidad para incrementar o disminuir la actividad Quinasa RC de un polipéptido de la Quinasa RC. Se puede medir la actividad Quinasa RC, por ejemplo, utilizando los métodos referenciados en el Ejemplo 1. Se puede medir la actividad Quinasa RC después de poner en contacto o bien un polipéptido de la Quinasa RC purificado, un extracto celular, o una célula intacta con un compuesto de ensayo. Un compuesto de ensayo que disminuye la actividad Quinasa RC en al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, o 100% se identifica como un agente potencial para disminuir la señalización a través de un sistema de fosfoliberación de quinasa MAP, la producción de mediadores inflamatorios, o la degradación de la matriz extracelular. Un compuesto de ensayo que incrementa la actividad Quinasa RC en al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, o 100% se identifica como un agente potencial para incrementar la señalización a través de un sistema de fosfoliberación de quinasa MAP, la producción de mediadores inflamatorios, o la degradación de la matriz extracelular.

Expresión Génica

En otra realización, se identifican los compuestos de ensayo que incrementan o disminuyen la expresión del gen de la Quinasa RC. Se pone en contacto un polinucleótido de Quinasa RC con un compuesto de ensayo, y se determina la expresión de un ARN o un polipéptido producto del polinucleótido de la Quinasa RC. Se compara el nivel de expresión del ARNm o el polipéptido de la Quinasa RC en presencia del compuesto de ensayo con el nivel de expresión del ARNm o el polipéptido de la Quinasa RC en ausencia del compuesto de ensayo. Después se puede identificar el compuesto de ensayo como un modulador de la expresión basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión del ARNm o el polipéptido de la Quinasa RC es mayor en presencia del compuesto de ensayo que en su ausencia, se identifica el compuesto de ensayo como un estimulador o potenciador de la expresión del ARNm o el polipéptido de la Quinasa RC. Alternativamente, cuando la expresión del ARNm o la proteína es menor en presencia del compuesto de ensayo que en su ausencia, se identifica el compuesto de ensayo como inhibidor de la expresión del ARNm o el polipéptido de la Quinasa RC.

El nivel de expresión de ARNm o el polipéptido de la Quinasa RC en las células puede ser determinado mediante métodos bien conocidos en la técnica para detectar ARNm o proteína. Se pueden utilizar métodos cualitativos o cuantitativos. La presencia de productos polipeptídicos de un polinucleótido de la Quinasa RC se puede determinar, por ejemplo, utilizando una variedad de mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo métodos inmunoquímicos tales como el radioinmunoanálisis, la transferencia Western, y la inmunohistoquímica. Alternativamente, se puede determinar la síntesis de polipéptidos *in vivo*, en un cultivo celular, o en un sistema de traducción *in vitro* detectando la incorporación de aminoácidos marcados a un polipéptido de la Quinasa RC.

Semejante escrutinio se puede llevar a cabo o bien en un sistema de análisis sin células o bien en una célula intacta. Se puede utilizar cualquier célula que exprese un polinucleótido de Quinasa RC en un sistema de análisis basado en células. El polinucleótido de Quinasa RC puede ser de origen natural en la célula o puede ser introducido utilizando técnicas tales como las descritas antes. Se puede utilizar un cultivo primario o una línea celular establecida, incluyendo, líneas celulares neoplásicas tales como las líneas celulares de cáncer de colon establecidas HCT116, DLD1, HT29, Caco2, SW837, SW480, y RKO, líneas celulares de cáncer de mama 21-PT, 21-MT, MDA-468, SK-BR-3, y BT-474, la línea celular de cáncer de pulmón A549, y la línea celular de glioblastoma H392.

Composiciones Farmacéuticas

Los polipéptidos de Quinasa RC de la presente invención son adecuados para su uso en composiciones farmacéuticas que se pueden administrar a un paciente para lograr un efecto terapéutico. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender un polipéptido de la Quinasa RC, un polinucleótido de la Quinasa RC, anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de la Quinasa RC, o miméticos, agonistas, antagonistas, o inhibidores de un polipéptido de la Quinasa RC. Las composiciones se pueden administrar solas o combinadas con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizador, que se puede administrar en cualquier portador farmacéutico biocompatible, estéril, incluyendo, pero no limitado a, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, y agua. Las composiciones se pueden administrar a un paciente solas, o combinadas con otros agentes, fármacos u hormonas.

Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y coadyuvantes que facilitan el tratamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden administrar mediante cualquiera de las numerosas rutas incluyendo, pero no limitadas a, métodos orales, intravenosos, intramusculares, intra-arteriales, intramedulares, intratecales, intraventriculares, transdérmicos, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, parenterales, tópicos, sublinguales, orales, o rectales. Las composiciones farmacéuticas para la administración oral se pueden formular utilizando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para la administración oral. Tales portadores permiten formular las composiciones farmacéuticas en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas semilíquidas, suspensiones, y similares, para la ingestión por el paciente.

Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener por medio de la combinación de compuestos activos con excipientes sólidos, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y sometiendo a tratamiento una mezcla de gránulos, después de añadir coadyuvantes adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son cargas de carbohidratos o proteínas, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, u otras plantas; celulosa, tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o sal de sodio de carboximetilcelulosa; gomas incluyendo arábica, y tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, ácido algínico, o una de sus sales, tales como alginato de sodio.

Se pueden utilizar núcleos de grageas junto con recubrimientos adecuados, tales como soluciones de azúcares concentradas, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y disolventes orgánicos adecuados o mezclas disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, esto es, la dosificación.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar oralmente incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas, hechas de gelatina y un recubrimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener ingredientes activos mezclados con una carga o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquidos, o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tal como solución de Hank, solución de Ringer, o solución salina tamponada fisiológicamente. Las suspensiones para inyectables acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como sal de sodio de carboximetilcelulosa, sorbitol, o dextrano. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones para inyectables oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. También se pueden utilizar polímeros amínicos policatiónicos no lipídicos para su liberación. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas. Para la administración tópica o nasal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera concreta que se vaya a penetrar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden fabricar de una manera que sea conocida en la técnica, p. ej., por medio de procedimientos de mezclado, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento, o liofilización convencionales. La composición farmacéutica puede ser proporcionada en forma de sal y se puede formar con muchos ácidos, incluyendo pero no limitados a, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos de lo que lo son las correspondientes formas de base libre. En otros casos, las preparaciones preferidas pueden ser un polvo liofilizado que contiene cualquiera o todos los siguientes: histidina 1-50 mM, sacarosa al 0,1%-2%, y manitol al 2-7%, a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, que se combina con un tampón antes de su uso.

Los detalles adicionales para la formulación y la administración se pueden encontrar en la última edición de REMINGTON PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Después de haber preparado las composiciones farmacéuticas, éstas se puede colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de la afección indicada. Semejante etiquetado debería incluir la cantidad, frecuencia, y método de administración.

5

Análisis Predictivos, Diagnósticos y Prognósticos

La presente invención proporciona métodos para determinar si un sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar EPOC y otros trastornos detectando los biomarcadores descritos, esto es, el marcador polinucleotídico descrito que comprende la secuencia de polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 y/o los marcadores polipeptídicos codificados de ese modo o los marcadores polipeptídicos que comprenden las secuencias de polipéptidos del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12.

En las aplicaciones clínicas, se pueden escrutar muestras biológicas en busca de la presencia y/o ausencia de los biomarcadores identificados en la presente memoria. Tales muestras son por ejemplo núcleos de biopsias con aguja, muestras de resecciones quirúrgicas, o fluidos corporales como suero, productos aspirados de pezón con aguja fina y orina. Por ejemplo, estos métodos incluyen la obtención de una biopsia, que opcionalmente es fraccionada mediante seccionamiento criostático para enriquecer las células enfermas hasta aproximadamente 80% de la población de células totales. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos extraídos de estas muestras se pueden amplificar utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Los niveles de expresión de los marcadores seleccionados detectados se compararían con grupos estadísticamente válidos de muestras enfermas y sanas.

En una realización el método de diagnóstico *in vitro* comprende determinar si un sujeto tiene un nivel de ARNm y/o proteína anómalo de los marcadores descritos, por ejemplo mediante análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR), hibridación *in situ*, inmunoprecipitación, hibridación por transferencia Western, o inmunohistoquímica. De acuerdo con el método, se obtienen células de un sujeto y se determinan los niveles de los biomarcadores descritos, el nivel de proteína o ARNm, y se comparan con el nivel de estos marcadores en un sujeto sano. Es probable que un nivel normal del polipéptido biomarcador o de los niveles de ARNm sea indicativo de enfermedades tales como EPOC.

30

En otra realización el método *in vitro* comprende determinar si un sujeto tiene un contenido de ADN anómalo de dichos genes o dichos loci genómicos, por ejemplo mediante análisis de transferencia Southern, análisis de transferencia puntual, Hibridación *In Situ* con Fluorescencia o Colorimetría, Hibridación Genómica comparativa o PCR cuantitativa. En general estos análisis comprenden el uso de sondas de regiones genómicas representativas. Las sondas contienen al menos porciones de dichas regiones genómicas o secuencias complementarias o análogas a dichas regiones. En particular regiones intra- o inter-génicas de dichos genes o regiones genómicas. Las sondas pueden consistir en secuencias de nucleótidos o secuencias de funciones análogas (p. ej., PNA, Morfolino-oligómeros) que sean capaces de unirse a regiones diana mediante hibridación. En general las regiones genómicas que están alteradas en dichas muestras de pacientes se comparan con muestras de control no afectadas (tejido normal del mismo o diferente paciente, que rodean tejido no afectado, sangre periférica) o con regiones genómicas de la misma muestra que no tienen dichas alteraciones y por lo tanto pueden servir como controles internos. En una realización preferida se utilizan regiones localizadas sobre el mismo cromosoma. Alternativamente, se utilizan regiones cromosómicas y/o regiones con una cantidad variable definida en la muestra. En una realización favorable se compara el contenido, la estructura, la composición o las modificaciones del ADN que se encuentra en distintas regiones genómicas. Especialmente favorables son los métodos que detectan el contenido de ADN de dichas muestras, donde la cantidad de regiones diana está alterada por la amplificación y/o las delecciones. En otra realización se analizan las regiones diana en busca de la presencia de polimorfismos (esto es, Polimorfismos de un Único Nucleótido o mutaciones) que afectan o predisponen a las células de dichas muestras con respecto a aspectos clínicos, siendo de valor diagnóstico, pronóstico o terapéutico. Preferiblemente, se utiliza la identificación de variaciones de la secuencia para definir haplotipos que dan como resultado un comportamiento característico de dichas muestras con dichos aspectos clínicos.

50

Una realización de la invención es un método *in vitro* para la predicción, diagnosis o prognosis de la EPOC mediante la detección de al menos 10, al menos 5, o al menos 4, o al menos 3 y más preferiblemente al menos 2 marcadores por medio del cual los marcadores son genes y/o secuencias de ácido nucleico genómicas que están localizadas en una región cromosómica que está alterada en la EPOC.

55

La invención hace referencia a un método *in vitro* para la predicción, diagnosis o prognosis de enfermedades respiratorias que comprende detectar al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido de la invención; y (b) un polipéptido de la Quinasa RC de la invención.

60

La invención también se refiere al método descrito antes en el que la enfermedad es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el cáncer, o una enfermedad respiratoria en la que la señalización celular es defectuosa, y/o donde el método de detección comprende el uso de PCR, matrices o cuentas.

La invención también se refiere a un método *in vitro* para la predicción, diagnosis o prognosis de EPOC que comprende detectar al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido de la invención, y (b) un polipéptido de la Quinasa RC de la invención.

65

ES 2 347 247 T3

La invención también incluye un método como se ha descrito antes, donde se detecta el nivel de expresión del marcador.

Una realización adicional de la invención es un método *in vitro* para la predicción, diagnosis o pronosis de la EPOC mediante la detección del gen y/o la secuencia de ácido nucleico genómico de la Quinasa RC.

En una realización, el método *in vitro* para la predicción, diagnóstico o pronóstico de la EPOC y la EPOC en particular se realiza mediante la detección de:

- 10 (a) un polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6;
- (b) un polinucleótido que hibrida en condiciones restrictivas con un polinucleótido especificado en el apartado (a) que codifica un polipéptido que muestra la misma función biológica que la Quinasa RC;
- 15 (c) un polinucleótido cuyas secuencias se apartan del polinucleótido especificado en el apartado (a) y (b) debido a la degeneración del código genético que codifica un polipéptido que muestra la misma función biológica que la Quinasa RC; o
- 20 (d) un polinucleótido que representa un fragmento específico, derivado o variación alélica de una secuencia de polinucleótidos especificada en el apartado (a) a (c) que codifica un polipéptido que muestra la misma función biológica que la Quinasa RC.

en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas: hibridación de cualquier polinucleótido u oligómero análogo especificado en el apartado (a) a (d) con un material polinucleotídico de una muestra biológica, formando de ese modo un complejo de hibridación; y detección de dicho complejo de hibridación.

En otra realización el método *in vitro* para la predicción, diagnosis o pronosis de la EPOC se realiza exactamente como se acaba de describir pero, donde antes de la hibridación, el material polinucleotídico de la muestra biológica se amplifica.

En otra realización el método *in vitro* para la diagnosis o la pronosis de la EPOC en particular se realiza mediante la detección de:

- 35 (a) un polinucleótido seleccionado entre los polinucleótidos del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6;
- (b) un polinucleótido que hibrida en condiciones restrictivas con un polinucleótido especificado en (a) que codifica un polipéptido que muestra la misma función biológica que la Quinasa RC;
- 40 (c) un polinucleótido cuya secuencia se aparta del polinucleótido especificado en el apartado (a) y (b) debido a la degeneración del código genético que codifica un polipéptido que muestra la misma función biológica que la Quinasa RC;
- 45 (d) un polinucleótido que representa un fragmento, derivado o variación alélica específicos de una secuencia polinucleotídica especificada en el apartado (a) a (c) que codifica un polipéptido que muestra la misma función biológica que la Quinasa RC;
- (e) un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos especificada en el apartado (a) a (d); o
- 50 (f) un polipéptido que comprende el polipéptido del SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12;

que comprende las etapas de poner en contacto una muestra biológica con un reactivo que interacciona específicamente con el polinucleótido especificado en el apartado (a) a (d) o el polipéptido especificado en el apartado (e) o (f).

1. Tecnología de matrices de ADN

En una realización, la presente invención también proporciona un método en el que se inmovilizan sondas polinucleotídicas en un chip de ADN en una matriz organizada. Los oligonucleótidos se pueden unir a un soporte sólido mediante una variedad de procedimientos, incluyendo la litografía. Por ejemplo un chip puede tener capacidad hasta para 41.000 oligonucleótidos (GeneChip, Affymetrix). La presente invención proporciona ventajas significativas sobre los ensayos para EPOC disponibles, tales como EPOC, debido a que incrementa la fiabilidad del ensayo al proporcionar una matriz de marcadores polinucleotídicos sobre un único chip.

El método incluye obtener una biopsia de una persona afectada, que es fraccionada opcionalmente mediante seccionamiento criostático para enriquecer células enfermas hasta aproximadamente 80% de la población de células totales y el uso de fluidos corporales tales como suero u orina, suero o líquidos que contienen células (p. ej., derivados de productos aspirados con aguja). Después se extrae el ADN o el ARN, se amplifica, y se analiza con un chip

de ADN para determinar la presencia o ausencia de las secuencias del polinucleótido marcador. En una realización, las sondas polinucleotídicas se aplican sobre un sustrato en una matriz o formación bidimensional, las muestras de polinucleótidos se pueden marcar y después hibridar a las sondas. Se pueden detectar polinucleótidos de doble hebra, que comprenden los polinucleótidos de la muestra marcados unidos a los polinucleótidos de la sonda, una vez que la porción no unida de la muestra se lava.

Los polinucleótidos de la sonda se pueden aplicar sobre sustratos incluyendo vidrio, nitrocelulosa, etc. Las sondas se pueden unir al Sustrato mediante enlaces covalentes o mediante interacciones no específicas, tales como interacciones hidrófobas. Los polinucleótidos de la muestra se pueden marcar utilizando marcas radiactivas, fluoróforos, cromóforos, etc. Las técnicas para construir matrices y los métodos de uso de estas matrices se describen en los documentos EP Núm. 0799.897; PCT Núm. WO 97/29212; PCR Núm. WO 97/27317; EP Núm. 0.785.280; PCT Núm. WO 97/02357; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.593.839; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.578.832; EP Núm. 0.728.520; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.599.695; EP Núm. 0.721.016; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.556.752; PCT Núm. WO 95/22058; y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.631.734. Adicionalmente, se pueden utilizar matrices para examinar la expresión diferencial de los genes y se pueden utilizar para determinar la función del gen. Por ejemplo, se pueden utilizar matrices de las presentes secuencias de polinucleótidos para determinar si cualquiera de las secuencias de polinucleótidos se expresan diferencialmente entre células normales y células enfermas, por ejemplo. Una expresión elevada de un mensaje concreto en una muestra enferma, que no se observa en la correspondiente muestra normal, puede indicar una proteína específica de EPOC.

En la presente memoria se describen sondas y cebadores que son específicos para los marcadores polinucleotídicos únicos descritos en la presente memoria.

En una realización, el método comprende utilizar una sonda polinucleotídica para determinar la presencia de células malignas o de EPOC en particular en un tejido de un paciente. Específicamente, el método comprende:

- 1) proporcionar una sonda polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 12 nucleótidos de longitud, preferiblemente, 25 nucleótidos, y muy preferiblemente al menos 40 nucleótidos, y hasta toda o casi toda la secuencia codificante que es complementaria a una porción de la secuencia codificante de un polinucleótido del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o una secuencia complementaria a esta y
- 2) es expresada diferencialmente en la EPOC;
- 3) obtener una muestra de tejido de un paciente con EPOC;
- 4) proporcionar una segunda muestra de tejido de un paciente sin EPOC;
- 5) poner en contacto la sonda polinucleotídica en condiciones restrictivas con ARN de cada una de dichas primera y segunda muestras de tejido (p. ej., en una transferencia Northern o en un análisis de hibridación *in situ*); y
- 6) comparar (a) la cantidad de hibridación de la sonda con el ARN de la primera muestra de tejido, con (b) la cantidad de hibridación de la sonda con ARN de la segunda muestra de tejido;

donde una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de hibridación con el ARN de la primera muestra de tejido en comparación con la cantidad de hibridación con el ARN de la segunda muestra de tejido es indicativa de EPOC y en particular de EPOC en la primera muestra de tejido.

2. Métodos de análisis de los datos

La comparación de los niveles de expresión de una o más "Quinasas RC" con los niveles de expresión de referencia, p. ej., los niveles de expresión en las células enfermas de EPOC o en células de la contraparte normal, se lleva a cabo preferiblemente utilizando un sistema informático. Los niveles de expresión pueden ser obtenidos en dos células y estos dos grupos de niveles de expresión son introducidos en un sistema informático para su comparación. Un grupo de niveles de expresión puede ser introducido en un sistema informático para la comparación con los valores que ya están presentes en el sistema informático, o en una forma legible con ordenador que después es introducida en el sistema informático.

En la presente memoria se describe una forma legible con ordenador de los datos del perfil de expresión del gen de la invención, o de los valores correspondientes al nivel de expresión de al menos una "Quinasa RC" en una célula enferma. Los valores pueden ser los niveles de expresión del ARNm obtenido de los experimentos, p. ej., análisis de micromatrices. Los valores también pueden ser los niveles de ARNm normalizados relativos a un gen de referencia cuya expresión es constante en numerosas células en numerosas afecciones, p. ej., GAPDH. Los valores del ordenador pueden ser las razones de, o las diferencias entre, los niveles de ARNm normalizados o no normalizados en diferentes muestras.

ES 2 347 247 T3

Los datos del perfil de expresión del gen pueden estar en forma de una tabla, tal como una tabla de Excel. Los datos pueden estar solos, o pueden ser parte de una base de datos más grande, p. ej., que comprende otros perfiles de expresión. Por ejemplo, los datos del perfil de expresión de la invención pueden ser parte de una base de datos pública. La forma legible con ordenador puede estar en un ordenador. En la presente memoria también se describe un ordenador que presenta los datos del perfil de expresión del gen.

En la presente memoria se describe un método para determinar la similitud entre el nivel de expresión de una o más “Quinasas de RC” en una primera célula, p. ej., una célula de un sujeto, y el de una segunda célula, que comprende obtener el nivel de expresión de una o más “Quinasas de RC” en una primera célula e introducir estos valores en un ordenador que comprende una base de datos incluyendo registros que comprenden los valores correspondientes a niveles de expresión de una o más “Quinasas de RC” en una segunda célula, y las instrucciones de un procesador, p. ej., una interfaz del usuario, capaz de recibir una selección de uno o más valores con el fin de compararlos con los datos que están almacenados en el ordenador. El ordenador puede comprender adicionalmente un medio para convertir los datos de la comparación en un diagrama o gráfico u otro tipo de salida.

Los valores que representan los niveles de expresión de la “Quinasa RC” pueden ser introducidos en un sistema informático, que comprende una o más bases de datos con niveles de expresión de referencia obtenidos de más de una célula. Por ejemplo, el ordenador comprende los datos de expresión de células enfermas y normales. Se proporcionan instrucciones al ordenador, y el ordenador es capaz de comparar los datos introducidos con los datos del ordenador para determinar si los datos introducidos son más similares a los de una célula normal o a los de una célula enferma.

En la presente memoria se describe un ordenador que comprende valores de niveles de expresión en células de sujetos en diferentes fases de EPOC, y el ordenador es capaz de comparar los datos de expresión introducidos en el ordenador con los datos almacenados, y producir resultados que indiquen a cual de los perfiles de expresión del ordenador, es más similar el introducido, para determinar por ejemplo la fase de EPOC del sujeto.

Los perfiles de expresión de referencia del ordenador descrito en la presente memoria son los perfiles de expresión de células de EPOC de uno o más sujetos, cuyas células se tratan *in vivo* o *in vitro* con un fármaco utilizado para la terapia de la EPOC. Después de introducir los datos de expresión de una célula de un sujeto tratado *in vitro* o *in vivo* con el fármaco, se instruye el ordenador para comparar los datos introducidos con los datos del ordenador, y para proporcionar resultados que indiquen si la entrada de los datos de expresión al ordenador son más similares a los de una célula de un sujeto que es sensible al fármaco o más similar a los de una célula de un sujeto que no es sensible al fármaco. De este modo, los resultados indican si es probable que el sujeto responda al tratamiento con el fármaco o es improbable que responda a él.

En la presente memoria se describe un sistema que comprende un medio para recibir datos de expresión génica para uno de una pluralidad de genes; un medio para comparar los datos de expresión génica de cada uno de dichos genes de una pluralidad de genes con un marco de referencia común; y un medio para presentar los resultados de la comparación. Este sistema puede comprender adicionalmente un medio para agrupar los datos.

En la presente memoria también se describe un programa informático para analizar datos de expresión génica que comprende (i) un código informático que recibe los datos de expresión de los genes de entrada para una pluralidad de genes y (ii) un código informático que compara dichos datos de expresión génica de dicha pluralidad de genes con un marco de referencia común.

En la presente memoria también se describe un medio legible a máquina o legible con ordenador que incluye instrucciones del programa para realizar las siguientes etapas: (i) comparar una pluralidad de valores correspondientes a niveles de expresión de uno o más genes característicos de EPOC en una célula problema con una base de datos que incluye registros que comprende la expresión de referencia y los datos del perfil de expresión de una o más células de referencia y una anotación del tipo de célula; y (ii) indicar a qué célula es más similar la célula problema basándose en las similitudes de los perfiles de expresión. Las células de referencia pueden ser células de sujetos en diferentes fases de EPOC. Las células de referencia también pueden ser células de sujetos que responden o no responden a un tratamiento con un fármaco concreto e incubadas opcionalmente *in vitro* o *in vivo* con el fármaco.

Las células de referencia también pueden ser células de sujetos que responden o no responden a diversos tratamientos diferentes, y el sistema informático indica un tratamiento preferido para el sujeto. Por consiguiente, se describe en la presente memoria un método para seleccionar una terapia para un paciente que tiene EPOC, comprendiendo el método: (i) proporcionar el nivel de expresión de uno o más genes característicos de la EPOC en una célula enferma de un paciente; (ii) proporcionar una pluralidad de perfiles de referencia, asociado cada uno con una terapia, donde el perfil de expresión del sujeto y cada perfil de referencia tiene una pluralidad de valores, representando cada valor el nivel de expresión de un gen característico de EPOC; y (iii) seleccionar el perfil de referencia más similar al perfil de expresión del sujeto, para de ese modo seleccionar una terapia para dicho paciente. La etapa (iii) se puede realizar por medio de un ordenador. Se puede seleccionar el perfil de referencia más similar ponderando un valor de comparación de la pluralidad utilizando un valor de ponderación asociado con los correspondientes datos de expresión.

La abundancia relativa de un ARNm en dos muestras biológicas se puede puntuar como una perturbación y su magnitud se puede determinar (esto es, la abundancia es diferente en las dos fuentes de ARNm sometidas a ensayo), o como no perturbada (esto es, la abundancia relativa es la misma). Una diferencia entre las dos fuentes de ARN de al

ES 2 347 247 T3

menos un factor de aproximadamente 25% (el ARN de una fuente es 25% más abundante que el de la otra fuente), más normalmente aproximadamente 50%, incluso a menudo un factor de aproximadamente 2 (dos veces tan abundante), 3 (tres veces tan abundante) o 5 (cinco veces tan abundante) puede ser puntuada como perturbación. La perturbación puede ser utilizada por un ordenador para el cálculo y las comparaciones de expresión.

Preferiblemente, además de identificar una perturbación como positiva o negativa, resulta ventajoso determinar la magnitud de la perturbación. Esto se puede llevar a cabo, como se ha observado antes, calculando la proporción de emisión de los dos fluoróforos utilizados para el marcaje diferencial, o mediante métodos análogos que resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

El medio legible con ordenador puede comprender adicionalmente un puntero para un descriptor de una fase de la EPOC o para un tratamiento para la EPOC.

En funcionamiento, el medio para recibir los datos de la expresión génica, los medios para comparar los datos de la expresión génica, los medios para presentarlos, los medios para normalizarlos, y los medios para agruparlos en el contexto de los sistemas descritos en la presente memoria pueden implicar un ordenador programado con las respectivas funcionalidades descritas en la presente memoria, con un soporte físico o un soporte físico y un soporte lógico implementados; un circuito lógico u otro componente de un ordenador programado que realice las operaciones identificadas específicamente en la presente memoria, dictadas por un programa de ordenador; o una memoria de ordenador codificada con instrucciones ejecutables que representen un programa informático que pueda hacer que un ordenador funcione de la manera concreta descrita en la presente memoria.

Los expertos en la técnica comprenderán que los sistemas y métodos descritos en la presente memoria se pueden aplicar a una variedad de sistemas, incluyendo ordenadores personales compatibles con IBM que funcionan con MS-DOS o Microsoft Windows.

El ordenador puede tener componentes internos conectados con componentes externos. Los componentes internos pueden incluir un elemento procesador interconectado con una memoria principal. El sistema informático puede incluir un procesador Intel Pentium® de 200 MHz o mayor frecuencia y con 32 MB o más de memoria principal. El componente externo puede comprender un almacenamiento masivo, que puede consistir en uno o más discos duros (que típicamente se empaquetan junto al procesador y la memoria). Tales discos duros tienen típicamente una capacidad de almacenamiento de 1 GB o más. Otros componentes externos incluyen un dispositivo de interfaz del usuario, que puede ser un monitor, junto con un dispositivo de introducción, que puede ser un "ratón", u otros dispositivos de introducción gráficos, y/o un teclado. También se puede adjuntar al ordenador un dispositivo de impresión.

Típicamente, el sistema informático también está conectado a una conexión con la red, que puede ser una conexión Ethernet a otro sistema informático local, sistemas informáticos remotos, o redes de comunicación de banda ancha, tal como Internet. Esta conexión a la red permite que el sistema informático comparta datos y tareas de procesamiento con otros sistemas informáticos.

Durante el funcionamiento del sistema se cargan en la memoria diversos componentes del soporte lógico, que son convencionales en la técnica y especiales para la presente descripción. Estos componentes del soporte lógico hacen en conjunto que funcione el sistema informático de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Estos componentes del soporte lógico se almacenan típicamente en el almacenamiento masivo. Un componente del soporte lógico representa el sistema operativo, que es responsable del manejo del sistema informático y sus interconexiones en red. Este sistema operativo puede ser, por ejemplo, de la familia de Microsoft Windows, tal como Windows 95, Windows 98, Windows NT o Windows XP. Un componente de soporte lógico representa lenguajes comunes y funciones convenientemente presentes en este sistema para ayudar a los programas a implementar los métodos específicos para esta descripción. Se pueden utilizar muchos lenguajes informáticos de nivel elevado o bajo para programar los métodos analíticos descritos en la presente memoria. Las instrucciones pueden ser interpretadas durante el tiempo de ejecución o recopiladas. Los lenguajes preferidos incluyen C/C++, y JAVA®. Muy preferiblemente, los métodos descritos en la presente memoria se programan en paquetes de soporte lógico matemático que permiten una entrada simbólica de ecuaciones y una especificación de elevado nivel del procesamiento, incluyendo los algoritmos a utilizar, liberando de ese modo al usuario de la necesidad de programar procedimentalmente ecuaciones o algoritmos individuales. Tales paquetes incluyen Matlab de Mathworks (Natick, Mass.). Las matemáticas de Wolfram Research (Champaign, III), o S-Plus de Math Soft (Cambridge, Mass.). Por consiguiente, un componente del soporte lógico representa los métodos analíticos descritos en la presente memoria programados en un lenguaje procedimental o un paquete simbólico. El sistema informático también puede contener una base de datos que comprende valores que representan niveles de expresión de uno o más genes característicos de EPOC. La base de datos puede contener uno o más perfiles de expresión de genes característicos de EPOC en diferentes células.

En una implementación ilustrativa, para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria, un usuario carga primero los datos del perfil de expresión en el sistema informático. Estos datos pueden ser introducidos directamente por el usuario desde un monitor y un teclado, o desde otros sistemas informáticos conectados mediante una conexión en red, o sobre un medio de almacenamiento extraíble tal como un CD-ROM o un disco flexible o a través de la red. A continuación el usuario ejecuta el soporte lógico para el análisis del perfil de expresión que realiza las etapas de comparación y, p. ej., agrupación de genes co-variantes en grupos de genes.

En otra implementación ilustrativa, se comparan los perfiles de expresión utilizando un método descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.203.987. Primero el usuario carga los datos del perfil de expresión en el sistema informático. Las definiciones del perfil Geneset se cargan en la memoria desde el medio de almacenamiento o desde un ordenador remoto, preferiblemente desde un sistema de bases de datos de geneset dynamyc, a través de la red. A continuación el usuario ejecuta el soporte lógico de proyección que realiza las etapas de convertir el perfil de expresión en perfiles de expresión proyectados. Después se presentan los perfiles de expresión proyectados.

En otra implementación ilustrativa más, el usuario conduce primero el perfil proyectado a la memoria. Después el usuario efectúa la carga de un perfil de referencia en la memoria. A continuación, el usuario ejecuta el soporte lógico de comparación que realiza las etapas de comparación objetiva de los perfiles.

3. *Detección de una secuencia de polinucleótidos variante*

En la presente memoria se describen métodos para determinar si un sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar una enfermedad, tal como una predisposición a desarrollar EPOC, por ejemplo EPOC, asociada con una actividad aberrante de uno cualquiera de los polipéptidos codificados por cualquiera de los polinucleótidos del SEQ ID NO: 1, donde la actividad aberrante del polipéptido se caracteriza por detectar la presencia o ausencia de una lesión genética caracterizada por al menos uno de estos:

- (i) una alteración que afecta a la integridad de un gen que codifica un polipéptido marcador, o
- (ii) la expresión errónea del polinucleótido codificante.

Como ilustración, se pueden detectar tales lesiones genéticas averiguando la existencia de al menos una de estas:

- I. una deleción de uno o más nucleótidos de la secuencia de polinucleótidos
- II. una adición de uno o más nucleótidos a la secuencia de polinucleótidos
- III. una sustitución de uno o más nucleótidos de la secuencia de polinucleótidos
- IV. una transposición cromosómica grosera de la secuencia de polinucleótidos
- V. una alteración grosera del nivel de un transcrito del ARN mensajero de la secuencia de polinucleótidos
- VI. una modificación aberrante de la secuencia de polinucleótidos, por ejemplo del patrón de metilación del ADN genómico
- VII. la presencia de un patrón de empalme de tipo no salvaje de un transcrito de ARN mensajero del gen
- VIII. un nivel de tipo no salvaje del polipéptido marcador
- IX. pérdida alélica del gen
- X. modificación post-traducciona inapropiada del polipéptido marcador

En la presente memoria se describen técnicas de análisis para detectar mutaciones en la secuencia de polinucleótidos codificante. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, métodos que implican análisis de la secuencia, hibridación por transferencia Southern, mapeo del sitio de la enzima de restricción, y métodos que implican la detección de la ausencia de emparejamiento de nucleótidos - entre el polinucleótido que se va a analizar y una sonda.

Enfermedades o trastornos específicos, p. ej., enfermedades o trastornos genéticos, están asociados con variantes alélicas específicas de regiones polimórficas de ciertos genes, que no codifican necesariamente una proteína mutada. De este modo, la presencia de una variante alélica específica de una región polimórfica de un gen en un sujeto puede volver susceptible al sujeto a desarrollar una enfermedad o trastorno específico. Las regiones polimórficas de los genes, pueden ser identificadas determinando la secuencia de nucleótidos de los genes en las poblaciones de individuos. Si se identifica una región polimórfica, se puede determinar la conexión con una enfermedad específica estudiando poblaciones específicas de individuos, p. ej., individuos que desarrollan una enfermedad específica, tal como EPOC. Una región polimórfica puede ser localizada en cualquier región de un gen, p. ej., exones, en regiones codificantes o no codificantes de exones, intrones, y regiones promotoras.

Una composición de polinucleótidos puede comprender una sonda polinucleotídica incluyendo una región de una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridar con una secuencia efectora o antisentido de un gen o sus mutantes de origen natural, o secuencias limítrofes 5' o 3' o secuencias intrónicas asociadas naturalmente con los genes sujeto o sus mutantes de origen natural. El polinucleótido de una célula se vuelve accesible a la hibridación, la sonda se pone en contacto con el polinucleótido de la muestra, y se detecta la hibridación de la sonda al polinucleótido de la muestra.

Tales técnicas se pueden utilizar para detectar lesiones o variantes alélicas a nivel genómico o de ARNm, incluyendo delecciones, sustituciones, etc., así como para determinar los niveles del transcrito de ARNm.

Un método de detección preferido es la hibridación alelo específica utilizando sondas que solapan la mutación o sitio polimórfico y que tienen aproximadamente 5, 10, 20, 25, o 30 nucleótidos en torno a la mutación o la región polimórfica. Se pueden anclar a un soporte sólido, p. ej., un “chip” varias sondas capaces de hibridar específicamente con variantes alélicas. El análisis de detección de mutaciones utilizando estos chips que comprenden oligonucleótidos, también denominados “matrices de sondas de ADN” es descrito, p. ej., por Cohn et al. (119). Un chip puede comprender todas las variantes alélicas de al menos una región polimórfica de un gen. El soporte en fase sólida se pone en contacto después con un polinucleótido de ensayo y se detecta la hibridación con las sondas específicas. Por consiguiente, la identidad de numerosas variantes alélicas de uno o más genes puede ser identificada en un experimento de hibridación simple.

La detección de la lesión puede comprender la utilización de la sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Véase, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.683.195 y 4.683.202), tal como PCR de anclaje o PCR RACE, o alternativamente, en una reacción en cadena de ligasa (LCR) [Landegran *et al.*, 1988, (120) y Nakazawa *et al.*, (121)], la última de las cuales puede ser particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en el gen; Abravaya *et al.*, 1995, (122)]. En una realización meramente ilustrativa, el método incluye las etapas de (i) recoger una muestra de células de un paciente, (ii) aislar el polinucleótido (p. ej., genómico, ARNm, o ambos) de las células de la muestra, (iii) poner en contacto la muestra de polinucleótido con uno o más cebadores que hibridan específicamente con una secuencia de polinucleótidos en condiciones tales que se produce la hibridación y la amplificación del polinucleótido (si está presente), y (iv) 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 de control. Se prevé que puede ser deseable utilizar la PCR y/o la LCR como etapa de amplificación preliminar junto con cualquiera de las técnicas utilizadas para detectar las mutaciones descritas en la presente memoria.

Los métodos de amplificación alternativos incluyen: la replicación de secuencias autosostenida [Guatelli, J.C. *et al.*, 1990, (123)], el sistema de amplificación transcripcional [Kwoh, D.Y. *et al.*, 1989, (124)], la replicasa Q-beta [Lizardi, P.M. *et al.*, 1988, (125)], o cualquier otro método de amplificación de polinucleótidos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de polinucleótido si tales moléculas están presentes en un número muy bajo.

En el análisis sujeto, las mutaciones, o las variantes alélicas, de un gen de una célula de la muestra pueden ser identificadas mediante alteraciones en los patrones de escisión con enzimas de restricción. Por ejemplo, se aíslan la muestra y el ADN de control, se amplifican (opcionalmente, se digieren con una o más endonucleasas de restricción y se determinan las longitudes de los fragmentos mediante electroforesis en gel. Por otra parte, se puede hacer uso de ribozimas específicas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.498.531) para puntuar la presencia de mutaciones específicas mediante el desarrollo o la pérdida de un sitio de escisión para la ribozima.

4. Hibridación *In Situ*

En un aspecto, el método comprende la hibridación *in situ* con una sonda derivada de un polinucleótido marcador dado, cuya secuencia se selecciona entre cualquiera de las secuencias de polinucleótidos del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o una secuencia complementaria a estas. El método comprende poner en contacto la sonda de hibridación marcada con una muestra de un tipo de tejido dado de un paciente que tiene potencialmente EPOC y EPOC en particular así como tejido normal de una persona sin EPOC, y determinar si la sonda marca el tejido del paciente hasta un grado significativamente diferente (p. ej., al menos en un factor de dos, o al menos en un factor de cinco, o al menos en un factor de veinte, o al menos en un factor de cincuenta) que el grado al cual se marca el tejido normal.

Indicaciones y Métodos Terapéuticos

Es probable que la Quinasa RC humana descrita en la presente memoria sea útil para los mismos fines que las serina/treonina quinasas identificadas previamente, o más específicamente para los mismos fines que las quinasas de la quinasa MAPK identificadas previamente. Por ejemplo, el factor de crecimiento transformante de tipo beta (TGF- β) regula la proliferación y diferenciación de una variedad de tipos celulares que se unen a y activan receptores de la superficie celular que poseen actividad serina/treonina quinasa. Atfi *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 12110-04, 1995) han demostrado que el TGF- β activa una proteína serina/treonina quinasa de 78 kDa (p78); la quinasa p78 fue activada solamente en células para las cuales el TGF- β actúa como factor inhibidor del crecimiento. Otro ejemplo es la MAPKKK3, la quinasa humana con la cual la Quinasa RC está más íntimamente relacionada. La MAPKKK3 es conocida por regular directamente las rutas de la proteína quinasa activada por estrés (SAPK) y la proteína quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) activando SEK y MEK1/2 respectivamente. También puede intensificar la transcripción a partir de un gen informador dependiente de factor nuclear kappa- β (NF κ B). Otras quinasas de la quinasa MAPK identificadas previamente incluyen c-Raf, Mos, MEKK1, B-Raf, TAK1, A-Raf, Tpl-2, MEKK2, MUK, SPRK, MAPKKK5, MEKK4, y MST. La Quinasa RC humana descrita en la presente memoria también puede estar implicada en semejante señalización. De este modo, la regulación de su actividad se puede utilizar para tratar trastornos en los cuales la señalización es defectuosa o está desregulada.

El perfil de expresión de la Quinasa RC demostró que ésta es expresada sumamente en el pulmón y la tráquea, y que se puede encontrar que se expresa en células b activadas y otros leucocitos. Algunas de las EST, que son expresadas a partir de la Quinasa RC humana, p. ej., números de acceso de Genbank BU676900, BG484791, CA311871, BQ045211, y BM969829, y también son expresadas en las células epiteliales de pulmón y en células epiteliales de fibrosis quística de pulmón primarias. Además, el análisis con micromatrices que comparan pulmones de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y pulmones de pacientes normales demostró que la Quinasa RC está regulada al alza a una media de 4,58 veces en los pulmones con EPOC (figura 1). De este modo, la Quinasa RC humana podría ser una diana potencial para tratar las enfermedades pulmonares, tales como la EPOC.

La EPOC es una afección definida fisiológicamente como una obstrucción del flujo de aire que generalmente resulta de una mezcla de enfisema y obstrucción de las vías respiratorias periféricas debida a bronquitis crónica (Senior & Shapiro, *Pulmonary Diseases and Disorders*, 3ª ed., Nueva York, McGraw-Hill, 1998, págs. 659-681, 1998; Barnes, *Chess 117*, 10S-14S, 2000). El enfisema se caracteriza por la destrucción de las paredes alveolares hasta un alargamiento anormal de los espacios aéreos del pulmón. La bronquitis crónica se define clínicamente como la presencia de tos productiva crónica durante tres meses en cada uno de los dos años sucesivos. En la EPOC, la obstrucción del flujo de aire es normalmente progresiva y solo es parcialmente reversible. Con mucho el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la EPOC es fumar cigarrillos, aunque la enfermedad se produce en no fumadores.

La expresión de la Quinasa RC en células incrementa significativamente después del tratamiento de las células con cloruro de potasio (KCl) 95 mM, que somete a las células a estrés hiperosmótico. Adicionalmente, algunas líneas celulares incrementan su expresión de Quinasa RC en respuesta a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 500 μm, un tratamiento que somete a las células a un estrés oxidativo y que se ha informado que deteriora la capacidad de las células B para estimular las células T específicas. Semejante regulación al alza de la Quinasa RC en las líneas celulares en respuesta al estrés hiperosmótico y oxidativo sugiere que la expresión más elevada de la Quinasa RC en los pulmones de los pacientes con EPOC puede ser el resultado de los estreses celulares causados por los agentes irritantes del humo del tabaco o los estreses causados por la respuesta inflamatoria a estos agentes irritantes.

La inflamación crónica de las vías respiratorias es un rasgo patológico clave de la EPOC (Senior y Shapiro, 1998). La población de células inflamatorias comprende un número incrementado de macrófagos, neutrófilos, y linfocitos CD8⁺. Los agentes irritantes inhalados, tales como el humo del tabaco, activan los macrófagos que son residentes en el tracto respiratorio, así como las células epiteliales conduciendo a la liberación de quimioquinas (p. ej., interleuquina-8) y otros factores quimiotácticos. Estos factores quimiotácticos actúan incrementando el tráfico de neutrófilos, monocitos, y linfocitos desde la sangre al tejido pulmonar y las vías respiratorias. Los linfocitos CD8⁺ reclutados en las vías respiratorias pueden reconocer las proteínas que han sido alteradas por productos químicos inhalados, tales como el humo del tabaco, e inducir la apoptosis de las células que expresan semejantes proteínas alteradas. Los linfocitos también pueden liberar los mediadores inflamatorios para reclutar otros leucocitos en los pulmones. Las células apoptóticas eliminadas por los linfocitos pueden liberar adicionalmente enzimas proteolíticas. Los neutrófilos y monocitos reclutados en las vías respiratorias pueden liberar una variedad de mediadores potencialmente dañinos tales como las enzimas proteolíticas y las especies reactivas de oxígeno. Aunque no tan bien estudiadas, también se han descubierto células B en un número incrementado en los pulmones de fumadores con obstrucción de las vías respiratorias, particularmente en los nódulos linfoides que se desarrollan en la adventitia de las vías respiratorias (Bosken, CH *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145(4 Pt 1):911-7, 1992). Las células B pueden jugar papeles en la presentación de antígenos, la producción de citoquinas inflamatorias, y la generación de anticuerpos tales como IgE e IgA que dirigen, promueven, y mantienen la respuesta inmunitaria en los pulmones de los que sufren EPOC. La degeneración de la matriz y el enfisema, junto con el engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias, la disfunción del tensioactivo, y la hipersecreción de mucus, son todas secuelas potenciales de esta respuesta inflamatoria que conducen a un deterioro del flujo de aire y del intercambio de gases.

La Quinasa RC tiene la capacidad de fosforilar la quinasa de la quinasa MAP MKK4, y en menor grado, la quinasa de la quinasa MAP MKK6, indicando que la Quinasa RC es un activador aguas arriba en una o más cascadas de señalización de la quinasa MAP. Como se ha descrito más arriba, la activación de las cascadas de señalización de la quinasa MAP tiene muchas consecuencias celulares, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la adaptación al estrés medioambiental, la producción de citoquinas, y la apoptosis. Se ha demostrado en muchos casos que la activación de MKK4 conduce a la fosforilación de las quinasas MAP de tipo JNK, que a su vez puede activar c-Jun, un componente del complejo del factor de transcripción AP-1. También se sabe que las quinasas MAP de tipo JNK inhiben los factores de transcripción NFAT. Asimismo se ha encontrado que otras quinasas de quinasas MAP, tales como MEKK1, que son iniciadoras de las cascadas de señalización que resultan de la fosforilación de las quinasas MAP de tipo JNK, son capaces de activar el factor de transcripción NFκB, indicando que este factor de transcripción también es una diana aguas abajo de estas cascadas. La activación de MKK6, por otra parte, conduce a la fosforilación de las quinasas de tipo p38, que son conocidas por ser importantes en la activación de la respuesta inmunitaria y son reguladores clave de la expresión de las citoquinas inflamatorias.

La Quinasa RC parece estar regulada al alza y posiblemente activada por el estrés celular, después fosforila MKK4 (y en un grado menor MKK6), lo que conduce a la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB. Como resultado de la activación de esta cascada de señalización, se incrementa la producción de interleuquina-8 y conduce al reclutamiento de células inflamatorias, tales como los neutrófilos, que juegan un papel en la patología de la EPOC. La aparición de estrés celular, la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB, y la producción en exceso de Interleuquina-8 son características de numerosas enfermedades inflamatorias, muchas de las cuales pueden ser tratadas

o evitadas por medio de la regulación de la Quinasa RC. Tales enfermedades incluyen asma; rinitis alérgica; dermatitis atópica; urticaria; conjuntivitis; catarro primaveral; artrorreumatismo crónico; lupus eritematoso generalizado; psoriasis; colitis diabrotica; síndrome de respuesta inflamatoria generalizada (SRIG); sepsis; polimiositis; dermatomiositis (DM); Poliarteritis nodosa (PN); enfermedad del tejido conectivo mixto (ETCM); síndrome de Sjögren; y gota.

Las EST de la Quinasa RC humana, p. ej., número de acceso GenBank B1832332, BX090530, N47620, y N57475, también son expresadas en médula de cerebro normal y en lesiones de esclerosis múltiple en el sistema nervioso central. De este modo, la Quinasa RC humana podría ser una diana potencial para tratar la esclerosis múltiple y otros trastornos del sistema nervioso central.

Las EST de Quinasa RC humana, p. ej., número de acceso GenBank AI683447, también son expresadas en adenocarcinoma endometrial bien diferenciado. De este modo, la Quinasa RC humana podría ser una diana potencial para tratar cánceres. El cáncer es una enfermedad causada fundamentalmente por una transformación celular oncogénica. Existen muchos rasgos distintivos de células transformadas que las distinguen de sus contrapartes normales y subyacen a la patofisiología del cáncer. Estos incluyen proliferación celular anormal, insensibilidad a señales de inducción de muerte normales (inmortalización), aumento de la motilidad e invasividad celulares, aumento de la capacidad para reclutar suministro de sangre a través de la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), inestabilidad genética, y desregulación de la expresión génica. Las diferentes combinaciones de estas fisiologías aberrantes, junto con la adquisición de la resistencia a fármacos a menudo conducen a una enfermedad intratable en la cual se producen por último el fallo orgánico y la muerte del paciente.

La mayor parte de las terapias para el cáncer convencionales se dirigen a la proliferación celular y se basan en las capacidades proliferativas diferenciales entre las células transformadas y normales para su eficacia. Este enfoque está dificultado por los hechos de que varios tipos de células normales importantes también son muy proliferativas y de que las células cancerosas frecuentemente se vuelven resistentes a estos agentes. Así, los índices terapéuticos para las terapias anti-cancerosas tradicionales raramente exceden de 2,0.

La llegada de la identificación de dianas moleculares dirigida por la genómica ha abierto la posibilidad de identificar nuevas dianas específicas del cáncer para la intervención terapéutica que proporcionarán tratamientos más seguros, más eficaces para los pacientes con cáncer. De este modo, los genes asociados con tumores recientemente descubiertos y sus productos pueden ser sometidos a ensayo en busca de sus papeles en la enfermedad y utilizados como herramientas para descubrir y desarrollar terapias innovadoras. Los genes que juegan papeles importantes en cualquiera de los procesos fisiológicos esbozados antes pueden ser caracterizados como dianas de cáncer.

Los genes o fragmentos génicos identificados por medio de la genómica pueden ser fácilmente expresados en uno o más sistemas de expresión heterólogos para producir proteínas recombinantes funcionales. Estas proteínas se caracterizan *in vitro* por sus propiedades bioquímicas y después se utilizan como herramientas en los programas de escrutinio molecular de elevado rendimiento para identificar los moduladores químicos de sus actividades bioquímicas. De esta manera se pueden identificar agonistas y/o antagonistas de la actividad de la proteína diana y someter a ensayo en modelos de enfermedad celulares e *in vivo* para la actividad anti-cancerosa. La optimización de los compuestos cabeza de serie con el ensayo iterativo en modelos biológicos y los análisis farmacocinéticos y toxicológicos detallados forman la base para el desarrollo de fármacos y su posterior ensayo en seres humanos.

En la presente memoria se describe el uso de agentes novedosos identificados mediante los análisis de escrutinio descritos más arriba. Por consiguiente, en la presente memoria se describe el uso de un compuesto de ensayo identificado como se ha descrito en la presente memoria en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, se puede utilizar un agente identificado como se describe en la presente memoria (p. ej., un agente modulador, una molécula de ácido nucleico antisentido, un anticuerpo específico, una ribozima, o un compañero de unión de un polipéptido) en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad, o efectos secundarios del tratamiento con tal agente. Alternativamente, un agente identificado como se ha descrito en la presente memoria se puede utilizar en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de semejante agente. Además, esta invención está relacionada con los usos de agentes novedosos identificados mediante los análisis de escrutinio descritos más arriba para los tratamientos descritos en la presente memoria.

Se puede administrar a una célula humana un reactivo que afecta a la actividad de la Quinasa RC, *in vitro* o *in vivo*, para reducir la actividad de la Quinasa RC. El reactivo se une preferiblemente a un producto de expresión de un gen de Quinasa RC humana. Si el producto de expresión es un polipéptido, el reactivo es preferiblemente un anticuerpo. Para el tratamiento de células humanas *ex vivo*, se puede añadir un anticuerpo a una preparación de células pluripotenciales que han sido separadas del organismo. Las células se pueden reponer en el mismo u otro organismo humano, con o sin propagación clonal, como es sabido en la técnica.

El reactivo puede ser liberado utilizando un liposoma. Preferiblemente, el liposoma es estable en el animal en el cual ha sido administrado durante al menos aproximadamente 30 minutos, más preferiblemente durante al menos aproximadamente 1 hora, e incluso más preferiblemente durante al menos aproximadamente 24 horas. Un liposoma comprende una composición lipídica que es capaz de dirigir un reactivo, concretamente un polinucleótido, a un sitio concreto en un animal, tal como un ser humano. Preferiblemente, la composición lipídica del liposoma es capaz de dirigirse a un órgano específico de un animal, tal como el pulmón o el hígado.

ES 2 347 247 T3

Un liposoma útil en la presente descripción comprende una composición lipídica que es capaz de fusionarse con la membrana plasmática de la célula elegida como diana para liberar su contenido en la célula. Preferiblemente, la eficacia de transfección de un liposoma es de aproximadamente 0,5 μg de ADN por 16 nmoles de liposomas liberados en aproximadamente 10^6 células, más preferiblemente aproximadamente 1,0 μg de ADN por 16 nmoles de liposomas liberados en aproximadamente 10^6 células, e incluso más preferiblemente aproximadamente 2,0 μg de ADN por 16 nmoles de liposomas liberados en aproximadamente 10^6 células. Preferiblemente, un liposoma está entre aproximadamente 100 y 500 nm, más preferiblemente entre aproximadamente 150 y 450 nm, e incluso más preferiblemente entre aproximadamente 200 y 400 nm de diámetro.

Los liposomas adecuados para su uso en la presente descripción incluyen aquellos liposomas utilizados convencionalmente, por ejemplo, en métodos de liberación de genes conocidos por los expertos en la técnica. Los liposomas más preferidos incluyen los liposomas que tienen una composición lipídica policatiónica y/o los liposomas que tienen un esqueleto de colesterol conjugado con polietilenglicol. Opcionalmente, un liposoma comprende un compuesto capaz de dirigir el liposoma a una célula tumoral, tal como un ligando de una célula tumoral expuesto sobre la superficie externa del liposoma.

La formación de un complejo de liposomas con un reactivo tal como un oligonucleótido antisentido o ribozima se puede lograr utilizando métodos que son convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 5.705.151). Preferiblemente, se combinan desde aproximadamente 0,1 μg a aproximadamente 10 μg de polinucleótido con aproximadamente 8 nmoles de liposomas, más preferiblemente se combinan de aproximadamente 0,5 μg a aproximadamente 5 μg de polinucleótidos con aproximadamente 8 nmoles de liposomas, e incluso más preferiblemente se combinan aproximadamente 1,0 μg de polinucleótidos con aproximadamente 8 nmoles de liposomas.

Se pueden liberar anticuerpos en tejidos específicos *in vivo* utilizando la liberación dirigida mediada por receptores. Los mecanismos de liberación de ADN mediada por receptores son ilustrados, por ejemplo, por Findels *et al.*, *Trends in Biotechnol.* 11, 202-05 (1993); Chion *et al.*, GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 263, 621-24 (1988); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269, 542-46 (1994); Zenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3655-59 (1990); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266, 338-42 (1991).

Si el reactivo es un anticuerpo de cadena sencilla, los polinucleótidos que codifican el anticuerpo pueden ser contruidos e introducidos en una célula o bien *ex vivo* o bien *in vivo* utilizando mecanismos bien establecidos incluyendo, pero no limitados a, transferencia de ADN mediada por policación de transferrina, transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, fusión celular mediada por liposomas, transporte intracelular de cuentas de látex recubiertas con ADN, fusión de protoplastos, infección viral, electroporación, "pistola génica" y transfección mediada por DEAE o fosfato de calcio.

Determinación de una Dosis Terapéuticamente Eficaz

La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz está dentro de las aptitudes de los expertos en la técnica. Una dosis terapéuticamente eficaz hace referencia a aquella cantidad de ingrediente activo que incrementa o disminuye la degradación de la matriz extracelular con respecto a la que se produce en ausencia de la dosis terapéuticamente eficaz.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente o bien en análisis de cultivo celular o bien en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros, o cerdos. El modelo animal también se puede utilizar para determinar el intervalo de concentración y la ruta de administración apropiados. Semejante información se puede utilizar después para determinar dosis y rutas útiles para su administración a seres humanos.

La eficacia terapéutica y la toxicidad, p. ej., la DE_{50} (dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL_{50} (dosis letal para 50% de la población), se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales. La razón de dosificación de los efectos tóxicos a terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la razón DL_{50}/DE_{50} .

Se prefieren las composiciones terapéuticas que muestran índice terapéuticos grandes. Los datos obtenidos de los análisis de cultivo celular y de estudios en animales se utilizan en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación contenida en tales composiciones se encuentra preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente, y la ruta de administración.

La dosificación exacta será determinada por el médico, a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del ingrediente activo o para mantener el efecto deseado. Los factores que se pueden tomar en consideración incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso, y el género del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación de fármacos, las sensibilidades de reacción, y la tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de larga duración se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la vida media y de la tasa de aclaramiento de la formulación concreta.

ES 2 347 247 T3

Las cantidades normales de dosificación pueden variar de 0,1 a 100.000 μ gramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 μ g, dependiendo de la ruta de administración. Las pautas para las dosificaciones concretas y los métodos de liberación se proporcionan en la literatura y generalmente se encuentran disponibles para los profesionales de la técnica. Los expertos en la técnica emplearán diferentes formulaciones para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores. De un modo similar, la liberación de polinucleótidos o polipéptidos será específica para células, condiciones, localizaciones concretas, etc.

Las dosificaciones eficaces *in vivo* de un anticuerpo están en el intervalo de aproximadamente 5 μ g a aproximadamente 50 μ g/kg, de aproximadamente 50 μ g a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 100 μ g a aproximadamente 500 μ g/kg de peso corporal del paciente, y de aproximadamente 200 a aproximadamente 250 μ g/kg de peso corporal del paciente. Para la administración de polinucleótidos que codifican anticuerpos de cadena sencilla, las dosificaciones eficaces *in vivo* están en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 ng, de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 μ g a aproximadamente 500 μ g, y de aproximadamente 20 μ g a aproximadamente 100 μ g de ADN.

Si el producto de expresión es ARNm, el reactivo es preferiblemente un oligonucleótido antisentido o una ribozima. Los polinucleótidos que expresan oligonucleótidos antisentido o ribozimas se pueden introducir en las células mediante una variedad de métodos, como se describe más arriba.

Preferiblemente, un reactivo reduce la expresión de un polinucleótido de Quinasa RC o la actividad de un polipéptido de la Quinasa RC en al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, o 100% con respecto a la ausencia del reactivo. La eficacia del mecanismo elegido para disminuir el nivel de expresión de un polinucleótido de Quinasa RC o la actividad de un polipéptido de la Quinasa RC se puede evaluar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como la hibridación de sondas nucleotídicas a ARNm específico de Quinasa RC, la RT-PCR cuantitativa, la detección inmunológica de un polipéptido de la Quinasa RC, o la medida de la actividad Quinasa RC.

Cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden ser administradas combinadas con otros agentes terapéuticos apropiados. La selección de los agentes apropiados para su uso en la terapia combinada puede ser realizada por un experto en la técnica, de acuerdo con los principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos actúa sinérgicamente para efectuar el tratamiento o la prevención de los diferentes trastornos descritos más arriba. Utilizando este enfoque, se puede lograr una eficacia terapéutica con dosificaciones inferiores de cada agente, reduciendo de este modo el potencial de efectos secundarios adversos.

Cualquiera de los métodos terapéuticos descritos antes se puede aplicar a cualquier sujeto que necesite semejante terapia, incluyendo, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos, y muy preferiblemente, seres humanos.

Ejemplo 1

Detección de la actividad Quinasa RC

Para la expresión de elevado nivel de un polipéptido de la Quinasa RC etiquetado con FLAG, se transfectaron células HEK293 con un vector de expresión pcDNA3.1-polipéptido de Quinasa RC (que expresa la secuencia de ADN de ID NO: 1 con una secuencia epitópica FLAG en su extremo amino) utilizando el reactivo de transfección Polyfect (Qiagen). Las células se cosecharon 48 h después de la infección y se lisaron en Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X al 1%, NaF 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, y Coctel Inhibidor de Proteinasa (Roche). El polipéptido de la Quinasa RC se inmunoprecipitó después a partir del producto lisado utilizando anticuerpos anti-FLAG. Se realizó un análisis con quinasa *in vitro* en un volumen de 40 μ l con FLAG-polipéptido de Quinasa RC inmunoprecipitado en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, ditiotreitól 1 mM. La reacción se inició mediante la adición de 4 μ l de ATP 1 mM con un suplemento de 5 μ Ci de ATP(P^{32}) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Después de eso, las muestras se sometieron a SDS-PAGE y se detectaron las proteínas fosforiladas mediante autorradiografía. Se sometieron a ensayo como sustratos histona H1, proteína alcalina de mielina, MEK2, MKK4, y MKK6. Se demostró que el polipéptido con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7 tiene actividad Quinasa RC, específicamente que tiene la capacidad de fosforilar otros polipéptidos de Quinasa RC, MKK4, y MKK6 (Fig. 8).

Ejemplo 2

Identificación de un compuesto de ensayo que se une a un polipéptido de la Quinasa RC

Los polipéptidos de Quinasa RC purificados que comprenden una proteína glutatión-S-transferasa y absorbidos sobre pocillos derivatizados con glutatión de placas de microtitulación de 96 pocillos se ponen en contacto con compuestos de ensayo de una genoteca de moléculas pequeñas a pH 7,0 en una solución de tampón fisiológico. Los polipéptidos de Quinasa RC comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en los SEQ ID NO: 2, 5, 6, o 7. Los compuestos de ensayo comprenden una etiqueta fluorescente. Las muestras se incuban durante 5 minutos a una hora. Las muestras de control se incuban en ausencia de compuesto de ensayo.

ES 2 347 247 T3

La solución tampón que contiene los compuestos de ensayo se lava de los pocillos. La unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido de la Quinasa RC se detecta mediante medición de la fluorescencia de los contenidos de los pocillos. Un compuesto de ensayo que incrementa la fluorescencia en un pocillo en al menos 15% con respecto a la fluorescencia de un pocillo en el que no se incubó compuesto de ensayo se identifica como un compuesto que se une a un polipéptido de la Quinasa RC.

Ejemplo 3

10 *Identificación de un compuesto de ensayo que disminuye la actividad de la Quinasa RC*

Los polipéptidos de Quinasa RC, purificados como se describe en el Ejemplo 1, se ponen en contacto con los compuestos de ensayo de una genoteca de moléculas pequeñas y se analizan en busca de actividad Quinasa RC utilizando cualquiera de los sustratos mencionados en el Ejemplo 1 u otros sustratos de Quinasa RC. Como controles, también se analizaron los polipéptidos de Quinasa RC en ausencia de compuesto de ensayo. Se mide la actividad Quinasa como se describe en el Ejemplo 1 o como ilustran Trost *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275, 7373-77, 2000; Hayashi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 449-56, 1999; Masure *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 265, 353-60; y Mukhopadhyay *et al.*, *J. Bacteriol.* 181, 6615-22, 1999.

Alternativamente, la actividad Quinasa RC se puede medir indirectamente midiendo los efectos aguas abajo, por ejemplo, analizando la actividad del gen informador NFκB o AP-1 en células que expresan la Quinasa RC, o analizando la producción de Interleuquina-8 por las células que expresan la Quinasa RC. Por ejemplo, se pueden utilizar genes informadores Mercury[®] Pathway Profiling Luciferase System 2 (CLONTECH) transfectando las células así como el vector de expresión de la Quinasa RC. Puesto que en presencia del informador AP-1 o NFκB así como de Quinasa RC en la célula transfectada muestran una potente actividad Luciferasa, estas células pueden controlar la eficacia de un compuesto, inhiba este o no la Quinasa RC, midiendo su actividad informadora indirectamente. Las células que expresan la Quinasa RC se ponen en contacto con los compuestos de ensayo de una genoteca de moléculas pequeñas y se analizan en busca de producción de Interleuquina-8 siendo capaces de controlar la actividad Quinasa RC indirectamente. Como controles, se llevan a cabo los mismos análisis en ausencia de compuestos de ensayo.

Un compuesto de ensayo que disminuye la actividad Quinasa RC con respecto al control en al menos 20% se identifica como un inhibidor de la Quinasa RC.

35 Ejemplo 4

Identificación de un compuesto de ensayo que disminuye la expresión del gen de la Quinasa RC

Se administra un compuesto de ensayo a un cultivo de células transfectadas con un constructo de expresión que expresa la Quinasa RC y se incuban a 37°C durante 10 a 45 minutos. Un cultivo del mismo tipo de células incubado durante el mismo tiempo sin el compuesto de ensayo proporciona un control negativo.

El ARN se aísla de los dos cultivos como describen Chirgwin *et al.*, *Biochem.* 18, 5294-99, 1979). Se preparan transferencias Northern utilizando de 20 a 30 μg de ARN total y se hibridan con una sonda específica de Quinasa RC marcada con P³² a 65°C en Express-hyb (CLONTECH). La sonda comprende al menos 11 nucleótidos contiguos seleccionados del complemento del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Un compuesto de ensayo que disminuye la señal específica de la Quinasa RC con respecto a la señal obtenida en ausencia del compuesto de ensayo se identifica como inhibidor de la expresión de la Quinasa RC.

50 Ejemplo 5

Tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica con un reactivo que se une específicamente a un producto del gen de la Quinasa RC

Se realiza la síntesis de oligonucleótidos de la Quinasa RC antisentido que comprenden al menos 11 nucleótidos contiguos seleccionados entre el complemento del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6 sobre un sintetizador de serie de Pharmacia Gene Assembler utilizando el procedimiento de la fosforamidita (Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 534-83, 1990). Después del ensamblaje y la desprotección, los oligonucleótidos se precipitan con etanol dos veces, se secan, y se suspenden en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a la concentración deseada. La pureza de estos oligonucleótidos se somete a ensayo mediante electroforesis en gel por capilaridad y HPLC de intercambio iónico. Los niveles de endotoxinas de la preparación de oligonucleótido se determinan utilizando el Análisis con Amebocito *Limulus* (Banf, *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)* 105, 361-362, 1953).

Se administra intrabronquialmente una composición acuosa que contiene los oligonucleótidos antisentido a una concentración de 0,1-100 μM a un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La gravedad de la enfermedad se suprime debido a un descenso de la actividad de la Quinasa RC.

ES 2 347 247 T3

Ejemplo 6

Expresión de la Quinasa RC específica de la enfermedad detectada mediante análisis con micromatrices

5 *Preparación de la diana*

Se preparó ARN total humano a partir de tejido pulmonar congelado de cuatro individuos normales y tres individuos diagnosticados de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Analytical Biological Services Inc. Wilmington, DE, EEUU) utilizando Trizol® (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EEUU). Se añadieron 5 µg de cada uno de los ARN totales a una mezcla de reacción en un volumen final de 12 µl, que contenía los ARNm de control bacterianos (2,5 pg/µl de araB/entF, 8,33 pg/µl de fixB/gnd y 25 pg/µl de hisB/leuB) y 1,0 µl de cebador oligonucleotídico T7-(dT)₁₄ de 0,5 pmoles/µl. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 70°C y se enfrió con hielo. Dejando la mezcla sobre el hielo se añadieron 4 µl de 5x tampón de la primera hebra, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM y 1 µl de ARNasa H-transcriptasa inversa Superscript® II (200 U/µl) para hacer un volumen final de 20 µl, y la mezcla se incubó durante 1 hora en un baño de agua a 42°C. Se sintetizó ADNc de la segunda hebra en un volumen final de 150 µl, en una mezcla que contenía 30 µl de 5x tampón de la segunda hebra, 3 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 4 µl de ADN polimerasa I de *Escherichia coli* (10 U/µl) y 1 µl de ARNasa H (2 U/µl) durante 2 horas a 16°C. El ADNc se purificó utilizando un kit de purificación QIAquick de Qiagen, se secó, y se resuspendió en la mezcla de reacción IVT, que contenía 3,0 µl de agua sin nucleasa, 4,0 µl de 10x tampón de reacción, 4,0 µl de ATP 75 mM, 4,0 µl de GTP 75 mM, 3,0 µl de CTP 75 mM, 3,0 de UTP 75 mM, 7,5 µl de Biotina 11-CTP 10 mM, 7,5 µl de Biotina 11-UTP 10 mM (Perkin Elmer Life Sciences Inc. Boston, MA, EEUU) y 4,0 µl de mezcla enzimática. La mezcla de reacción se incubó durante 14 horas a 37°C y el ARNc diana se purificó utilizando un kit RNAeasy® (Qiagen). El rendimiento de ARNc se cuantificó midiendo la absorbancia UV a 260 nm, y se fragmentó en Tris-acetato 40 mM (TrisOAc) pH 7,9, KOAc 100 mM y MgOAc 31,5 mM, a 94°C durante 20 minutos. Esto da como resultado típicamente una diana fragmentada con un intervalo de tamaño entre 100 y 200 bases.

Hibridación de matrices

Se utilizaron diez microgramos de ARNc diana fragmentado para la hibridación de cada chip UniSet Human I Expression Bioarray (Amersham Biosciences), en 260 µl de solución de hibridación que contenía 78 µl de componente A de tampón Hyb de Amersham y 130 µl de componente B de tampón Hyb de Amersham. La solución de hibridación se calentó a 90°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARNc y se enfrió con hielo. La muestra se sometió a vórtice durante 5 segundos a velocidad máxima, y se inyectaron 250 µl en el puerto de entrada de la cámara de hibridación. Los portas se cargaron en una incubadora con sacudimiento ISF-4-W (Kuhner, Birsfelden, Suiza), con las cámaras de hibridación enfrentadas. Los portas se incubaron durante 24 horas a 37°C, mientras se sacudían a 300 rpm.

Procesamiento post-hibridación utilizando estreptavidina-Cy5

Los portas se separaron del aparato de sacudimiento ISF-4-W, y la cámara de hibridación se separó de cada porta. Cada porta se enjuagó brevemente en tampón TNT (Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, NaCl 0,15 M, Tween-20 al 0,05%) a la temperatura ambiente, y después se lavó en tampón TNT a 42°C durante 60 minutos. La señal se reveló utilizando una dilución 1:500 de estreptavidina-Cy5 (Amersham Biosciences), durante 30 minutos a la temperatura ambiente. El exceso de colorante se eliminó lavando cuatro veces con tampón TNT, durante 5 minutos cada una, a la temperatura ambiente. Los portas se enjuagaron en Tween-20 al 0,05% y se secaron en gas nitrógeno. Los portas procesados se escanearon utilizando un Escaner Axon GenePix 4000B con el láser ajustado a 635 nm, el voltaje del tubo fotomultiplicador (PMT) a 600 y la resolución del escáner a 10 µm. Se adquirieron imágenes con el Soporte Lógico Axon GenePixPro v4.0 Scanning (Amersham Biosciences), y se analizaron utilizando el Soporte Lógico CodeLink® Expression Analysis (Amersham Biosciences).

50 *Análisis de los datos*

El Soporte Lógico CodeLink® Expression Analysis (Amersham Biosciences) crea automáticamente datos de la señal para cada punto aplicado como en una hoja de cálculo formateada para Microsoft Excel. Después se compararon los datos utilizando el programa informático Spotfire Decision Site 7.0 (Spotfire Japan K.K., Tokio, Japón) para determinar la diferencia de multiplicidad entre cada gen en pulmón normal y con EPOC. Como resultado de este análisis, se encontró que el transcrito del gen de la Quinasa RC era más expresado en el pulmón con EPOC que en el normal (Fig. 1, 2).

60 Ejemplo 7

Expresión específica del tejido de la Quinasa RC

El patrón de expresión cualitativo de la Quinasa RC en diferentes tejidos se determina mediante Transcripción Inversa-Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Para demostrar que la Quinasa RC está implicada en el proceso de enfermedad de la EPOC, se utilizaron como molde 25 µg de ARN total de las siguientes fuentes en reacciones para sintetizar el ADNc de la primera hebra para el

perfilado de la expresión: Panel I-V de ARN Total Humano (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, EEUU), líneas celulares primarias de pulmón normal (BioWhittaker Clonetics, Walkersville, MD, EEUU), células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Kurabo, Osaka, Japón), varias líneas celulares comunes (ATCC, Washington, DC), y diferentes células purificadas a partir de sangre periférica. El ADNc de la primera hebra se sintetizó utilizando oligo(dT) (Nippon Gene Research Laboratories, Sendai, Japón) y el Sistema de Síntesis de la Primera Hebra SUPERSRIPT® para RT-PCR (Life Technologies, Rockville, MD) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para estas muestras, se utilizó con posterioridad un 1/1250° del ADNc de la primera hebra sintetizado como molde para la PCR cuantitativa. Las muestras adicionales se adquirieron en forma de ADNc presintetizados (Panel MTC de Sistema Inmunitario Humano y Panel MTC de Fracciones de Sangre Humana, Clontech Laboratories), y para estas, se utilizaron 10 ng de ADNc como molde para la PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa se realizó en un LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) con los cebadores oligonucleotídicos 5'-AATGGCACCCACAGTGACATGCTT-3' (SEQ ID NO: 13) y 5'-CCCTCGGTGTGCTCCGATGTA AAA-3' (SEQ ID NO: 14) en presencia del colorante fluorescente de unión a ADN SYBR Green I. Los resultados se convirtieron después en números de copias del transcrito del gen por nanogramo de ADNc molde ajustándolos a una curva patrón. La curva patrón se obtuvo realizando simultáneamente la reacción de PCR cuantitativa sobre los productos de la PCR de concentraciones conocidas amplificadas de antemano a partir del gen diana.

Para corregir las diferencias en los niveles de transcripción del ARNm por célula en los diferentes tipos de tejidos, se realizó un procedimiento de normalización utilizando niveles de expresión calculados de un modo similar de cinco genes domésticos diferentes: gliceraldehído-3-fosfatasa (GADPH), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT), beta-actina, porfobilinogeno desaminasa (PBGD), y beta-2 microglobulina. Se considera que el nivel de expresión del gen doméstico que es relativamente constante para todos los tejidos (Adams *et al.*, 1993, Adams *et al.*, 1995, Liew *et al.*, (1994) y por lo tanto se puede utilizar como calibre para aproximar el número relativo de célula por ng de molde de ADNc. Los niveles de expresión de los cinco genes domésticos en todas las muestras de tejido se midieron en tres reacciones independientes por gen utilizando el LightCycler y una cantidad constante (25 µg) de ARN de partida. El número de copias calculado para cada gen, derivado de la comparación con patrones que reaccionan simultáneamente de concentraciones conocidas, se registró y se convirtió en un porcentaje de la suma del número de copias del gen en todas las muestras de tejido. Para cada muestra de tejido, se calculó la suma de los valores del porcentaje para cada gen, y se calculó un factor de normalización dividiendo el valor del porcentaje de la suma para cada tejido por el valor del porcentaje de la suma de uno de los tejidos seleccionado arbitrariamente como patrón. Para normalizar un valor obtenido experimentalmente para la expresión de un gen concreto en una muestra de tejido, se multiplicó el valor obtenido por el factor de normalización para el tejido sometido a ensayo. Este método de normalización se utilizó para todos los tejidos excepto para aquellos derivados del Panel MTC de Fracciones de Sangre Humana, que se normalizó frente al gen doméstico solo, beta-2-microglobulina, debido a la amplia variación en la expresión de otro gen doméstico en estos tejidos dependiendo del estado de activación. Los resultados de este perfilado de la expresión se dan en la Figura 4 y en la Figura 5, que muestran los valores normalizados para los números de copias de ARNm por 10 ng de ADNc de la primera hebra en cada muestra sometida a ensayo.

Para medir el número de copias relativo de estos genes en las muestras de los pacientes y en las muestras de pulmón sano, se preparó ARN total a partir de tejido de pulmón congelado obtenido de cuatro individuos normales y dos individuos diagnosticados de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Analytical Biological Services Inc. Wilmington, DE, EEUU) utilizando Trizol® (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EEUU). El ADNc se sintetizó después como antes y se utilizó como molde para la PCR cuantitativa como se ha descrito antes. Se realizó la normalización utilizando el gen doméstico de la GAPDH solo. Los diferentes niveles de expresión del transcrito del gen de la Quinasa RC entre las muestras de tejido de pulmón normal y con EPOC se muestran en la Figura 3, que presenta la razón de transcrito de Quinasa RC con respecto al transcrito de GAPDH medidos en cada muestra sometida a ensayo.

Ejemplo 8

Clonación del ADNc de la Quinasa RC

Debido a las discrepancias entre la secuencia de nucleótidos de la Quinasa RC asequible en las bases de datos públicas (número de acceso GenBank NM_025052, longitud 2022 pb), y las EST que se emparejan con este locus del gen, se realizó el intento de obtener la secuencia completa correcta utilizando RACE (amplificación rápida de extremos del ADNc). Los moldes de RACE para este propósito se sintetizaron a partir de tejido de pulmón humano utilizando el kit GeneRacer® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA, EEUU). La amplificación mediante PCR del ADNc de la Quinasa de RC se llevó a cabo después utilizando el cebador oligonucleotídico específico del gen 5'-CCCTCGGTGTGCTCCGATGTA AAA-3' (SEQ ID NO: 14) y el cebador 5' de Gene Racer incluido en el kit. La amplificación mediante PCR generó un producto de aproximadamente 5 kilobases de longitud, indicando un transcrito significativamente más largo que el registrado en la base de datos GenBank.

Para amplificar la secuencia completa de la Quinasa RC, se diseñaron los cebadores de la PCR dentro de los exones aguas arriba y los exones aguas abajo pronosticados del gen de la Quinasa RC. Los exones aguas arriba fueron

ES 2 347 247 T3

pronosticados alineando el ortólogo de la Quinasa RC de ratón, generado mediante el programa de predicción génica GenomeScan y registrado en GenBank con el número de acceso XM_136210, con el locus genómico de la Quinasa RC humana. Se consideró que las regiones de alineamiento eran exones potencial del gen humano. Los exones aguas abajo fueron pronosticados mediante alineamiento de las EST con el locus genómico y selección de las regiones más 3' del alineamiento. Los cebadores utilizados para la amplificación de la secuencia completa de la Quinasa RC fueron 5'-TTCAAAGAAACAGCAGCTTTTGGACATT-3' (SEQ ID NO: 15) y 5'-GCATCTGCAGTGGAAGTGGGAAGAA-3' (SEQ ID NO: 16).

Los productos de la PCR se clonaron en un vector de secuenciación pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), se sometieron a secuenciación cíclica con un Kit de Reacción de Secuenciación Cíclica con Terminadores Marcados ABI Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA), y se analizaron en un sistema de secuenciación ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

Ejemplo 9

Debido a que la aparición de EPOC está fuertemente correlacionada con la inhalación repetida a largo plazo de agentes irritantes contenidos en el humo del tabaco, los solicitantes realizaron un análisis para determinar la influencia de diferentes estreses celulares que inducían los compuestos sobre la expresión de la Quinasa RC. Como se muestra en las figuras 6 y 7, la expresión de la Quinasa RC en las líneas celulares HEK293, Jurkat y Daudi aumentaba significativamente después del tratamiento de las células con cloruro de potasio (KCl) 95 mM, que somete a las células a estrés hiperosmótico. Adicionalmente, la línea de células Jurkat (y en un menor grado, la línea de células Daudi) aumentó su expresión de la Quinasa RC en respuesta a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 500 μM, un tratamiento que somete a las células a estrés oxidativo y que se ha informado que deteriora la capacidad de las células B para estimular células T específicas. Semejante regulación al alza de la Quinasa RC en las líneas celulares en respuesta al estrés hiperosmótico y oxidativo sugiere que la mayor expresión de la Quinasa RC en los pulmones de pacientes con EPOC puede ser el resultado de los estreses celulares causados por los agentes irritantes del humo del tabaco o los estreses causados por la respuesta inflamatoria a esos agentes irritantes.

Ejemplo 10

Con el fin de determinar si la expresión en exceso de la Quinasa RC tiene el potencial de activar los factores de transcripción, los solicitantes utilizaron un análisis con gen informador de luciferasa para medir la activación del factor de transcripción específico. Como se muestra en la figura 9, la transfección y la expresión en exceso de la Quinasa RC conducen a la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB. Se pudo detectar una activación muy pequeña del factor de transcripción NFAT. Las consecuencias de esta activación del factor de transcripción se estudiaron después utilizando micromatrices para analizar qué genes muestran un aumento de transcripción cuando se expresa en exceso la Quinasa RC. Como resultado, se encontró que la expresión de la quimioquina Interleuquina-8 aumentaba fuertemente en las células transfectadas con Quinasa RC. Para confirmar este resultado, se compararon las cantidades de Interleuquina-8 en el medio de cultivo de las células transfectadas con un vector de expresión de Quinasa RC y de células transfectadas con un vector vacío mediante un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada. Como se muestra en la figura 10, la expresión en exceso de la Quinasa RC ocasiona un incremento de casi 35 veces en la producción de Interleuquina-8 por las células. Por lo tanto, como se ilustra en la figura 11, la Quinasa RC parece estar regulada al alza y posiblemente activada por el estrés celular, después fosforila MKK4 (y en un grado menor MKK6), lo que conduce a la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB. Como resultado de la activación de la cascada de señalización, se aumenta la producción de Interleuquina-8 y se conduce al reclutamiento de células inflamatorias, tales como neutrófilos, que juegan un papel en la patología de la EPOC.

Ejemplo 11

Medición de la producción de Interleuquina-8 por células que expresan la Quinasa RC

Los niveles de h-IL-8 en el medio de cultivo de células HEK293 que expresan la Quinasa RC se midieron utilizando placas de fondo redondo de 96 pocillos MAXISORP (Nunc, Roskilde, Dinamarca) utilizando el Duoset ELISA Development System para IL-8 humana (Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA).

Se recogió el medio de cultivo de las células HEK293 dos días después de la transfección con un vector vacío o un vector de expresión de Quinasa RC. Se diluyeron 100 μl del medio recogido y se pusieron en pocillos de placas que se habían cubierto previamente durante la noche con anticuerpo primario y se bloquearon con 300 μl de BSA-PBS al 1% durante 1h a la temperatura ambiente. Las placas se incubaron después durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de lavar las placas dos veces con 300 μl de PBS-Tween al 0,05%, se añadieron a los pocillos 100 μl de anticuerpo secundario de 0,25 μg/ml diluido con PBS-BSA al 0,1%-Tween al 0,05% y las placas se incubaron 1 hora a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron después tres veces con 300 μl de PBS-Tween al 0,05%. Se añadieron 100 μl de anticuerpo de detección (estreptavidina-HRP) de 0,25 μg/ml diluido con PBS-BSA al 0,1%-Tween al 0,05%, y las placas se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de lavar las placas cuatro veces con 300 μl de PBS-Tween al 0,05%, las placas se revelaron utilizando un color mediado por peroxidasa

ES 2 347 247 T3

(Sumitomo Bakelite, Tokio, Japón) y se midió la absorbancia a DO 450 nm. La concentración de Interleuquina-8 se calculó después comparando la absorbancia medida frente a la absorbancia de patrones de IL-8 diluidos seriadamente preparados simultáneamente.

5 Como resultado, se demostró que la expresión en exceso de la Quinasa RC en células HEK293 ocasiona un incremento aproximado de 35 veces en la producción de Interleuquina-8 (Fig. 10).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la Quinasa RC, una serina/treonina quinasa, con una expresión incrementada en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido de la Quinasa RC, cuyo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 15 (i) una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en 75% a la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12; y
- (ii) una secuencia de aminoácidos como la descrita en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12,
- (b) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6; y
- 20 (c) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se aparta de las secuencias de polinucleótidos especificadas en los apartados a) a b) debido a la degeneración del código genético.
- 25 2. Un vector de expresión que contiene cualquiera de los polinucleótidos de la reivindicación 1.
3. Una célula anfitriona que contiene el vector de expresión de la reivindicación 2.
- 30 4. Un polipéptido de la Quinasa RC sustancialmente purificado codificado por un polinucleótido de la reivindicación 1.
5. Un método para producir un polipéptido de la Quinasa RC de la reivindicación 4, donde el método comprende las siguientes etapas:
- 35 (a) cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 3 en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido; y
- (b) recuperar el polipéptido del cultivo de la célula anfitriona.
- 40 6. Un método para la detección de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la Quinasa RC de acuerdo con la reivindicación 4 en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas:
- (a) hibridar cualquier polinucleótido de la reivindicación 1 con un material ácido nucleico de una muestra biológica, formando de ese modo un complejo de hibridación; y
- 45 (b) detectar dicho complejo de hibridación.
7. El método de la reivindicación 6, donde antes de la hibridación, el material ácido nucleico de la muestra biológica es amplificado.
- 50 8. Un método para la detección de un polinucleótido de la reivindicación 1 o un polipéptido de la Quinasa RC de la reivindicación 4 que comprende poner en contacto una muestra biológica con un reactivo que interacciona específicamente con el polinucleótido o el polipéptido, donde el reactivo es una ribozima, un oligonucleótido antisentido o un anticuerpo.
- 55 9. Un kit diagnóstico para llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
10. Un método de escrutinio para agentes que disminuyen la actividad de un polipéptido de la Quinasa RC de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende las etapas de:
- 60 (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido codificado por cualquier polinucleótido de la reivindicación 1; y
- (b) detectar la unión del compuesto de ensayo al polinucleótido, donde un compuesto de ensayo que se une al polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad de dicho
- 65 polipéptido.

ES 2 347 247 T3

11. Un método de escrutinio para agentes que regulan la actividad de un polipéptido de la Quinasa RC, que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido de la Quinasa RC codificado por cualquier polinucleótido de la reivindicación 1; y
- (b) detectar la actividad de fosforilación del polipéptido de la Quinasa RC, donde un compuesto de ensayo que incrementa la actividad del polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para incrementar la actividad del polipéptido de la Quinasa RC, y donde un compuesto de ensayo que disminuye la actividad del polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad del polipéptido de la Quinasa RC.

12. Un método de escrutinio para agentes que regulan la actividad de una Quinasa RC, que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido de la Quinasa RC codificado por cualquier polinucleótido de la reivindicación 1 y MKK4; y
- (b) detectar fosforilación del polipéptido de la Quinasa RC, donde un compuesto de ensayo que incrementa la fosforilación por el polipéptido de la Quinasa RC de MKK4 se identifica como un agente terapéutico potencial para incrementar la actividad del polipéptido de la Quinasa RC, y donde un compuesto de ensayo que disminuye la fosforilación por el polipéptido de la Quinasa RC de MKK4 se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad del polipéptido de la Quinasa RC.

13. Un método de escrutinio de agentes que disminuyen la actividad de un polipéptido de la Quinasa RC, que comprende poner en contacto un compuesto de ensayo con cualquier polinucleótido de la reivindicación 1 y detectar la unión del compuesto de ensayo al polinucleótido, donde un compuesto de ensayo que se une al polinucleótido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad del polipéptido de la Quinasa de RC.

14. Un método de reducción de la actividad de la Quinasa RC, que comprende poner en contacto una célula en el exterior de un organismo humano o animal con un reactivo que se une específicamente a cualquier polinucleótido de la reivindicación 1 o cualquier polipéptido de la Quinasa de RC de la reivindicación 4, donde el reactivo es una ribozima, un oligonucleótido antisentido o un anticuerpo, donde la actividad de la Quinasa RC es reducida.

15. Un método *in vitro* para la predicción, la diagnosis o la prognosis de enfermedades respiratorias que comprende detectar al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) un polinucleótido de la reivindicación 1; y
- (b) un polipéptido de Quinasa RC de la reivindicación 4.

16. El método de la reivindicación 15, donde la enfermedad es una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer, o una enfermedad respiratoria en la cual la señalización celular es defectuosa.

17. El método de la reivindicación 15 o 16, donde el método de detección comprende el uso de PCR, matrices o cuentas.

18. Un método *in vitro* para la predicción, diagnosis o prognosis de la EPOC que comprende detectar al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) un polinucleótido de la reivindicación 1; y
- (b) un polipéptido de Quinasa RC de la reivindicación 4.

19. El método de la reivindicación 18, donde se detecta el nivel de expresión del marcador.

20. Una matriz que comprende una pluralidad de polinucleótidos o análogos de polinucleótidos que codifican un polipéptido de la Quinasa RC, una serina/treonina quinasa, con una expresión incrementada en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, donde cada uno de los polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido de la Quinasa RC, cuyo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

ES 2 347 247 T3

(i) una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en 75% a la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12; y

(ii) una secuencia de aminoácidos como se representa en el SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12;

5

(b) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 6; y

(c) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se aparta de la secuencia de nucleótidos especificada en los apartados (a) a (b) debido a la degeneración del código genético.

10

21. El uso de un método de escrutinio, comprendiendo dicho método las etapas de

(a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, y

15

(b) detectar la unión de dicho compuesto de ensayo a un polipéptido del apartado (a), para la identificación de compuestos útiles en el tratamiento de la EPOC.

20

22. El uso de un método de escrutinio, comprendiendo dicho método las etapas de

(a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en 90% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, y

25

(b) detectar la actividad de un polipéptido del apartado (a), para la identificación de compuestos útiles en el tratamiento de la EPOC.

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

Rango	Núm. Acceso	Descripción	Múltiplo de regulación al alza
1	B183334	ADNc de Homo Sapiens 603087960f1, Extremo 5' (GADD34)	21,28
2	NM_024833	Proteína Hipotética FLJ23506 (FLJ23506), ARNm, Proteína Dedo de Cinc	15,35
3	BG68092	ADNc de Homo Sapiens 602628721F1, Extremo 5'	12,71
4	AL11741	ARNm de Homo Sapiens; ADNc DKFZP434k0521 (Del Clon DKFZP434k0521)	11,15
5	NM_000095	Proteína Matriz Oligomérica Cartilago (Pseudocondroplasia, Displasia Epifisal 1, Múltiple), ARNm	7,99
6	NM_005672	Antígeno de Células Pluripotenciales de Próstata (PSCA), ARNm	7,53
7	NM_005181	Anhidrasa Carbónica III; Específica de Músculo (Ca3), ARNm	7,48
8	NM_021870	Fibrinógeno, Polipéptido Gamma (FGG), Transcrito Variante Gamma-B, ARNm	7,22
9	AL05038	ARNm de Homo Sapiens; ADNc DKFZP564m2422 (De Clon DKFZP564m2422); CDS Parcial	6,96
10	NM_013332	Proteína 2 inducible por Hipoxia (HIG2), ARNm	6,86
11	NM_021992	Timosina, Beta. Identificada en Células de Neuroblastoma (TMSNB), ARNm	6,22
12	NM_002228	Homólogo Oncoæen Virus Sarcoma de Rous 17 V-iun (Aviar), (JUN), ARNm	5,97
13	NM_021052	Familia de Histona H2a, Miembro a (H2AFA), ARNm	5,71
14	NM_007021	Proteína Decidua inducida por Progesterona (DEPP), ARNm	5,62
15	NM_001179	ADP-ribosiltransferasa 3 (ART3), ARNm	5,07
16	AL13361	ARNm de Homo Sapiens; ADNc DKFZP434f1928 (De Clon DKFZP434f1928)	4,81
17	NM_005064	Subfamilia a de Citoquinas inducibles Pequeñas (Cys-Cys), Miembro 23 (SCYA23), ARNm	4,70
18	NM_025052	Proteína Hipotética FLJ23074 (FLJ23074) ARNm, Supuesta Proteína	4,58
19	NM_000519	Quinasa Fragmento de la Quinasa RC	4,57
20	NM_006145	Hemoglobina, Delta (HBD), ARNm DNAJ (HSP40) Homólogo, Subfamilia B, Miembro 1 (DNAJB1), ARNm	4,57

Figura 2

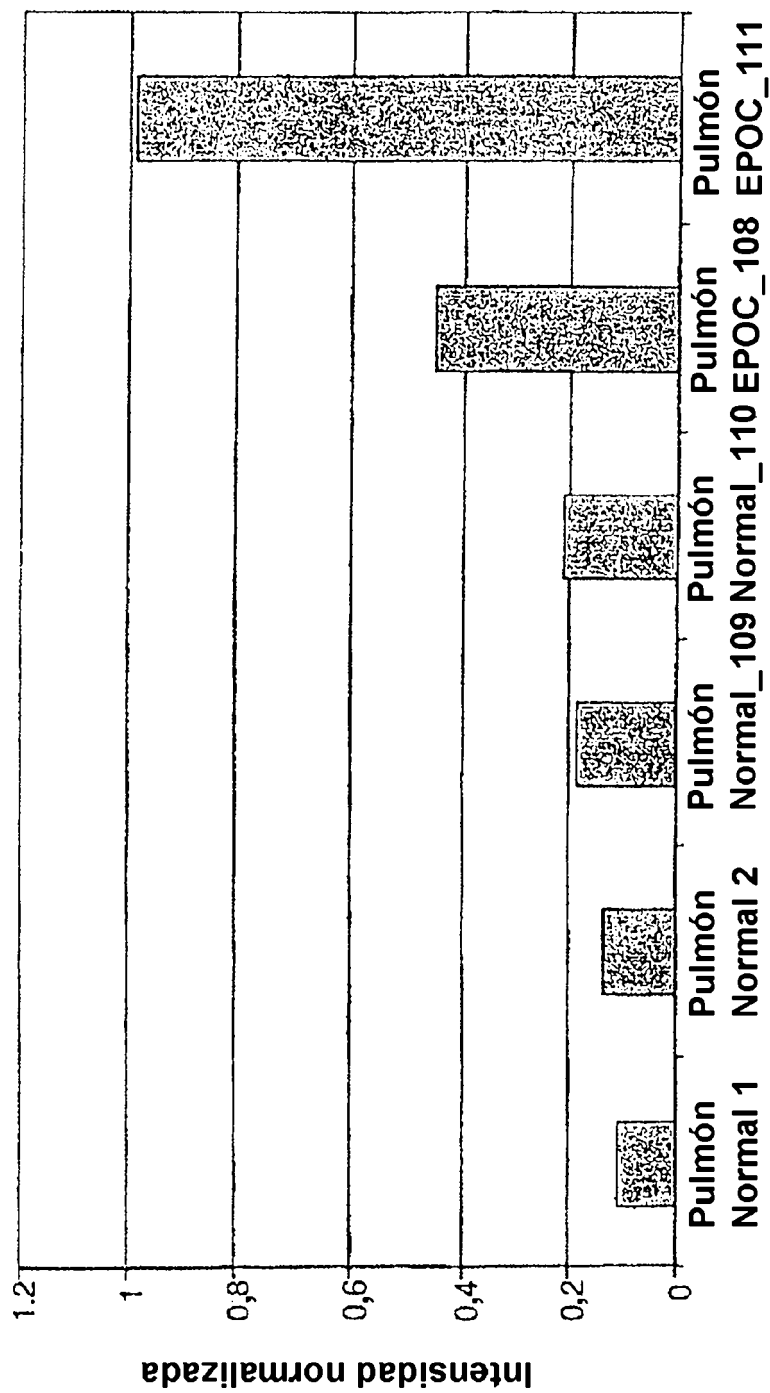


Figura 3

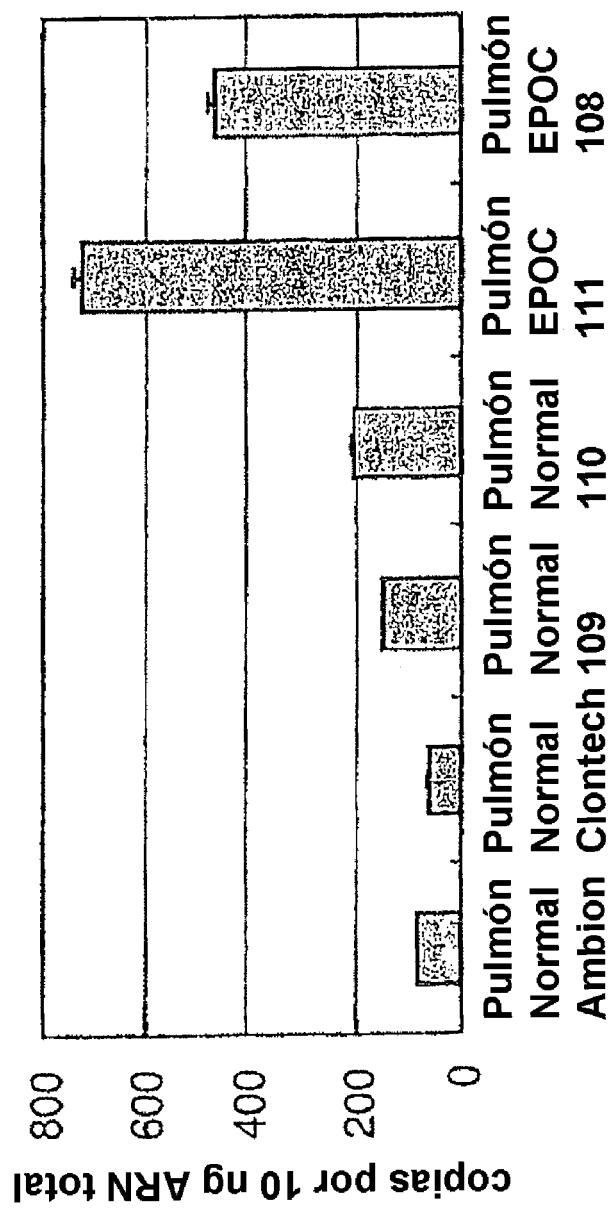
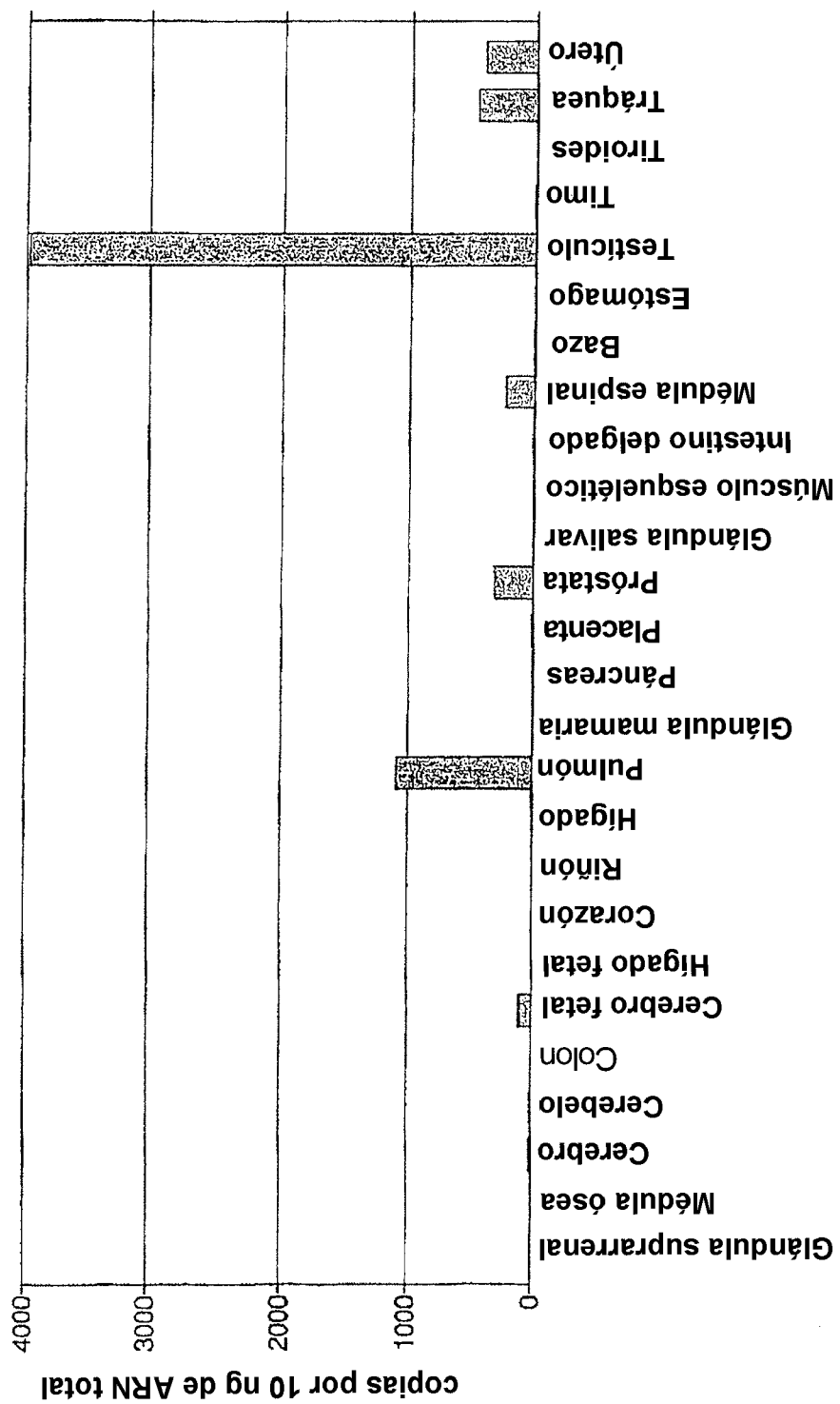


Figura 4



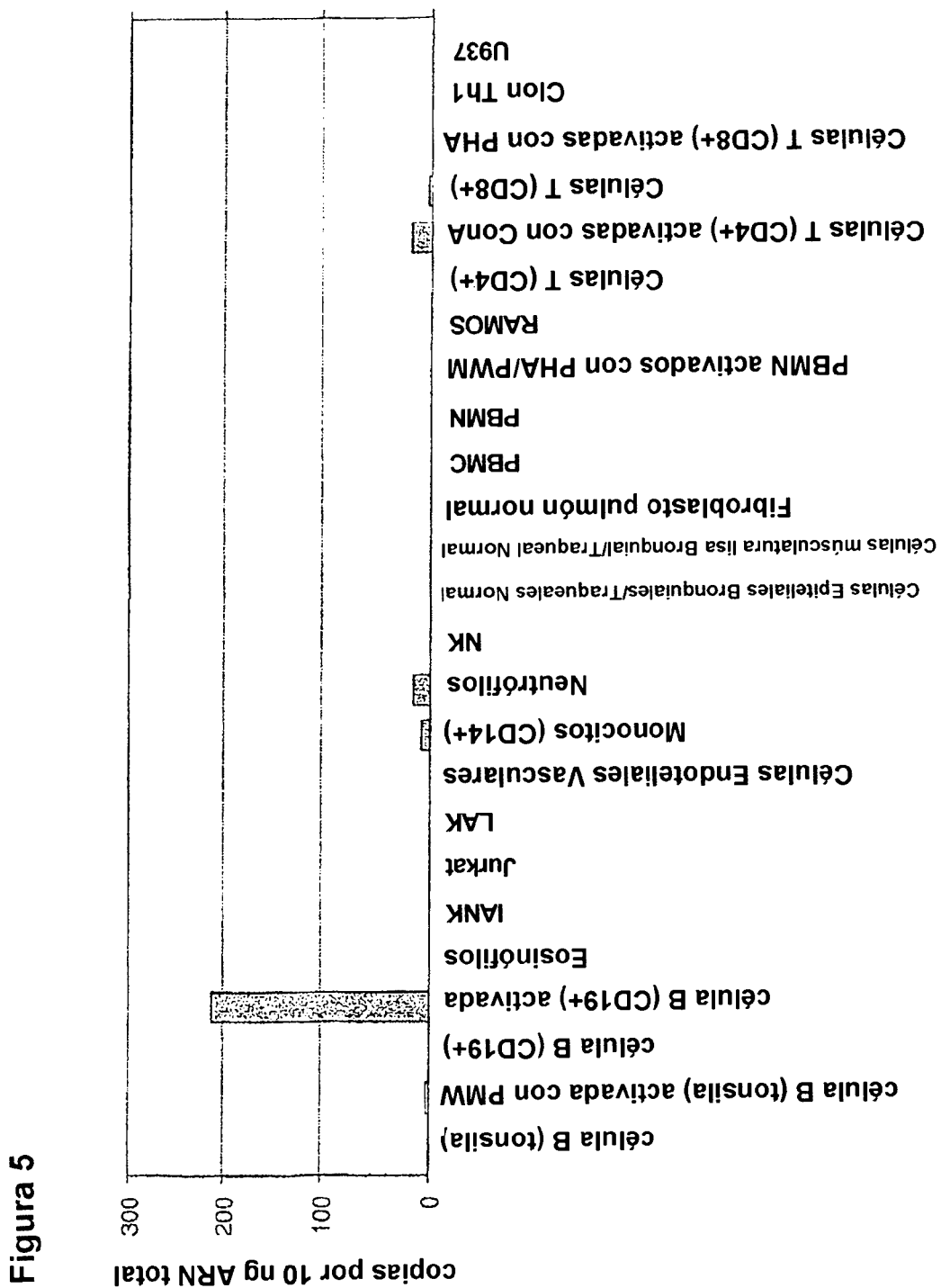


Figura 6

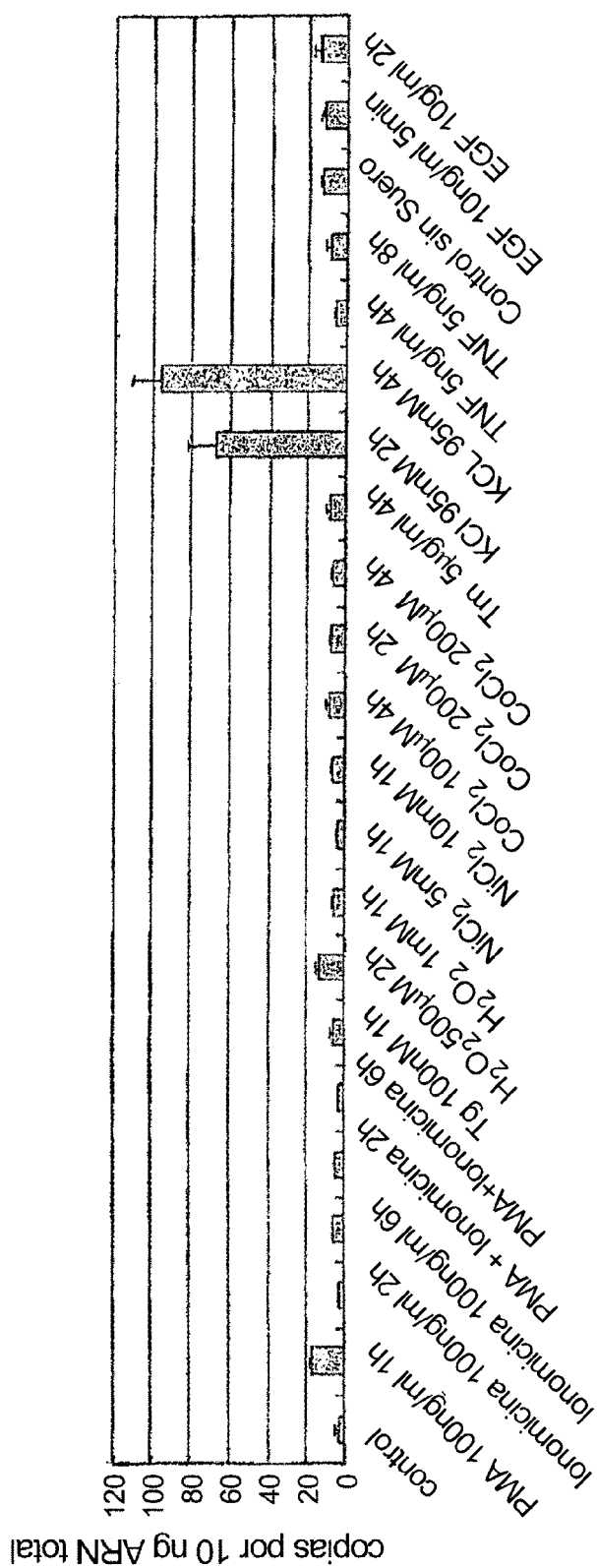
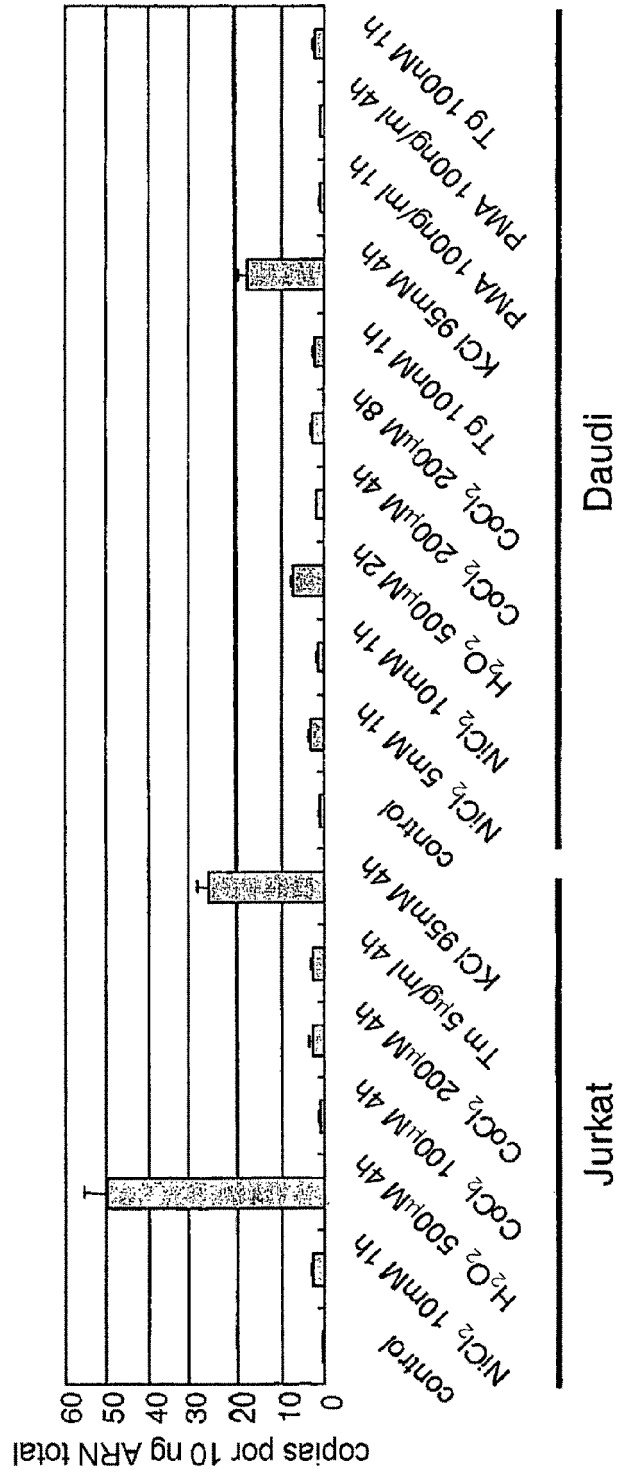


Figura 7



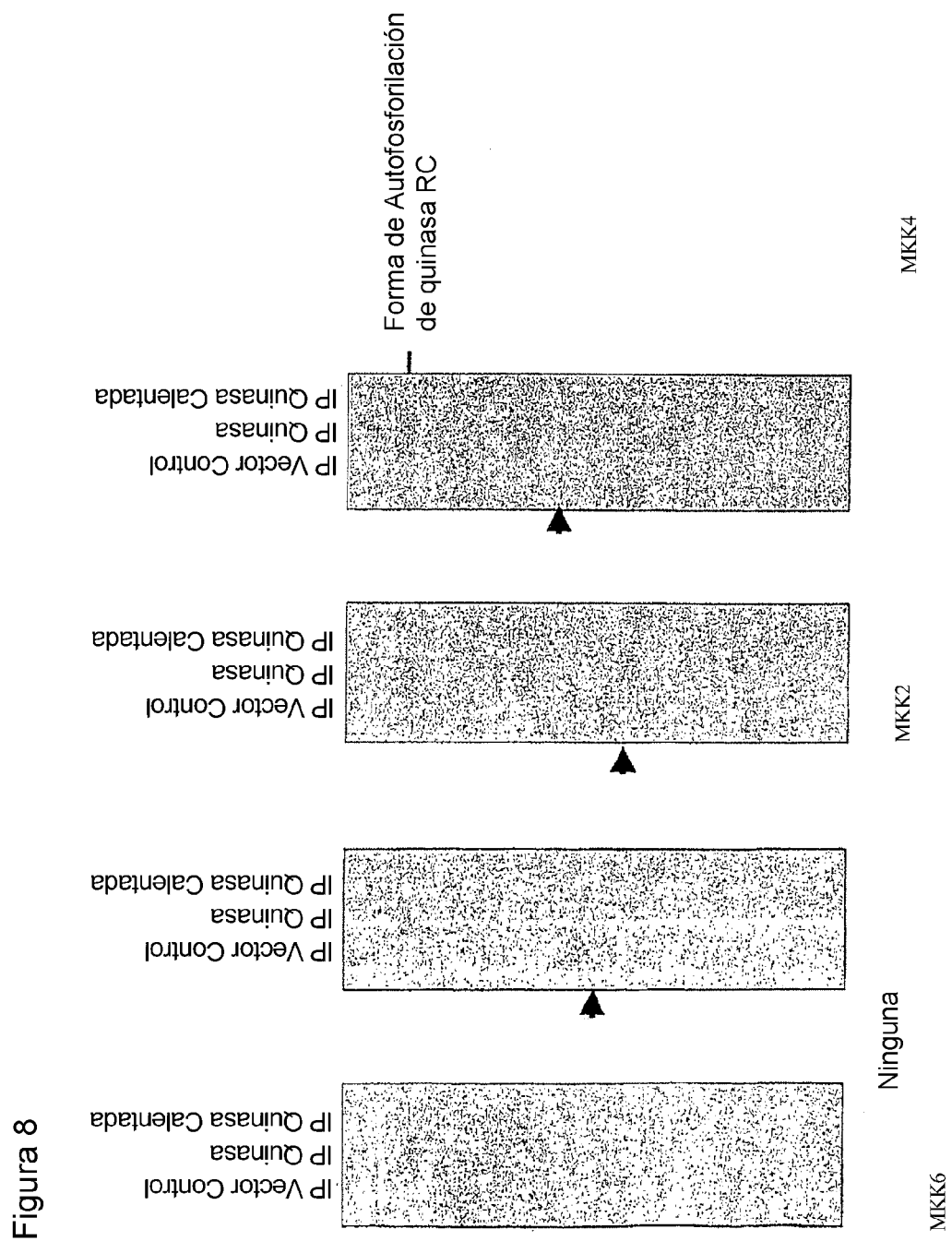


Figura 9

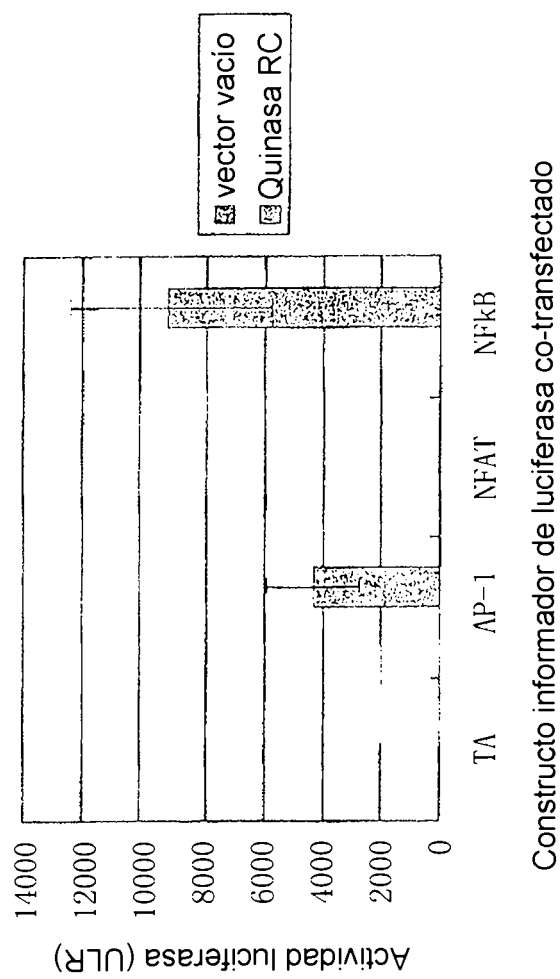
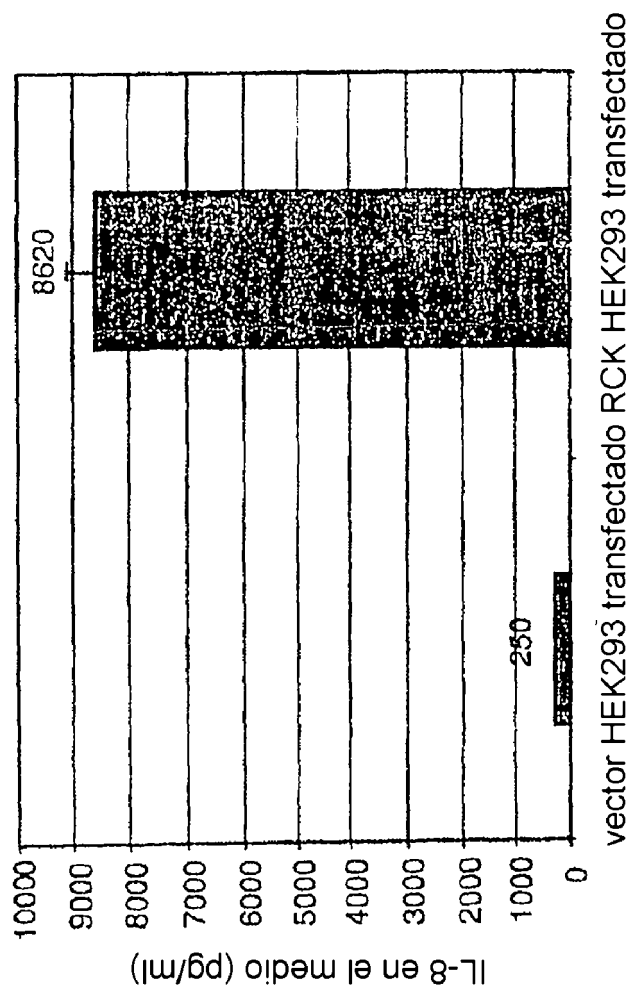


Figura 10



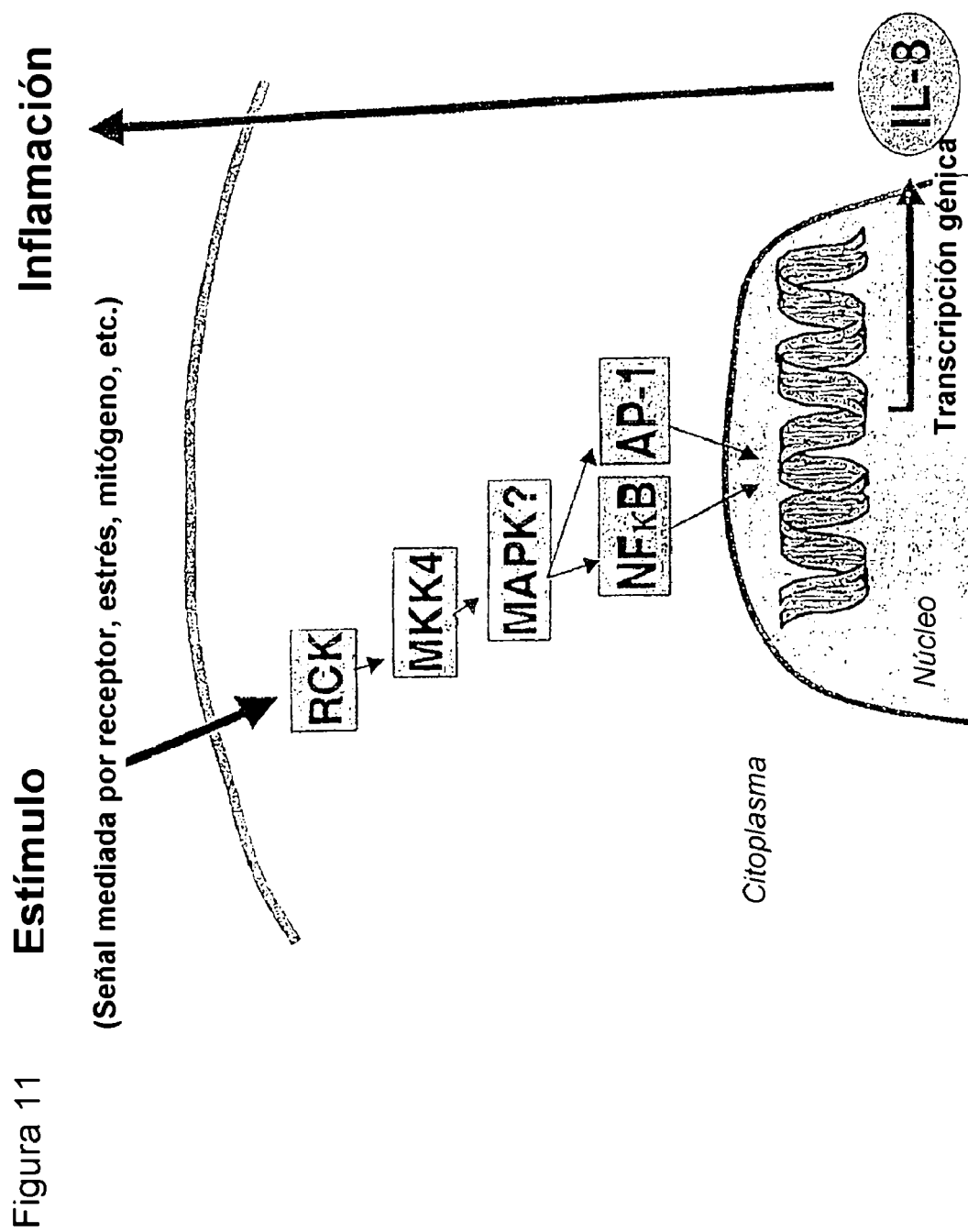


Figura 11

ES 2 347 247 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Bayer AG

5 <120> REGULACIÓN DE UNA QUINASA NOVEDOSA, QUINASA REGULADA EN LA EPOC (QUINASA RC)

<130> Quinasa Regulada en la EPOC

10 <140>

<141>

<160> 14

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 3719

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

```

ttcaaagaaa cagcagcttt tggacatttt aatgagttct atgccaaaac cagaaagaca 60
tgctgagtca ttgcttgaca tttgtcatga tacaaactct tctccaactg atttgatgac 120
agttaccaaa aatcaaaaaca tcatcttgca aagcatcagc agaagtgagg agttcgacca 180
agatgggtgac tgcagtcatt ccacactggg taatgaagaa gaagatccca gtgggtggtag 240
acaggactgg caaccagga cagaagagtt ttcgacctct catatgaagt acagtggccg 300
aagcatcaag ttccttotgc caccactgtc actcttgccc acgcatctg gtgtccttac 360
tattccccc aaacacaagt ttccaaaaga aaaagaaaga aacattccaa gtctcacatc 420
ttttgtgctt aagctctcag tgtctgttcg tcaatctgat gagctcagcc catcaaacga 480
gcctccggga gccctagtta agtcgttgat ggatccgact ctcaggtctt ctgatggctt 540
catttgggtca agaacaatgt gctcttttcc taagactaac catcacaggg aatgcctgga 600
gaaggaggaa aactggaaat ccaaggaaat agaagaatgt aacaaaatg aaatcactca 660
ctttgaaaaa gggcagcttt tgggtcttt tgagaatttg aaggaaggca atattcctgc 720
agttagggaa gaggatattg actgccatgg tagtaaaacg cgaaaacctg aagaagagaa 780
ctctcaatat ctttcatcaa gaaagaatga gaggtcagta gccaaaaact atgaacaaga 840
tccagaataa gtatgtacca ttccaagcaa gttccaagaa acccagcatt cagaataaac 900
tccaagccag gatgaagaga tgagaataaa taagctgct tcaaaaagag tttcattaca 960
taaaaatgaa gcaatggaac caaacaatat tttagaagag tgtactgtac ttaaaagctt 1020
atccagtgta gtccttgatg accccattga taactccca gaaggttcta gcagctgga 1080
gacaaacata aaaaatcaaa tagcagaaag agccaacca gaaatgagta ggtgggtgcc 1140
ttcatccac atcaccttc ctgtggatgg accgccaag gaaccagtga tagccaacc 1200
aagcctccaa acaagaaagg gaaccattca taacaaccat agtgtcaaca tacctgtaca 1260
ccaagaaaaa gacaagcata agatgaattc ccataggagt aagttggatt caaagaccaa 1320
gacaagtaag aagcacctc agaattttgt gatttctact gaaggtccca ttaagcctac 1380
catgcataaa accagcataa aaacacaaat ttcccggct ttgggacttg tggaccccag 1440
gccttggcaa ttgcccaggt ttcaaaagaa aatgccacag atagcaaaag agcaatcaac 1500
tcaccggact cagaaaccta aaaagcaatc atttctctgc atctgtaaaa atccaggaac 1560
acagaagtca tgtgttctc tctctgttca accgacagag ccaagactaa attacctaga 1620
tcttaagtat agtgateatg tcaagaaat caattcaact gctaattggac ctggaatcta 1680
tgaaatgttt gggaccctgt tttattgtca tbtgcgagag actgaaaggg atgaaaacac 1740
gtattaccgt gagatatgtt cggctccatc aggcagcgt atcaccaata aatgtcgate 1800
ttcacacagt gagaggaaga gcaatatcag aacaagactt tctcagaaaa aaacacatat 1860
gaaatgcca aagacttcat ttggcattaa acaagagcac aaagtcttaa tttctaagaa 1920
aaagagttcc aaggctgtac atagcaacct acatgacatt gaaaatggtg atggatattc 1980
agaaccagac tggcagataa agtcttcagg aaatgagttt ctatcttcca aagatgaaat 2040
tcatcccagtg aacttggctc agacacctga gcagtccatg aaacagaatg aattccctcc 2100
tgtctcagat ttatccattg ttgaagaagt ttctatggaa gagtctactg gtgatagaga 2160
catttctaac aatcaaatc tcaccacaag cctcagagat ctgcaagaac ttgaagagct 2220
acatcaccag atcccattta tccttcaga agcacgtgg gcagtgcca gtgagaagaa 2280
ttetaacaag tatgtacagc aagaaaagca gaatacagca tctcttagta aagtaaatgc 2340
cagccgaatt ttaactaatg atctagagtt tgatagttt tcagatcact ctaaaacact 2400
tacaatttc tctttccaag caaaaacaaga aagtgcactt tcccagacat atcaatattg 2460
ggtacattat ttggatcatg atagtttagc aataagtca atcacatatc aaatgtttgg 2520
aaaaacctta agtggcacia attcaatttc ccaagaaatt atggactctg taataaatga 2580
agaattgaca gatgaactat taggttgtct agctgcagaa ttattagctc ttgatgagaa 2640
agataacaac tcttgccaaa aaatggcaaa tgaacagat cctgaaaacc taactcttgt 2700
cctcagatgg agaggaagta ccccaaaaaga aatgggcaga gagacaacaa aagtcaaaat 2760

```

ES 2 347 247 T3

5
10
15

```

acagagggcat agtagtgggc tcaggatata tga.cagggag gagaaatttc tcattctcaa 2820
tgaaaagaag atattttctg aaaatagttt aaagtctgaa gaacctatcc tatggacca 2880
gggtgagatt cttggaaagg gagcctacgg cAcagtatac tgtgggtctca ctagtcaagg 2940
acagctaata gctgtaaaac aggtggcctt gga.tacctct aataaattag ctgctgaaaa 3000
ggaataccgg aaactacagg aagaagtaga tttgctcaa gcaactgaaac atgtcaacat 3060
tgtggcctat ttggggacat gcttgcaaga ga.cactgtg agcattttca tggagtttgt 3120
tcctgggtggc tcaatctcta gtattataaa ccgtrtttggg ccattgcctg agatgggtgtt 3180
ctgtaaatat acgaaacaaa tacttcaagg tgt.tgcttat ctccatgaga actgtgtggt 3240
acatcgcgat atcaaaggaa ataatgttat gct.catgcca actggaataa taaagctgat 3300
tgactttggc ttgtccaggc gtttggcctg ggc.aggttta aatggcacc acagtgacat 3360
gcttaagtcc atgcatggga ctccatattg gat.ggcccc gaagtcacat atgagtctgg 3420
ctatggacgg aatcagata tctggagcat tggtrtact gtgtttgaga tggctacagg 3480
gaagcctcca ctggctcca tggacaggat ggc.cgccatg ttttacatcg gagcacacc 3540
agggctatg cctcctttac cagaccatt ct.cagaaaat gcagcagact ttgtgocgat 3600
gtgctgacc agggaccagc atgagcgacc tct.tgctctc cagctcctga agcactcctt 3660
cttggagaga agtcactgaa tatacatcaa gactttcttc ccagttccac tgcagatgc 3719

```

<210> 2
<211> 3338
20 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

25
30
35
40
45
50
55
60
65

```

ttogaccaag atggtgactg cagtcattcc acaactggta atgaagaaga agatcccagt 60
ggtagtagac aggactggca acccaggaca gaagggtgtg agatcactgt aacttttcca 120
agagatgtca gtcctcccca agaaatgagc caagaagact taaaagaaaa gaatctgata 180
aactcatcgc ttcaagaatg ggcacaagca cat.gcagttt ctcatccaaa tgaatataga 240
acgggtggagc tcaggaaaaa gaagctgacc atg.cggccct tagttttgca aaaagaggaa 300
agttccaggg agctctgcaa tgtgaacttg ggc.tttttgc taccaagatc ttgtttagaa 360
ctgaacattt ccaagctgtg taaccagaaa gct.gctcttc atttctgaa gggatgcaa 420
agaaaatctg aagagttttc gacctctcat atg.aagtaca gtggccgaag catcaagttc 480
cttctgcoac cactgtcact cttgcccagc cga.ctggtg tccttactat ccccaaaaat 540
cacaagtttc caaaagaaa agaaagaaac att.ccaagtc tcacatcttt tgtgtcaag 600
ctctcagttg ctctgtgca atctgtgag ct.cagccat caaacgagcc tccgggagcc 660
ctagttaagt cgttgatgga tccgactctc aggtctctct atggcttcat ttgggtcaaga 720
aacatgtgct cttttctaa gactaacat cac.aggcaat gcctggagaa ggaggaaaac 780
tggaaatcca aggaaataga agaatgtaac aa.aattgaaa tcaactactt tgaaaaagg 840
cagttcttgg tgtcttttga gaatttgaag gaaggcaata ttctgcagt tagggaagag 900
gatattgact gccatggtag taaaacgcga aa.cctgaag aagagaactc tcaatatctt 960
tcatcaagaa agaattgagc ttcagtagcc aa.aaactatg aacaagatcc agaaatagta 1020
gtaccattc caagcaagtt ccaagaaacc cag.cattcag aaataactcc aagccaggat 1080
gaagagatga gaaataataa agctgcttca aa.agagttt cattacataa aaatgaagca 1140
atggaaccaa acaatatttt agaagagtgt act.gtactta aaagcttatc cagtgtagtc 1200
tttgatgacc ccattgataa actcccagaa ggt.tgtagca gcatggagac aaacataaaa 1260
atataatagc cagaagagc caaccagaa at.gagtagga tgggtgctct tatccacatc 1320
accttccctg tggatggaag cccaaggaa cc.agtgatag ccaaaccaag cctccaaca 1380
agaaagggaa ccattcataa caaccatagt gt.caacatac ctgtacacca agaaaatgac 1440
aagcataaga tgaattccca taggagtaag tt.ggattcaa agaccaagac aagtaagaag 1500
acacctcaga attttgtgat ttctactgaa ggt.cccatta agcctacat gcataaaaacc 1560
agcataaaaa cacaaatttt cccggctttg gga.cttgtgg accccaggcc ttggcaattg 1620
cccagtttc aaaagaaaat gccacagata gc.aagaaagc aatcaactca ccggactcag 1680
aaacctaaaa agcaatcatt tcttgcctc tg.taaaaatc caggaacaca gaagtcatgt 1740
gttctctct ctgttcaacc gacagagcca ag.actaaat acctagatct taagtatagt 1800
gatattgtca aagaaatcaa ttcaactgct aa.tggacctg gaatctatga aatgtttggg 1860
accctgttt atgtcatgt cccatcagg cagacgtatc ga.aaggatg aaaacacgta ttaccgtgag 1920
atatgttcgg ctccatcagg ac.caataaat gtcgatcttc acacagtgag 1980
aggaagagca atatcagaac aagactttct cag.aaaaaaa cacatatgaa atgcccaag 2040
acttcatttg gcattaaaca agagcacaaa gt.cttaattt ctaaagaaaa gagttccaag 2100
cgtgtacata gcaacctaca tgacattgaa aa.tgggtgat gtatttcaga accagactgg 2160
gatcaaatg ctccagaaa tgagtttcta tc.ttccaaag atgaaattca tcccataaac 2220
ttggctcaga cacctgagca gtccatgaaa cagaatgaat tcctctctgt ct.cagattta 2280
tccattgttg aagaagtttc tatggaagag tc.tactggtg atagagacat ttctaacaat 2340
caataactca ccacaagcct cagagatctg ca.agaacttg aagagctaca tcaccagatc 2400
ccattttacc cttcagaaga cagctgggca gt.cccagtg agaagaattc taacaagtat 2460
gtacagcaag aaaagcagaa tacagcatct ct.tagtaag taaatgccag ccgaatttta 2520
actaatgatc tagagtttga tagtgtttca ga.tcactcta aaacacttac aaatttctct 2580
ttccaagcaa aacaagaaag tgcactttcc ca.gacatata aatattgggt acattatttg 2640

```

ES 2 347 247 T3

5 gatcatgata gtttagcaaa taagtcaatc aCatatcaaa tgtttgghaaa aaccttaagt 2700
 ggcacaaatt caatttccca agaaattatg gactctgtaa ataatgaaga attgacagat 2760
 gaactattag gttgtctagc tgcagaatta ttagctcttg atgagaaaga taacaactct 2820
 tgccaaaaaa tggcaaatga aacagatcct gaaaaaccta atcttgtcct cagatggaga 2880
 ggaagtaccc caaaagaat gggcagagag acaacaaaag tcaaaatata gaggcatagt 2940
 agtgggctca ggatatatga cagggaggag aaatctctca tctcaaatga aaagaagata 3000
 ttttctgaaa atagttttaa gtctgaagaa cctatcctat ggaccaaggg tgagattctt 3060
 ggaaggggag cctacggcac agtatactgt agtctcacta gtcaaggaca gctaatagt 3120
 gtaaaacagg tggctttgga tacctctaat aaattagctg ctgaaaagga ataccggaa 3180
 ctacaggaag aagtagattt gctcaagca ctgaaacatg tgccctgacca gggaccagca 3240
 tgagcgacct tctgtctctc agctcctgaa gcaactcctc ttggagagaa gtcactgaat 3300
 atacatcaag actttctctc cagttccact gcagatgc 3338

<210> 3

15 <211> 3510

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 3

25 ttcaagaaa cagcagcttt tggacatttt aatgagttct atgccaaaac cagaaagaca 60
 tgctgagtea ttgcttgaca tttgtcatga tacaaaactct tctccaactg atttgatgac 120
 agttaccaaa aatcaaaaaca tcatcttgca aagcatcagc agaagtgagg agttcgacca 180
 agatggtgac tgcagtcatt ccacactggg taatgaagaa gaagatccca gtgggtggtag 240
 acaggyatgg caaccagga cagaaggtgt tgagatcact gtaacttttc caagagatgt 300
 cagtcctccc caagaaatga gccaaaga cttaaaagaa aagaatctga taaactcatc 360
 gcttcaagaa tgggcacaag cacatgcagt tctctatcca aatgaaatag aaacgggtgga 420
 gctcaggaaa aagaagctga ccacgccc cctagttttg caaaaagagg aaagttccag 480
 ggagctctgc aatgtgaact tgggcttttt gctaccaaga tcttgtttag aactgaacat 540
 30 ttccaagtct gtaaccagag aagatgctcc tcaatttctg aaggagcagc aaagaaaatc 600
 tgaagagttt tgcacctctc atatgaagta cagtgggcga agcatcaagt tcttctgccc 660
 accactgtca ctcttgccca cgcgatctgg tctccttact atccccaaa atcacaagt 720
 tccaaaagaa aaagaagaa acattccaag tctcacatct tttgtgccta agctcaggt 780
 gtctgtctgt caatctgatg agctcagccc atcaaacgag cctccgggag cctcagttaa 840
 35 gtctgtgatg gatccgactc tcaggtcttc tgatggcttc atttgggtcaa gaacatgtg 900
 ctcttttctt aagactaacc atcacaggca atgcctggag aaggaggaaa actggaaatc 960
 caaggaataa gaagaatgta acaaaattga aatcactcac tttgaaaaag ggcagctctt 1020
 ggtgtctttt gagaatttga aggaaggcaa tattectgca gttaggggag aggatattga 1080
 ctgccatggt agtaaaacgc gaaaacctga agaagagaac tctcaatate tttcatcaag 1140
 aaagaatgag agttcagtag ccaaaaacta tgaacaagat ccagaaatag tatgtaccat 1200
 40 tccaagcaag ttccaagaaa ccagcattc agaaataact ccaagccagg atgaagagat 1260
 gagaataaat aaagctgctt caaaaagagt tctattacat aaaaatgaag caatggaacc 1320
 aaacaatatt ttagaagagt gtactgtact taaaagctta tccagtgtag tctttgatga 1380
 ccccattgat aaactcccag aaggttgtag cagcatggag acaaacataa aaatatcaat 1440
 agcagaaaga gccaaaccag aaatgagtag gatgggtgct cttatccaca tcacctccc 1500
 45 tgtggatgga agccccagg aaccagtgat agccaaacca agcctccaaa caagaaaggg 1560
 aaccatctat aacaaccata gtgtcaacat acctgtacac caagaaaatg acagcataa 1620
 gatgaattcc cataggagta agttggattc aagaccaag acaagtaaga acacacctca 1680
 gaattttgtg atttctactg aaggtcccat taagcctacc atgcataaaa ccagcataaa 1740
 aacacaaatt ttcccggctt tgggacttgt ggacccccagg ccttggcaat tgcccagggt 1800
 tcaaaaagaaa atgcccacaga tagcaaaagaa gcaatcaact caccggactc agaaaacctaa 1860
 50 aaagcaatca tttccttgca tctgtaaaaa tcaggaaca cagaagtcac gtgttccctc 1920
 ctctgttcaa ccgacagagc caagactaaa t tacctagat cttaaagtata gtgatattgt 1980
 caaagaatc aattcaactg ctaatggacc tgggaatctat gaaatgtttg ggaccctgt 2040
 ttattgtcat gtgcgagaga ctgaaagggg tgaaaacacg tattaccgtg agatatgttc 2100
 ggctccatca ggcagacgta tcaccaataa atgtcgatct tcacacagtg agaggaagag 2160
 caatatcaga acaagacttt ctcagaaaaa acacatatg aaatgcccac agacttcatt 2220
 55 tggcatata caagagcaca aagtcttaat ttctaagaa aagagttcca agcctgtaca 2280
 tagcaaccta catgacattg aaaaagggtga tgggtatttca gaaccagact ggcagataaa 2340
 gtcttcagga aatgagtttc tatcttccaa agatgaaatt catcccatga acttggctca 2400
 gacacctgag cagtcctatg aacagaatga atctccctct gtctcagatt tatccattgt 2460
 tgaagaggtt tctatgggag agtctactgg tgatagagac atttcttaaca atcaaatct 2520
 caccacaagc ctcagagatc tgcaagaact tgaagagcta catcaccaga tcccatttat 2580
 60 ccctccagaa gacagctggg cagtgcccag tggagaagaat tctaacaagt atgtcagca 2640
 agaaaagcag aatacagcat ctcttagtaa agtaaatgcc agccgaattt taactaatga 2700
 tctagagttt gatagtgttt cagatcactc taaaacactt acaaatctct ctttccaage 2760
 aaaacaagaa agtgcactct cccagacata tcaattatgg gtacattatt tggatcatga 2820
 tagtttagca aataagtcac tcacatatca aatgtttgga aaaaccttaa tgggcacaaa 2880

65

ES 2 347 247 T3

5
10

ttcaatttcc	caagaaatta	tggactctgt	aaataatgaa	gaattgacag	atgaactatt	2940
aggttgtcta	gctgcagaat	tattagctct	tgatgagaaa	gataacaact	cttgccaaaa	3000
aatggcaaat	gaaacagatc	ctgaaaacct	aaatcttgtc	ctcagatgga	gaggaagtac	3060
cccaaaagaa	atgggcagag	agacaacaaa	agtcaaaaata	cagaggcata	gtagtgggct	3120
caggatata	gacagggagg	agaaatttct	catctcaaat	gaaaagaaga	tattttctga	3180
aaatagttta	aagtctgaag	aacctatcct	atggaccaag	ggtgagattc	ttggaaaggg	3240
agcctacggc	acagtatact	gtggtctcac	tagtcaagga	cagctaatag	ctgtaaaaca	3300
ggtggtcttg	gatacctcta	ataaattagc	tgctgaaaag	gaataccgga	aactacagga	3360
agaagtagat	ttgctcaaag	ctactgaaaca	tgctcctgac	cagggaccag	catgagcgc	3420
cttctgctct	ccagctcctg	aagcactcct	tcttggagag	aagtactga	atatacatca	3480
agactttctt	cccagttcca	ctgcagatgc				3510

<210> 4
<211> 4058
15 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 4

25
30
35
40
45
50
55
60
65

ttcaaaagaaa	cagcagcttt	tggacatttt	aatgagttct	atgccaaaac	cagaagagaca	60
tgctgagtca	ttgcttgaca	tttgtcatga	tacaaaactct	tctccaactg	atttgatgac	120
agttaccaaa	aatcaaaaca	tcactttgca	aagcatcagc	agaagtgagg	agttcgacca	180
agatggtgac	tgacgtcatt	ccacactggt	taatgaagaa	gaagatccca	gtggtggtag	240
acaggactgg	caaccagga	cagaagggtgt	tgagatcact	gtaacttttc	caagagatgt	300
cagtcctccc	caagaaatga	gccaaagaaga	cttaaaagaa	aagaatctga	taaaactcatc	360
gcttcaagaa	tgggcacaag	cacatgcagt	ttctcatcca	aatgaaatag	aaacgggtgga	420
gctcaggaaa	aagaagctga	ccatgctggc	cttagttttg	caaaaagagg	aaagttccag	480
ggagctctgc	aatgtgaact	tgggcttttt	gctaccaaga	tcttgttttag	aactgaacat	540
ttccaagtct	gtaaccagag	aagatgctcc	tcattttctg	aaggagcagc	aaagaaaatc	600
tgaagagttt	tcgacctctc	atatgaagta	cagtgccga	agcatcaagt	tccttctgcc	660
accactgtca	ctcttgccca	cgcatctgg	tgctcttact	atccccaaa	atcacaagtt	720
tccaaaagaa	aaagaaagaa	acattccaag	tctcacatct	tttgtgccta	agctctcagt	780
gtctggttca	caatctgatg	agctcagccc	atcaaacgag	cctccgggag	ccatagttaa	840
gtcgttgatg	gatccgactc	tcaggtcttc	tgatggcttc	atttgggtcaa	gaaacatgtg	900
ctcttttctc	aagactaacc	atcacaggca	atgcctggag	aaggaggaaa	actggaaatc	960
caaggaaata	gaagaatgta	acaaaattga	aatcactcac	tttgaaaaag	ggcagctctt	1020
ggtgtctttt	gagaatttga	aggaaggcaa	tattcctgca	gtaggggaa	aggtatttga	1080
ctgccatggt	agtaaaacgc	gaaaacctga	agaagagAAC	tctcaatatc	tttcatcaag	1140
aaagaatgag	agttcagtag	ccaaaaacta	tgaacaagat	ccagaaatag	tatgtaccat	1200
tcacaagcaag	ttccaagaaa	cccagcatc	agaaataact	ccaagccagg	atgaagccat	1260
gagaataaat	aaagctgctt	caaaaagagt	ttcattacat	aaaaatgaag	caatggaacc	1320
aaacaatatt	ttagaagagt	gtactgtact	taaaagctta	tccagtgtag	tcctttgatga	1380
ccccattgat	aaactcccag	aagttgtgat	cagcatggag	acaaacataa	aaatatcaat	1440
agcagaaaga	gccaaccacg	aaatgagtag	gatggtgcct	cttatccaca	tcaccttccc	1500
tgtggatgga	agccccagg	aaccagtgat	agccaaacca	agcctccaaa	caagaaaggg	1560
aaccattcat	aacaaccata	gtgtcaacat	acctgtacac	caagaaaatg	acaagcataa	1620
gatgaattcc	cataggagta	agttggattc	acaagcaag	acaagtaaga	agacacctca	1680
gaattttgtg	atctctactg	aaggtcccat	taagcctacc	atgcataaaa	ccagcataaa	1740
aacacaaatt	ttcccggctt	tgggacttgt	ggaccccagg	ccttggcaat	tgcccagggt	1800
tcaaaagaaa	atgccacaga	tagcaaaagaa	gcaatcaact	caccggactc	agaaacctaa	1860
aaagcaatca	tttcccttga	tctgtaaaaa	tccaggaaca	cagaagtcac	gtgttctctt	1920
ctctgttcaa	ccgacagagc	caagactaaa	ttacctagat	cttaagtata	gtgatatgtt	1980
caaagaaatc	aattcaactg	ctaattggacc	tggaaatctat	gaaatgtttg	ggaccccctgt	2040
ttattgtcat	gtgcgagaga	ctgaaagggg	tgaaaacacg	tattaccgtg	agatatgttc	2100
ggctccatca	ggcagacgta	tcaccaataa	atgtcgatct	tcacacagtg	agaggaagag	2160
caatatcaga	acaagacttt	ctcagaaaaa	aacacatatg	aaatgcccaa	agacttcatt	2220
tggcattaaa	caagagcaca	aagtcttaat	ttctaagaaa	aagagttcca	aggctgtaca	2280
tagcaacctc	catgacattg	aaaatgggtga	tggtatttca	gaaccagact	ggcagataaa	2340
gtcttcagga	aatgagtttc	tatcttccaa	agatgaaatt	catcccatga	acttgggtca	2400
gacacctgag	cagtcacatga	aacagaatga	attccctcct	gtctcagatt	tatccattgt	2460
tgaagaagtc	tctatggaag	agtctactgg	tgatagagac	atcttctaaca	atcaaatact	2520
caccacaagc	ctcagagatc	tgcagaagact	tgagaagact	catcaccaga	tccacttat	2580
cccttcagaa	gacagctggg	cagtgcccag	tgagaagaat	tctaacaagt	atgtacagca	2640
agaaaagcag	aatacagcat	ctcttagtaa	agtaaaatgcc	agccgaattt	taactaaatg	2700
tctagagttt	gatagtgttt	cagatcactc	taaaacactt	acaatttctt	ctttccaagc	2760
aaaacaagaa	agtgcatctt	cccagacata	tcaatattgg	gtacattatt	tggatcatga	2820
tagtttagca	aataagtcaa	tcacatatca	aatgtttgga	aaaaccttaa	gtggcacaaa	2880
ttcaatttcc	caagaaatta	tggactctgt	aaataatgaa	gaattgacag	atgaactatt	2940

ES 2 347 247 T3

5
10
15

```

aggttgctcta gctgcagaat tattagctct tgatgagaaa gataacaact cttgcoaaaa 3000
aatggcaaat gaaacagatc ctgaaaacct aaatcttgct ctcagatgga gaggaagtac 3060
cccaaaagaa atgggcagag agacaacaaa agtcaaaata cagaggcata gtagtgggct 3120
caggatataat gacagggagg agaaatttct catctcaaat gaaaagaaga tattttctga 3180
aatagttta agtctgaag aacctatcct atggaccaag ggtgagattc ttggaaaggg 3240
agcctacggc acagtatact gtggctcctac tagtcaagga cagctaatag ctgtaaaaca 3300
ggtggctttg gatacctcta ataaattagc tgctgaaaag gaataccgga aactacagga 3360
agaagtagat ttgctcaaag cactgaaa.ca tegtcaacatt gtggcctatt tggggacatg 3420
cttgcaagag aacactgtga gcattttcat ggagtttgtt cctgggtggct caatctctag 3480
tattataaac cgttttgggc cattgcctga gatggtgttc tgtaaatata cgaacaaaat 3540
acttcaaggt gttgcttacc tccatgagaa ctgtgtggta catcgcgata tcaagggaaa 3600
taatgttatg ctcatgcaa ctggaataat aaagctgatt gactttggct gtgccaggcg 3660
tttggcctgg caacccttaa atggcacc.ca cagtgcacatg cttaaagtcca tgcattggac 3720
tccatattgg atggccccag aagtcaccaa tgagtctggc tatggacgga aatcagatat 3780
ctggagcatt ggttgtactg tgtttgagat ggctacaggg aagcctccac tggctccat 3840
ggacaggatg ccgcctatgt tttacatcgg agcacaccga gggctgatgc ctctttacc 3900
agaccacttc tcagaaaatg cagcagactt tggcgcgatg tgctgacca ggcaccagca 3960
tgagcgacct tctgctctcc agctcctgaa gcactccttc ttggagagaa gtcactgaat 4020
atacatcaag actttcttcc cagttcca.ct gcagatgc 4058

```

<210> 5

20 <211> 1460

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 5

30
35
40
45

```

ttcaaaagaaa cagcagcttt tggacatttt aatgagttct atgccaaaac cagaaagaca 60
tgctgagtc aatgcttgaca tttgtcatga tacaaactct tctccaactg atttgatgac 120
agttaccaaa aatcaaaaaca tcatcttgca aagcatcagc agaagtgagg agttcgacca 180
agatgggtgac tgcagtcatt ccacactggc taatgaagaa gaagatccca gtgggtggtag 240
acaggactgg caaccagga cagaaggctgt tgagatcact gtaacttttc caagagatgt 300
cagtcctccc caagaaatga gccaaaga cttaaaagaa aagaatctga taaactcatc 360
gcttcaagaa tgggcacaag cacatgcagt ttctcatcca aatgaaatag aaacggtgga 420
gctcaggaaa aagaagctga ccatgcccgc cttagttttg caaaaagagg aaagtccag 480
ggagctctgc aatgtgaact tgggcttttt gctaccaaga tcttgtttag aactgaacat 540
ttccaagtct gtaaccagag aagatgctcc tcattttctg aaggagcagc aaagaaaatc 600
tgaagagttt tcgacctctc atatgaagta cagtggccga agcatcaaga ggcatagtag 660
tgggctcagg atatatgaca gggaggagaa atttctcatc tcaaatgaaa agaagatatt 720
ttctgaaaat agtttaaagt ctgaagaacc tatcctatgg accaaggtag atttgctcaa 780
agcactgaaa catgtcaaca ttgtggccta tttggggaca tgcttgcaag agaactgt 840
gagcattttc atggagtttg ttctgtgtgg ctcaatctct agtattataa accgtttttg 900
gccattgcct gagatgggtg tctgtaaaata tacgaaacaa atacttcaag gtgttgett 960
tctccatgag aactgtgtgg tacatcgcga tatcaagga aataatgta tgetcatgcc 1020
aactggaata ataaagctga ttgactttgg ctgtgccagg cgtttggcct gggcaggttt 1080
aaatggcacc cacagtgaca tgcttaagtc catgcatggg actccatatt ggatggcccc 1140
agaagtcac aatgagctg gctatggacg gaaatcagat atctggagca ttggtgttac 1200
tgtgtttgag atggctacag ggaagcctcc actggcttcc atggacagga tggccgcat 1260
gttttatcat ggagcacacc gaggctgrat gctccttta ccagaccact tctcagaaaa 1320
tgcagcagac tttgtgcga tgtgctgac cagggacag catgagcgac cttctgtctc 1380
ccagctcctg aagcactcct tcttggagag aagtcactga atatacatca agactttctt 1440
cccagttcca ctgcagatgc 1460

```

<210> 6

50 <211> 1604

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 6

60
65

```

ttcaaaagaaa cagcagcttt tggacatttt aatgagttct atgccaaaac cagaaagaca 60
tgctgagtc aatgcttgaca tttgtcatga tacaaactct tctccaactg atttgatgac 120
agttaccaaa aatcaaaaaca tcatcttgca aagcatcagc agaagtgagg agttcgacca 180
agatgggtgac tgcagtcatt ccacactggc taatgaagaa gaagatccca gtgggtggtag 240
acaggactgg caaccagga cagaaggctgt tgagatcact gtaacttttc caagagatgt 300
cagtcctccc caagaaatga gccaaaga cttaaaagaa aagaatctga taaactcatc 360
gcttcaagaa tgggcacaag cacatgcagt ttctcatcca aatgaaatag aaacggtgga 420
gctcaggaaa aagaagctga ccatgcccgc cttagttttg caaaaagagg aaagtccag 480

```

ES 2 347 247 T3

```

5  ggagctctgc aatgtgaact tgggcttttt gctaccaaga tcttgtttag aactgaacat 540
   ttccaagtct gtaaccagag aagatgctcc tcattttctg aaggagcagc aaagaaaatc 600
   tgaagagttt tcgacctctc atatgaagta cagtggccga agcatcaaga ggcatagtag 660
   tgggctcagg atatatgaca gggaggagaa atttctcatc tcaaatgaaa agaagatatt 720
10 ttctgaaaat agtttaaagt ctgaagaacc tatectatgg accaaggggtg agattccttg 780
   aaagggagcc tacggcacag tatactgtgg tctcactagt caaggacagc taatagctgt 840
   aaaacaggtg gctttggata cctctaataa attagctgct gaaaaggaat accggaaact 900
   acaggaagaa gtagatttgc tcaaagcact gaaacatgct aacattgtgg cctatttggg 960
   gacatgcttg caagagaaca ctgtgagcat ttctatggag ttgttctctg gtggctcaat 102 0
15 ctctagtatt ataaaccgtt ttgggccatt gcctgagatg gtgttctgta aatatacгаа 108 0
   acaataactt caaggtgttg cttatctcca tgagaactgt gtggtacatc gcgatataca 114 0
   aggaaataat gttatgctca tgccaactgg aataataaag ctgattgact ttggctgtgc 120 0
   caggcgtttg gcctgggcag gtttaaattgg cacccacagt gacatgctta agtccatgca 126 0
   tgggactcca tattggatgg ccccagaagt catcaatgag tctggctatg gacggaaatc 132 0
   agatattctg agcattgggt gtactgtggt tgagatggct acaggggaagc ctccatggc 138 0
20 ttccatggac aggatggcag ccatgtttta catcggagca caccgagggc tgatgcctcc 144 0
   tttaccagac cacttctcag aaaatgcagc agactttgtg cgcatgtgcc tgaccagggg 150 0
   ccagcatgag cgacttctg ctctccagct cctgaagcac tccttcttgg agagaagtca 156 0
   ctgaatatac atcaagactt tcttccagct tccactgcag atgc 160 4

```

```

20 <210> 7
   <211> 1225
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens
25 <400> 7

```

```

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

```

ES 2 347 247 T3

5 Gln Ser Leu Val Ser Phe Glu Asn Leu Lys Glu Gly Asn Ile Pro Ala
 225 230 235 240
 Val Arg Glu Glu Asp Ile Asp Cys His Gly Ser Lys Thr Arg Lys Pro
 245 250 255
 10 Glu Glu Glu Asn Ser Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Lys Asn Glu Ser Ser
 260 265 270
 Val Ala Lys Asn Tyr Glu Gln Asp Pro Glu Ile Val Cys Thr Ile Pro
 275 280 285
 15 Ser Lys Phe Gln Glu Thr Gln His Ser Glu Ile Thr Pro Ser Gln Asp
 290 295 300
 Glu Glu Met Arg Asn Asn Lys Ala Ala Ser Lys Arg Val Ser Leu His
 305 310 315 320
 20 Lys Asn Glu Ala Met Glu Pro Asn Asn Ile Leu Glu Glu Cys Thr Val
 325 330 335
 Leu Lys Ser Leu Ser Ser Val Val Phe Asp Asp Pro Ile Asp Lys Leu
 340 345 350
 25 Pro Glu Gly Cys Ser Ser Met Glu Thr Asn Ile Lys Ile Ser Ile Ala
 355 360 365
 Glu Arg Ala Lys Pro Glu Met Ser Arg Met Val Pro Leu Ile His Ile
 370 375 380
 30 Thr Phe Pro Val Asp Gly Ser Pro Lys Glu Pro Val Ile Ala Lys Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Gln Thr Arg Lys Gly Thr Ile His Asn Asn His Ser Val Asn
 405 410 415
 35 Ile Pro Val His Gln Glu Asn Asp Lys His Lys Met Asn Ser His Arg
 420 425 430
 Ser Lys Leu Asp Ser Lys Thr Lys Thr Ser Lys Lys Thr Pro Gln Asn
 435 440 445
 40 Phe Val Ile Ser Thr Glu Gly Pro Ile Lys Pro Thr Met His Lys Thr
 450 455 460
 Ser Ile Lys Thr Gln Ile Phe Pro Ala Leu Gly Leu Val Asp Pro Arg
 465 470 475 480
 45 Pro Trp Gln Leu Pro Arg Phe Gln Lys Lys Met Pro Gln Ile Ala Lys
 485 490 495
 Lys Gln Ser Thr His Arg Thr Gln Lys Pro Lys Lys Gln Ser Phe Pro
 500 505 510
 50 Cys Ile Cys Lys Asn Pro Gly Thr Gln Lys Ser Cys Val Pro Leu Ser
 515 520 525
 Val Gln Pro Thr Glu Pro Arg Leu Asn Tyr Leu Asp Leu Lys Tyr Ser
 530 535 540
 55 Asp Met Phe Lys Glu Ile Asn Ser Thr Ala Asn Gly Pro Gly Ile Tyr
 545 550 555 560
 60 Glu Met Phe Gly Thr Pro Val Tyr Cys His Val Arg Glu Thr Glu Arg
 565 570 575

65

ES 2 347 247 T3

Asp Glu Asn Thr Tyr Tyr Arg Glu Ile Cys Ser Ala Pro Ser Gly Arg
 580 585 590
 5 Arg Ile Thr Asn Lys Cys Arg Ser Ser His Ser Glu Arg Lys Ser Asn
 595 600 605
 Ile Arg Thr Arg Leu Ser Gln Lys Lys Thr His Met Lys Cys Pro Lys
 610 615 620
 10 Thr Ser Phe Gly Ile Lys Gln Glu His Lys Val Leu Ile Ser Lys Glu
 625 630 635 640
 Lys Ser Ser Lys Ala Val His Ser Asn Leu His Asp Ile Glu Asn Gly
 645 650 655
 15 Asp Gly Ile Ser Glu Pro Asp Trp Gln Ile Lys Ser Ser Gly Asn Glu
 660 665 670
 Phe Leu Ser Ser Lys Asp Glu Ile His Pro Met Asn Leu Ala Gln Thr
 675 680 685
 20 Pro Glu Gln Ser Met Lys Gln Asn Glu Phe Pro Pro Val Ser Asp Leu
 690 695 700
 Ser Ile Val Glu Glu Val Ser Met Glu Glu Ser Thr Gly Asp Arg Asp
 705 710 715 720
 25 Ile Ser Asn Asn Gln Ile Leu Thr Thr Ser Leu Arg Asp Leu Gln Glu
 725 730 735
 Leu Glu Glu Leu His His Gln Ile Pro Phe Ile Pro Ser Glu Asp Ser
 740 745 750
 30 Trp Ala Val Pro Ser Glu Lys Asn Ser Asn Lys Tyr Val Gln Gln Glu
 755 760 765
 Lys Gln Asn Thr Ala Ser Leu Ser Lys Val Asn Ala Ser Arg Ile Leu
 770 775 780
 35 Thr Asn Asp Leu Glu Phe Asp Ser Val Ser Asp His Ser Lys Thr Leu
 785 790 795 800
 40 Thr Asn Phe Ser Phe Gln Ala Lys Gln Glu Ser Ala Ser Ser Gln Thr
 805 810 815
 Tyr Gln Tyr Trp Val His Tyr Leu Asp His Asp Ser Leu Ala Asn Lys
 820 825 830
 45 Ser Ile Thr Tyr Gln Met Phe Gly Lys Thr Leu Ser Gly Thr Asn Ser
 835 840 845
 Ile Ser Gln Glu Ile Met Asp Ser Val Asn Asn Glu Glu Leu Thr Asp
 850 855 860
 50 Glu Leu Leu Gly Cys Leu Ala Ala Glu Leu Leu Ala Leu Asp Glu Lys
 865 870 875 880
 Asp Asn Asn Ser Cys Gln Lys Met Ala Asn Glu Thr Asp Pro Glu Asn
 885 890 895
 55 Leu Asn Leu Val Leu Arg Trp Arg Gly Ser Thr Pro Lys Glu Met Gly
 900 905 910
 60 Arg Glu Thr Thr Lys Val Lys Ile Gln Arg His Ser Ser Gly Leu Arg
 915 920 925
 Ile Tyr Asp Arg Glu Glu Lys Phe Leu Ile Ser Asn Glu Lys Lys Ile
 930 935 940

65

ES 2 347 247 T3

Phe Ser Glu Asn Ser Leu Lys Ser Glu Glu Pro Ile Leu Trp Thr Lys
 945 950 955 960
 Gly Glu Ile Leu Gly Lys Gly Ala Tyr Gly Thr Val Tyr Cys Gly Leu
 965 970 975
 Thr Ser Gln Gly Gln Leu Ile Ala Val Lys Gln Val Ala Leu Asp Thr
 980 985 990
 Ser Asn Lys Leu Ala Ala Glu Lys Glu Tyr Arg Lys Leu Gln Glu Glu
 995 1000 1005
 Val Asp Leu Leu Lys Ala Leu Lys His Val Asn Ile Val Ala Tyr Leu
 1010 1015 1020
 Gly Thr Cys Leu Gln Glu Asn Thr Val Ser Ile Phe Met Glu Phe Val
 1025 1030 1035 1040
 Pro Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ile Ile Asn Arg Phe Gly Pro Leu Pro
 1045 1050 1055
 Glu Met Val Phe Cys Lys Tyr Thr Lys Gln Ile Leu Gln Gly Val Ala
 1060 1065 1070
 Tyr Leu His Glu Asn Cys Val Val His Arg Asp Ile Lys Gly Asn Asn
 1075 1080 1085
 Val Met Leu Met Pro Thr Gly Ile Ile Lys Leu Ile Asp Phe Gly Cys
 1090 1095 1100
 Ala Arg Arg Leu Ala Trp Ala Gly Leu Asn Gly Thr His Ser Asp Met
 1105 1110 1115 1120
 Leu Lys Ser Met His Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ala Pro Glu Val Ile
 1125 1130 1135
 Asn Glu Ser Gly Tyr Gly Arg Lys Ser Asp Ile Trp Ser Ile Gly Cys
 1140 1145 1150
 Thr Val Phe Glu Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro Leu Ala Ser Met Asp
 1155 1160 1165
 Arg Met Ala Ala Met Phe Tyr Ile Gly Ala His Arg Gly Leu Met Pro
 1170 1175 1180
 Pro Leu Pro Asp His Phe Ser Glu Asn Ala Ala Asp Phe Val Arg Met
 1185 1190 1195 1200
 Cys Leu Thr Arg Asp Gln His Glu Arg Pro Ser Ala Leu Gln Leu Leu
 1205 1210 1215
 Lys His Ser Phe Leu Glu Arg Ser His
 1220 1225

50 <210> 8
 <211> 1080
 <212> PRT
 55 <213> *Homo sapiens*

<400> 8
 Phe Asp Gln Asp Gly Asp Cys Ser His Ser Thr Leu Val Asn Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Asp Pro Ser Gly Gly Arg Gln Asp Trp Gln Pro Arg Thr Glu Gly
 20 25 30

65

ES 2 347 247 T3

Val Glu Ile Thr Val Thr Phe Pro Arg Asp Val Ser Pro Pro Gln Glu
 35 40 45
 5 Met Ser Gln Glu Asp Leu Lys Glu Lys Asn Leu Ile Asn Ser Ser Leu
 50 55 60
 Gln Glu Trp Ala Gln Ala His Ala Val Ser His Pro Asn Glu Ile Glu
 65 70 75 80
 10 Thr Val Glu Leu Arg Lys Lys Lys Leu Thr Met Arg Pro Leu Val Leu
 85 90 95
 Gln Lys Glu Glu Ser Ser Arg Glu Leu Cys Asn Val Asn Leu Gly Phe
 100 105 110
 15 Leu Leu Pro Arg Ser Cys Leu Glu Leu Asn Ile Ser Lys Ser Val Thr
 115 120 125
 Arg Glu Asp Ala Pro His Phe Leu Lys Glu Gln Gln Arg Lys Ser Glu
 130 135 140
 20 Glu Phe Ser Thr Ser His Met Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ile Lys Phe
 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Pro Leu Ser Leu Leu Pro Thr Arg Ser Gly Val Leu Thr
 165 170 175
 25 Ile Pro Gln Asn His Lys Phe Pro Lys Glu Lys Glu Arg Asn Ile Pro
 180 185 190
 Ser Leu Thr Ser Phe Val Pro Lys Leu Ser Val Ser Val Arg Gln Ser
 195 200 205
 30 Asp Glu Leu Ser Pro Ser Asn Glu Pro Pro Gly Ala Leu Val Lys Ser
 210 215 220
 Leu Met Asp Pro Thr Leu Arg Ser Ser Asp Gly Phe Ile Trp Ser Arg
 225 230 235 240
 Asn Met Cys Ser Phe Pro Lys Thr Asn His His Arg Gln Cys Leu Glu
 245 250 255
 40 Lys Glu Glu Asn Trp Lys Ser Lys Glu Ile Glu Glu Cys Asn Lys Ile
 260 265 270
 Glu Ile Thr His Phe Glu Lys Gly Gln Ser Leu Val Ser Phe Glu Asn
 275 280 285
 45 Leu Lys Glu Gly Asn Ile Pro Ala Val Arg Glu Glu Asp Ile Asp Cys
 290 295 300
 His Gly Ser Lys Thr Arg Lys Pro Glu Glu Glu Asn Ser Gln Tyr Leu
 305 310 315 320
 50 Ser Ser Arg Lys Asn Glu Ser Ser Val Ala Lys Asn Tyr Glu Gln Asp
 325 330 335
 Pro Glu Ile Val Cys Thr Ile Pro Ser Lys Phe Gln Glu Thr Gln His
 340 345 350
 55 Ser Glu Ile Thr Pro Ser Gln Asp Glu Glu Met Arg Asn Asn Lys Ala
 355 360 365
 Ala Ser Lys Arg Val Ser Leu His Lys Asn Glu Ala Met Glu Pro Asn
 370 375 380
 60 Asn Ile Leu Glu Glu Cys Thr Val Leu Lys Ser Leu Ser Ser Val Val
 385 390 395 400

65

ES 2 347 247 T3

Phe Asp Asp Pro Ile Asp Lys Leu Pro Glu Gly Cys Ser Ser Met Glu
 405 410 415
 5 Thr Asn Ile Lys Ile Ser Ile Ala Glu Arg Ala Lys Pro Glu Met Ser
 420 425 430
 Arg Met Val Pro Leu Ile His Ile Thr Phe Pro Val Asp Gly Ser Pro
 435 440 445
 10 Lys Glu Pro Val Ile Ala Lys Pro Ser Leu Gln Thr Arg Lys Gly Thr
 450 455 460
 Ile His Asn Asn His Ser Val Asn Ile Pro Val His Gln Glu Asn Asp
 465 470 475 480
 15 Lys His Lys Met Asn Ser His Arg Ser Lys Leu Asp Ser Lys Thr Lys
 485 490 495
 Thr Ser Lys Lys Thr Pro Gln Asn Phe Val Ile Ser Thr Glu Gly Pro
 500 505 510
 20 Ile Lys Pro Thr Met His Lys Thr Ser Ile Lys Thr Gln Ile Phe Pro
 515 520 525
 Ala Leu Gly Leu Val Asp Pro Arg Pro Trp Gln Leu Pro Arg Phe Gln
 530 535 540
 25 Lys Lys Met Pro Gln Ile Ala Lys Lys Gln Ser Thr His Arg Thr Gln
 545 550 555 560
 Lys Pro Lys Lys Gln Ser Phe Pro Cys Ile Cys Lys Asn Pro Gly Thr
 565 570 575
 30 Gln Lys Ser Cys Val Pro Leu Ser Val Gln Pro Thr Glu Pro Arg Leu
 580 585 590
 Asn Tyr Leu Asp Leu Lys Tyr Ser Asp Met Phe Lys Glu Ile Asn Ser
 595 600 605
 35 Thr Ala Asn Gly Pro Gly Ile Tyr Glu Met Phe Gly Thr Pro Val Tyr
 610 615 620
 40 Cys His Val Arg Glu Thr Glu Arg Asp Glu Asn Thr Tyr Tyr Arg Glu
 625 630 635 640
 Ile Cys Ser Ala Pro Ser Gly Arg Arg Ile Thr Asn Lys Cys Arg Ser
 645 650 655
 45 Ser His Ser Glu Arg Lys Ser Asn Ile Arg Thr Arg Leu Ser Gln Lys
 660 665 670
 Lys Thr His Met Lys Cys Pro Lys Thr Ser Phe Gly Ile Lys Gln Glu
 675 680 685
 50 His Lys Val Leu Ile Ser Lys Glu Lys Ser Ser Lys Ala Val His Ser
 690 695 700
 Asn Leu His Asp Ile Glu Asn Gly Asp Gly Ile Ser Glu Pro Asp Trp
 705 710 715 720
 55 Gln Ile Lys Ser Ser Gly Asn Glu Phe Leu Ser Ser Lys Asp Glu Ile
 725 730 735
 His Pro Met Asn Leu Ala Gln Thr Pro Glu Gln Ser Met Lys Gln Asn
 740 745 750
 60
 65

ES 2 347 247 T3

Glu Phe Pro Pro Val Ser Asp Leu Ser Ile Val Glu Glu Val Ser Met
 755 760 765
 5 Glu Glu Ser Thr Gly Asp Arg Asp Ile Ser Asn Asn Gln Ile Leu Thr
 770 775 780
 Thr Ser Leu Arg Asp Leu Gln Glu Leu Glu Glu Leu His His Gln Ile
 785 790 795 800
 10 Pro Phe Ile Pro Ser Glu Asp Ser Trp Ala Val Pro Ser Glu Lys Asn
 805 810 815
 Ser Asn Lys Tyr Val Gln Gln Glu Lys Gln Asn Thr Ala Ser Leu Ser
 820 825 830
 15 Lys Val Asn Ala Ser Arg Ile Leu Thr Asn Asp Leu Glu Phe Asp Ser
 835 840 845
 Val Ser Asp His Ser Lys Thr Leu Thr Asn Phe Ser Phe Gln Ala Lys
 850 855 860
 20 Gln Glu Ser Ala Ser Ser Gln Thr Tyr Gln Tyr Trp Val His Tyr Leu
 865 870 875 880
 Asp His Asp Ser Leu Ala Asn Lys Ser Ile Thr Tyr Gln Met Phe Gly
 885 890 895
 25 Lys Thr Leu Ser Gly Thr Asn Ser Ile Ser Gln Glu Ile Met Asp Ser
 900 905 910
 Val Asn Asn Glu Glu Leu Thr Asp Glu Leu Leu Gly Cys Leu Ala Ala
 915 920 925
 30 Glu Leu Leu Ala Leu Asp Glu Lys Asp Asn Asn Ser Cys Gln Lys Met
 930 935 940
 Ala Asn Glu Thr Asp Pro Glu Asn Leu Asn Leu Val Leu Arg Trp Arg
 945 950 955 960
 Gly Ser Thr Pro Lys Glu Met Gly Arg Glu Thr Thr Lys Val Lys Ile
 965 970 975
 40 Gln Arg His Ser Ser Gly Leu Arg Ile Tyr Asp Arg Glu Glu Lys Phe
 980 985 990
 Leu Ile Ser Asn Glu Lys Lys Ile Phe Ser Glu Asn Ser Leu Lys Ser
 995 1000 1005
 45 Glu Glu Pro Ile Leu Trp Thr Lys Gly Glu Ile Leu Gly Lys Gly Ala
 1010 1015 1020
 Tyr Gly Thr Val Tyr Cys Gly Leu Thr Ser Gln Gly Gln Leu Ile Ala
 1025 1030 1035 1040
 50 Val Lys Gln Val Ala Leu Asp Thr Ser Asn Lys Leu Ala Ala Glu Lys
 1045 1050 1055
 Glu Tyr Arg Lys Leu Gln Glu Glu Val Asp Leu Leu Lys Ala Leu Lys
 1060 1065 1070
 55 His Val Pro Asp Gln Gly Pro Ala
 1075 1080

60 <210> 9
 <211> 1137
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 347 247 T3

<400> 9

5 Ser Lys Lys Gln Gln Leu Leu Asp Ile Leu Met Ser Ser Met Pro Lys
 1 5 10 15
 10 Pro Glu Arg His Ala Glu Ser Leu Leu Asp Ile Cys His Asp Thr Asn
 20 25 30
 15 Ser Ser Pro Thr Asp Leu Met Thr Val Thr Lys Asn Gln Asn Ile Ile
 35 40 45
 20 Leu Gln Ser Ile Ser Arg Ser Glu Glu Phe Asp Gln Asp Gly Asp Cys
 50 55 60
 25 Ser His Ser Thr Leu Val Asn Glu Glu Glu Asp Pro Ser Gly Gly Arg
 65 70 75 80
 30 Gln Asp Trp Gln Pro Arg Thr Glu Gly Val Glu Ile Thr Val Thr Phe
 85 90 95
 35 Pro Arg Asp Val Ser Pro Pro Gln Glu Met Ser Gln Glu Asp Leu Lys
 100 105 110
 40 Glu Lys Asn Leu Ile Asn Ser Ser Leu Gln Glu Trp Ala Gln Ala His
 115 120 125
 45 Ala Val Ser His Pro Asn Glu Ile Glu Thr Val Glu Leu Arg Lys Lys
 130 135 140
 50 Lys Leu Thr Met Arg Pro Leu Val Leu Gln Lys Glu Glu Ser Ser Arg
 145 150 155 160
 55 Glu Leu Cys Asn Val Asn Leu Gly Phe Leu Leu Pro Arg Ser Cys Leu
 165 170 175
 60 Glu Leu Asn Ile Ser Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Ala Pro His Phe
 180 185 190
 65 Leu Lys Glu Gln Gln Arg Lys Ser Glu Glu Phe Ser Thr Ser His Met
 195 200 205
 70 Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ile Lys Phe Leu Leu Pro Pro Leu Ser Leu
 210 215 220
 75 Leu Pro Thr Arg Ser Gly Val Leu Thr Ile Pro Gln Asn His Lys Phe
 225 230 235 240
 80 Pro Lys Glu Lys Glu Arg Asn Ile Pro Ser Leu Thr Ser Phe Val Pro
 245 250 255
 85 Lys Leu Ser Val Ser Val Arg Gln Ser Asp Glu Leu Ser Pro Ser Asn
 260 265 270
 90 Glu Pro Pro Gly Ala Leu Val Lys Ser Leu Met Asp Pro Thr Leu Arg
 275 280 285
 95 Ser Ser Asp Gly Phe Ile Trp Ser Arg Asn Met Cys Ser Phe Pro Lys
 290 295 300
 100 Thr Asn His His Arg Gln Cys Leu Glu Lys Glu Glu Asn Trp Lys Ser
 305 310 315 320
 105 Lys Glu Ile Glu Glu Cys Asn Lys Ile Glu Ile Thr His Phe Glu Lys
 325 330 335
 110 Gly Gln Ser Leu Val Ser Phe Glu Asn Leu Lys Glu Gly Asn Ile Pro
 340 345 350

65

ES 2 347 247 T3

Ala Val Arg Glu Glu Asp Ile Asp Cys His Gly Ser Lys Thr Arg Lys
 355 360 365
 5 Pro Glu Glu Glu Asn Ser Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Lys Asn Glu Ser
 370 375 380
 Ser Val Ala Lys Asn Tyr Glu Gln Asp Pro Glu Ile Val Cys Thr Ile
 385 390 395 400
 10 Pro Ser Lys Phe Gln Glu Thr Gln His Ser Glu Ile Thr Pro Ser Gln
 405 410 415
 Asp Glu Glu Met Arg Asn Asn Lys Ala Ala Ser Lys Arg Val Ser Leu
 420 425 430
 15 His Lys Asn Glu Ala Met Glu Pro Asn Asn Ile Leu Glu Glu Cys Thr
 435 440 445
 Val Leu Lys Ser Leu Ser Ser Val Val Phe Asp Asp Pro Ile Asp Lys
 450 455 460
 20 Leu Pro Glu Gly Cys Ser Ser Met Glu Thr Asn Ile Lys Ile Ser Ile
 465 470 475 480
 Ala Glu Arg Ala Lys Pro Glu Met Ser Arg Met Val Pro Leu Ile His
 485 490 495
 25 Ile Thr Phe Pro Val Asp Gly Ser Pro Lys Glu Pro Val Ile Ala Lys
 500 505 510
 Pro Ser Leu Gln Thr Arg Lys Gly Thr Ile His Asn Asn His Ser Val
 515 520 525
 30 Asn Ile Pro Val His Gln Glu Asn Asp Lys His Lys Met Asn Ser His
 530 535 540
 Arg Ser Lys Leu Asp Ser Lys Thr Lys Thr Ser Lys Lys Thr Pro Gln
 545 550 555 560
 35 Asn Phe Val Ile Ser Thr Glu Gly Pro Ile Lys Pro Thr Met His Lys
 565 570 575
 Thr Ser Ile Lys Thr Gln Ile Phe Pro Ala Leu Gly Leu Val Asp Pro
 580 585 590
 40 Arg Pro Trp Gln Leu Pro Arg Phe Gln Lys Lys Met Pro Gln Ile Ala
 595 600 605
 Lys Lys Gln Ser Thr His Arg Thr Gln Lys Pro Lys Lys Gln Ser Phe
 610 615 620
 45 Pro Cys Ile Cys Lys Asn Pro Gly Thr Gln Lys Ser Cys Val Pro Leu
 625 630 635 640
 Ser Val Gln Pro Thr Glu Pro Arg Leu Asn Tyr Leu Asp Leu Lys Tyr
 645 650 655
 50 Ser Asp Met Phe Lys Glu Ile Asn Ser Thr Ala Asn Gly Pro Gly Ile
 660 665 670
 Tyr Glu Met Phe Gly Thr Pro Val Tyr Cys His Val Arg Glu Thr Glu
 675 680 685
 55 Arg Asp Glu Asn Thr Tyr Tyr Arg Glu Ile Cys Ser Ala Pro Ser Gly
 690 695 700
 60 Arg Arg Ile Thr Asn Lys Cys Arg Ser Ser His Ser Glu Arg Lys Ser
 705 710 715 720
 65

ES 2 347 247 T3

Asn Ile Arg Thr Arg Leu Ser Gln Lys Lys Thr His Met Lys Cys Pro
 725 730 735
 5 Lys Thr Ser Phe Gly Ile Lys Gln Glu His Lys Val Leu Ile Ser Lys
 740 745 750
 Glu Lys Ser Ser Lys Ala Val His Ser Asn Leu His Asp Ile Glu Asn
 755 760 765
 10 Gly Asp Gly Ile Ser Glu Pro Asp Trp Gln Ile Lys Ser Ser Gly Asn
 770 775 780
 Glu Phe Leu Ser Ser Lys Asp Glu Ile His Pro Met Asn Leu Ala Gln
 785 790 795 800
 15 Thr Pro Glu Gln Ser Met Lys Gln Asn Glu Phe Pro Pro Val Ser Asp
 805 810 815
 Leu Ser Ile Val Glu Glu Val Ser Met Glu Glu Ser Thr Gly Asp Arg
 820 825 830
 20 Asp Ile Ser Asn Asn Gln Ile Leu Thr Thr Ser Leu Arg Asp Leu Gln
 835 840 845
 Glu Leu Glu Glu Leu His His Gln Ile Pro Phe Ile Pro Ser Glu Asp
 850 855 860
 25 Ser Trp Ala Val Pro Ser Glu Lys Asn Ser Asn Lys Tyr Val Gln Gln
 865 870 875 880
 Glu Lys Gln Asn Thr Ala Ser Leu Ser Lys Val Asn Ala Ser Arg Ile
 885 890 895
 30 Leu Thr Asn Asp Leu Glu Phe Asp Ser Val Ser Asp His Ser Lys Thr
 900 905 910
 Leu Thr Asn Phe Ser Phe Gln Ala Lys Gln Glu Ser Ala Ser Ser Gln
 915 920 925
 35 Thr Tyr Gln Tyr Trp Val His Tyr Leu Asp His Asp Ser Leu Ala Asn
 930 935 940
 40 Lys Ser Ile Thr Tyr Gln Met Phe Gly Lys Thr Leu Ser Gly Thr Asn
 945 950 955 960
 Ser Ile Ser Gln Glu Ile Met Asp Ser Val Asn Asn Glu Glu Leu Thr
 965 970 975
 45 Asp Glu Leu Leu Gly Cys Leu Ala Ala Glu Leu Leu Ala Leu Asp Glu
 980 985 990
 Lys Asp Asn Asn Ser Cys Gln Lys Met Ala Asn Glu Thr Asp Pro Glu
 995 1000 1005
 50 Asn Leu Asn Leu Val Leu Arg Trp Arg Gly Ser Thr Pro Lys Glu Met
 1010 1015 1020
 Gly Arg Glu Thr Thr Lys Val Lys Ile Gln Arg His Ser Ser Gly Leu
 1025 1030 1035 1040
 55 Arg Ile Tyr Asp Arg Glu Glu Lys Phe Leu Ile Ser Asn Glu Lys Lys
 1045 1050 1055
 Ile Phe Ser Glu Asn Ser Leu Lys Ser Glu Glu Pro Ile Leu Trp Thr
 1060 1065 1070

65

ES 2 347 247 T3

Pro Lys Glu Lys Glu Arg Asn Ile Pro Ser Leu Thr Ser Phe Val Pro
 245 250 255
 5 Lys Leu Ser Val Ser Val Arg Gln Ser Asp Glu Leu Ser Pro Ser Asn
 260 265 270
 Glu Pro Pro Gly Ala Leu Val Lys Ser Leu Met Asp Pro Thr Leu Arg
 275 280 285
 10 Ser Ser Asp Gly Phe Ile Trp Ser Arg Asn Met Cys Ser Phe Pro Lys
 290 295 300
 Thr Asn His His Arg Gln Cys Leu Glu Lys Glu Glu Asn Trp Lys Ser
 305 310 315 320
 15 Lys Glu Ile Glu Glu Cys Asn Lys Ile Glu Ile Thr His Phe Glu Lys
 325 330 335
 Gly Gln Ser Leu Val Ser Phe Glu Asn Leu Lys Glu Gly Asn Ile Pro
 340 345 350
 20 Ala Val Arg Glu Glu Asp Ile Asp Cys His Gly Ser Lys Thr Arg Lys
 355 360 365
 Pro Glu Glu Glu Asn Ser Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Lys Asn Glu Ser
 370 375 380
 25 Ser Val Ala Lys Asn Tyr Glu Gln Asp Pro Glu Ile Val Cys Thr Ile
 385 390 395 400
 30 Pro Ser Lys Phe Gln Glu Thr Gln His Ser Glu Ile Thr Pro Ser Gln
 405 410 415
 Asp Glu Glu Met Arg Asn Asn Lys Ala Ala Ser Lys Arg Val Ser Leu
 420 425 430
 35 His Lys Asn Glu Ala Met Glu Pro Asn Asn Ile Leu Glu Glu Cys Thr
 435 440 445
 Val Leu Lys Ser Leu Ser Ser Val Val Phe Asp Asp Pro Ile Asp Lys
 450 455 460
 40 Leu Pro Glu Gly Cys Ser Ser Met Glu Thr Asn Ile Lys Ile Ser Ile
 465 470 475 480
 Ala Glu Arg Ala Lys Pro Glu Met Ser Arg Met Val Pro Leu Ile His
 485 490 495
 45 Ile Thr Phe Pro Val Asp Gly Ser Pro Lys Glu Pro Val Ile Ala Lys
 500 505 510
 Pro Ser Leu Gln Thr Arg Lys Gly Thr Ile His Asn Asn His Ser Val
 515 520 525
 50 Asn Ile Pro Val His Gln Glu Asn Asp Lys His Lys Met Asn Ser His
 530 535 540
 Arg Ser Lys Leu Asp Ser Lys Thr Lys Thr Ser Lys Lys Thr Pro Gln
 545 550 555 560
 55 Asn Phe Val Ile Ser Thr Glu Gly Pro Ile Lys Pro Thr Met His Lys
 565 570 575
 Thr Ser Ile Lys Thr Gln Ile Phe Pro Ala Leu Gly Leu Val Asp Pro
 580 585 590
 60 Arg Pro Trp Gln Leu Pro Arg Phe Gln Lys Lys Met Pro Gln Ile Ala
 595 600 605

65

ES 2 347 247 T3

Lys Lys Gln Ser Thr His Arg Thr Gln Lys Pro Lys Lys Gln Ser Phe
 610 615 620
 5 Pro Cys Ile Cys Lys Asn Pro Gly Thr Gln Lys Ser Cys Val Pro Leu
 625 630 635 640
 Ser Val Gln Pro Thr Glu Pro Arg Leu Asn Tyr Leu Asp Leu Lys Tyr
 645 650 655
 10 Ser Asp Met Phe Lys Glu Ile Asn Ser Thr Ala Asn Gly Pro Gly Ile
 660 665 670
 Tyr Glu Met Phe Gly Thr Pro Val Tyr Cys His Val Arg Glu Thr Glu
 675 680 685
 15 Arg Asp Glu Asn Thr Tyr Tyr Arg Glu Ile Cys Ser Ala Pro Ser Gly
 690 695 700
 Arg Arg Ile Thr Asn Lys Cys Arg Ser Ser His Ser Glu Arg Lys Ser
 705 710 715 720
 20 Asn Ile Arg Thr Arg Leu Ser Gln Lys Lys Thr His Met Lys Cys Pro
 725 730 735
 Lys Thr Ser Phe Gly Ile Lys Gln Glu His Lys Val Leu Ile Ser Lys
 740 745 750
 25 Glu Lys Ser Ser Lys Ala Val His Ser Asn Leu His Asp Ile Glu Asn
 755 760 765
 Gly Asp Gly Ile Ser Glu Pro Asp Trp Gln Ile Lys Ser Ser Gly Asn
 770 775 780
 30 Glu Phe Leu Ser Ser Lys Asp Glu Ile His Pro Met Asn Leu Ala Gln
 785 790 795 800
 35 Thr Pro Glu Gln Ser Met Lys Gln Asn Glu Phe Pro Pro Val Ser Asp
 805 810 815
 Leu Ser Ile Val Glu Glu Val Ser Met Glu Glu Ser Thr Gly Asp Arg
 820 825 830
 40 Asp Ile Ser Asn Asn Gln Ile Leu Thr Thr Ser Leu Arg Asp Leu Gln
 835 840 845
 Glu Leu Glu Glu Leu His His Gln Ile Pro Phe Ile Pro Ser Glu Asp
 850 855 860
 45 Ser Trp Ala Val Pro Ser Glu Lys Asn Ser Asn Lys Tyr Val Gln Gln
 865 870 875 880
 Glu Lys Gln Asn Thr Ala Ser Leu Ser Lys Val Asn Ala Ser Arg Ile
 885 890 895
 50 Leu Thr Asn Asp Leu Glu Phe Asp Ser Val Ser Asp His Ser Lys Thr
 900 905 910
 Leu Thr Asn Phe Ser Phe Gln Ala Lys Gln Glu Ser Ala Ser Ser Gln
 915 920 925
 55 Thr Tyr Gln Tyr Trp Val His Tyr Leu Asp His Asp Ser Leu Ala Asn
 930 935 940
 60 Lys Ser Ile Thr Tyr Gln Met Phe Gly Lys Thr Leu Ser Gly Thr Asn
 945 950 955 960
 65

ES 2 347 247 T3

Ser Ile Ser Gln Glu Ile Met Asp Ser Val Asn Asn Glu Glu Leu Thr
 965 970 975
 5 Asp Glu Leu Leu Gly Cys Leu Ala Ala Glu Leu Leu Ala Leu Asp Glu
 980 985 990
 Lys Asp Asn Asn Ser Cys Gln Lys Met Ala Asn Glu Thr Asp Pro Glu
 995 1000 1005
 10 Asn Leu Asn Leu Val Leu Arg Trp Arg Gly Ser Thr Pro Lys Glu Met
 1010 1015 1020
 Gly Arg Glu Thr Thr Lys Val Lys Ile Gln Arg His Ser Ser Gly Leu
 1025 1030 1035 1040
 15 Arg Ile Tyr Asp Arg Glu Glu Lys Phe Leu Ile Ser Asn Glu Lys Lys
 1045 1050 1055
 Ile Phe Ser Glu Asn Ser Leu Lys Ser Glu Glu Pro Ile Leu Trp Thr
 1060 1065 1070
 20 Lys Gly Glu Ile Leu Gly Lys Gly Ala Tyr Gly Thr Val Tyr Cys Gly
 1075 1080 1085
 Leu Thr Ser Gln Gly Gln Leu Ile Ala Val Lys Gln Val Ala Leu Asp
 1090 1095 1100
 25 Thr Ser Asn Lys Leu Ala Ala Glu Lys Glu Tyr Arg Lys Leu Gln Glu
 1105 1110 1115 1120
 Glu Val Asp Leu Leu Lys Ala Leu Lys His Val Asn Ile Val Ala Tyr
 1125 1130 1135
 30 Leu Gly Thr Cys Leu Gln Glu Asn Thr Val Ser Ile Phe Met Glu Phe
 1140 1145 1150
 35 Val Pro Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ile Ile Asn Arg Phe Gly Pro Leu
 1155 1160 1165
 Pro Glu Met Val Phe Cys Lys Tyr Thr Lys Gln Ile Leu Gln Gly Val
 1170 1175 1180
 40 Ala Tyr Leu His Glu Asn Cys Val Val His Arg Asp Ile Lys Gly Asn
 1185 1190 1195 1200
 Asn Val Met Leu Met Pro Thr Gly Ile Ile Lys Leu Ile Asp Phe Gly
 1205 1210 1215
 45 Cys Ala Arg Arg Leu Ala Trp Ala Gly Leu Asn Gly Thr His Ser Asp
 1220 1225 1230
 Met Leu Lys Ser Met His Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ala Pro Glu Val
 1235 1240 1245
 50 Ile Asn Glu Ser Gly Tyr Gly Arg Lys Ser Asp Ile Trp Ser Ile Gly
 1250 1255 1260
 Cys Thr Val Phe Glu Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro Leu Ala Ser Met
 1265 1270 1275 1280
 Asp Arg Met Ala Ala Met Phe Tyr Ile Gly Ala His Arg Gly Leu Met
 1285 1290 1295
 60 Pro Pro Leu Pro Asp His Phe Ser Glu Asn Ala Ala Asp Phe Val Arg
 1300 1305 1310
 Met Cys Leu Thr Arg Asp Gln His Glu Arg Pro Ser Ala Leu Gln Leu
 1315 1320 1325
 65 Leu Lys His Ser Phe Leu Glu Arg Ser His
 1330 1335

ES 2 347 247 T3

<210> 11

<211> 472

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

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

ES 2 347 247 T3

5 Met Val Phe Cys Lys Tyr Thr Lys Gln Ile Leu Gln Gly Val Ala Tyr
 305 310 315 320
 Leu His Glu Asn Cys Val Val His Arg Asp Ile Lys Gly Asn Asn Val
 325 330 335
 10 Met Leu Met Pro Thr Gly Ile Ile Lys Leu Ile Asp Phe Gly Cys Ala
 340 345 350
 Arg Arg Leu Ala Trp Ala Gly Leu Asn Gly Thr His Ser Asp Met Leu
 355 360 365
 15 Lys Ser Met His Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Asn
 370 375 380
 Glu Ser Gly Tyr Gly Arg Lys Ser Asp Ile Trp Ser Ile Gly Cys Thr
 385 390 395 400
 20 Val Phe Glu Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro Leu Ala Ser Met Asp Arg
 405 410 415
 Met Ala Ala Met Phe Tyr Ile Gly Ala His Arg Gly Leu Met Pro Pro
 420 425 430
 25 Leu Pro Asp His Phe Ser Glu Asn Ala Ala Asp Phe Val Arg Met Cys
 435 440 445
 Leu Thr Arg Asp Gln His Glu Arg Pro Ser Ala Leu Gln Leu Leu Lys
 450 455 460
 30 His Ser Phe Leu Glu Arg Ser His
 465 470

<210> 12

<211> 520

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

ES 2 347 247 T3

Lys Leu Thr Met Arg Pro Leu Val Leu Gln Lys Glu Glu Ser Ser Arg
 145 150 155 160
 Glu Leu Cys Asn Val Asn Leu Gly Phe Leu Leu Pro Arg Ser Cys Leu
 165 170 175
 Glu Leu Asn Ile Ser Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Ala Pro His Phe
 180 185 190
 Leu Lys Glu Gln Gln Arg Lys Ser Glu Glu Phe Ser Thr Ser His Met
 195 200 205
 Lys Tyr Ser Gly Arg Ser Ile Lys Arg His Ser Ser Gly Leu Arg Ile
 210 215 220
 Tyr Asp Arg Glu Glu Lys Phe Leu Ile Ser Asn Glu Lys Lys Ile Phe
 225 230 235 240
 Ser Glu Asn Ser Leu Lys Ser Glu Glu Pro Ile Leu Trp Thr Lys Gly
 245 250 255
 Glu Ile Leu Gly Lys Gly Ala Tyr Gly Thr Val Tyr Cys Gly Leu Thr
 260 265 270
 Ser Gln Gly Gln Leu Ile Ala Val Lys Gln Val Ala Leu Asp Thr Ser
 275 280 285
 Asn Lys Leu Ala Ala Glu Lys Glu Tyr Arg Lys Leu Gln Glu Glu Val
 290 295 300
 Asp Leu Leu Lys Ala Leu Lys His Val Asn Ile Val Ala Tyr Leu Gly
 305 310 315 320
 Thr Cys Leu Gln Glu Asn Thr Val Ser Ile Phe Met Glu Phe Val Pro
 325 330 335
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ile Ile Asn Arg Phe Gly Pro Leu Pro Glu
 340 345 350
 Met Val Phe Cys Lys Tyr Thr Lys Gln Ile Leu Gln Gly Val Ala Tyr
 355 360 365
 Leu His Glu Asn Cys Val Val His Arg Asp Ile Lys Gly Asn Asn Val
 370 375 380
 Met Leu Met Pro Thr Gly Ile Ile Lys Leu Ile Asp Phe Gly Cys Ala
 385 390 395 400
 Arg Arg Leu Ala Trp Ala Gly Leu Asn Gly Thr His Ser Asp Met Leu
 405 410 415
 Lys Ser Met His Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Asn
 420 425 430
 Glu Ser Gly Tyr Gly Arg Lys Ser Asp Ile Trp Ser Ile Gly Cys Thr
 435 440 445
 Val Phe Glu Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro Leu Ala Ser Met Asp Arg
 450 455 460
 Met Ala Ala Met Phe Tyr Ile Gly Ala His Arg Gly Leu Met Pro Pro
 465 470 475 480
 Leu Pro Asp His Phe Ser Glu Asn Ala Ala Asp Phe Val Arg Met Cys
 485 490 495
 Leu Thr Arg Asp Gln His Glu Arg Pro Ser Ala Leu Gln Leu Leu Lys
 500 505 510
 His Ser Phe Leu Glu Arg Ser His
 515 520

ES 2 347 247 T3

<211> 24
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
5
<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(24)
10
<400> 13

aatggcacc acagtgacat gctt 24
15
<210> 14
<211> 24
<212> ADN
20 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> característica_misc
25 <222> (1)..(24)
<223> Cebador

<400> 14
30

ccctcgtgt gctccgatg aaaa 24
35
<210> 15
<211> 24
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
40
<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(28)
45 <223> Cebador

<400> 15
50
ttcaaagaaa cagcagcttt tggacatt 28

<210> 16
<211> 24
55 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
60 <221> característica_misc
<222> (1)..(25)
<223> Cebador

<400> 16
65

gcatctgcag tggactggg aagaa 25