



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 995**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97913986 .2**

96 Fecha de presentación : **27.03.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0932674**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.1999**

54

Título: **Un nuevo gen de mamífero, *bcl-w*, que pertenece a la familia de *bcl-2* de genes que controlan la apoptosis.**

30

Prioridad: **27.03.1996 AU PN8965**

73

Titular/es: **THE WALTER AND ELIZA HALL
INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH
1G Royal Parade
Parkville, Victoria 3052, AU**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

72

Inventor/es: **Cory, Suzanne;
Adams, Jerry, McKee;
Gibson, Leonie, M. y
Holmgreen, Shaun P.**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 309 995 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

Un nuevo gen de mamífero, *bcl-w*, que pertenece a la familia *bcl-2* de genes que controlan la apoptosis.

5 La presente invención se dirige extensamente a moléculas terapéuticas capaces de, entre otras cosas, modular la apoptosis en células de mamíferos. Las moléculas terapéuticas de la presente invención abarcan secuencias genéticas y entidades químicas capaces de regular la expresión de un nuevo gen de mamífero perteneciente a la familia *bcl-2* y que promueve la supervivencia de células. Las moléculas terapéuticas de la presente invención pueden tener utilidad adicional en retrasar la entrada del ciclo de células. Además, la presente invención se extiende a entidades químicas capaces de modular la actividad y función del producto de traducción de dicho nuevo gen de la familia *bcl-2*. La presente invención se extiende también al producto de traducción del nuevo gen de la familia *bcl-2* y su uso en, por ejemplo, terapia, diagnosis, generación de anticuerpos y como herramienta de examen para moléculas terapéuticas capaces de modular la muerte o supervivencia celular fisiológica y/o modular la entrada del ciclo de células.

15 Se recogen al final de la descripción detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se hace referencia numéricamente en esta memoria descriptiva. Los Números de Identidad de Secuencia (SEQ ID NOs.) para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos a los que se hace referencia en la memoria descriptiva se definen siguiendo la bibliografía. Se proporciona un sumario de los SEQ ID NOs. antes de los Ejemplos.

20 En toda esta memoria descriptiva, salvo que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un elemento o número entero indicados o grupo de elementos o números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

25 La sofisticación creciente de la tecnología de ADN recombinante está facilitando en gran medida la investigación y el desarrollo en los campos médico y de salud conexas. Esta tecnología se está haciendo particularmente importante en investigación en el tratamiento y diagnosis de trastornos de células proliferativas tales como cánceres y sarcomas y en enfermedades degenerativas tales como algunos estados autoinmunes. Hay necesidad de identificar y caracterizar en el nivel genético los elementos implicados en supervivencia de células y muerte fisiológica de células (apoptosis).

30 La apoptosis se consigue por un proceso que se conserva entre organismos tan diversos como nemátodos y el hombre. La regulación positiva y negativa de la supervivencia de células es esencial para el desarrollo y diferenciación apropiados de los embriones y para asegurar homeostasis en tejidos de adultos. La supervivencia de células puede promoverse por la unión de factores de crecimiento a sus receptores o por interacción de moléculas de adhesión celular. Un intervalo de agentes citotóxicos puede contrarrestar estas señales y activar apoptosis, un proceso definido inicialmente por criterios morfológicos específicos, tales como condensación de cromatina, compactación de células, formación de ampollas en membranas y, a menudo, división internucleosómica de ADN.

40 Los detalles bioquímicos de las trayectorias intracelulares que gobiernan la supervivencia y muerte de células permanecen indefinidos en gran medida. Sin embargo, han aparecido varios reguladores clave. El primero descubierto fue Bcl-2, una proteína citoplásmica de 26 kD codificada por el gen *bcl-2* translocado al lugar de IGH en linfoma folicular humano. Altos niveles de Bcl-2 aumentan en gran medida la capacidad de células para sobrevivir a la privación de citoquina y una amplia variedad de otros estados citotóxicos, incluyendo daño de ADN.

50 El genoma de mamíferos contiene otros genes homólogos de *bcl-2* pero que difieren en función. Por ejemplo, *bcl-x* bloquea apoptosis (Boise *et al.*, 1993) mientras que *bax* y *bak* inhiben la función de supervivencia de *bcl-2* y *bcl-x* (Oltvai *et al.*, 1993; Chittenden *et al.*, 1995; Farrow *et al.*, 1995; Kiefer *et al.*, 1995). Debido a la importancia potencial de genes controladores de la apoptosis de células en el tratamiento de cánceres y sarcomas y en el tratamiento de trastornos degenerativos, hay necesidad de identificar nuevos genes homólogos de *bcl-2* en estructura y función.

55 Según la presente invención, los inventores han identificado un nuevo gen de mamíferos denominado aquí “*bcl-w*”. Estudios de transferencia de genes muestran que *bcl-w* aumenta la supervivencia celular y pertenece a la familia *bcl-2* de genes controladores de la apoptosis. La identificación de este nuevo gen conducirá a la generación de un intervalo de moléculas terapéuticas capaces de actuar como antagonistas o agonistas de la expresión o actividad de *bcl-w* y serán útiles en terapia de cáncer o enfermedad degenerativa. La identificación del gen permitirá también la producción de vastas cantidades de productos de traducción recombinantes para uso en terapia, diagnosis, generación de anticuerpos y como examen para moléculas terapéuticas capaces de modular las muertes o supervivencia fisiológica de células incluyendo modulación de la entrada del ciclo de células.

60 Por consiguiente, la presente invención se dirige a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o es complementaria de una secuencia que codifica un nuevo gen de mamíferos de la familia *bcl-2* y que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica o es complementaria de una secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o codifica un derivado de ellas.

- 5 El término “similitud” según se usa aquí incluye identidad exacta entre secuencias comparadas al nivel de nucleótidos o aminoácidos. Cuando hay no identidad al nivel de nucleótidos, “similitud” incluye diferencias entre secuencias que producen diferentes aminoácidos que están no obstante relacionados entre sí en los niveles estructural, funcional, bioquímico y/o conformacional. Cuando hay no identidad al nivel de aminoácidos, “similitud” incluye aminoácidos que están no obstante relacionados entre sí en los niveles estructural, funcional, bioquímico y/o conformacional.

El porcentaje de similitud está entre el 80% y el 100% inclusive, tal como aproximadamente 80% u 85%, 90% o 95% o mayor del 96% o un porcentaje de similitud entre ellos.

- 15 Otra molécula de ácido nucleico preferida de la presente invención comprende la secuencia de nucleótidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o comprende un derivado de dicha secuencia.

La molécula de ácido nucleico según este aspecto de la presente invención corresponde aquí a “*bcl-w*”. Se ha determinado por los inventores según la presente invención que este gen aumenta la supervivencia celular. Se hace referencia al producto del gen *bcl-w* como Bcl-w. Se define Bcl-w humano por la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 y se define Bcl-w de ratón en SEQ ID NO: 9. Las secuencias de nucleótidos respectivas de *bcl-w* humano y *bcl-w* de ratón se muestran en SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8 respectivamente. La referencia aquí a “*bcl-w*” incluye referencia a derivados de él, incluyendo sustituciones, supresiones y/o adiciones de nucleótidos simples o múltiples, y que tengan la identidad de secuencia descrita aquí. De modo similar, la referencia aquí a “Bcl-w” incluye todos los derivados, incluyendo sustituciones, supresiones y/o adiciones de aminoácidos. El gen es preferiblemente de un ser humano, primate, animal de ganadería (oveja, cerdo, vaca, caballo, burro), animal de ensayo de laboratorio (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya), animal de compañía (por ejemplo, perro, gato) o animal salvaje cautivo (por ejemplo, zorro, canguro, ciervo).

- 30 Aunque la presente invención se refiere a un homólogo de mamífero de Bcl-w que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, la invención sujeto se extiende a nuevos homólogos de Bcl-w de cualquier animal incluyendo un mamífero no descritos previamente que tengan la identidad de secuencia requerida.

- 35 Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica Bcl-w humano o un derivado del mismo, teniendo dicho Bcl-w humano una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 7 o es un homólogo de mamífero del mismo que tenga una secuencia de aminoácidos de sustancialmente identidad del 80% o superior con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7.

- 40 Un aspecto adicional proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica Bcl-w humano o un derivado del mismo, teniendo dicho Bcl-w humano una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 9 o es un homólogo de mamífero del mismo que tiene una secuencia de aminoácidos de sustancialmente identidad del 80% o superior con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9.

- 50 La molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención está ligada preferiblemente a un vector, tal como un vector de expresión. Por “aislada” se entiende una molécula de ácido nucleico que ha experimentado al menos una etapa de purificación y ésta está definida convenientemente, por ejemplo, por una composición que comprende al menos aproximadamente 10% de la molécula de ácido nucleico sujeto, preferiblemente al menos aproximadamente 20%, más preferiblemente al menos aproximadamente 30%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 40-50%, incluso aún preferiblemente al menos aproximadamente 60-70%, incluso aún más preferiblemente 80-90% o superior de molécula de ácido nucleico sujeto con relación a otros componentes, determinado por peso molecular, actividad de modificación, secuencia de nucleótidos, composición de base u otro medio conveniente. La molécula de ácido nucleico de la presente invención también puede considerarse, en una realización preferida, biológicamente pura.

- 55 La molécula de ácido nucleico que codifica *bcl-w* es preferiblemente una secuencia de ácidos desoxirribonucleicos tal como una secuencia de cADN o una secuencia genómica. Una secuencia genómica puede comprender también exones e intrones. Una secuencia genómica puede incluir también una región de promotor u otra región reguladora. En una realización particularmente preferida, la secuencia de nucleótidos correspondiente a *bcl-w* es una secuencia de cADN que comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en SEQ ID NO: 6 (humana) o SEQ ID NO: 8 (ratón) o es un derivado de ella, incluyendo una secuencia de nucleótidos que tiene similitud con SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8, pero que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene identidad 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9.

El término “derivado” según se usa aquí incluye porciones, fragmentos, partes, homólogos o análogos de la molécula de ácido nucleico o un producto de traducción de ella. Un derivado también puede ser un nucleótido simple

o múltiple o una sustitución, supresión y/o adición de aminoácidos. Un derivado de la molécula de ácido nucleico de la presente invención incluye también moléculas de ácidos nucleicos capaces de hibridarse con la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 bajo condiciones de bajo rigor y codifica una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9. Preferiblemente, el bajo rigor es a 42°C.

Más particularmente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica o es complementaria de una secuencia que codifica un nuevo gen de mamífero de la familia *bcl-2* y que comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o un derivado de la misma capaz de hibridarse con SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 en condiciones de bajo rigor y que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene un 80% de identidad o más con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9.

La referencia aquí a un bajo rigor a 42°C incluye y abarca desde formamida a al menos aproximadamente el 1% v/v hasta al menos aproximadamente 15% v/v y de sal al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M para condiciones de lavado. Alternativamente, pueden aplicarse condiciones de rigor cuando sea necesario, tales como rigor medio, que incluye y abarca desde formamida a al menos aproximadamente el 16% v/v hasta al menos aproximadamente 30% v/v y de sal al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M para condiciones de lavado, o alto rigor, que incluye y abarca desde formamida a al menos aproximadamente el 31% v/v hasta al menos aproximadamente 50% v/v y de sal al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M para hibridación, y sal al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M para condiciones de lavado.

Los derivados de la molécula de ácido nucleico de la presente invención incluyen oligonucleótidos, cebadores de PCR, moléculas antisentido, moléculas adecuadas para uso en co-supresión y moléculas de ácidos nucleicos de fusión. Otras moléculas son capaces de regular la expresión de *bcl-w*, tales como ribozimas dirigidas a *bcl-w*. Los derivados del producto de traducción de Bcl-w de la presente invención incluyen fragmentos que tengan epítopes particulares o partes de la proteína de Bcl-w completa fusionadas a péptidos, polipéptidos u otra proteínas. También se consideran anticuerpos catalíticos para Bcl-w o derivados de él. Tales anticuerpos catalíticos serían útiles para controlar o modular de otro modo Bcl-w. Los anticuerpos catalíticos u otras moléculas reguladoras pueden necesitar ser modificados para facilitar la entrada en las células. Alternativamente, pueden producirse genéticamente en células transgénicas o introducirse mediante un vector vírico u otro adecuado.

En otra realización la presente invención se dirige a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica Bcl-w o un derivado del mismo, seleccionándose dicha molécula de ácido nucleico de la lista constituida por:

- (i) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
- (ii) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
- (iii) una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 en condiciones de bajo rigor y que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9; y
- (iv) una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse con el ácido nucleico de la parte (i) o (ii) o (iii) en condiciones de bajo rigor y que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9.

La molécula de ácido nucleico puede estar ligada a un vector de expresión capaz de expresión en una célula procariota (por ejemplo, *E. coli*) o una célula eucariota (por ejemplo, células de levadura, células de hongos, células de insectos, células de mamíferos o células de plantas). La molécula de ácido nucleico puede estar ligada o fusionada o asociada de otro modo con una molécula de ácido nucleico que codifique otra entidad tal como un péptido señal, una citoquina u otro miembro de la familia Bcl-2.

La presente invención se extiende al producto de expresión de la molécula de ácido nucleico definida anteriormente.

El producto de expresión es Bcl-w que tiene una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o es un derivado de él (como se ha definido antes) o es un homólogo de mamífero que tiene una secuencia de aminoácidos de una identidad del 80% o superior con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7

o SEQ ID NO: 9. Un derivado puede ser una sustitución, supresión y/o adición de aminoácidos simple o múltiple. Otros derivados incluyen análogos químicos de Bcl-w. Los análogos de Bcl-w considerados aquí incluyen, aunque sin limitarse a ellos, modificación de las cadenas secundarias, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante la síntesis de péptidos, polipéptidos o proteínas y el uso de reticuladores y otros métodos que impongan restricciones conformacionales de la molécula proteínica o sus análogos.

Otro aspecto de la presente invención se dirige a un polipéptido aislado seleccionado de la lista constituida por:

- (i) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
- (ii) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
- (iii) un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 en condiciones de bajo rigor y que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
- (iv) un polipéptido como se define en la parte (i) o (ii) o (iii) en forma homodímera; y
- (v) un polipéptido como se define en la parte (i) o (ii) o (iii) en forma heterodímera.

Un derivado puede llevar una mutación en cualquier parte de la molécula de Bcl-w tal como, aunque sin limitarse a ellas, la región de S1 y/o S2. Por ejemplo, está abarcada por la presente invención una sustitución en posición 94 en S2 de Gly a Glu. Otras áreas de Bcl-w para las que se consideran mutaciones incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la región inmediatamente N-terminal a S2, la región de NH1, la región de S3, la región de S2-S3 y la región de BH3.

Los ejemplos de modificaciones de cadenas secundarias considerados por la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tales como mediante alquilación reductora por reacción con un aldehído seguida por reducción con NaBH₄; amidinación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato; trinitrobenzilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguida por reducción con NaBH₄.

El grupo guanidina de residuos de arginina puede modificarse por formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilglicolal y glicolal.

El grupo carboxilo puede modificarse por activación de carbodiimida mediante formación de O-acilisourea seguida por derivación subsiguiente, por ejemplo, a una amida correspondiente.

Pueden modificarse grupos sulfhidrilo por métodos tales como carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; oxidación de ácido per fórmico a ácido cisteico; formación de disulfuros mezclados con otros compuestos tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados mercuriales usando 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercuri-4-nitrofenol y otros mercuriales; carbamoilación con cianato a pH alcalino.

Pueden modificarse residuos de triptófano mediante, por ejemplo, oxidación con N-bromosuccinimida o alquilación del anillo indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo o haluros de sulfenilo. Pueden alterarse por otra parte residuos de tirosina por nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina.

La modificación del anillo imidazol de un residuo de histidina puede conseguirse por alquilación con derivados de ácido yodoacético o N-carboxilación con pirocarbonato de dietilo.

Los ejemplos de incorporación de aminoácidos no naturales y derivados durante la síntesis de péptidos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el uso de norleucina, ácido 4-aminobutírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 6-aminohexanoico, t-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, 2-tienilalanina y/o D-isómeros de aminoácidos. Una lista de aminoácidos no naturales considerados aquí se muestra en la Tabla 1.

Pueden usarse reticuladores, por ejemplo, para estabilizar conformaciones 3D, usando reticuladores homo-bifuncionales tales como los imidoésteres bifuncionales que tienen grupos espaciadores (CH₂)_n con n = 1 a n = 6, glu-

taraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida y reactivos hetero-bifuncionales que contienen habitualmente un resto amino-reactivo tal como N-hidroxisuccinimida y un resto reactivo específico para otro grupo tal como maleimido o un resto ditio (SH) o carbodiimida (COOH). Además, pueden restringirse conformacionalmente péptidos mediante, por ejemplo, incorporación de C_α y N_α-metilaminoácidos, introducción de dobles enlaces entre átomos C_α y C_β de aminoácidos y la formación de péptidos cíclicos o análogos introduciendo enlaces covalentes tal como formación de un enlace amida entre los términos N y C, entre dos cadenas secundarias o entre una cadena secundaria y el término N o C.

La identificación de *bcl-w* permite la generación de un intervalo de moléculas terapéuticas capaces de modular la expresión de *bcl-w* o modular la actividad de Bcl-2. Tales moduladores incluyen agonistas y antagonistas de la expresión de *bcl-w*. Los antagonistas de la expresión de *bcl-w* incluyen moléculas antisentido, ribozimas y moléculas de co-supresión. Los agonistas incluyen moléculas que aumentan la capacidad del promotor o interfieren con mecanismos reguladores negativos. Los agonistas de Bcl-w incluyen moléculas que superan cualquier mecanismo regulador negativo. Los antagonistas de *bcl-w* incluyen anticuerpos y fragmentos de péptidos inhibidores.

En una realización, la presente invención proporciona un modulador de la expresión de *bcl-w* que es una molécula antisentido para *bcl-w* o su derivado que comprende una secuencia complementaria de la invención para uso en métodos descritos aquí o para uso como medicamento. Los moduladores adicionales para tales usos incluyen un modulador de la expresión de *bcl-w* que es una molécula sentido de *bcl-w* o su derivado que comprende una secuencia de codificación de la invención que regula la expresión de dicho *bcl-w* o su derivado, un modulador que aumenta o disminuye la actividad de Bcl-w que es un anticuerpo para Bcl-w o su derivado como se define aquí y un modulador que aumenta o disminuye la actividad de Bcl-w que es una forma de Bcl-w no de membrana o es un derivado de ella como se define aquí.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 309 995 T3

TABLA 1

	Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
5	ácido α -aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
	α -amino- α -metilbutirato	Mgab	L-N-metilarginina	Nmarg
10	aminociclopropanocarboxilato	Cpro	L-N-metilasparagina	Nmasn
	ácido aminoisobutírico	Aib	ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
15	aminonorbornilcarboxilato	Norb	L-N-metilcisteína	Nmcys
	ciclohexilalanina		L-N-metilglutamina	Nmgln
	ciclopentilalanina	Cpen	ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
20	D-alanina	Dal	Chexa L-N-metilhistidina	Nmhis
	D-arginina	Darg	L-N-metilisoleucina	Nmile
	ácido D-aspártico	Dasp	L-N-metilleucina	Nmleu
25	D-cisteína	Dcys	L-N-metillisina	Nmlys
	D-glutamina	Dgln	L-N-metilmetionina	Nmmet
30	ácido D-glutámico	Dglu	L-N-metilnorleucina	Nmnle
	D-histidina	Dhis	L-N-metilnorvalina	Nmnva
	D-isoleucina	Dile	L-N-metilornitina	Nmorn
35	D-leucina	Dleu	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
	D-lisina	Dlys	L-N-metilprolina	Nmpro
	D-metionina	Dmet	L-N-metilserina	Nmser
40	D-ornitina	Dorn	L-N-metiltreonina	Nmthr
	D-fenilalanina	Dphe	L-N-metilriptófano	Nmtrp
45	D-prolina	Dpro	L-N-metiltirosina	Nmtyr
	D-serina	Dser	L-N-metilvalina	Nmval
	D-treonina	Dthr	L-N-metiletilglicina	Nmetg
50	D-riptófano	Dtrp	L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
	D-tirosina	Dtyr	L-norleucina	Nle
	D-valina	Dval	L-norvalina	Nva
55	D- α -metilalanina	Dmala	α -metil-aminoisobutirato	Maib
	D- α -metilarginina	Dmarg	α -metil- γ -aminobutirato	Mgab
60	D- α -metilasparagina	Dmasn	α -metilciclohexilalanina	Mchexa
	D- α -metilaspartato	Dmasp	α -metilciclopentilalanina	Mcpen
	D- α -metilcisteína	Dmcys	α -metil- α -naftilalanina	Manap
65	D- α -metilglutamina	Dmgln	α -metilpenicilamina	Mpen

	D- α -metilhistidina	Dmhis	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
	D- α -metilisoleucina	Dmile	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
5	D- α -metilleucina	Dmleu	N-(3-aminopropil)glicina	Norn
	D- α -metillisina	Dmlys	N-amino- α -metilbutirato	Nmaabu
10	D- α -metilmetionina	Dmmet	α -naftilalanina	Anap
	D- α -metilornitina	Dmorn	N-bencilglicina	Nphe
	D- α -metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carbamiletil)glicina	Nglu
15	D- α -metilprolina	Dmpro	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
	D- α -metilserina	Dmser	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
	D- α -metiltreonina	Dmthr	N-(carboximetil)glicina	Nasp
20	D- α -metiltriptófano	Dmtrp	N-ciclobutilglicina	Ncbut
	D- α -metiltirosina	Dmtyr	N-cicloheptilglicina	Nchep
25	D- α -metilvalina	Dmval	N-ciclohexilglicina	Nchex
	D-N-metilalanina	Dnmala	N-ciclodecilglicina	Ncdec
	D-N-metilarginina	Dnmarg	N-ciclododecilglicina	Ncdod
30	D-N-metilasparagina	Dnmasn	N-ciclooctilglicina	Ncoct
	D-N-metilaspartato	Dnmasp	N-ciclopropilglicina	Ncpro
	D-N-metilcisteína	Dnmcys	N-cicoundecilglicina	Ncund
35	D-N-metilglutamina	Dnmglu	N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhm
	D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
40	D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
	D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(1-hidroxietil)glicina	Nthr
	D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(hidroxietil)glicina	Nser
45	D-N-metillisina	Dnmlys	N-(imidazoliletil)glicina	Nhis
	N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	N-(3-indoliletil)glicina	Nhtrp
	D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
50	N-metilglicina	Nala	D-N-metilmetionina	Dnmmet
	N-metilaminoisobutirato	Nmaib	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
55	N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
	N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metilprolina	Dnmpro
	D-N-metiltriptófano	Dnmtrp	D-N-metilserina	Dnmser
60	D-N-metiltirosina	Dnmtyr	D-N-metiltreonina	Dnmthr
	D-N-metilvalina	Dnmval	N-(1-metiletil)glicina	Nval
	ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-metil-naftilalanina	Nmanap
65	L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-metilpenicilamina	Nmpen

	L-etilglicina	Etg	N-(<i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Nhtyr
	L-homofenilalanina	Hphe	N-(tiometil)glicina	Ncys
5	L- α -metilarginina	Marg	penicilamina	Pen
	L- α -metilaspartato	Masp	L- α -metilalanina	Mala
10	L- α -metilcisteína	Mcys	L- α -metilasparagina	Masn
	L- α -metilglutamina	Mgln	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
	L- α -metilhistidina	Mhis	L-metiletilglicina	Metg
15	L- α -metilisoleucina	Mile	L- α -metilglutamato	Mglu
	L- α -metilleucina	Mleu	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
	L- α -metilmetionina	Mmet	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
20	L- α -metilnorvalina	Mnva	L- α -metillisina	Mlys
	L- α -metilfenilalanina	Mphe	L- α -metilnorleucina	Mnle
25	L- α -metilserina	Mser	L- α -metilornitina	Morn
	L- α -metilriptófano	Mtrp	L- α -metilprolina	Mpro
	L- α -metilvalina	Mval	L- α -metiltreonina	Mthr
30	N-(N-(2,2-difeniletil)- carbamilmetil)glicina	Nnbhm	L- α -metiltirosina	Mtyr
			L-N-metilhomofenilalanina	Nmhph
35	1-carboxi-1-(2,2-difenil)- etilamino)ciclopropano	Nmbc	N-(N-(3,3-difenilpropil)- carbamilmetil)glicina	Nnbhe

El Bcl-w de la presente forma puede estar en forma multímera, lo que significa que dos o más moléculas están asociadas entre sí. Cuando las mismas moléculas de Bcl-w están asociadas entre sí, el complejo es un homomultímero. Un ejemplo de un homomultímero es un homodímero. Cuando al menos un Bcl-w está asociado con al menos una molécula no Bcl-w, el complejo es un heteromultímero tal como un heterodímero. Un heteromultímero puede incluir una molécula que sea otro miembro de la familia Bcl-2 o una molécula capaz de promover o antagonizar la supervivencia de células y/o retrasar la entrada en el ciclo de células.

La presente invención considera, por tanto, un método para modular la expresión de *bcl-w* o un derivado del mismo *in vitro*, cuyo método comprende poner en contacto el gen *bcl-w* con una cantidad eficaz de un modulador de la expresión de *bcl-w* que es una molécula sentido para *bcl-w* que comprende una secuencia de codificación de la invención o una molécula antisentido para *bcl-w* que comprende una secuencia complementaria de la invención, durante un tiempo y en condiciones suficientes para regular hacia arriba o regular hacia abajo o modular de otro modo la expresión de *bcl-w* o su derivado. Por ejemplo, puede introducirse en una célula una molécula de ácido nucleico que codifique Bcl-w o un derivado del mismo para aumentar la capacidad de esa célula para sobrevivir, e inversamente, pueden introducirse secuencias antisentido de *bcl-w* tales como oligonucleótidos para disminuir la capacidad de supervivencia de cualquier célula que exprese el gen *bcl-w* endógeno.

La presente invención proporciona además el uso de un modulador de la expresión de *bcl-w* que es una molécula sentido o antisentido para *bcl-w*, que comprende una secuencia de codificación o complementaria de la invención, respectivamente, en la preparación de un medicamento para modular la expresión de *bcl-w* o un derivado del mismo.

Otro aspecto de la presente invención considera un método para modular la actividad de Bcl-w o su derivado *in vitro*, cuyo método comprende administrar a una célula una cantidad eficaz modulante de un modulador que es un anticuerpo o una forma no de membrana de Bcl-w o su derivado como se definen aquí durante un tiempo y en condiciones suficientes para aumentar o disminuir la actividad de Bcl-w.

La presente invención proporciona además el uso de un modulador que aumenta o disminuye la actividad de Bcl-w que es un anticuerpo o una forma no de membrana de Bcl-w o su derivado como se definen aquí en la preparación de un medicamento para modular la actividad de Bcl-w o su derivado.

La expresión de *bcl-w* o la actividad de Bcl-w aumentadas pueden influir para regular la inhibición o prevención de la degeneración de células tal como bajo condiciones citotóxicas durante, por ejemplo, irradiación y quimioterapia. La expresión de *bcl-w* o la actividad de Bcl-w disminuidas pueden ser importantes, por ejemplo, en la terapia selectiva de cáncer y la expresión de *bcl-w* aumentada puede ser importante para el tratamiento o profilaxis de estados tales como apoplejía y enfermedad de Alzheimer.

Por consiguiente, la presente invención considera una composición farmacéutica que comprende Bcl-w o un derivado del mismo como se define aquí o un modulador de la expresión de *bcl-w* o la actividad de Bcl-w como se ha definido anteriormente y uno o más vehículos y/o diluyentes aceptables farmacéuticamente.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersión inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta la medida en que se inyecte fácilmente con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de ellos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabens, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados antes, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contenga el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados antes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado bajo vacío y la técnica de liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de la solución filtrada estéril previamente de ellos.

Cuando los moduladores de *bcl-w* y Bcl-w están protegidos adecuadamente, pueden administrarse oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden encerrarse en cápsulas de gelatina de envuelta dura o blanda, o pueden comprimirse en pastillas, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta. Para administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de pastillas ingeribles, pastillas bucales, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos 1% en peso de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variarse, por supuesto, y puede estar convenientemente entre alrededor del 5 y aproximadamente el 80% del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones útiles terapéuticamente es tal que se obtenga una dosificación adecuada. Las composiciones o preparaciones preferidas según la presente invención se preparan de tal modo que una forma unitaria de dosificación oral contenga entre aproximadamente 0,1 µg y 2.000 mg de compuesto activo.

Las pastillas, comprimidos, píldoras, cápsulas y similares pueden contener también lo siguiente: un aglomerante tal como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato bicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato magnésico; y puede añadirse un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente saporífero tal como menta piperita, aceite de gualteria o sabor de cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Otros materiales diversos pueden estar presentes como revestimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, pastillas, píldoras o cápsulas pueden revestirse con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabens como agentes de conservación, un colorante y un saporífero tal como sabor de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado para preparar cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse a preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Los vehículos y/o diluyentes aceptables farmacéuticamente incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es muy conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se considera su uso en las composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse también en las composiciones ingredientes activos suplementarios.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación según se usa aquí se refiere a unidades discretas físicamente adaptadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en

asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las nuevas formas unitarias de dosificación de la invención viene dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal material activo para el tratamiento de enfermedad en sujetos vivos que tengan un estado enfermado en el que la salud corporal está dañada como se describe aquí con detalle.

El ingrediente activo principal se compone para administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un vehículo aceptable farmacéuticamente adecuado en forma unitaria de dosificación como se ha descrito anteriormente. Una forma de dosificación unitaria puede contener, por ejemplo, el compuesto activo principal en cantidades variables de 0,5 μg a aproximadamente 2.000 mg. Expresado en proporciones, el compuesto activo está presente generalmente en de alrededor de 0,5 μg a aproximadamente 2.000 mg/ml de vehículo. En el caso de composiciones que contienen ingredientes activos suplementarios, las dosificaciones se determinan con referencia a la dosis y manera de administración usuales de dichos ingredientes.

La composición farmacéutica puede comprender también moléculas genéticas tales como un vector capaz de transfectar células objetivo en la que el vector lleva una molécula de ácido nucleico capaz de modular la expresión de *bcl-w* o la actividad de Bcl-w. El vector puede ser, por ejemplo, un vector vírico.

Los estados que requieren modulación de la muerte celular fisiológica incluyen aumento de la supervivencia de células en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, infarto de miocardio, enfermedad degenerativa muscular, hipoxia, isquemia, infección por HIV o para prolongar la supervivencia de células trasplantadas para tratamiento de una enfermedad. Alternativamente, la secuencia antisentido podría usarse, por ejemplo, para reducir la capacidad de supervivencia de células tumorales o linfocitos autorreactivos. La secuencia sentido puede usarse también para modificar el comportamiento de células *in vitro*, por ejemplo, como parte de un método para desarrollar nuevos linajes a partir de tipos de células que tienen requisitos de factor de crecimiento no identificados; para facilitar el aislamiento de células de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales, como se describe después; y para aumentar la supervivencia de células de explantes primarios mientras se han modificado genéticamente.

Otro aspecto todavía de la presente invención se dirige a anticuerpos para Bcl-w y sus derivados, incluyendo anticuerpos catalíticos. Tales anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden seleccionarse entre anticuerpos para Bcl-w de origen natural o pueden producirse específicamente para Bcl-w o sus derivados. En el caso de estos últimos, puede necesitarse primero asociar Bcl-w o sus derivados con una molécula vehículo. Los anticuerpos y/o Bcl-w recombinante o sus derivados de la presente invención son particularmente útiles como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Alternativamente, pueden usarse fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab. Además, la presente invención se extiende a anticuerpos recombinantes y sintéticos y a híbridos de anticuerpos. Un "anticuerpo sintético" se considera aquí que incluye fragmentos e híbridos de anticuerpos. Los anticuerpos de este aspecto de la presente invención son particularmente útiles para inmunoterapia y pueden usarse también como herramienta de diagnóstico para valorar apoptosis o comprobar el programa de un régimen terapéutico.

Por ejemplo, pueden usarse Bcl-w y sus derivados para examinar anticuerpos para Bcl-w de origen natural. Éstos pueden tener lugar, por ejemplo, en algunas enfermedades autoinmunes.

Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos específicos para examinar proteínas de Bcl-w. Esto último sería importante, por ejemplo, como medio para examinar niveles de Bcl-w en un extracto de células u otro fluido biológico o purificación de Bcl-w hecha por medios recombinantes a partir de fluido sobrenadante de cultivo. Las técnicas para los ensayos considerados aquí son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos sándwich, ELISA y citometría de flujo.

Está dentro del alcance de esta invención incluir cualesquiera segundos anticuerpos (monoclonales, policlonales o fragmentos de anticuerpos) dirigidos a los primeros a los primeros anticuerpos mencionados discutidos antes. Los primeros y segundos anticuerpos pueden usarse en ensayos de detección o puede usarse un primer anticuerpo con un anticuerpo anti-inmunoglobulina disponible comercialmente. Un anticuerpo como se considera aquí incluye cualquier anticuerpo específico para cualquier región de Bcl-w.

Son obtenibles anticuerpos policlonales y monoclonales por inmunización con la proteína o derivados péptidos, y cualquier tipo es utilizable para inmunoensayos. Los métodos para obtener ambos tipos de sueros son muy conocidos en la técnica. Los sueros policlonales son menos preferidos pero se preparan de manera relativamente fácil por inyección de un animal de laboratorio adecuado con una cantidad eficaz de Bcl-w, o partes antígenas de él, recogida de suero del animal y aislamiento de sueros específicos por cualquiera de las técnicas de inmunoabsorbentes conocidas. Aunque son utilizables anticuerpos producidos por este método en virtualmente cualquier tipo de ensayo, son generalmente menos aceptados por la heterogeneidad potencial del producto.

El uso de anticuerpos monoclonales en un inmunoensayo es particularmente preferido por la capacidad para producirlos en grandes cantidades y la homogeneidad del producto. Puede hacerse la preparación de linajes celulares de hibridomas para producción de anticuerpos monoclonales derivados fusionando un linaje celular inmortal y linfocitos sensibilizados contra la preparación inmunógena por técnicas que son muy conocidas por los expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Douillard y Hoffman, Basic Facts about Hybridomas, en *Compendium of Immunology* Vol. II,

red. por Schwartz, 1981; Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-499, 1975, *European Journal of Immunology* 6: 511-519, 1976).

Otro aspecto de la presente invención considera un método para detectar Bcl-w en una muestra biológica de un sujeto, cuyo método comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo específico para Bcl-w o sus derivados como se ha definido aquí durante un tiempo y en condiciones suficientes para formarse un complejo anticuerpo-Bcl-w, y detectar después dicho complejo.

La detección de la presencia de Bcl-w puede conseguirse de un cierto número de formas tales como mediante procedimientos de manchas de Western, ELISA o citometría de flujo. Está disponible un amplio intervalo de técnicas de inmunoensayo, como puede verse con referencia a las Patentes de los EE.UU. N^{os} 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Éstas, por supuesto, incluyen ensayos de lugar simple y de dos lugares o “sándwich” de los tipos no competitivos, así como en los ensayos de unión competitiva tradicionales. Estos ensayos incluyen también unión directa de un anticuerpo marcado a un objetivo.

Los ensayos sándwich están entre los ensayos más útiles y usados comúnmente y son aceptados para su uso en la presente invención. Existe un cierto número de variaciones de la técnica de ensayos sándwich, y se pretende que todas estén abarcadas por la presente invención. Brevemente, en un ensayo directo típico, un anticuerpo no marcado se inmoviliza en un sustrato sólido y la muestra a ensayar se pone en contacto con la molécula unida. Después de un período adecuado de incubación, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo anticuerpo-antígeno, se añade e incuba después un segundo anticuerpo específico para el antígeno, marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, permitiendo tiempo suficiente para la formación de otro complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. Se separa por lavado cualquier material no reaccionado, y se determina la presencia del antígeno por observación de una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible, o pueden cuantificarse comparando con una muestra testigo que contenga cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones en el ensayo directo incluyen un ensayo simultáneo, en el que se añaden simultáneamente al anticuerpo unido la muestra y el anticuerpo marcado. Estas técnicas son muy conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo cualesquiera pequeñas variaciones como será evidente fácilmente. Según la presente invención, la muestra es una que podría contener Bcl-w, incluyendo extracto de células, biopsia de tejidos o posiblemente suero, saliva, secreciones mucósicas, linfa, fluido de tejidos y fluido respiratorio. La muestra es por tanto, generalmente, una muestra biológica que comprende fluido biológico pero se extiende también a fluido de fermentación y fluido sobrenadante tal como de un cultivo de células.

En el ensayo sándwich directo típico, un primer anticuerpo que tiene especificidad para el Bcl-w o partes antigénicas del mismo se une covalentemente o pasivamente a una superficie sólida. La superficie sólida es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros usados más comúnmente celulosa, poli(acrilamida), nylon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos de microplacas o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son muy conocidos en la técnica y consisten generalmente en unión covalente con reticulación o adsorción física, lavándose el complejo polímero-anticuerpo en la preparación para la muestra de ensayo. Una parte alícuota de la muestra a ensayar se añade después al complejo en fase sólida y se incuba durante un período de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-40 minutos) y en condiciones adecuadas (por ejemplo, 25°C) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Tras el período de incubación, la fase sólida con subunidad de anticuerpo se lava y seca e incuba con un segundo anticuerpo específico para una porción del hapteno. El segundo anticuerpo está enlazado a una molécula informadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo al hapteno.

Un método alternativo implica inmovilizar las moléculas objetivo en la muestra biológica y exponer después el objetivo inmovilizado a anticuerpo específico que puede o no estar marcado con una molécula informadora. Dependiendo de la cantidad de objetivo y la intensidad de la señal de la molécula informadora, un objetivo unido puede ser detectable por marcado directo con el anticuerpo. Alternativamente, un segundo anticuerpo marcado, específico para el primer anticuerpo, se expone al complejo objetivo-primer anticuerpo para formar un complejo terciario objetivo-primer anticuerpo-segundo anticuerpo. El complejo se detecta por la señal emitida por la molécula informadora.

Por “molécula informadora” según se usa en la presente memoria descriptiva se entiende una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal identificable analíticamente, que permite la detección de anticuerpo unido a antígeno. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. Las moléculas informadoras usadas más comúnmente en este tipo de ensayo son enzimas, fluoróforos o moléculas que contienen radionúclidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes.

En el caso de inmunoensayo de enzimas, se conjuga una enzima al segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o peryodato. No obstante, como se reconocerá fácilmente, existe una amplia variedad de diferentes técnicas de conjugación, que están disponibles fácilmente para el técnico experto. Las enzimas usadas comúnmente incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos a usar con las enzimas específicas se escogen generalmente para la producción, por hidrólisis mediante la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorógenos, que producen un producto fluorescente, en lugar de los sustratos cromógenos señalados antes. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se añade al primer complejo anticuerpo hapteno, se le deja unirse y se separa después por lavado el reactivo en exceso. Se añade

después una solución que contenga el sustrato apropiado al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima enlazada al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa, que puede cuantificarse adicionalmente, usualmente espectrofotométricamente, para dar una indicación de la cantidad de hapteno que estaba presente en la muestra. “Molécula informadora” se extiende también al uso de aglutinación de células o inhibición de la aglutinación tal como hemáties en perlas de látex y similares.

Alternativamente, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos, sin alterar su capacidad de unión, compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina. Cuando se activa por iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía de la luz, induciendo un estado hasta excitabilidad en la molécula, seguido por emisión de la luz en un color característico detectable visualmente con un microscopio óptico. Como en el EIA, el anticuerpo marcado fluorescente se deja unirse al primer complejo anticuerpo-hapteno. Después de separar por lavado el reactivo no unido, el complejo terciario restante se expone después a la luz de la longitud de onda apropiada; la fluorescencia observada indica la presencia del hapteno de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA están ambas muy bien establecidas en la técnica y se prefieren particularmente para el presente método. Sin embargo, pueden emplearse también otras moléculas informadoras tales como radioisótopos y moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

La presente invención considera también ensayos genéticos tales como implicando análisis de PCR para detectar *bcl-w* o sus derivados.

La presente invención se describe adicionalmente con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

En las Figuras:

La Figura 1 es una representación que muestra secuencias de aminoácidos predichas codificadas por cADNs de *bcl-w* de ratón y cADNs quiméricos correspondientes a transcriptos empalmados desde el exón 3 del gen *bcl-w* a un exón del gen *rox* adyacente. Las cajas destacan las regiones de mayor homología dentro de la familia Bcl-2, denominadas S1, S2 y S3 (Cory, 1995). La punta de flecha marca la posición correspondiente a un intrón dentro del gen. Dos residuos que difieren en el Bcl-w humano se indican por encima de la secuencia de ratón. No se determinó toda la secuencia de cADN de *rox* en ambas orientaciones.

La Figura 2 es una representación esquemática que muestra la estructura del lugar de *bcl-w* genómico y la derivación de los cADNs de *bcl-w* y *bcl-w/rox*. Se clonaron fragmentos genómicos que se solapan que abarcan una región de 22 kb, de los cuales sólo se muestra uno (a). Los fragmentos *b* a *f* son subclones del fragmento *a*. Los exones se indican como cajas, con regiones de no codificación abiertas, la región de codificación del gen *bcl-w* llena y la del gen *rox* (véase texto) punteada. Se encontraron dos tipos de extremo 5' para cada clase de mRNA, lo que sugiere promotores alternativos y/o empalme. Los primeros 815 residuos de la región no traducida 3' de *bcl-w* corresponden precisamente a los del exón genómico 4; la región de la que aún no se ha determinado la secuencia se indica como una línea quebrada. La representación de mapa de restricción sugiere que la región no traducida 3' de *bcl-w* contiene al menos un intrón más. La localización del resto del gen *rox* no es conocida.

La Figura 3 es una representación fotográfica que muestra la expresión de ARN de *bcl-w* en linajes de células hemopoyéticas. Se fraccionó por electroforesis ARN poliadenilado preparado a partir de linajes del macrófago indicado (mΦ), mielóide y linfóide T y B, se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con una sonda de cADN de *bcl-w*. Las sondas de la región de codificación y la región no traducida 3' de *bcl-w* dieron resultados idénticos.

La Figura 4 muestra la expresión de proteína de Bcl-w. (A) Expresión de FLAG-Bcl-w dentro de un clon (D3B5) de células FDC-P1 transfectadas con el vector de expresión PGKpuro de FLAG-bcl-w. Las células transfectantes (llenas) y parentales (abiertas) se colorearon con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG y se analizaron por citometría de flujo. (B) Inmunomanchas que revelan proteínas supervivientes etiquetadas con epítipo. Lisados de células FDC_P1 y células FDC-P1 que expresan Bcl-w de ratón etiquetado con FLAG (clon D3B5), Bcl-x_L humano o Bcl-2 humano se hicieron pasar sobre un gel de afinidad anti-FLAG (Kodak), se eluyeron con péptido de FLAG, se fraccionaron por electroforesis y se analizaron después con anticuerpo anti-FLAG. (C) Inmunomanchas con antisuero anti-Bcl-w de conejo policlonal en lisados de células fraccionados por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. En (B) y (C), las proteínas coloreadas se visualizaron por quimioluminiscencia aumentada (Amersham). WEHI-112.1 y EL4.1 son linajes de linfomas T (Harris *et al.*, 1973) y J774 es un linaje de macrófago (Ralph *et al.*, 1975). Se detectó también por el antisuero una proteína adicional de ~18 kD, aparentemente por reacción cruzada fortuita. Los pesos moleculares de marcadores (Bio-Rad) se dan en kD.

La Figura 5 es una representación gráfica que muestra que Bcl-w inhibe la apoptosis inducida por varios pero no todos los agentes citotóxicos. Células FDC-P1, que requieren IL-3 para supervivencia y proliferación (Dexter *et al.*, 1980) se lavaron tres veces (A, panel izquierdo) en medio carente de IL-3 o se irradiaron (10 Gy) (A, panel derecho) y se cultivaron después en medio carente (A, panel izquierdo) o que contenía IL-3 (A, panel derecho). Células de hibridoma T B6.216BW2 (Teh *et al.*, 1989) se cultivaron en medio que contenía dexametasona 1 μM (B, panel izquierdo) o se irradiaron (10 Gy) (B, panel derecho). Células de linfoma CH1 B (Lynes *et al.*, 1978) se cultivaron en presencia de 0,1 μg/ml de anticuerpo anti-ratón CD95 Jo2 (Ogasawara *et al.*, 1993) (C, panel izquierdo) o se irradiaron (10 Gy) (C, panel derecho). Los cultivos se iniciaron a razón de 2,5 x 10⁵ células/ml y se determinó la viabilidad coloreando con 0,4% p/v de eosina los días indicados.

La Figura 6 es una representación esquemática que muestra que *Bcl-w* se representa en la región central del cromosoma de ratón 14. Los modelos de segregación de *bcl-w* y genes flanqueantes en 134 animales de retrocruce tipificados para todos los lugares se muestran en la parte superior. Cada columna representa el haplotipo heredado del progenitor (C57BL/6J x *M. spretus*) F.; las cajas sombreadas representa el alelo de C57BL/6J y las cajas abiertas el alelo de *M. spretus*. El número de descendientes que heredan cada tipo de cromosoma se lista debajo de cada columna. Se muestra en el fondo un mapa de enlace parcial de cromosoma 14 que muestra la localización de *bcl-w* con relación a genes enlazados. Se muestran distancias de recombinación entre lugares en centiMorgans a la izquierda del cromosoma y las posiciones de lugares en cromosomas humanos, cuando se conocen, se muestran a la derecha. Pueden obtenerse referencias para las posiciones de lugares del mapa humano citadas en este estudio de GDB (Genoma Data Base), una base de datos de información de enlaces humanos mantenida por The William H. Welch Medical Library de The Johns Hopkins University (Baltimore, MD).

La Figura 7 es una representación fotográfica que muestra la localización de *bcl-w* en el cromosoma 14 humano. Metafase parcial que muestra FISH con la sonda intrónica de *bcl-w*. (A) Cromosomas de macho normales coloreados con yoduro de propidio. Los lugares de hibridación en el cromosoma 14 se indican por una fecha. (B) La misma metafase como en (A) coloreada con DAPI para identificación de cromosomas.

La Figura 8 es una representación de una comparación de sub-familias de Bcl-2 de supervivencia y anti-supervivencia. Se alinearon secuencias de aminoácidos de Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bax y Bak humanos por el programa Wisconsin PILEUP. Se muestran también la porción más conservada de la secuencia de Ced 9 y un segmento conservado corto en Bik. Las aberturas hechas en secuencias individuales para optimizar el alineamiento se indican por puntos. Los residuos idénticos o muy similares (L ~ M; E ~ D; K ~ R; V ~ I) en las proteínas que promueven supervivencia Bcl-2, Bcl-x_L y Bcl-w se muestran en un fondo negro, como también los idénticos o muy similares en todos los homólogos de Bcl-2. Un fondo gris indica residuos participados por Bak y Bax pero no presentes en las proteínas de supervivencia. Las regiones de homología S1, S2 y S3 (Cory, 1995) y el segmento C-terminal hidrófobo están en cajas, mientras que las regiones BH1, BH2, BH3 y NH1 definidas por otros (Yin *et al.*, 1994; Subramanian *et al.*, 1995) están sobre-rayadas. Las puntas de flecha llenas indican residuos conservados específicos para las proteínas de supervivencia; las puntas de flecha abiertas, los específicos para proteínas anti-supervivencia. Una flecha ininterrumpida indica la posición del lugar de empalme común a todas las proteínas; una flecha interrumpida, la posición del empalme 5' alternativo que crea la proteína de Bcl-x más pequeña y una línea ondulada un motivo C-terminal conservado.

La Figura 9 es una representación de la región de codificación de *bcl-w* (A) humano y (B) de ratón.

Se usan abreviaturas simples y de tres letras para residuos de aminoácidos en la memoria descriptiva sujeto, como se define en la Tabla 2.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 309 995 T3

TABLA 2

Abreviaturas de aminoácidos

	Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una letra
5	Alanina	Ala	A
10	Arginina	Arg	R
	Asparagina	Asn	N
	Ácido aspártico	Asp	D
15	Cisteína	Cys	C
	Glutamina	Gln	Q
	Ácido glutámico	Glu	E
20	Glicina	Gly	G
	Histidina	His	H
25	Isoleucina	Ile	I
	Leucina	Leu	L
	Lisina	Lys	K
30	Metionina	Met	M
	Fenilalanina	Phe	F
	Prolina	Pro	P
35	Serina	Ser	S
	Treonina	Thr	T
40	Triptófano	Trp	W
	Tirosina	Tyr	Y
	Valina	Val	V
45	Cualquier residuo	Xaa	X

Sumario de SEQ ID NOs.

SEQ ID NO.	Descripción
50	
1	Cebador 5' para <i>bcl-w</i> de ratón (junto con un lugar de Xba1)
2	Secuencia de aminoácidos para SEQ ID NO: 1
55	
3	Cebador 3' para <i>bcl-w</i> de ratón (junto con un lugar de EcoR1)
4	Secuencia de aminoácidos para SEQ ID NO: 3
60	
5	Secuencia de aminoácidos N-terminal de Bcl-w de ratón
6	<i>bcl-w</i> humano
7	Bcl-w humano
65	
8	<i>bcl-w</i> de ratón
9	Bcl-w de ratón

Ejemplo 1

Clonación de PCR

En base a la fuerte homología entre Bcl-2, Bcl-x_L y Bax, se diseñaron cebadores de PCR degenerados dentro de las regiones S2 y S3 (véase Figura 8), usando inosina en posiciones totalmente degeneradas. Para facilitar la clonación, se incorporaron lugares de restricción de Xba I y Eco RI en los extremos. El cebador 5' fue 5'GCTCTAG AAC TGG GGI (AC)GI (AG)TI GTI GCC TT(CT) TT3' [SEQ ID NO: 1], correspondiente a Xba I - NWGR(IV)VAFF [SEQ ID NO: 2], y el cebador 3' fue 5'GGAAT TC CCA GCC ICC IT(GT) ITC TTG GAT CCA 3' [SEQ ID NO: 3], correspondiente a WIQ(DE)(NQ)GGW - Eco RI [SEQ ID NO: 4]. Las plantillas de ARN poliadenilado (1 µg) para transcripción inversa procedían del linaje celular de macrófago de ratón J774 y cerebro de ratón d18. El ARN se precipitó en etanol, se secó, se resuspendió en 10 µl de agua, se calentó a 65°C durante 10 min y se enfrió en hielo. Se sometió después a transcripción inversa en una reacción de 20 µl que contenía Tris HCl 50 mM (pH 8,3 a 25°C), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotreitól 10 mM, dNTPs 0,5 mM, 2 µl de cebadores hexámeros aleatorios (Amersham First Strand cDNA Synthesis System) y 200 U de transcriptasa inversa Superscript II® (GIBCO), a 48°C durante 60 min. Para la reacción PCR, se añadió 1 µl de esta mezcla de reacción a 49 µl de un cóctel consistente en KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM (pH 9,0 a 25°C), 0,1% v/v de Triton X-100, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 10% v/v de glicerol, 0,05% p/v de gelatina, 0,3 µg de cada cebador y 2,5 U de polimerasa de ADN Taq. Esta mezcla se desnaturalizó a 94°C durante 3 min, y se sometió después a 5 ciclos que comprendían 1 min a 94°C, 2 min a 37°C, subida a razón de 0,3°C/s hasta 72°C, seguida por 1 min a 72°C. El perfil térmico para los siguientes 35 ciclos fue 1 min a 94°C, 2 min a 42°C, 1 min a 72°C. Finalmente, se incubó la mezcla a 72°C durante 5 min. Los productos de PCR se fraccionaron por electroforesis en gel y se extrajeron del gel fragmentos de ADN del tamaño esperado (159 pb), se restringieron con Eco RI y Xba I y se subclonaron en pBluescript II SK(+) digerido con EcoRI/Xba I. Se determinó la secuencia de los clones resultantes usando una reacción de base simple (T) usando el fmol® Sequencing System (Promega) y el método del fabricante. Se realizó después el análisis de la secuencia completa en un clon representativo para cada modelo de trayectoria T único.

Ejemplo 2

Representación del mapa de retrocruce de ratón interespecífico

Se generó progenie de retrocruce interespecífico apareando hembras (C57BL/6J x *M. spretus*)F y machos C57BL/6J como se ha descrito (Copeland y Jenkins, 1991). Se usó un total de 205 ratones N₂ para representar el mapa del lugar de *Bcl-w*. El aislamiento de ADN, la digestión con enzimas de restricción, la electroforesis en gel de agarosa, la transferencia de manchas de Southern y la hibridación se realizaron esencialmente como se ha descrito (Jenkins *et al.*, 1982). La sonda, un fragmento de *EcoRI/NotI* de 2,6 kb de cADN de ratón, se marcó con (α^{32} P) dCTP usando un juego de marcado con cebado aleatorio (Stratagene); se hizo lavado hasta un rigor final de 1,0 x SSCP, 0,1% p/v de SDS, 65°C. Se detectó un fragmento de 3,8 kb en digeridos de BamHI de ADN de C57BL/6J y 7,8 kb en ADN de *M. spretus*. Se siguió su distribución en ratones de retrocruce. Las sondas y RFLPs para los lugares enlazados a *bcl-w*, incluyendo proteína 1 asociada a tensioactivo (*Sftp1*), cadena alfa receptora de células T (*Tcr α*) y proteína alfa-3 de canal de membrana de unión de abertura (*Gja3*) se han descrito previamente (Haefliger *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1992). Se calcularon distancias de recombinación como se ha descrito (Green, 1981) usando el programa de ordenador SPRETUS MADNESS. El orden de genes se determinó minimizando el número de acontecimientos de recombinación requeridos para explicar los modelos de distribución de alelos.

Ejemplo 3

Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

cADN y sondas de intrones se trasladaron de corte con biotina-14-dATP y se hibridaron *in situ* con una concentración final de 20 ng/ml hasta metafases de macho normales. El método FISH se modificó del descrito previamente (Callen *et al.*, 1990) porque se colorearon cromosomas antes de análisis con yoduro de propidio (como colorante de contraste) y 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (para identificación de cromosomas). Las imágenes de las preparaciones de metafases se capturaron por una cámara CCD y se aumentaron por ordenador.

Ejemplo 4

Vectores de expresión

El vector plásmido usado para expresión y selección en células eucariotas se basa en el vector pEFBos que contiene el promotor potente (y empalme) del gen de factor de alargamiento altamente expresado 1 α y contiene un marcador seleccionable (puroR) dirigido por el promotor de PGK (Mizushima y Nagata, 1990; Visvader *et al.*, 1992). Se incorporó una etiqueta de epítopo FLAG (Hopp *et al.*, 1988) para ayudar a la identificación del producto proteínico. El cADN de *bcl-w* se insertó en pEF FLAG-X-PGKpuro, se determinó la secuencia para confirmar el marco de lectura y se transfeció por electroporación en células FDC-P1 (Dexter *et al.*, 1980), B6.2.16BW2 (The *et al.*, 1989) y CH1 (Lynes *et al.*, 1978). Se seleccionaron transfectantes por cultivo durante 7 días en medio que contenía 2 µg/ml de puomicina y se derivaron subsiguientemente clones de agrupaciones independientes por dilución limitante.

ES 2 309 995 T3

Para detectar proteínas etiquetadas con FLAG por inmunofluorescencia citoplásmica, se fijaron células durante 5 min en metanol del 80% v/v a -20°C y se permeabilizaron después con 0,3% de saponina (Sigma), que se incluyó en todas las etapas de coloración y lavado subsiguientes. Las células se incubaron primero con el anticuerpo monoclonal M2 primario (Eastman-Kodak, New Haven, CT) durante 40 min en hielo, se decoraron después con IgG anti-ratón de cabra conjugada a fluoresceína-isotiocianato (FITC) (1-2 µg/ml; Southern Biotechnology, Birmingham) y se analizaron por citometría de flujo usando el FACScan (Becton Dickinson).

Ejemplo 5

10 Anticuerpo de Bcl-w

Se produjeron anticuerpos anti-Bcl-w policlonales de conejo contra el péptido N-terminal Ac-MATPASTPD-TRALV-NH₂ [SEQ ID NO: 5] (Chiron Mimotopes). Se inyectó en conejos péptido conjugado a KLH (100 µg en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato con un volumen igual de coadyuvante de Freund) y 3, 7 y 14 semanas más tarde se reforzó a los animales con el mismo péptido pero en coadyuvante incompleto de Freund. Se examinaron por ELISA los antisueros de conejo frente al péptido conjugado a BSA.

Ejemplo 6

20 Identificación de un nuevo gen relacionado con *bcl-2*

Se usaron cebadores de PCR degenerados que codifican parte de las regiones S2 y S3 de los tres homólogos de *bcl-2* conocidos hasta el momento (*bcl-2*, *bcl-x* y *bax*) para multiplicación de bajo rigor de plantillas de cADN derivadas de mARN de un linaje celular de macrófagos de ratón y cerebro de ratón (véase Ejemplo 1). Se subclonaron y se examinaron por determinación de secuencia fragmentos del tamaño esperado (159 pb) para miembros de la familia de Bcl-2 conocidos. Como se anticipaba, se identificaron múltiples clones de *bcl-2*, *bcl-x* y *bax*, pero ambas fuentes de ARN producían también clones que representaban un gen nuevo. Para obtener un cADN de longitud completa, el producto de PCR clonado se usó para sondear genotecas de cADN de cerebro de ratón adulto, bazo y un linaje de células mieloides. Se obtuvieron dos clases de cADN (Figura 1). El primero codificaba un polipéptido notablemente similar a Bcl-2, que se denominó Bcl-w. El segundo codificaba un polipéptido mucho más grande, que era idéntico a Bcl-w en los primeros 144 residuos, pero divergía después destacadamente. El punto de divergencia era dentro de la región S3 en un punto correspondiente a una unión de empalme en los genes *bcl-2*, *bcl-x* y *bax*. Parecía así probable que la segunda clase de ARN era producida por empalme alternativo de transcritos de *bcl-w*.

Para resolver esta cuestión, se aislaron clones genómicos solapantes que abarcan 22 kb del lugar de *bcl-w* (Figura 2). La porción N-terminal de la región de codificación representaba en mapa a un fragmento de BamHI de 1,3 kb (subclon c). Se determinó su secuencia y la de fragmentos adyacentes. La comparación con secuencias de la primera clase de cADNs reveló que el gen *bcl-w* contenía al menos 4 exones espaciados estrechamente con la división de la región de codificación entre los exones 3 y 4. La región 3' no traducida inusualmente grande (~ 2,8 kb) comienza en el exón 4. Se hibridaron sondas correspondientes a la región de codificación o a la región 3' no traducida de estos cADNs de *bcl-w* con un ARN poliadenilado de 3,7 kb de abundancia relativamente baja (Figura 3). Los cADNs de *bcl-w* mayores son casi de esa longitud.

La segunda clase de cADNs se probó corresponder a ARNs quiméricos producidos a partir de *bcl-w* y un gen adyacente (Figura 2). Las secuencias genómica y de cADN divergían en el extremo 3' del exón 3, y la porción 3' de los cADNs se deriva de un exón de aproximadamente 9,2 kb aguas abajo (Figura 2).

Una investigación de base de datos reveló fuerte homología entre el exón aguas abajo y el gen *rox2* de *Drosophila*. La secuencia de aminoácidos de *rox* de ratón predicha del 66% de identidad y el 79% de similitud con el gen de *Drosophila*, que puede codificar una proteína de unión de ARN (Brand *et al.*, 1995). Así, el empalme alternativo genera transcritos de *bcl-w/rox*. La localización del resto del gen *rox* de ratón espera al aislamiento de clones genómicos adicionales.

Una sonda específica para *rox* de *Drosophila* (véase Brand *et al.*, 1995) se hibridó con abundantes mARNs de 2,8 y 1,8 kb, presumiblemente los transcritos de *bona fide* (no quiméricos) del gen *rox*. Puesto que las sondas de cADN correspondientes al exón 3 de *bcl-w* detectaron sólo el ARN de 3,7 kb, los transcritos de *bcl-w/rox* quiméricos parecen ser de baja abundancia. El significado de los transcritos de *bcl-w/rox* no está claro, y la incapacidad de los inventores para expresar niveles detectables de la proteína correspondiente ha imposibilitado así mucho un análisis adicional.

Ejemplo 7

Los genes *bcl-w* humano y de ratón son altamente homólogos

Se aislaron cADNs de *bcl-w* humano de una genoteca derivada de mARN de cerebro de adulto. Los seis clones correspondían a cADN de *bcl-w* y no se detectaron cADNs quiméricos. Las regiones de codificación de los genes humano y de ratón eran extremadamente homólogas: 99% idénticas al nivel de aminoácidos y 94% al nivel de nucleótidos. Las únicas diferencias de aminoácidos eran dos sustituciones conservadoras: alanina en lugar de treonina en el residuo 7 y ácido glutámico en lugar de ácido aspártico en el residuo 124, justo aguas arriba de la región S3.

Como comparación, la homología de las regiones de codificación de *bcl-2* humano y de ratón es del 90% al nivel de aminoácidos y del 88% al nivel de nucleótidos, y la de *bcl-x* es del 97% y el 94%.

Ejemplo 8

*El gen **bcl-w** aumenta la supervivencia de células*

Para permitir ensayos sobre su función, el cADN de *bcl-w* se insertó en vectores de expresión y se transfectó en tres linajes de células hemopoyéticas: FDC-P1, un linaje mielóide dependiente de IL-3; B6.2.16BW2, un linaje de hibridomas T; y CH1, un linaje de linfomas B. Para facilitar la detección, la proteína recombinante incluía un epítipo FLAG N-terminal (Hopp *et al.*, 1988). Se seleccionaron para el estudio varias agrupaciones independientes y clones de células resistentes a fármacos que se coloreaban fuertemente con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG (por ejemplo, Figura 4A). El análisis de manchas de Western (Figura 4B) mostró que la proteína de FLAG-Bcl-w tenía un peso molecular aparente de 25 kD. Antisuero de conejo producido para un péptido N-terminal de Bcl-w detectó no sólo la proteína etiquetada con FLAG sino también una proteína de ~22 kD, presumiblemente Bcl-w endógeno, que también era aparente en lisados de cuatro linajes celulares no transfectados (Figura 4C). La movilidad de la proteína endógena era indistinguible de la de Bcl-w carente de la etiqueta FLAG expresada transitoriamente en células COS.

Bcl-w tiene una región hidrófoba próxima a su término carboxi y sería de esperar por tanto que estuviera asociado a membrana. La microscopía confocal de células FDC-P1 transfectadas con un vector de expresión de *bcl-w* y coloreadas con el anticuerpo policlonal de conejo demostró que Bcl-w estaba situado en el citoplasma y que se distribución se parecía estrechamente a la de Bcl-2. La localización citoplásmica de Bcl-w se confirmó por manchas de western de fracciones de proteínas nucleares y citoplásmicas.

Para determinar si Bcl-w aumentaba o antagonizaba con la supervivencia de células, los linajes transfectados se sometieron a diversas condiciones citotóxicas. Las células FDC-P1 que expresan Bcl-w eran notablemente más robustas que las células progenitoras. Realmente, su supervivencia después de privación de IL-3 o irradiación y era comparable a la de linajes que sobreexpresan Bcl-2 o Bcl-x_L (Figura 5A). Bcl-w también aumentó en gran medida la supervivencia de las células de hibridomas T expuestas a dexametasona o irradiación (Figura 5B). Estos resultados sitúan claramente a Bcl-w en la subfamilia de proteínas relacionadas con Bcl-2 que inhibe la muerte celular.

Bcl-2 y Bcl-x_L son relativamente ineficaces para proteger células linfoides contra la apoptosis inducida provocando al receptor de la superficie celular CD95, también conocido como Fas o APO-1 (Strasser *et al.*, 1995). Eso también se mantiene para Bcl-w. Las células de linfoma CH1 B que expresan niveles de Bcl-w suficientes para proteger frente a apoptosis inducida por radiación (Figura 5C, panel derecho) morían tan rápidamente como las células testigo cuando se incubaban con un anticuerpo Jo2 anti-CD95 (Figura 5C, panel izquierdo). Como contraste, la proteína del virus de la viruela bovina CrmA, un potente inhibidor de la cisteína proteasa ICE (Ray *et al.*, 1992), bloqueaba muy eficazmente la apoptosis inducida mediante CD95 (Figura 5C, panel izquierdo) pero no protegía las células de muerte inducida por radiación (Figura 5C, panel derecho). Estos resultados significan que la apoptosis es inducida mediante al menos dos trayectorias, sólo una de las cuales implica activación de ICE.

Ejemplo 9

Modelo de expresión

Aunque *bcl-2* y *bcl-x* se expresan ambos ampliamente, sus modelos de expresión difieren significativamente (Hockenbery *et al.*, 1991; Krajewsky *et al.*, 1994). Los modelos de expresión de *bcl-x* y *bcl-w* se compararon por análisis de manchas de northern de ARN poliadenilado. Ambos genes se expresaban en muchos tejidos y cada uno dio los niveles más altos en cerebro, colon y glándula salival (Tabla 3). No obstante, surgían diferencias claras por análisis de un panel de linajes de células hemopoyéticas (Tabla 4). Mientras se detectó ARN de *bcl-x* en los 12 linajes linfoides T analizados y unos pocos linajes linfoides B, la expresión de *bcl-w* era rara en linajes linfoides T y B. Se encontraron, sin embargo, transcritos de ambos genes de supervivencia en muchos de los 23 linajes mieloides examinados, que incluían linajes de origen de células macrófagos, megacariocíticas, eritroides y cebada. Se analizaron cuatro linajes que tienen niveles relativamente altos de ARN de *bcl-w* por manchas de western con antisuero policlonal anti-Bcl-w y cada uno contenía la proteína de 22 kD esperada (Figura 4C). Estos hallazgos establecen que el modelo de expresión de *bcl-w* difiere del de *bcl-x* y producen la posibilidad de que, dentro del sistema hemopoyético, *bcl-w* regula la supervivencia en células mieloides en lugar de linfoides. En resumen, el gen *bcl-w* se expresa en muchos tipos de células y, entre los tejidos examinados, el nivel era más alto en cerebro, colon y glándula salival. Un examen de 50 linajes de células hemopoyéticas de ratón reveló que la expresión de *bcl-w* era común en células de varios linajes mieloides, incluyendo linajes de células macrófagos, megacariocitos, eritroides y cebada, pero raro en linajes linfoides B o T.

Ejemplo 10

*Localización de los genes **bcl-w** humano y de ratón*

La localización cromosómica de *bcl-w* en ratones se determinó genéticamente explotando un panel de retrocruce interespecífico que se había tipificado por más de 2.000 lugares, bien distribuido en todos los autosomas así como el cromosoma X (Copeland y Jenkins, 1991). Manchas de southern realizadas con una sonda de *bcl-w* en ADN de progenie derivada de apareamientos de ratones {(C57BL/6Jx *Mus spretus*)F₁ x C57BL/6J} indicó que *bcl-w* reside en

la región central del cromosoma 14 de ratones enlazado a proteína 1 asociada a tensioactivo (*Sftp1*), cadena alfa de receptor de células T (*tcra*) y proteína de canal de membrana de unión de abertura alfa-3 (*Gja3*). Se analizaron al menos 134 ratones para cada marcador, como se muestra en el análisis de segregación (Figura 6) y se tipificaron hasta 183 ratones para algunos pares de marcadores. Los datos completos para cada combinación por pares de marcadores se usaron para calcular frecuencias de recombinación. Para cada par de lugares, la relación del número de ratones que presentan cromosomas recombinantes al número de ratones analizados y el orden de genes más probable son: centrómero - *Sftp1* - 14/183 - *Tcra* - 1/182 - *Bcl-w* - 1/147 - *Gja3*. Las frecuencias de recombinación, expresadas en centiMorgans (cM) $\pm$ el error típico son: *Sftp1* - $7,7 \pm 2,0$ - *Tcra* - $0,6 \pm 0,6$ - *Bcl-w* - $0,7 \pm 0,7$ - *Gja3*.

La región central del cromosoma 14 de ratón comparte regiones de homología con los cromosomas humanos 10q, 14q y 13 (resumidos en la Figura 6). En particular, se ha puesto *Tcra* en 14q11.2 y *Gja3* en 13 humanos. El estrecho enlace entre *Bcl-w*, *Tcra* y *Gja3* en el ratón sugirió que *Bcl-w* residiría en 14q o 13 humanos. El análisis de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) usando un cADN humano de la región de codificación y una sonda genómica que se extendía en el intrón entre los exones de codificación asignó claramente *bcl-w* al cromosoma humano 14 en q11.2 (Figura 7). De las 20 metafases en las que se puntuó la señal fluorescente usando la sonda de intrón, 15 mostraban señal en uno o ambos cromátidos del cromosoma 14 en la región q11.2-q12 y el 90% de la señal era en 14q11.2.

Ejemplo 11

Método para producir fragmento n-terminal

Polipéptido de *Bcl-w* de ratón recombinante, etiquetado con un epítopo FLAG N-terminal (DYKDDDK), se expresó en células bacterianas BL-21pLyS y se purificó en una matriz de afinidad de anticuerpo anti-FLAG (Eastman-Kodak). Los 45 aminoácidos N-terminales se determinaron usando procedimientos estándares tras SDS-PAGE y electrotransferencia a la membrana de inmovilización PVDF (Ward *et al.*, 1990). Los primeros 27 aminoácidos son los correspondientes al epítopo FLAG y los aminoácidos adicionales esperados codificados por el vector de expresión. Los siguientes 18 aminoácidos correspondían a la secuencia N-terminal de *Bcl-w*.

Ejemplo 12

La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente de *bcl-w* humano y de ratón se muestran en la Figura 9.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita aquí es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Ha de entenderse que la invención incluye la totalidad de tales variaciones y modificaciones. La invención incluye también todas las etapas, aspectos, composiciones y compuestos a que se hace referencia o se indican en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de cualesquiera dos o más de dichas etapas o aspectos.

TABLA 3

Expresión en tejidos de bcl-w y bcl-x (ARN)

Tejido	<i>bcl-w</i>	<i>bcl-x</i>
Cerebro	++	++
colon	++	++
glándula salival	++	++
hígado	+	+
corazón	+	+/-
estómago	+	+
músculo	+	+/-
testículos	+	++*
riñón	+/-	+
timo	+/-	++
nodo linfático	-	-
placenta	+	++
hígado fetal (d13-18)	-	-

* transcritto de tamaño mayor

TABLA 4

Modelo de expresión de bcl-w y bcl-x en linajes celulares

TIPO DE CÉLULA	<i>bcl-w</i>	<i>bcl-x</i>
Linfoide B		
pre-B	1/6	2/6 ¹
B	1/4	0/4 ¹
	2/10	2/10
Linfoide T		
DN	3/4	4/4
DP	0/7	6/6
SP	1/2	2/2
	4/13	12/12
Mieloide		
macrófago	14/19	16/16
megacariocito	2/2	2/2
eritroide	4/5	4/4
cebada	1/1	1/1
	21/27	23/23

¹ niveles marginales en todos salvo 2 linajes indicados**Bibliografía**

Boise, L.H., González-García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X, Nunez, G. and Thompson, C.B. (1993). *Cell*, **74**, 597-608.

Brand, S.F., Pichoff, S., Noselli, S. and Bourbon, H.M. (1995), *Gene*, **154**, 187-192.

Callen, D.F., Baker, E., Eyre, H.J., Chemos, J.E., Bell, J.A. and Sutherland, G.R. (1990). *Ann. Rev. Gen.*, **33**, 219-221.

Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. and Lutz, R.J. (1995). *EMBO J.*, **14**, 5589-5596.

Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (1991). *Trends Genet.*, **7**, 113-118.

Cory, S. (1995). *Ann. Rev. Immunol.*, **13**, 513-543.

Dexter, T.M., Scott, G.D., Scolnick, E. and Metcalf, D. (1980). *J. Exp. Med.*, **152**, 1036-1047.

5 Farrow, S.N., White, J.H.M., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.-T., Grinham, C.J., Martinou, J.-C. and Brown, R. (1995). *Nature*, **374**, 731-733.

Green, E.L. (1981). Genetics and Probability in Animal Breeding Experiments. (eds). *Oxford University Press* New York, 77-113.

10 Haefliger, J.-A., Bruzzone, R., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. and Paul, D.L. (1992). *J. Biol. Chem.*, **267**, 2057-2064.

15 Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. and Korsmeyer, S. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6961-6965.

Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., Urdal, D.L. and Conlon, P.J. (1988). *Biotechnology*, **6**, 1204-1210.

20 Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Taylor, B.A. and Lee, B.K. (1982). *J. Virol.*, **43**, 26-36.

Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D. and Barr, P.J. (1995). *Nature*, **374**, 736-739.

25 Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, H.G., Irie, S., Fong, L. and Reed, J.C. (1994). *Cancer Res.*, **54**, 5501-5507.

Lynes, M.A., Lanier, L.L., Babcock, G.F., Wettstein, P.J. and Haughton, G. (1978). *J. Immunol.*, **121**, 2352-2357.

30 Mizushima, J. and Nagata, S. (1990). *Nuc. Acids Res.*, **18**, 5322.

Moore, K.J., D'Amore-Bruno, M.A., Korfhagen, T.R., Glasser, S.W., Whitsett, J.A., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (1992). *Genomics*, **12**, 388-393.

35 Nagata, S. and Golstein, P. (1995). *Science*, **267**, 1449-1456.

Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. and Nagata, S. (1993). *Nature*, **364**, 806-809.

40 Oltvai, Z.N., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993). *Cell*, **74**, 609-619.

Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, G.S. and Pickup, D.J. (1992). *Cell*, **69**, 597-604.

45 Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C.S., Krammer, P.H. and Cory, S. (1995) *EMBO J.*, **14**, 6136-6147.

Subramanian, T., Boyd, J.M. and Chinnadurai, G. (1995). *Oncogene*, **11**, 2403-2409.

Tell, H.-S., Kishi, H., Scott, B. and von Boehmer, H. (1989). *J. Exp. Med.*, **169**, 795-806.

50 Visvader, J.E., Elefanty, A.G., Strasser, A. and Adams, J.M. (1992). *EMBO J.*, **11**, 4557-4564.

Ward, L.D., Hong, J., Whitehead, R.H., and Simpson, R. J., (1990). *Electrophoresis*, **11**, 883-891.

55 Yin, X.-M., Oltvai, Z.N. and Korsmeyer, S.J. (1994). *Nature*, **369**, 321-323.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o es complementaria de una secuencia que codifica un nuevo gen de mamíferos de la familia *bcl-2* y que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9.
2. Una molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, en la que la secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o codifica un derivado de ellas.
3. Una molécula de ácido nucleico aislada según las reivindicaciones 1 o 2, en la que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos indicada sustancialmente en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o comprende un derivado de dicha secuencia.
4. Una molécula de ácido nucleico aislada según las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicha molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 en condiciones de bajo rigor y codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9.
5. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica Bcl-w o un derivado del mismo, molécula de ácido nucleico que se selecciona de la lista constituida por:
 - (i) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
 - (ii) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
 - (iii) una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 en condiciones de bajo rigor y que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9; y
 - (iv) una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse con el ácido nucleico de la parte (i) o (ii) o (iii) en condiciones de bajo rigor y que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9.
6. Un polipéptido aislado seleccionado de la lista constituida por:
 - (i) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
 - (ii) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos sustancialmente como se indica en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
 - (iii) un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 en condiciones de bajo rigor y que codifica una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o superior con SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
 - (iv) un polipéptido como se define en la parte (i) o (ii) o (iii) en forma homodímera; y
 - (v) un polipéptido como se define en la parte (i) o (ii) o (iii) en forma heterodímera.
7. Un polipéptido multímero en el que un polipéptido aislado como se define en la reivindicación 6 está en forma multímera con sí mismo o con un miembro de la familia Bcl-2.
8. Un modulador de la expresión de *bcl-w* que es una molécula antisentido para *bcl-w* o su derivado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha molécula antisentido es una secuencia complementaria como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, de uso como medicamento.
9. Un modulador de la expresión de *bcl-w* que es una molécula sentido de *bcl-w* o su derivado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y regula la expresión de dicho *bcl-w* o su derivado, en el que dicha molécula sentido es una secuencia de codificación como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, de uso como medicamento.

10. El uso de un modulador de la expresión de *bcl-w* como se define en las reivindicaciones 8 o 9, en la preparación de un medicamento para tratar cáncer, apoplejía, enfermedad de Alzheimer, enfermedades neurodegenerativas, infarto de miocardio, enfermedad degenerativa muscular, hipoxia, isquemia, infección por HIV, enfermedad autoinmune, o para prolongar la supervivencia de células trasplantadas.

11. Un método para modular la expresión de *bcl-w* o un derivado del mismo *in vitro*, cuyo método comprende poner en contacto el gen *bcl-w* con una cantidad eficaz de un modulador de la expresión de *bcl-w* como se define en las reivindicaciones 8 o 9, durante un tiempo y en condiciones suficientes para regular hacia arriba o regular hacia abajo o modular de otro modo la expresión de *bcl-w* o su derivado.

12. Un modulador que aumenta o disminuye la actividad de Bcl-w que es un anticuerpo para Bcl-w o su derivado como se define en la reivindicación 6, de uso como medicamento.

13. Un modulador que aumenta o disminuye la actividad de Bcl-w que es una forma no de membrana de Bcl-w o es un derivado del mismo o un polipéptido multímero del mismo como se define en las reivindicaciones 6 o 7, de uso como medicamento.

14. El uso de un modulador que aumenta o disminuye la actividad de Bcl-w como se define en las reivindicaciones 12 o 13, en la preparación de un medicamento para tratar cáncer, enfermedades neurodegenerativas, infarto de miocardio, enfermedad degenerativa muscular, hipoxia, isquemia, infección por HIV, enfermedad autoinmune, o para prolongar la supervivencia de células trasplantadas.

15. Un método para modular la actividad de Bcl-w o su derivado *in vitro*, cuyo método comprende administrar a una célula una cantidad eficaz moduladora de un modulador como se define en las reivindicaciones 12 o 13, durante un tiempo y en condiciones suficientes para aumentar o disminuir la actividad de Bcl-w.

16. Una composición farmacéutica que comprende Bcl-w o un derivado del mismo o un polipéptido multímero del mismo como se define en las reivindicaciones 6 o 7, o un modulador de la actividad de Bcl-w como se define en las reivindicaciones 12 o 13, o un modulador de la expresión de *bcl-w* como se define en las reivindicaciones 8 o 9, y uno o más vehículos y/o diluyentes aceptables farmacéuticamente.

17. Un anticuerpo para el polipéptido según la reivindicación 6.

18. Un anticuerpo según la reivindicación 17, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

19. Un método para detectar Bcl-w en una muestra biológica de un sujeto, cuyo método comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo específico para Bcl-w o sus derivados como se define en la reivindicación 6, durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se forme un complejo anticuerpo-Bcl-w, y detectar después dicho complejo.

20. Un método para examinar anticuerpos para Bcl-w o sus derivados en una muestra biológica, cuyo método comprende poner en contacto dicha muestra biológica con Bcl-w o su derivado o un polipéptido multímero del mismo como se define en las reivindicaciones 6 o 7, durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se forme un complejo anticuerpo-Bcl-w, y detectar después dicho complejo.

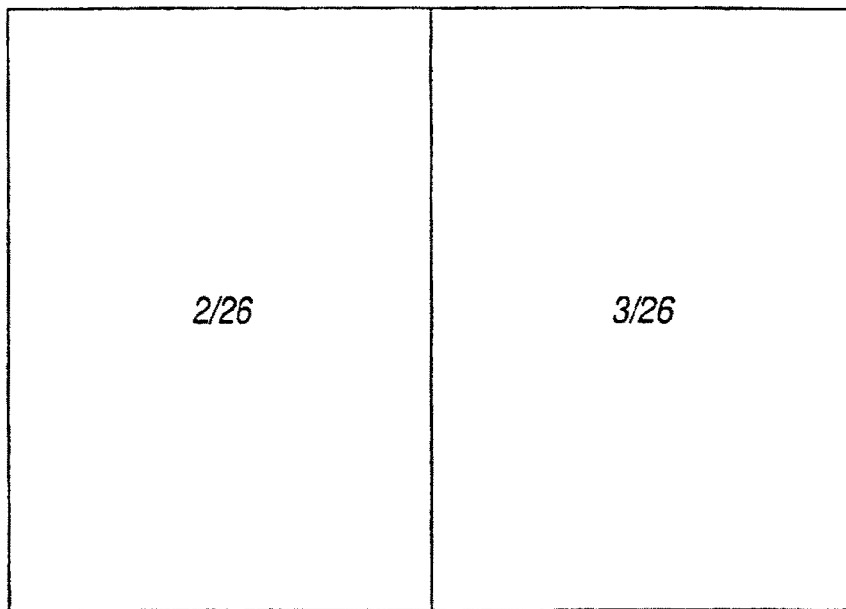


Fig. 1

	A	S1
Bclw	MATPASTPDT	RALVADFVGY
Bclw-Rox	MATPASTPDT	RALVADFVGY
Bclw	DEFETRFRRT	FSDLAAQLHV
Bclw-Rox	DEFETRFRRT	FSDLAAQLHV
Bclw	VFGAALCAES	VNKEMEPLVG
Bclw-Rox	VFGAALCAES	VNKEMEPLVG
Bclw	YGDGALEEAR	RLREGNWASV
Bclw-Rox	ARVREMEEEA	EKLKELQNEV
Bclw-Rox	IYVGNVDYGA	TAELEAHFH
Bclw-Rox	ESVRTSLALD	ESLFRGRQIK
Bclw-Rox	NSSRSRFYSG	FNSRPRGRIY

Fig. 1 (i)

KLRQKGYVCG	AGPGEGPAAD	PLHQAMRAAG	50
KLRQKGYVCG	AGPGEGPAAD	PLHQAMRAAG	50
S2			
TPGSAQQRFT	QVSDELFQGG	PNWGRLVAFF	100
TPGSAQQRFT	QVSDELFQGG	PNWGRLVAFF	100
E		S3	
QVQDWMVAYL	ETRLADWIHS	SGGWAEFTAL	150
QVQDWMVAYL	ETRLADWIHS	SGGWELEAIK	150
▲			
RTVLTGAVAL	GALVTVGAFF	ASK*	193
EKQMNMSPPP	GNAGPVIMSL	EEKMEADARS	200
GCGSVNRVTI	LCDKFSGHPK	GFAYIEFSDK	250
VIPKRTNRPG	ISTTDRGFPR	SRYRARTTNY	300
RGRARATSWY	SPY*		333

Fig. 1 (ii)

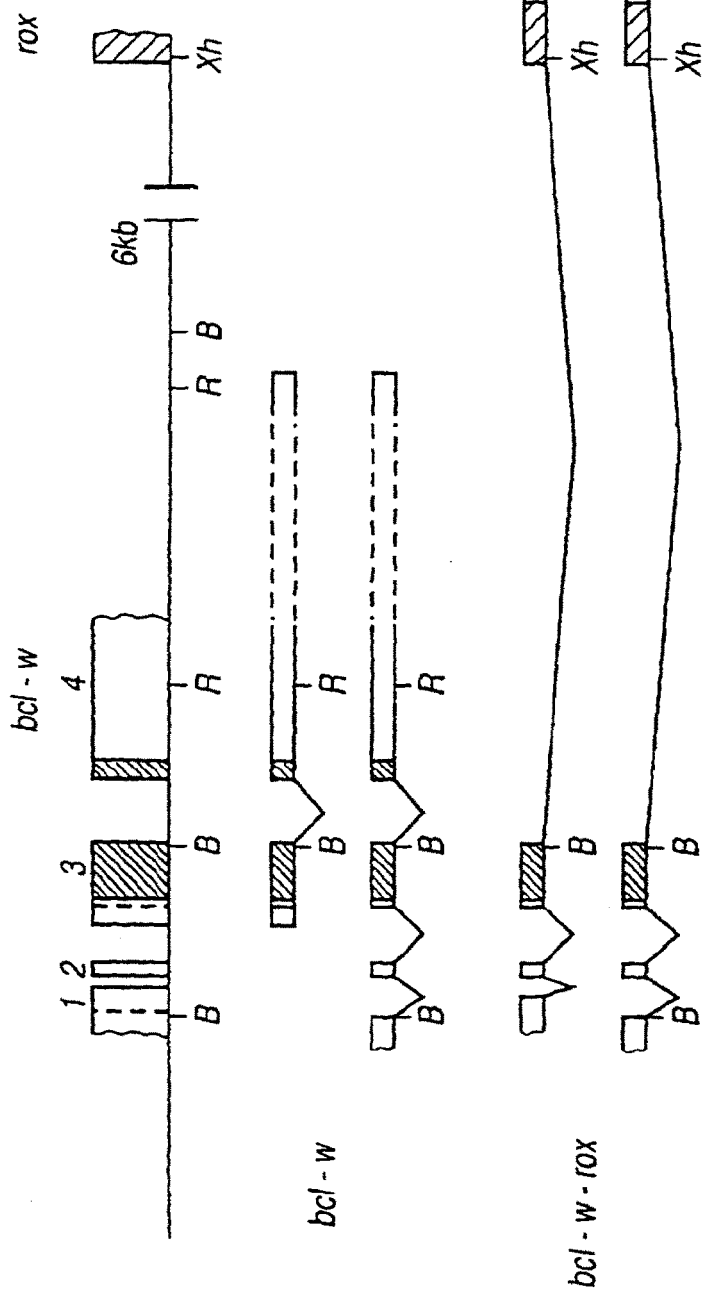
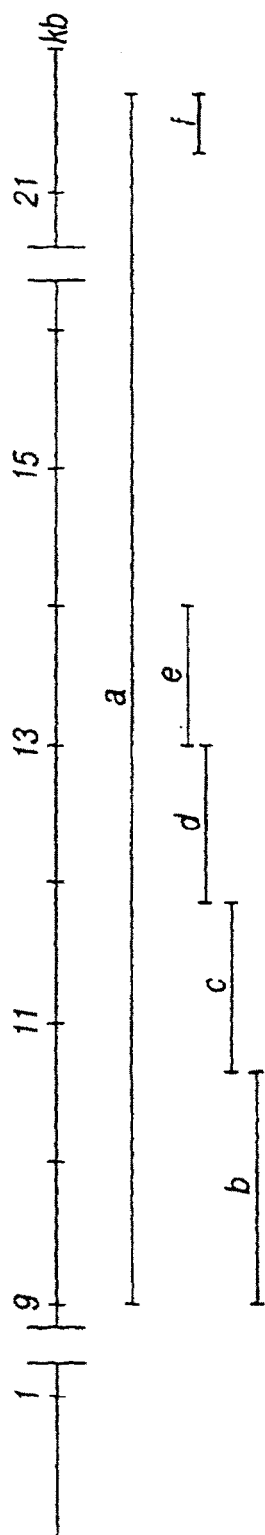


Fig. 2

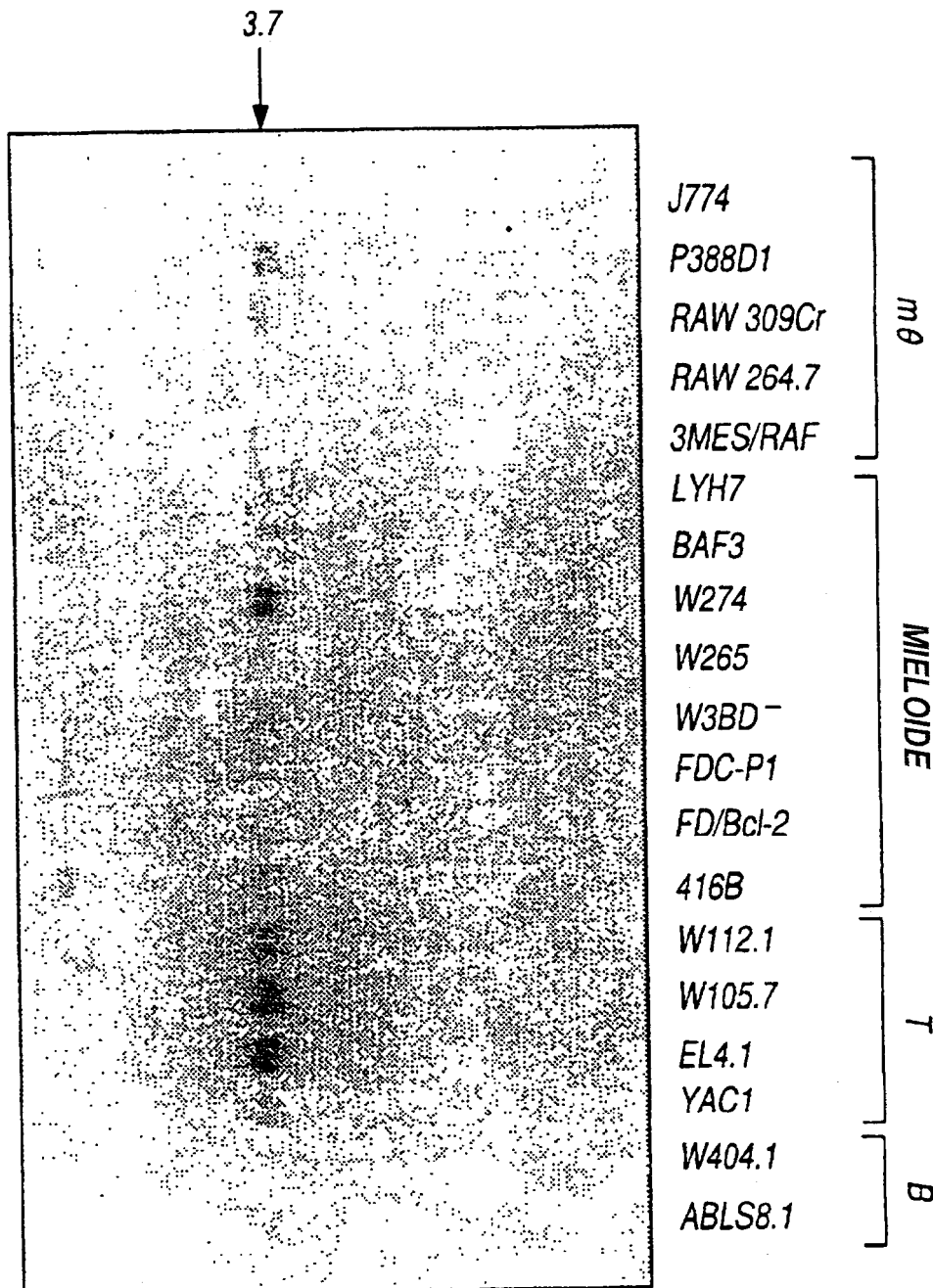


Fig. 3

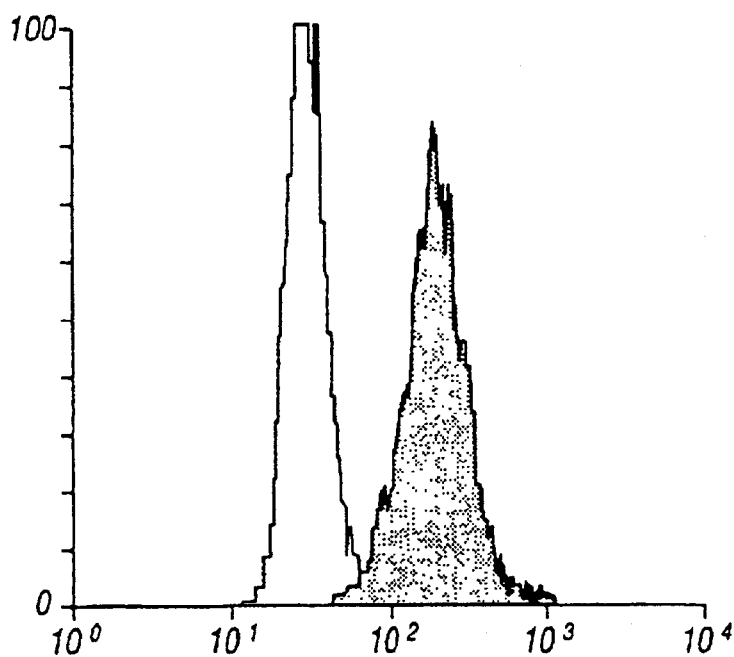


Fig. 4A

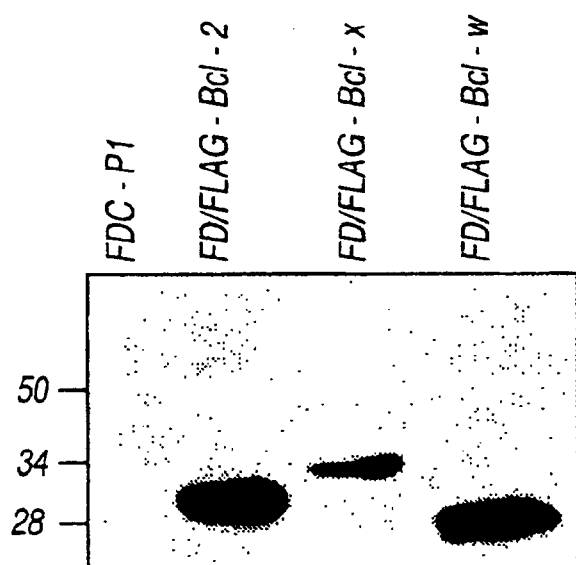


Fig. 4B

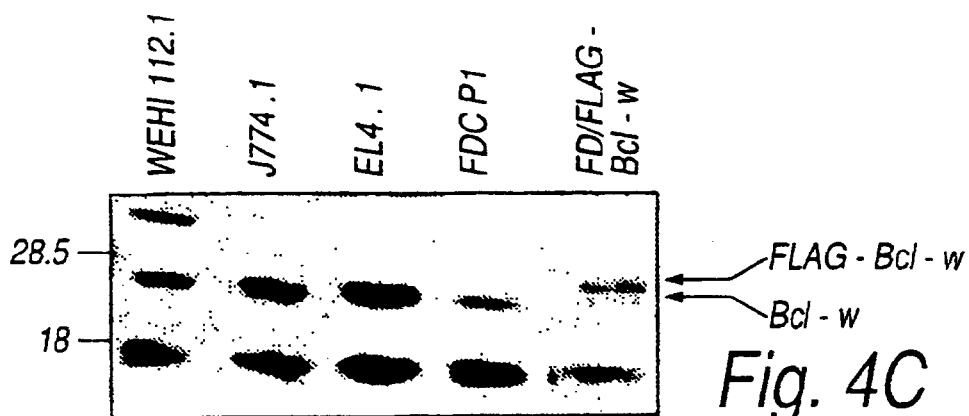


Fig. 4C

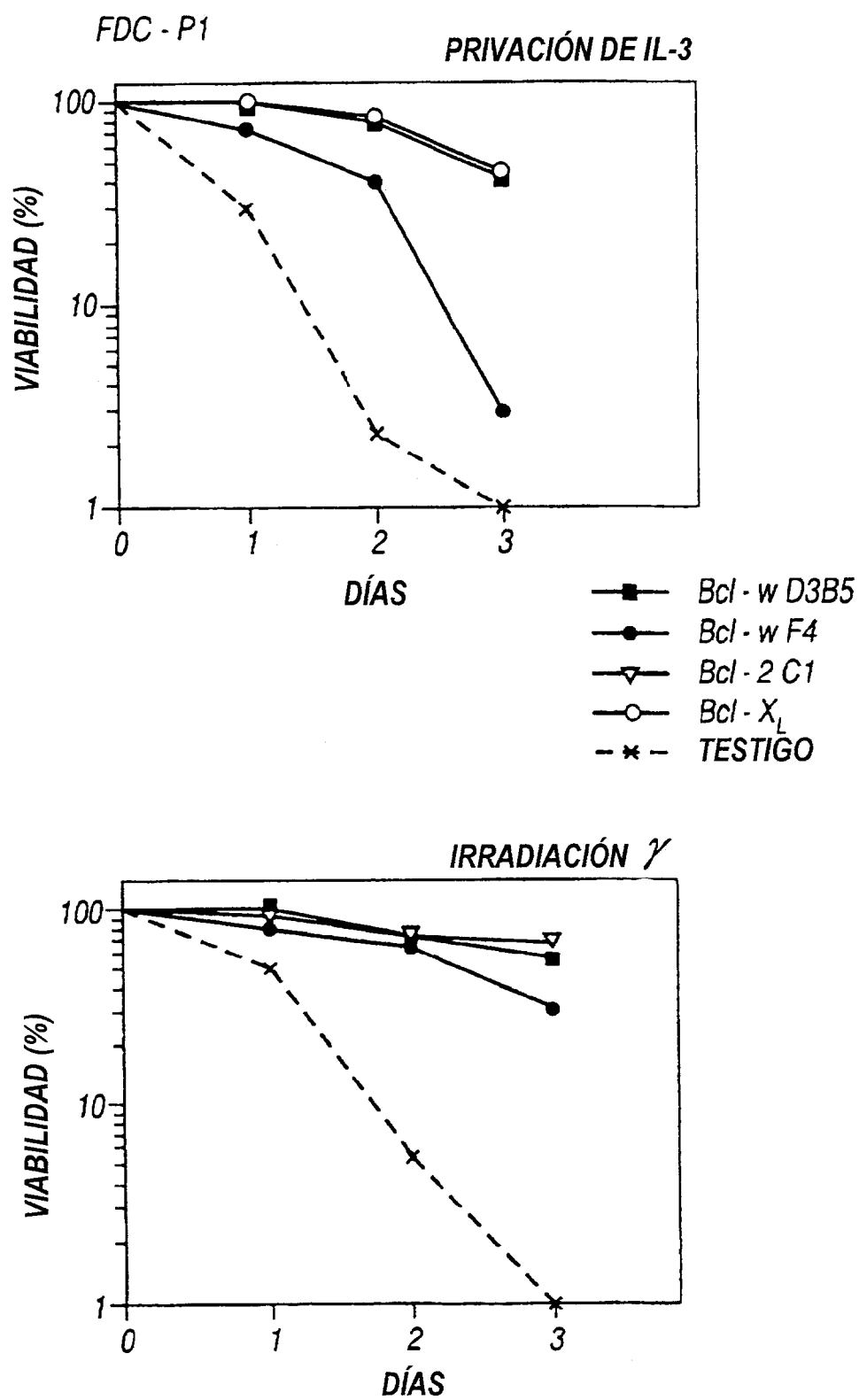


Fig. 5A

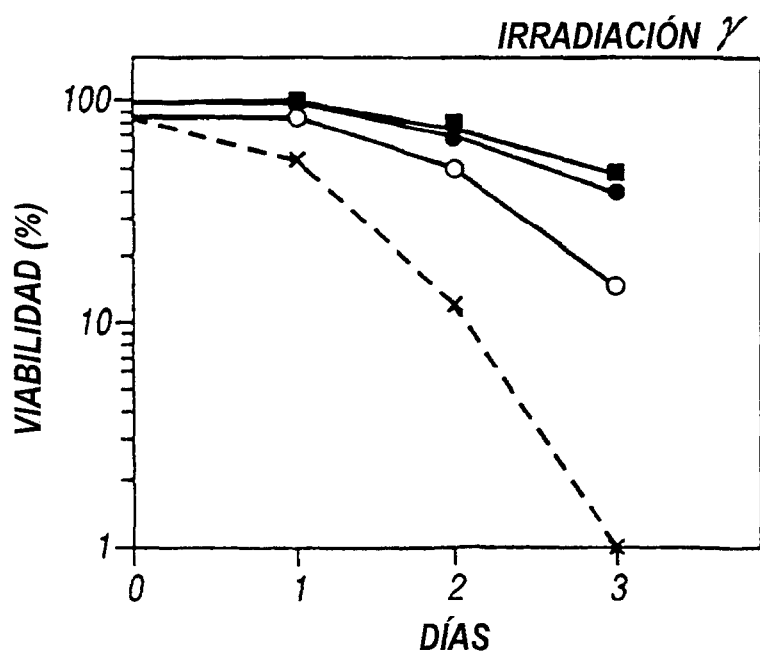
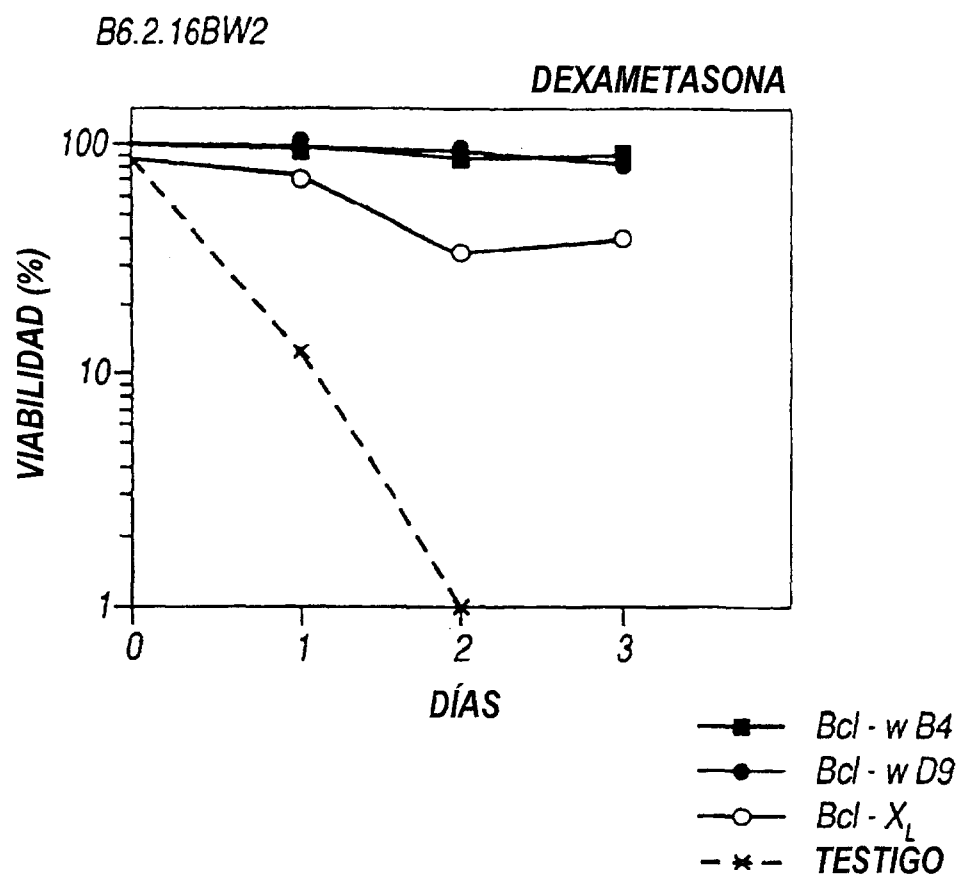


Fig. 5B

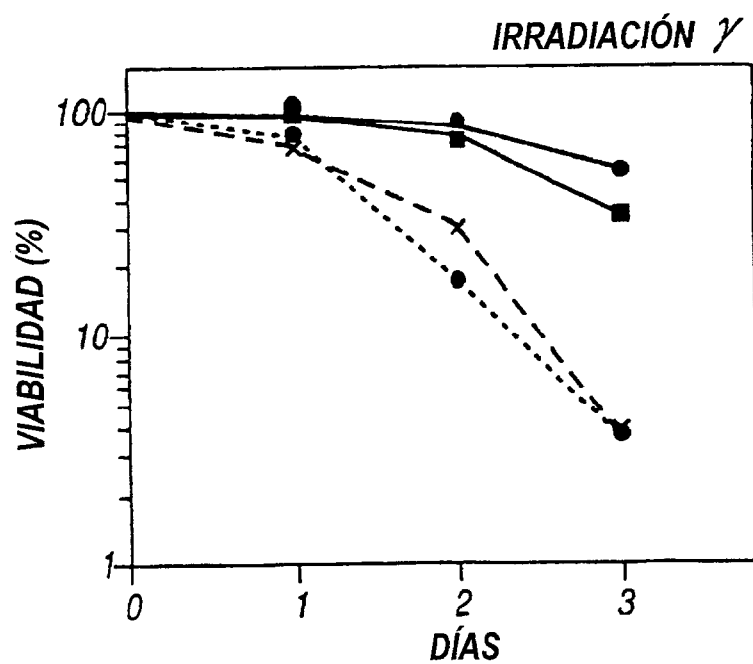
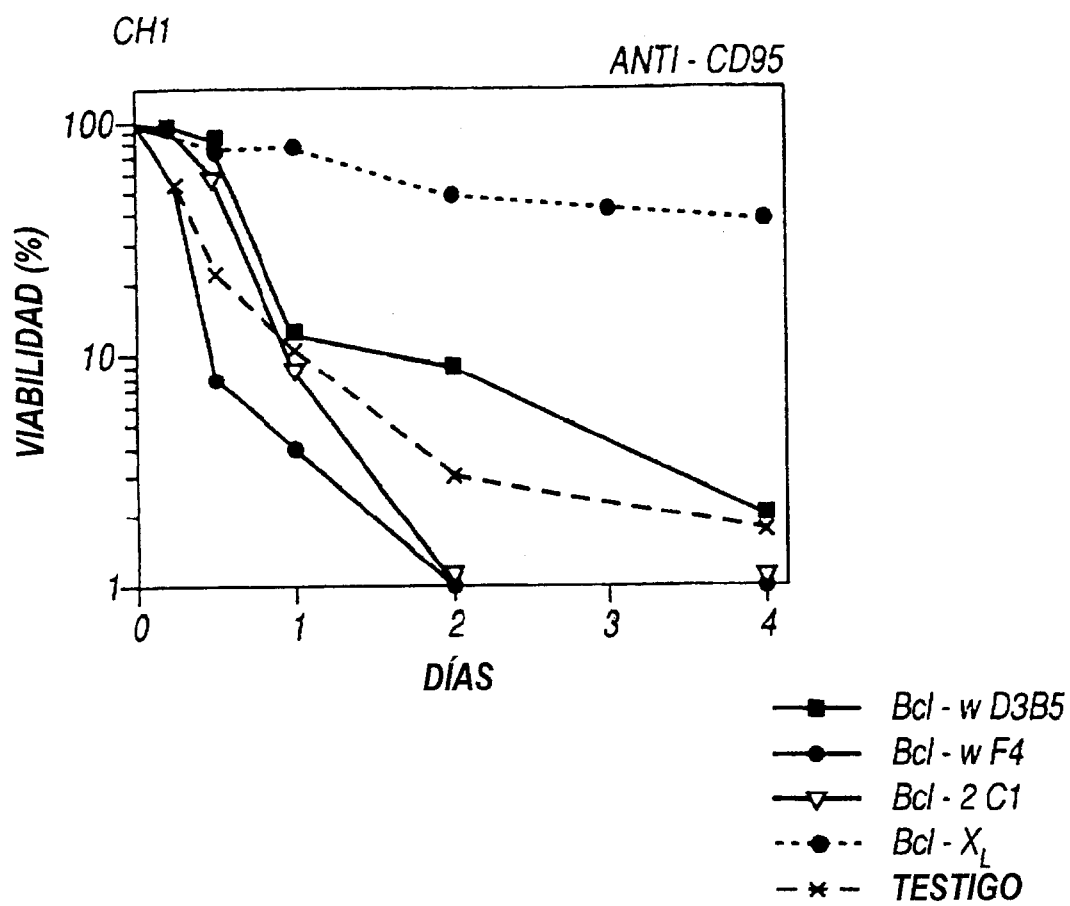


Fig. 5C

<i>Sftp1</i>								
<i>Tcra</i>								
<i>Bclw</i>								
<i>Gja3</i>								
	59	62	3	8	0	1	1	0

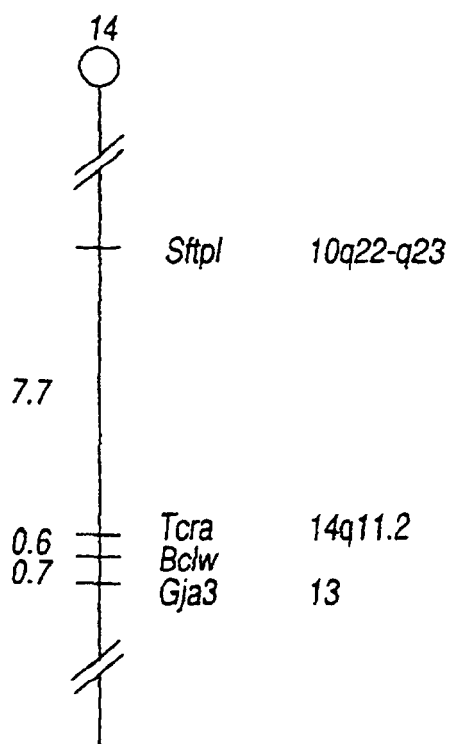


Fig. 6

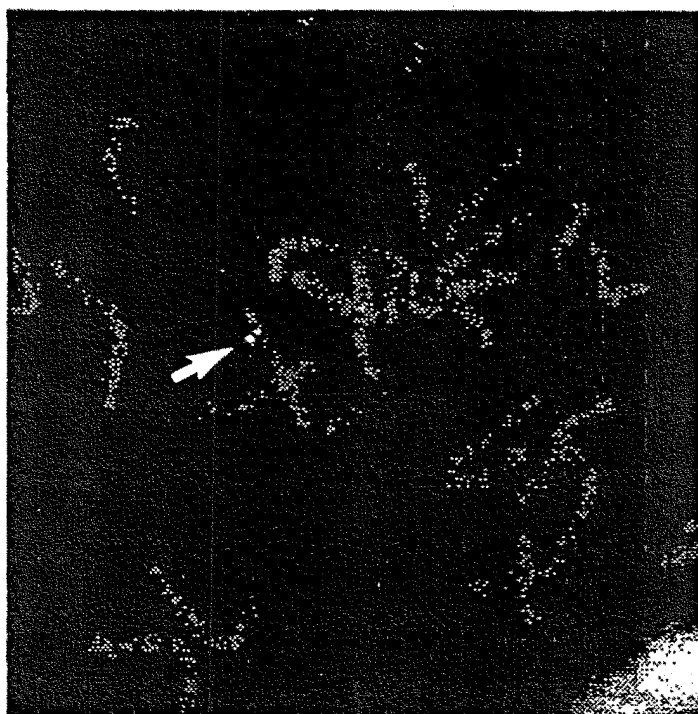


Fig. 7A



Fig. 7B

$13/26$	$14/26$
$15/26$	$16/26$

Fig. 8

		S1	
Bc12	MAHAGRTGYD	NREIVMKYIH	YKLSQRGYEW
Bc1x _L	MSQS	NRELVVDFLS	YKLSQKGYSW
Bc1w	.MATPASAPD	TRALVADFG	YKLRQKGYVC
Ced9		D IEGFVVDYFT	HRIRQNGMEW
Bak			MASG
Bax			
Bc12	ASRDPVARTS	PLQTPAAPGA	AAGPAL....
Bc1x _L	PSWH.LADSP	AVNGATGHSS	SLDARE....
Bc1w			
Ced9			
Bak	FRSYVFYRHQ	QEQAEGVAA	PADPEMVTLP
Bax	ALLQG	FIQDRAGRMG	GEAPELALDP
Bik			
		S2	
Bc12	MSRQLHLTP	FTARGREATV	VEELERDG.V
Bc1x _L	LTSQLHITP	GTAYQSFEQV	VNELERDG.V
Bc1w	LAAQLHVTP	GSAQQRFQV	SDELEQGG.P
cED9	FCEQLLAVP	RISFSLYQDV	VRTVGNAQTD

Fig. 8 (i)

DAGDVGAAPP	GAAPAPGIFS	SQPGHTPHTA	60
SQFSDVEENR	TEAPEGTESE	METPSAINGN	54
GAGPGE.....			35
			99
QGP G PPR Q EC	GEPALPSASE	EQVAQDTEEV	34
MDGS G E Q PR	GGGPTSSE Q I	MKTG.....	23
	BH3	NH1	
	▼	▼	
...SPVPPVV	HLTLRQAGDDFSRRYRRDFAE		113
...VIPMAAV	KQALREAGDEFELRYRRAFSD		107
...GPAADPL	HQAMRAAGDEFETRFRRTFSD		63
	HEMMRVMGTIFEKKHAENFET		132
	*	*	
LQPSSTMGQV	GRQLAIIGDDINRRYDSEFOT		95
VPQDASTKKL	SECLKRIGDELDSD..NMELQR		78
	LACIGDEMD		
	Δ	Δ	
BH1			
....NWGRIV	AFFFEFGG..V	MCVESVNRE	165
....NWGRIV	AFFSFGG..A	LCVESVDKE	158
....NWGRIV	AFFVEGA..A	LCAESVNKE	114
QCPMSYGRLI	GLISFGGFVA	AKMMESV..E	190

Fig. 8 (ii)

Bak	MLQHLOPTA	ENAYEYETKI	ATSLFESG.I
Bax	MIAAVD..T	DSPREVFFRV	AADMESDGNF
		△ △ △ △	
			S3
Bc12	MSPLVDNIAL	WMTEYLNHRH.	LHTWTQDNNGG
Bc1x _L	MQVLVSRIAA	WMATYLNDH.	LEPWTQENGG
Bc1w	MEPLVGQVQE	WMVAYLETR.	LADWLEHSSGG
Ced9	IQGQVRNLFV	YTSLEFIKTRI	RNNWKEHNRS
Bak	LTGFLGQVTR	FVVDFMLHHC	IARWIAQRGG
Bax	VPELIRTMG	WTLDFLRERL	LG.WIQDQGG
		△	
Bc12	DFSWLSLKTL	LSLAL.VGAC	ITLGAYLGHK
Bc1x _L	RKGQERFNRW	FLTGMTVAGV	VLLGSLFSRK
Bc1w	EGNWASVRTV	LTGAVALGAL	VTVGAFFASK
Bak	GP	ILNVLVVLGV	VLLGQFVVR
Bax	TPT	WQTVTIFVAG	VLTA SLTIWK

Fig. 8 (iii)

...	NWGRVV	ALLGEGY	.R	LALHVYQHG	146
...	NWGRVV	ALFYFAS	.K	LVLKALCTK	128
			Δ		
BH2					
	↓	▼			
WDAFVELYG.	...	PSMRPLF			210
WDTFVELYG.	...	NNAAAES			203
WAEETALYGD	GALEEARRLR				163
WDDFMTL.G.					218
WVAALNLGN.					185
WDGLLSYFG.					166
					239
					233
					193
FFKS					211
KMG					192

Fig. 8 (iv)

18/26	19/26
20/26	21/26

Fig. 9A

ATG	GCG	ACC	CCA	GCC	TCG	GCC	CCA	GAC
Met	Ala	Thr	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Asp
1				5				
TTT	GTA	GGT	TAT	AAG	CTG	AGG	CAG	AAG
Phe	Val	Gly	Tyr	Lys	Leu	Arg	Gln	Lys
			20					25
CCC	GGG	GAG	GGC	CCA	GCA	GCT	GAC	CCG
Pro	Gly	Glu	Gly	Pro	Ala	Ala	Asp	Pro
		35					40	
GCT	GGA	GAT	GAG	TTC	GAG	ACC	CGC	TTC
Ala	Gly	Asp	Glu	Phe	Glu	Thr	Arg	Phe
	50					55		
GCG	GCT	CAG	CTG	CAT	GTG	ACC	CCA	GGC
Ala	Ala	Gln	Leu	His	Val	Thr	Pro	Gly
65					70			
CAG	GTC	TCC	GAC	GAA	CTT	TTT	CAA	GGG
Gln	Val	Ser	Asp	Glu	Leu	Phe	Gln	Gly
				85				
GTA	GCC	TTC	TTT	CTC	TTT	GGG	GCT	GCA
Val	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Gly	Ala	Ala
			100					105

Fig. 9A (i)

ACA	CGG	GCT	CTG	GTG	GCA	GAC	48
Thr	Arg	Ala	Leu	Val	Ala	Asp	
10					15		
GGT	TAT	GTC	TGT	GGA	GCT	GGC	96
Gly	Tyr	Val	Cys	Gly	Ala	Gly	
			30				
CTG	CAC	CAA	GCC	ATG	CGG	GCA	144
Leu	His	Gln	Ala	Met	Arg	Ala	
			45				
CGG	CGC	ACC	TTC	TCT	GAT	CTG	192
Arg	Arg	Thr	Phe	Ser	Asp	Leu	
		60					
TCA	GCC	CAG	CAA	CGC	TTC	ACC	240
Ser	Ala	Gln	Gln	Arg	Phe	Thr	
	75					80	
GGC	CCC	AAC	TGG	GGC	CGC	CTT	288
Gly	Pro	Asn	Trp	Gly	Arg	Leu	
90					95		
CTG	TGT	GCT	GAG	AGT	GTA	AAC	336
Leu	Cys	Ala	Glu	Ser	Val	Asn	
			110				

Fig. 9A (ii)

AAG	GAG	ATG	GAA	CCA	CTG	GTG	GGA	CAA
Lys	Glu	Met	Glu	Pro	Leu	Val	Gly	Gln
		115					120	
TAC	CTG	GAG	ACG	CGG	CTG	GTC	GAC	TGG
Tyr	Leu	Glu	Thr	Arg	Leu	Val	Asp	Trp
	130					135		
GCG	GAG	TTC	ACA	GCT	CTA	TAC	GGG	GAC
Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Leu	Tyr	Gly	Asp
145					150			
CGT	CTG	CGG	GAG	GGG	AAC	TGG	GCA	TCA
Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asn	Trp	Ala	Ser
				165				
GCC	GTG	GCA	CTG	GGG	GCC	CTG	GTA	ACT
Ala	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Val	Thr
			180					185
AAG	TGA	A						
Lys	*							

Fig. 9A (iii)

GTG	CAG	GAG	TGG	ATG	GTG	GCC	384
Val	Gln	Glu	Trp	Met	Val	Ala	
			125				
ATC	CAC	AGC	AGT	GGG	GGC	TGG	432
Ile	His	Ser	Ser	Gly	Gly	Trp	
			140				
GGG	GCC	CTG	GAG	GAG	GCG	CGG	480
Gly	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Arg	
	155					160	
GTG	AGG	ACA	GTG	CTG	ACG	GGG	528
Val	Arg	Thr	Val	Leu	Thr	Gly	
170					175		
GTA	GGG	GCC	TTT	TTT	GCT	AGC	576
Val	Gly	Ala	Phe	Phe	Ala	Ser	
			190				
							583

Fig. 9A (iv)

<i>23/26</i>	<i>24/26</i>
<i>25/26</i>	<i>26/26</i>

Fig. 9B

ATG	CCG	ACC	CCA	GCC	TCA	ACC	CCA	GAC
Met	Pro	Thr	Pro	Ala	Ser	Thr	Pro	Asp
1				5				
TTT	GTA	GGC	TAT	AGG	CTG	AGG	CAG	AAG
Phe	Val	Gly	Tyr	Arg	Leu	Arg	Gln	Lys
			20					25
CCT	GGG	GAA	GGC	CCA	GCC	GCC	GAC	CCG
Pro	Gly	Glu	Gly	Pro	Ala	Ala	Asp	Pro
		35					40	
GCT	GGA	GAC	GAG	TTT	GAG	ACC	CGT	TTC
Ala	Gly	Asp	Glu	Phe	Glu	Thr	Arg	Phe
	50					55		
GCC	GCT	CAG	CTG	CAC	GTG	ACC	CCA	GGC
Ala	Ala	Gln	Leu	His	Val	Thr	Pro	Gly
65					70			
CAG	GTT	TCC	GAC	GAA	CTT	TTC	CAA	GGG
Gln	Val	Ser	Asp	Glu	Leu	Phe	Gln	Gly
			85					
GTG	GCA	TTC	TTT	GTC	TTT	GGG	GCT	GCC
Val	Ala	Phe	Phe	Val	Phe	Gly	Ala	Ala
			100					105

Fig. 9B (i)

ACA	CGC	GCT	CTA	GTG	GCT	GAC	48
Thr	Arg	Ala	Leu	Val	Ala	Asp	
10					15		
GGT	TAT	GTC	TGT	GGA	GCT	GGG	96
Gly	Tyr	Val	Cys	Gly	Ala	Gly	
			30				
CTG	CAC	CAA	GCC	ATG	CGG	GCT	144
Leu	His	Gln	Ala	Met	Arg	Ala	
		45					
CGC	CGC	ACC	TTC	TCT	GAC	CTG	192
Arg	Arg	Thr	Phe	Ser	Asp	Leu	
		60					
TCA	GCC	CAG	CAA	CGC	TTC	ACC	240
Ser	Ala	Gln	Gln	Arg	Phe	Thr	
	75					80	
GGC	CCT	AAC	TGG	GGC	CGT	CTT	288
Gly	Pro	Asn	Trp	Gly	Arg	Leu	
90					95		
CTG	TGT	GCT	GAG	AGT	GTC	AAC	336
Leu	Cys	Ala	Glu	Ser	Val	Asn	
			110				

Fig. 9B (ii)

AAA	GAA	ATG	GAG	CCT	TTG	GTG	GGA	CAA
Lys	Glu	Met	Glu	Pro	Leu	Val	Gly	Gln
		115					120	
TAC	CTG	GAG	ACA	CGT	CTG	GTC	GAC	TGG
Tyr	Leu	Glu	Thr	Arg	Leu	Ala	Asp	Trp
	130					135		
GCG	GAC	TTC	ACA	GCT	CTA	TAC	GGG	GAC
Ala	Asp	Phe	Thr	Ala	Leu	Tyr	Gly	Asp
145					150			
CGT	CTG	CGG	GAG	GGC	AAC	TGG	GCA	TGA
Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asn	Trp	Ala	*
			165					
GCC	GTG	GCA	CTG	GGG	GCC	CTG	GTA	ACT
Ala	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Val	Thr
		180					185	
AAG	TG							
Lys								

Fig. 9B (iii)

GTC	CAG	GAT	TGG	ATC	GTG	GCC	384
Val	Gln	Asp	Trp	Ile	Val	Ala	
			125				
ATC	CAC	AGC	AGT	GGC	GGC	TGG	432
Ile	His	Ser	Ser	Gly	Gly	Trp	
			140				
GGG	GCC	CTG	GAG	GAC	GCA	CGG	480
Gly	Ala	Leu	Glu	Asp	Ala	Arg	
	155					160	
GTG	AGC	ACA	GTG	GTG	ACG	GGG	528
Val	Ser	Thr	Val	Val	Thr	Gly	
170					175		
GTA	GGG	GCC	TTT	TTT	GCT	AGC	576
Val	Gly	Ala	Phe	Phe	Ala	Ser	
			190				
							582

Fig. 9B (iv)

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: AMRAD OPERATIONS PTY LTD

(B) CALLE: 17-27 Cotham Road

(C) CIUDAD: Kew

(D) ESTADO: Victoria

(E) PAÍS: AUSTRALIA

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 3101

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Un nuevo gen de mamífero, bcl-w, pertenece a la familia bcl-2 de genes que controlan apoptosis

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 13

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, versión 1.30 (EPO)

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO E SOLICITUD: AU PN 8965

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 27 de Marzo de 1996

(viii) INFORMACIÓN SOBRE EL APODERADO/AGENTE:

(A) JONES DR, ELIZABETH *et al.*

FRANK B. DEHN & CO.

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: -

(B) LOCALIZACIÓN: uno-de (16,19, 22, 25)

(D) OTRA INFORMACIÓN: /etiqueta= N/nota= "N= Inosina (I)"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

GCTCTAGAAC TGGGGNMGNR TNGTNGCCTT YTT

33

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: -

(B) LOCALIZACIÓN: uno-de (14,17, 20)

(D) OTRA INFORMACIÓN: /etiqueta= N/nota= "N= Inosina (I)"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

GGAATTCCTCA GCCNCCNTKN TCTTGGATCC A

31

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

Met Ala Thr Pro Ala Ser Thr Pro Asp Thr Arg Ala Leu Val
5 10

ES 2 309 995 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 583 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

```

15  ATG GCG ACC CCA GCC TCG GCC CCA GAC ACA CGG GCT CTG GTG GCA GAC 48
    TTT GTA GGT TAT AAG CTG AGG CAG AAG GGT TAT GTC TGT GGA GCT GGC 96
    CCC GGG GAG GGC CCA GCA GCT GAC CCG CTG CAC CAA GCC ATG CGG GCA 144
20  GCT GGA GAT GAG TTC GAG ACC CGC TTC CGG CGC ACC TTC TCT GAT CTG 192
    GCG GCT CAG CTG CAT GTG ACC CCA GGC TCA GCC CAG CAA CGC TTC ACC 240
    CAG GTC TCC GAC GAA CTT TTT CAA GGG GGC CCC AAC TGG GGC CGC CTT 288
25  GTA GCC TTC TTT CTC TTT GGG GCT GCA CTG TGT GCT GAG AGT GTC AAC 336
    AAG GAG ATG GAA CCA CTG GTG GGA CAA GTG CAG GAG TGG ATG GTG GCC 384
    TAC CTG GAG ACG CGG CTG GTC GAC TGG ATC CAC AGC AGT GGG GGC TGG 432
30  GCG GAG TTC ACA GCT CTA TAC GGG GAC GGG GCC CTG GAG GAG GCG CGG 480
    CGT CTG CGG GAG GGG AAC TGG GCA TCA GTG AGG ACA GTG CTG ACG GGG 528
    GCC GTG GCA CTG GGG GCC CTG GTA ACT GTA GGG GCC TTT TTT GCT AGC 576
35  AAG TGA A 583
  
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 193 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

```

50  Met Ala Thr Pro Ala Ser Ala Pro Asp Thr Arg Ala Leu Val Ala Asp
    1      5      10      15
    Phe Val Gly Tyr Lys Leu Arg Gln Lys Gly Tyr Val Cys Gly Ala Gly
        20      25      30
55  Pro Gly Glu Gly Pro Ala Ala Asp Pro Leu His Gln Ala Met Arg Ala
        35      40      45
    Ala Gly Asp Glu Phe Glu Thr Arg Phe Arg Arg Thr Phe Ser Asp Leu
        50      55      60
60  Ala Ala Gln Leu His Val Thr Pro Gly Ser Ala Gln Gln Arg Phe Thr
        65      70      75      80
    Gln Val Ser Asp Glu Leu Phe Gln Gly Gly Pro Asn Trp Gly Arg Leu
        85      90      95
65  Val Ala Phe Phe Val Phe Gly Ala Ala Leu Cys Ala Glu ser val Asn
  
```

ES 2 309 995 T3

100 105 110
 Lys Glu Met Glu Pro Leu Val Gly Gln Val Gln Glu Trp Met Val Ala
 115 120 125
 5 Tyr Leu Glu Thr Arg Leu Ala Asp Trp Ile His Ser Ser Gly Gly Trp
 130 135 140
 10 Ala Glu Phe Thr Ala Leu Tyr Gly Asp Gly Ala Leu Glu Glu Ala Arg
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Glu Gly Asn Trp Ala Ser Val Arg Thr Val Leu Thr Gly
 165 170 175
 15 Ala Val Ala Leu Gly Ala Leu Val Thr Val Gly Ala Phe Phe Ala Ser
 180 185 190
 Lys *

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 581 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

35 ATG CCG ACC CCA GCC TCA ACC CCA GAC ACA CGC GCT CTA GTG GCT GAC 48
 TTT GTA GGC TAT AGG CTG AGG CAG AAG GGT TAT GTC TGT GGA GCT GGG 96
 CCT GGG GAA GGC CCA GCC GCC GAC CCG CTG CAC CAA GCC ATG CGG GCT 144
 40 GCT GGA GAC GAG TTT GAG ACC CGT TTC CGC CGC ACC TTC TCT GAC CTG 192
 GCC GCT CAG CTA CAC GTG ACC CCA GGC TCA GCC CAG CAA CGC TTC ACC 240
 CAG GTT TCC GAC GAA CTT TTC CAA GGG GGC CCT AAC TGG GGC CGT CTT 288
 45 GTG GCA TTC TTT GTC TTT GGG GCT GCC CTG TGT GCT GAG AGT GTC AAC 336
 AAA GAA ATG GAG CCT TTG GTG GGA CAA GTC CAG GAT TGG ATC GTG GCC 384
 50 TAC CTG GAG ACA CGT CTG GCT GAC TGG ATC CAC AGC AGT GGC GGC TGG 432
 GCG GAC TTC ACA GCT CTA TAC GGG GAC GGG GCC CTG GAG GAC GCA CGG 480
 CGT CTG CGG GAG GGC AAC TGG GCA TGA GTG AGC ACA GTG GTG ACG GGG 528
 55 GCC GTG GCA CTG GGG GCC CTG GTA ACT GTA GGG GCC TTT TTT GCT AGC 576
 AAG TG 581

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 193 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 309 995 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

```

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

50 (C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

```

      Asn Trp Gly Arg Val Val Ala Phe Phe
      1      5
```

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

65 (B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

Trp Ile Gln Asp Gln Gly Gly Trp
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp
1 5