(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
15 de Febrero de 2001 (15.02.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/11027 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]: C12N 9/12, 15/54

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES00/00308

(22) Fecha de presentación internacional:
4 de Agosto de 2000 (04.08.2000)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
99500139.3 6 de Agosto de 1999 (06.08.1999) EP

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: **GLAXO WELLCOME, S.A.** [ES/ES]; Severo Ochoa, 2 P.T.M., E-28760 Tres Cantos (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **MOSCAT GUILLEN, Jorge** [ES/ES]; Centro de Biología Molecular, "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, E-28049 Cantoblanco (ES). **DIAZ-MECO CONDE, Maria Teresa** [ES/ES]; Centro de Biología Molecular, "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, E-28049 Cantoblanco (ES).

(74) Mandatario: **CARPINTERO LOPEZ, Francisco**; Herrero & Asociados, S.L., Alcalá, 35, E-28014 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(nacional)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Estados designados *(regional)*: patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *Con informe de búsqueda internacional.*
— *Antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones.*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: NEW PROTEIN

(54) Título: NUEVA PROTEINA

(57) **Abstract:** The invention relates to human lambda interaction proteins LIB and BLIP involved in the activation of NF-KB and the inactive kinase mutants of BLIP. The invention also relates to sequences of nucleotides which code for such proteins and mutants thereof, process for producing said proteins, vectors of expression, cell lines, antibodies, compounds which modulate the activation of NF-KB depending on BLIP and their selection processes, and treatment processes related to said proteins.

(57) **Resumen:** Proteinas de interación lambda humanas LIB y BLIP implicadas en la activación de NF-KB y los mutantes quinasa inactivos de BLIP. Asimismo la invención se refiere a las secuencias de nucleótidos que codifican tales proteinas y sus mutantes, procedimientos de producción de las citadas proteinas, vectores de expresión, líneas celulares, anticuerpos, compuestos moduladores de la activación de NF-KB dependiente de BLIP y sus procedimientos de selección, y procedimientos de tratamiento relacionadas con dichas proteinas.

WO 01/11027 A1

Nueva Proteína

Campo de la invención

La presente invención se refiere a proteínas de interacción lambda humanas implicadas en la activación del Factor Nuclear κB (NF-κB) y además, pero no exclusivamente, a mutantes quinasa-inactivos de tales proteínas; a secuencias de nucleótidos que codifican tales proteínas y proteínas mutantes; y a vectores de expresión, líneas celulares, anticuerpos, procedimientos de selección, compuestos, procedimientos de producción y procedimientos de tratamiento relacionados con las proteínas.

Antecedentes de la Invención

Los isotipos atípicos de la Proteína Quinasa C (PKC) (λ/ιPKC y ςPKC) son necesarios para funciones celulares básicas tales como la proliferación y la supervivencia. Ciertos estudios han demostrado que las PKC atípicas (aPKC) se estimulan por el TNFα y se requieren para activación de NF-κB por esta citocina, a través de un mecanismo que implica probablemente la fosforilación de IκB mediante la activación de la IκB quinasa β.

El factor de transcripción NF-κB juega un papel crítico en varias funciones celulares incluyendo las

respuestas clave inflamatorias y las respuestas inmunes. El factor κB nuclear es un factor de transcripción de múltiples subunidades expresado en todas partes, que se activa en varios tipos de células por un grupo diverso de agentes inflamatorios tales como TNFα, IL-1β, endotoxina bacteriana y virus de ARN. NF-κB se compone de dímeros de diferentes miembros de la familia de proteínas Rel. la forma clásica de NF-κB es un heterodímero de p50 y p65 (Rel A) (Baeurle y Henkel, 1994; Baldwin, 1996; Thanos y Maniatis, 1995); está complejado en el citosol por IκB, que impide su translocación nuclear y su actividad.

Tras la estimulación de las células por citocinas inflamatorias tales como TNFα o IL-1, el IκBα se fosforila, activando su extensión y la posterior degradación de IκB a través de la ruta proteosómica (Verna y col., 1995). Estos acontecimientos liberan NF-κB, que se transloca al núcleo, donde activa varios genes (Baeurle y Henkel, 1994; Baldwin, 1996; Thanos y Maniatis, 1995; Verma y col., 1995).

La identificación de la quinasa responsable de la fosforilación de IκB inducida por la señal ha sido objeto de investigación. Se han identificado varios grupos y se han clonado dos actividades IκB quinasa (IKKα e IKKβ) que fosforilan los restos 32 y 36 de IκBα, y cuya actividad se estimula potencialmente por TNF e

IL-1 (DiDonato y col., 1997; Mercurio y col., 1997; Réginer y col., 1997; Woronicz y col., 1997; Zandi y col., 1997). Las IKK se unen a NIK (quinasa inductora de NFκB), un miembro de la familia MAPKKK que interacciona con TRAF2 (Malinin y col., 1997), asociando así la degradación de IκB y la activación de NF-κB al complejo receptor del TNF.

El TNFα es un potente activador de las PKC atípicas in vivo. Previamente se ha demostrado que las isoformas atípicas de PKC ς (zeta) y λ/ι (lambda/iota) juegan un papel crítico durante la activación de NF-κB (Diaz-Meco y col., 1996; Folgueira y col., 1996; Sontag y col., 1997). Así pues, el bloqueo de las PCK atípicas por inhibidores peptídicos de pseudosustrato microinyectados (Dominguez y col., 1993), oligonucleótidos antisentido (Folgueira y col., 1996) o la transfección de mutantes negativos dominantes sin actividad quinasa de ςPKC o λ/ιPKC (Berra y col., 1995, Bjorkoy y col., 1995; Diaz-Meco y col., 1996; Sontag y col., 1997) debilita dramáticamente la activación de NF-κB.

Sin embargo, siguen sin conocerse los mecanismos por los que las PKC atípicas participan en la ruta de activación de NF-κB. Como ςPKC no puede fosforilar directamente IκB (Diaz-Meco y col., 1994), es posible que las señales generadas por la estimulación de las PKC atípicas pueda estar mediada por las nuevas IKK. A este

respecto, recientemente se ha demostrado que las PKC atípicas se unen a las IKK *in vitro* e *in vivo* (Lallena y col., 1999). La sobreexpresión de estas PKC modula positivamente la actividad IKKβ, pero no la actividad IKKα, mientras que la transfección de sus mutantes negativos dominantes respectivos debilita gravemente la activación de IKKβ, pero no la de IKKα, en células estimuladas con TNFα (Lallena y col., 1999). Además, la PKC atípica activa recombinante estimula dramáticamente *in vitro* la IKKβ -- pero no la IKKα -- en células no estimuladas (Lallena y col., 1999). Colectivamente, estos resultados demuestran un papel crítico de las PKC atípicas en la ruta de NF-κB a través de la regulación de la actividad de IKKβ.

En contraste con las isoformas clásicas o nuevas de las PKC, las PKC atípicas son insensibles a ésteres de forbol o al diacilglicerol, pero se activan por otros segundos mensajeros lipídicos importantes tales como fosfatidilinositol 3,4,5-P_3 (Nakanishi y col., 1993) y ceramida (Lozano y col., 1994). Aunque los productos de la PI 3-quinasa activan las aPKC (Nakanishi y col., 1993; Akimoto y col., 1996), también estimulan otras quinasas tales como εPKC, θPKC, PRK1 o c-Akt (Diaz-Meco y col., 1996). La ceramida activa a las dos aPKC (Lozano y col., 1994; Müller y col., 1995), pero la también estimula la proteína quinasa activada por ceramida, entre otras dianas posibles. Esto sugiere que los

diferentes mediadores lipídicos no son selectivos para una PKC dada.

Ahora se ha descubierto que una nueva proteína de interacción lambda (denominada aquí BLIP) interacciona con λ/ιPKC de una forma dependiente del TNFα. La expresión ectópica de BLIP de tipo silvestre es suficiente para activar NF-κB de una forma dependiente de λ/ιPKC, mientras que el mutante de BLIP quinasa-inactivo es dominante negativo. Las proteínas BLIP humanas y de otros mamíferos son útiles para seleccionar procedimientos para la identificación y desarrollo de nuevos agentes farmacéuticos, incluyendo agonistas y antagonistas de las proteínas, que pueden usarse para aumentar o reducir la activación de NF-κB (en comparación con la activación que se produciría en una célula de control no tratada).

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar proteínas BLIP humanas aisladas y ADN que codifica tales proteínas. Otros objetos de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la misma.

Resumen de la Invención

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona una proteína BLIP humana aislada o una variable de la misma. En un aspecto particularmente preferido de la invención, la proteína

tiene una secuencia de aminoácidos como la proporcionada en la **Figura 2A** (SEC ID NO: 4).

Un aspecto adicional de la presente invención es un mutante sin actividad quinasa de una proteína BLIP.

Otro aspecto de la presente invención es una proteína LIP humana aislada o una variante de la misma. En un aspecto particularmente preferido de la invención, la proteína tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 6.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una proteína BLIP o una variante de la misma, o una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la misma. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADNc. De una forma particularmente preferida, la secuencia de nucleótidos es o comprende la SEC ID NO: 3.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una proteína LIP o una variante de la misma, o una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la misma. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADNc. De una forma particularmente preferida, la secuencia de nucleótidos es o comprende la SEC ID NO: 6.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ADN aislada que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: (a) ADN aislado que codifica la proteína BLIP de la **Figura 2A** (SEC ID NO: 4); (b) ADN aislado que hibrida con el ADN aislado de (a) anterior bajo condiciones representadas por una rigurosidad de lavado de NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M y SDS 0,1% a 60°C, que tiene una homología de al menos un 65% con el ADN aislado de (a) anterior, y que codifica una proteína BLIP; y (c) ADN aislado que tiene una secuencia complementaria a (a) - (c) anteriores.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico como se ha mencionado anteriormente. De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico que tiene un promotor y un ácido nucleico heterólogo unido operativamente a dicho promotor, donde dicho ácido nucleico heterólogo es una molécula de ácido nucleico como la proporcionada anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una línea de células estables que comprende una secuencia de ADN recombinante o un vector de expresión como se ha mencionado anteriormente, capaz de expresar la proteína codificada. Preferiblemente, la

línea celular es una línea de células Hela o HEK293 modificadas.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo policlonal o monoclonal que se une específicamente a una proteína BLIP como se ha indicado anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un oligonucleótido antisentido complementario a un ácido nucleico como se ha indicado anteriormente y que tiene una longitud suficiente como para hibridar con el mismo bajo condiciones fisiológicas; junto con un ADN que codifica tal oligonucleótido antisentido; y una construcción de ácido nucleico que tiene un promotor y un ácido nucleico heterólogo unido operativamente a dicho promotor, donde el ácido nucleico heterólogo es un ADN que codifica tal oligonucleótido antisentido.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para inhibir la activación de NF-κB en una célula, que comprende proporcionar a la célula un inhibidor de la activación de NF-κB relacionada con BLIP, en una cantidad eficaz para inhibir la activación de NF-κB en dicha célula. La célula puede proporcionarse en cualquier forma adecuada, tal como en un cultivo *in vitro*. La etapa de proporción puede realizarse por cualquier medio adecuado, tal como

suministrando el compuesto inhibidor en el interior de la célula o suministrando dentro de la célula un ácido nucleico que codifica y expresa una proteína inhibidora. La célula preferiblemente es una célula de mamífero y, más preferiblemente, una célula humana.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un mutante BLIP sin actividad quinasa, o una proteína LIP, como un inhibidor de la activación de NF-κB en una célula o como un agente o adyuvante contra el cáncer.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para seleccionar compuestos con respecto a la capacidad de modular (aumentar o inhibir) la activación dependiente de BLIP de NF-κB. Tales procedimientos comprenden poner en contacto un compuesto de ensayo con una proteína BLIP como se ha mencionado anteriormente y detectar la actividad o la inactividad de modulación.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto que modula la actividad NF-κB dependiente de BLIP, identificable por los procedimientos mencionados anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de tratamiento o profilaxis de un trastorno que responde a la modulación de la activación de NF-κB dependiente de BLIP, en un mamífero, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad

eficaz de un compuesto que modula (inhibe o aumenta) la activación NF-κB dependiente de BLIP. Preferiblemente, el trastorno se selecciona entre trastornos neoplásicos, inflamatorios e inmunes.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto que modula la activación de NF-κB dependiente de BLIP en un procedimiento de formulación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un trastorno que responde a la modulación de la activación de NF-κB dependiente de BLIP.

Breve Descripción de las Figuras.

La presente invención se describirá adicionalmente a modo de ejemplo y haciendo referencia a las siguientes figuras:

La Figura 1 muestra en un gráfico el efecto de la sobreexpresión de LIP sobre la activación de NF-κB; aumentando la expresión de LIP la actividad reducida del mensajero dependiente de κB inducido por TNFα.

La Figura 2A muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína BLIP humana (SEC ID NO: 4).

La Figura 2B es una representación esquemática de BLIP que muestra el dominio de tipo PI 3-quinasa de FRAP/ATM y la región LIP.

La Figura 3A es una alineación del dominio de PI 3-quinasa de la proteína BLIP humana con el de FRAP. Los asteriscos indican los aminoácidos que son idénticos en las dos proteínas alineadas; los restos críticos conservados que confieren actividad catalítica a la proteína están incluidos en recuadros.

La Figura 3B es una alineación del dominio de PI 3-quinasa de la proteína BLIP humana con el de ATM. Los asteriscos indican los aminoácidos que son idénticos en las dos proteínas alineadas; los restos críticos conservados que confieren actividad catalítica a la proteína están incluidos en recuadros.

La Figura 4A muestra en un gráfico los efectos del BLIP sobre la activación de NF-κB en cultivos de células HEK293 humanas. Las células HEK293 se transfectaron con un plásmido mensajero de luciferasa dependiente de κB y: un vector de control negativo (primera barra); concentraciones crecientes de un plásmido de expresión para BLIP de tipo silvestre (BLIP; segunda-sexta barras); concentraciones crecientes de un plásmido de expresión para la proteína BLIP quinasa-inactiva ($BLIP^{MUT}$; séptima-undécima barra); o un vector de expresión RIP (control positivo; barra final). Después de 24 horas, se determinaron los niveles de expresión de

luciferasa. Los resultados son la media ±SD de tres experimentos independientes con incubaciones por duplicado.

La Figura 4B ilustra en un gráfico el papel de BLIP sobre la activación de NF-κB en cultivos de células HEK293. Las células se transfectaron con un plásmido mensajero de luciferasa dependiente de κB y: un vector de control negativo (barras blancas), un plásmido de expresión para λ/ιPKC de tipo silvestre (λ/ιPKC; barras sombreadas) o un plásmido de expresión para λ/ιPKC quinasa-inactivo ($\lambda/\iota PKC^{MUT}$; barras negras). Se evaluó la actividad luciferasa en las células sin BLIP (control) y con concentraciones crecientes de BLIP de tipo silvestre (BLIP) después de 24 horas. Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes con incubaciones por duplicado.

La Figura 5 muestra el porcentaje de células HeLa con p65 nuclear después de la transfección con un vector para una versión marcada con HA de $BLIP^{MUT}$. Veinte horas después de la transfección, las células se dejaron sin tratar (control, barras blancas) o se estimularon durante 20 minutos con TNFα (30 ng/ml; barras negras). El análisis se realizó mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal anti-HA 12CA5 y un anticuerpo policlonal de cabra anti-p65. El

gráfico muestra la media ± SD de varios campos (300 células) de tres experimentos independientes.

La Figura 6 proporciona la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO: 3) del ADN que codifica la proteína BLIP de la SEC ID NO: 4.

Descripción Detallada de la Invención

Los presentes inventores han aislado y caracterizado una nueva isoforma LIP, denominada aquí BLIP (por "big LIP" (LIP grande)) (SEC ID NO: 4). BLIP interacciona con λ/ιPKC de una forma dependiente de TNFα y activa NF-κB de una forma dependiente de λ/ιPKC. De relevancia funcional, BLIP tiene un dominio que es muy homólogo a la región semejante a PI 3-quinasa de la proteína asociada a FKBP-rapamicina (FRAP) y la proteína Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) (véanse las **Figs. 3A** y **3B**). De forma interesante, la expresión ectópica de BLIP de tipo silvestre es suficiente para activar NF-κB de una forma dependiente de λ/ιPKC, mientras que el mutante quinasa-inactivo de BLIP es dominante negativo. Esta es la primera evidencia de la implicación de una molécula semejante a FRAP/ATM en la activación de NF-κB. Se ha demostrado que NF-κB es relevante en la proliferación de las células y en la apoptosis (Baldwin, 1996; Lenardo y Baltimore, 1989). Los presentes inventores expandieron adicionalmente la secuencia conocida de la proteína LIP humana y determinaron que la

proteína LIP inhibe la transcripción dependiente de NF-κB cuando se expresa en una célula.

Las PKC atípicas se regulan por reguladores proteicos. En comparación con las secuencias de aminoácidos de las PKC nuevas o clásicas, las secuencias de la subfamilia de PKC atípicas difieren en el dominio regulador. La identificación de moduladores selectivos para cada isotipo de PKC ayudará a comprender la función y regulación de las diferentes isoformas de PKC. Se ha identificado una proteína denominada LIP como regulador selectivo de λ/ιPKC (Diaz-Meco y col., 1996). LIP se une al saliente de cinc de λ/ιPKC, pero no se une a αPKC, a εPKC ni incluso al ςPKC muy relacionado (Diaz-Meco y col., 1996). De forma interesante, la sobreexpresión de un fragmento de LIP (el fragmento R4) que es suficiente para interaccionar con λ/ιPKC es capaz de estimular una actividad promotora dependiente de κB (Diaz-Meco y col., 1996).

Previamente, se informó que la expresión de una región C-terminal mínima de LIP (denominada R4 en Diaz-Meco y col., 1996) que se unía a λ/ιPKC, también era suficiente para activar NF-κB (Diaz Meco y col., 1996). Sin embargo, los presentes inventores determinaron que la sobreexpresión de LIP de longitud entera no activa NF-κB, y de hecho inhibe la transcripción de genes dependientes de κB (véase el Ejemplo 4).

LIP se identificó inicialmente por el sistema de dos híbridos en levadura. Diaz-Meco y col., (1996), describen un ADNc aislado de LIP que codifica una proteína de 713 aminoácidos, con un peso molecular previsto de 79,7 kDa. Los presentes inventores determinaron que la secuencia de LIP era de 779 aminoácidos (SEC ID NO: 6) y observaron que LIP se expresaba en tejidos de testículo y de corazón, pero no en otros tejidos investigados (hígado, ovarios, bazo, timo, cerebro, pulmón y riñón). Sin embargo, inesperadamente se detectó una banda que reaccionaba con el anticuerpo anti-LIP y que tenía un peso molecular mayor de 200 kDa (resultados no mostrados).

Después se determinó la expresión de LIP y la banda recién identificada en dos líneas de células humanas diferentes (células HEK293 y HeLa). Véase el Ejemplo 2. Se observó que las dos bandas eran detectables en las dos líneas de células aunque variaba la proporción, siendo la proteína de mayor peso molecular (BLIP) más abundante en células HEK293 que en células HeLa (resultados no mostrados).

Los presentes inventores evaluaron si BLIP se podía unir a λ/ιPKC in vivo (Ejemplo 3), usando células HEK293 que no estaban tratadas (control) o estimuladas con TNFα durante diversos tiempos. Bajo condiciones de reposo había una asociación pequeña o nula de BLIP o LIP

con λ/ιPKC (datos no mostrados). Sin embargo, tras la estimulación de TNFα, había una interacción rápida y sostenida de BLIP con λ/ιPKC.

Para investigar adicionalmente si BLIP era fisiológicamente relevante en la ruta aPKC/NF-κB, los presentes inventores después clonaron y caracterizaron molecularmente BLIP (Ejemplo 5). BLIP es una proteína de 2392 aminoácidos (**Fig. 2A**, SEC ID NO: 4); la región que abarca los aminoácidos 881-1209 de BLIP presenta un alto grado de homología con los dominios PI 3-quinasa de FRAP (SEC ID NO:1) y de ATM (SEC ID NO: 2) (**Figs. 3A y 3B**). La alineación de los dominios de tipo PI 3-quinasa de BLIP, FRAP y ATM indica que BLIP tiene actividad quinasa, ya que los motivos DXXXXN y DFG que constituyen restos críticos del sitio catalítico conservado en todos los miembros de la familia ATM con actividad quinasa, también se conservan en BLIP. (véanse las **Figs. 3A y 3B**).

Los presentes inventores investigaron si el dominio quinasa semejante a FRAP/ATM de BLIP juega un papel en la activación de NF-κB (Ejemplo 6). Se transfectaron células HEK293 con un gen mensajero dependiente de κB (luciferasa) junto con concentraciones crecientes de plásmidos de expresión para BLIP, bien para BLIP de tipo silvestre o para un mutante quinasa-inactivo ($BLIP^{MUT}$). Los resultados (**Figura 4A**) indican que la expresión de BLIP de tipo silvestre (pero no un

mutante de BLIP quinasa inactivo) es suficiente para activar la actividad del mensajero dependiente de κB en un grado comparable al de RIP (Proteína de Interacción con el Receptor).

Otros experimentos establecieron que el efecto de activación de NF-κB de la proteína BLIP depende de λ/ιPKC (Ejemplo 7). Las células se transfectaron con un plásmido mensajero de luciferasa dependiente de κB y un vector de control negativo, un plásmido de expresión para λ/ιPKC de tipo silvestre, o un plásmido de expresión para $\lambda/\iota PKC^{MUT}$ quinasa-inactivo. Se evaluó la actividad luciferasa en células sin BLIP (control) y con concentraciones crecientes de BLIP de tipo silvestre (BLIP) y se observó que la co-expresión de λ/ιPKC de tipo silvestre cooperaba con BLIP para activar NF-κB, mientras que la expresión del mutante λ/ιPKC quinasa-inactivo no lo hacía. Los resultados se muestran en la **Figura 4B**.

El trabajo de los presentes inventores indica que BLIP es un componente crítico de la ruta de NF-κB, y depende de su propia actividad quinasa y de la de λ/ιPKC para ejercer su función.

Para demostrar que BLIP controla la translocación de RelA al núcleo, se transfectaron células con el vector de expresión de BLIP mutante ($BLIP^{MUT}$) marcado con

HA. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se estimularon con TNFα o se dejaron sin tratar (control). Después, las células se analizaron mediante inmunofluorescencia doble usando un anticuerpo anti p65 (RelA) y un anticuerpo anti-HA para detectar las células que estaban expresando la construcción (datos no mostrados). El análisis de las células reveló que las células transfectadas con el BLIP mutante habían inhibido la translocación inducida por TNFα de p65 en comparación con las células transfectadas con BLIP de tipo silvestre (**Fig. 5**).

Las PKC atípicas están implicadas en el control de NF-κB y p70S6K (Romanelli y col., 1999). Las dos rutas son críticas en el control de la función de células inflamatorias e inmunosupresoras. NF-κB controla una miríada de respuestas inmunes y es una molécula anti-apoptótica potente. La inhibición de las quinasas PKC atípicas bloquea el crecimiento y la proliferación de las células e inicia una muerte celular programada (Berra y col, 1993, 1997; Diaz-Meco y col., 1996; Murray y col., 1997). Además, la inhibición de aPKC conduce a la inversión del fenotipo transformante de células transformadas con Ras (Bjorkoy y col., 1995), indicando que los inhibidores de las PKC atípicas pueden tener efectos antineoplásicos y serían adecuados para la selección de efectos terapéuticos contra el cáncer. Consistente con esta noción, las PKC atípicas se dirigen a intermedios clave de la cascada de señalización de las

células implicada en la proliferación celular. Se ha demostrado que ζPKC, así como λ/ιPKC, controlan la activación de la cascada de señalización MEK-ERK, junto con Raf, en las rutas Ras y PI 3-quinasa γ (Diaz-Meco y col., 1994, 1995; Liao y col., 1997; Schönwasser y col., 1998; Takeda y col., 1999).

Los presentes inventores determinaron que BLIP tiene un dominio muy homólogo a la región quinasa de FRAP. FRAP es la diana de la molécula inmunosupresora rapamicina (Dennis y col., 1999). La rapamicina bloquea la activación de p70S6K en células T, lo cual constituye la base molecular de sus acciones inmunosupresoras (Dennis y col., 1999). De forma interesante, se requiere la actividad de p70S6K y es suficiente para la progresión del ciclo celular de los linfocitos T. El tándem BLIP-λ/ιPKC representa una ruta alternativa a la de FRAP en el diseño de nuevas moléculas potencialmente inmunosupresoras.

Los resultados presentados aquí demuestran el papel crítico de BLIP en la activación de NF-κB, y también demuestran que el dominio quinasa semejante a FRAP/ATM de BLIP es importante en la activación de NF-κB. Un mutante sin actividad quinasa de la proteína BLIP no puede activar BLIP NF-κB, e incluso tiene una actividad dominante negativa cuando transfecta a células activadas con TNFα (similar a los efectos de LIP de longitud entera).

Aunque no se desea limitación por una sola teoría subyacente a los mecanismos de las proteínas LIP y BLIP, los presentes investigadores postulan que la proteína LIP de longitud entera limita la capacidad de λ/ιPKC de activar NF-κB. Esta limitación no está presente cuando el fragmento R4 se usa para investigar la activación de NF-κB (Diaz-Meco y col., 1996). Es posible que en el caso de BLIP, la supuesta limitación se alivie por la acción de la actividad quinasa similar a FRAP/ATM.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprender" e "incluir" y variaciones tales como "comprende", "comprendiendo", "incluye" e "incluyendo" deben interpretarse de forma inclusiva. Es decir, estas palabras pretenden significar la posible inclusión de otros elementos o enteros no mencionados específicamente, cuando lo permita el contexto.

Las secuencias de aminoácidos descritas aquí se presentan en la dirección amino a carboxi, de izquierda a derecha. Los grupos amino y carboxi no se presentan en la secuencia. Las secuencias de nucleótidos se presentan aquí solo con una cadena, en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha. Los nucleótidos y aminoácidos se representan de la forma recomendada por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB, o (para aminoácidos)

por el código de tres letras, de acuerdo con el uso establecido.

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a proteínas BLIP y LIP aisladas. La información de secuencia para la BLIP humana aislada se proporciona en la **Figura 2A** (aminoácidos; SEC ID NO:4) y en la **Fig. 6** (nucleótidos; SEC ID NO: 3). La información de la secuencia de aminoácidos para un mutante quinasa-inactivo de BLIP se proporciona en la SEC ID NO:5. La información de la secuencia para LIP se proporciona en la SEC ID NO: 6 (aminoácidos) y en la SEC ID NO: 7 (nucleótidos). En el contexto de esta invención, el término "aislado" indica que la molécula de proteína o nucleótido no está en su estado nativo, en tanto que se ha purificado al menos en algún grado o se ha producido sintéticamente, por ejemplo, por procedimientos recombinantes. El término "aislado", por lo tanto, incluye la posibilidad de la molécula que está en combinación con otro material biológico o no biológico tal como células, suspensiones de células o fragmentos celulares, proteínas, péptidos, vectores de expresión, disolventes orgánicos o inorgánicos u otros materiales cuando sea apropiado, pero excluye la situación en la que la proteína está en el estado en el que se encuentra en la naturaleza.

Pueden emplearse procedimientos rutinarios conocidos en la técnica, tales como los explicados adicionalmente en la sección experimental mostrada más

adelante, para purificar y/o sintetizar las moléculas de proteínas y nucleótidos de acuerdo con la invención. Tales procedimientos se comprenden bien por las personas especialistas en la técnica e incluyen técnicas tales como las descritas en Sambrook, J. y col (1), cuya descripción se incluye aquí en su totalidad por referencia.

El término "variante de BLIP", según se usa a lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se refiere a otros péptidos y proteínas que retienen el mismo carácter funcional esencial de la proteína BLIP de la SEC ID NO: 4 proporcionada aquí, pero que varía en la secuencia de aminoácidos. También pretenden incluirse variantes dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, se consideran variantes de la proteína BLIP, péptidos o proteínas con una homología de secuencia mayor de aproximadamente un 65%, preferiblemente de al menos un 70%, 75%, 80% u 85% y, de una forma particularmente preferida, de al menos aproximadamente un 90% o incluso de un 95% o 98% con la SEC ID NO:4, y que retienen funciones de BLIP. Tales variantes pueden incluir la deleción, modificación o adición de aminoácidos individuales o de grupos de aminoácidos dentro de la secuencia de la proteína, siempre que el péptido mantenga la funcionalidad biológica básica de una proteína BLIP, es decir, interaccione con λ/ιPKC de una forma dependiente de TNFα y active NF-κB de una forma dependiente de TNFα y dependiente de λ/ιPKC. Esta

funcionalidad biológica puede evaluarse realizando estudios como los descritos aquí y los conocidos en la técnica.

El término "proteína BLIP", como se usa en este documento, no incluye una proteína que consta sólo de la secuencia de la proteína LIP (SEC ID NO: 6) o el fragmento R4 (SEC ID NO:8).

Como se usa en este documento, una proteína BLIP es una que tiene los aminoácidos de la SEC ID NO:4, o que tiene una homología de aminoácidos de al menos un 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o incluso del 99% con la SEC ID NO: 4 y que tiene funciones de BLIP. Una proteína que tiene funciones de BLIP es una que interacciona con λ/ιPKC de una forma dependiente de TNFα, que activa NF-κB de una manera dependiente de TNFα y dependiente de λ/ιPKC, y que contiene un dominio quinasa funcional. El grado de homología de la secuencia de aminoácidos entre proteínas puede calcularse usando diversos programas de software de ordenador disponibles en el mercado (por ejemplo, el análisis BLAST, como se conoce en la técnica).

Como se usa aquí, un mutante quinasa inactivo de BLIP es una proteína o péptido que tiene una homología de secuencia sustancial con una proteína BLIP funcional (por ejemplo, con una homología de secuencia de al menos aproximadamente un 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%,

98% o incluso del 99%), pero que tiene un dominio quinasa no funcional. Un especialista en la técnica reconocerá el dominio PI-3 quinasa de una proteína BLIP por su secuencia. En la SEC ID NO: 5 se proporciona un ejemplo de un mutante BLIP quinasa-inactivo.

El término "variante de LIP", según se usa a lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se refiere a otros péptidos o proteínas que retienen el mismo carácter funcional de la proteína LIP de la SEC ID NO:6 proporcionada aquí, pero que varía en la secuencia de aminoácidos. También pretenden incluirse variantes dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, los péptidos o proteínas con una homología de secuencia mayor de aproximadamente un 90%, 92%, 95% o incluso 97% o 99% con la SEC ID NO: 6 y que retienen funciones de LIP, se consideran variantes de la proteína LIP. Tales variantes pueden incluir la deleción, modificación o adición de aminoácidos individuales o de grupos de aminoácidos dentro de la secuencia de la proteína, siempre que el péptido mantenga la funcionalidad biológica básica de una proteína LIP, es decir, inhiba la transcripción dependiente de NF-κB. Esta funcionalidad biológica puede evaluarse realizando los estudios descritos en este documento y conocidos en la técnica. Como se usa aquí, una proteína LIP es una que tiene los aminoácidos de la SEC ID NO: 6 o que tiene una homología de aminoácidos de al menos aproximadamente un 90%, 92%, 95%, 97%, 98% o

incluso un 99% con la SEC ID NO: 6 y que tiene funciones de LIP. El grado de homología de la secuencia de aminoácidos entre proteínas puede calcularse usando diversos programas de software de ordenador disponibles en el mercado (por ejemplo, análisis BLAST como se conoce en la técnica).

En general, los especialistas en la técnica apreciarán que pueden realizarse deleciones o sustituciones minoritarias en las secuencias de aminoácidos de los péptidos y proteínas de la presente invención sin afectar adversamente a la actividad de las mismas. Así pues, las proteínas que contienen tales deleciones o sustituciones son un aspecto adicional de la presente invención. En péptidos que contienen sustituciones o reemplazos de aminoácidos, uno o más aminoácidos de una secuencia pueden reemplazarse por uno o más aminoácidos distintos siempre que tal reemplazo no afecte a la función de la secuencia. Tales cambios pueden guiarse por homologías conocidas entre aminoácidos en características físicas tales como densidad de carga, hidrofobia/hidrofilia, tamaño y configuración, de tal forma que los aminoácidos se sustituyan con otros aminoácidos que tienen esencialmente las mismas propiedades funcionales, como se conoce en la técnica.

La invención también incluye secuencias de nucleótidos que codifican proteínas BLIP y LIP, mutantes y variantes de las mismas, así como secuencias de

nucleótidos que son complementarias a las mismas. La secuencia de nucleótidos puede ser ADN o ARN, incluyendo ADN genómico, ADN sintético o ADNc. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y, aún más preferiblemente, una secuencia de ADNc. (La información de la secuencia de nucleótidos se proporciona en la **Figura 6** (SEC ID NO: 3); la proteína BLIP de la SEC ID NO: 4 se codifica por los nucleótidos 152 - 7327 de la SEC ID NO: 3). Las moléculas de nucleótidos pueden aislarse a partir de células humanas o sintetizarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, como se describe a modo de ejemplo en Sambrook, J. y col (1), cuya descripción se incluye aquí en su totalidad por referencia. Las moléculas de nucleótidos de acuerdo con la invención tienen utilidad en la producción de las proteínas de acuerdo con la invención, que pueden tener lugar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Las moléculas de nucleótidos pueden implicarse en síntesis de proteínas recombinantes o, de hecho, como agentes terapéuticos por sí mismas, pueden utilizarse en técnicas de terapia génica. En la terapia génica también pueden usarse nucleótidos complementarios a los que codifican proteínas BLIP o secuencias antisentido, tales como en estrategias para la regulación negativa de la expresión de las proteínas de la invención.

Como se usa en este documento, las moléculas de ADN que codifican una proteína BLIP pretenden incluir variaciones alélicas naturales de las moléculas de ADN.

Las condiciones de hibridación que permiten que otras secuencias de ADN que codifican para una proteína BLIP hibriden con una secuencia de ADN como la proporcionada aquí (por ejemplo, SEC ID NO: 3), en general son condiciones muy rigurosas. Por ejemplo, la hibridación de tales secuencias puede realizarse bajo condiciones representadas por una rigurosidad de lavado de NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M, SDS al 0,1% a 60°C o incluso a 70°C, en un ensayo de hibridación convencional in situ. Véase, J. Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory)). En general, las secuencias de ADN que codifican para una proteína BLIP e hibridan con una secuencia de ADN de la SEC ID NO: 3 descrita aquí, tendrán una homología de secuencia de nucleótidos de al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92% o incluso del 95% con la SEC ID NO: 3, y codificarán una proteína con funciones de BLIP. La homología de las secuencias puede determinarse usando programas de software de ordenador disponibles en el mercado (por ejemplo, el análisis BLAST como se conoce en la técnica). El ADN aislado de la presente invención puede ser de cualquier especie de origen, incluyendo ratón, rata, conejo, gato, cerdo y ser humano, pero preferiblemente es de origen mamífero y más preferiblemente de origen humano.

Como se usa en este documento, se entiende que una molécula de ADN que codifica una proteína LIP incluye variaciones alélicas naturales en las moléculas de ADN.

Las condiciones de hibridación que permiten que otras secuencias de ADN que codifican para una proteína LIP hibriden con una secuencia de ADN como la proporcionada aquí (por ejemplo, la SEC ID NO: 7), son en general condiciones muy rigurosas. Por ejemplo, la hibridación de tales secuencias puede realizarse bajo condiciones representadas por una rigurosidad de lavado de NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M, SDS 0,1% a 60°C o incluso a 70°C en un ensayo de hibridación convencional in situ. Véase, J. Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory)). En general, las secuencias de ADN que codifican para una proteína LIP e hibridan con una secuencia de ADN de la SEC ID NO: 3 descrita aquí tendrán al menos una homología de secuencia de nucleótidos de al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92% o incluso del 95% con la SEC ID NO: 3, y codificarán una proteína con funciones de LIP. La homología de secuencia puede determinarse usando programas de software de ordenador disponibles en el mercado (por ejemplo, análisis BLAST como se conoce en la técnica). El ADN aislado de la presente invención puede ser de cualquier especie de origen, incluyendo ratón, rata, conejo, gato, cerdo y humano, pero preferiblemente es de origen mamífero y más preferiblemente de origen humano.

Además, las moléculas de oligonucleótido que codifican para proteínas BLIP o LIP (o mutantes o

variantes de las mismas) pero que difirieren en la secuencia de los codones de las moléculas de ADN anteriores debido a la degeneración del código genético, también son un aspecto de esta invención. La degeneración del código genético, que permite que diferentes secuencias de ácido nucleico codifiquen para la misma proteína o péptido, es bien conocida en la técnica. Las moléculas de oligonucleótido que codifican para la misma proteína BLIP que la codificada por las secuencias anteriores, pero que difiriere de éstas en la secuencia de codones debido a mutagénesis de localización dirigida, son otro aspecto de esta invención. En la técnica se conocen las técnicas de mutagénesis de localización dirigida.

La presente invención también incluye vectores de expresión que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las presentes proteínas, mutantes o variantes de las mismas. Tales vectores de expresión se construyen rutinariamente en la técnica de la biología molecular y pueden implicar, por ejemplo, el uso de ADN plasmídico y de iniciadores apropiados, promotores, inductores y otros elementos, tales como, por ejemplo, señales de poliadenilación que pueden ser necesarias y que se colocan en la orientación correcta para permitir la expresión de las proteínas. Para las personas especialistas en la técnica serán evidentes los vectores adecuados. A modo de ejemplo adicional a este respecto,

se hará referencia a Sambrook y col. (1), cuya descripción se incluye aquí en su totalidad.

Pueden usarse vectores para amplificar el ADN que codifica una proteína deseada y/o para expresar un ADN que codifica una proteína deseada. La secuencia de ADN que codifica la proteína deseada se une operativamente a secuencias de control adecuadas capaces de realizar la expresión de la proteína en un hospedador adecuado. Las regiones de ADN se unen operativamente o se asocian operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, un promotor se une operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas se une operativamente a una secuencia codificante si está situado de forma que permita la traducción. La necesidad de tales secuencias de control variará dependiendo del hospedador seleccionado y del procedimiento de transformación elegido. Los vectores pueden incluir plásmidos, virus (por ejemplo, adenovirus, citomegalovirus), fagos y fragmentos de ADN integrables (es decir, fragmentos integrables en el genoma del hospedador por recombinación).

La invención también incluye líneas de células que se han modificado o transfectado para expresar las proteínas de la presente invención. Tales líneas de células incluyen líneas de células eucariotas superiores, transitorias o preferiblemente estables

(tales como células de mamífero o células de insectos), células eucariotas inferiores (tales como levaduras) o células procariotas (tales como células bacterianas). También es posible que las proteínas de la invención se expresen transitoriamente en una línea de células, tal como, por ejemplo, en un sistema de expresión de baculovirus.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención también se refiere a anticuerpos (anticuerpos policlonales o preferiblemente monoclonales) que se unen específicamente a las proteínas de la presente invención, (es decir, anticuerpos que se unen a un solo sitio antigénico o epítopo de las proteínas). Tales anticuerpos son preferiblemente de origen monoclonal. Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos IgG de cualquier especie adecuada, tal como rata, conejo o caballo, pero generalmente son de origen mamífero. Se entiende que los fragmentos de anticuerpos IgG que retienen la capacidad de unirse específicamente a las proteínas de la presente invención, tales como fragmentos $F(ab')_2$, F(ab') y Fab, se incluyen por el término "anticuerpo" de este documento. Véase, en general, E. Harlow y D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988) (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Los anticuerpos pueden ser quiméricos, como se describe por M. Walker y col., Molecular Immunol. 26, 403 (1989). Los anticuerpos que se unen a proteínas

BLIP, pero no a proteínas LIP más cortas, son particularmente preferidos.

Tales anticuerpos son útiles en la purificación, aislamiento o selección que implican técnicas de inmunoprecipitación, y pueden usarse como herramientas para averiguar adicionalmente la función de la proteína BLIP, o como agentes terapéuticos por sí mismos.

Los oligodesoxinucleótidos de ácidos nucleicos complementarios y capaces de hibridar con la cadena con sentido de un gen, o con un ARNm transcrito a partir de ese gen, son oligodesoxinucleótidos antisentido. Cuando la cadena con sentido de un gen diana, o un ARNm, se expone a sus oligodesoxinucleótidos antisentido, se producirá la interacción de los dos, de tal forma que se bloqueará la transcripción del gen o se bloqueará la traducción del ARNm. La presente invención incluye oligómeros capaces de hibridar con una porción de un gen (o de un ARNm) que codifica la proteína BLIP o LIP. Cuando tal oligómero hibrida con la molécula diana, la producción de la proteína se impedirá o se reducirá sustancialmente (en comparación con la que se produciría en ausencia del oligonucleótido antisentido). La prevención sustancial significa que la proteína no se produce o se produce a niveles que no son funcionales.

Los oligonucleótidos antisentido (y los ácidos nucleicos que expresan tales moléculas antisentido)

pueden obtenerse de acuerdo con técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5.023.243 de Tullis; y la Patente de Estados Unidos No. 5.149.797 de Pederson y col. La longitud del oligonucleótido antisentido (es decir, el número de nucleótidos que tiene) no es crítica siempre que se una selectivamente a la localización deseada; esto puede determinarse de acuerdo con procedimientos rutinarios. En general, el oligonucleótido antisentido tendrá una longitud desde 8, 10 ó 12 nucleótidos hasta 20, 30 ó 50 nucleótidos. Tales oligonucleótidos antisentido pueden ser oligonucleótidos en los que al menos uno o todos los restos de fosfato de unión entre nucleótidos son fosfatos modificados, tales como metil fosfonatos, metil fosfonotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y fosforamidatos. Por ejemplo, cada uno de los restos fosfato de unión entre nucleótidos puede estar modificado como se ha descrito. En otro ejemplo no limitante, tales oligonucleótidos antisentido son oligonucleótidos en los que al menos uno o todos los nucleótidos contienen un radical alquilo inferior 2' (por ejemplo, alquilo C_1-C_4, lineal o ramificado, saturado o insaturado, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo e isopropilo). Por ejemplo, pueden estar modificados un oligonucleótido si y otro no como se ha descrito. Véase también P. Furdon y col., Nucleic Acids Res. 17, 9193-9204 (1989); S. Agrawal y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1401-1405 (1990); C. Baker y col., Nucleic Acids Res. 18, 3537-

3543 (1990); B. Sproat y col., Nucleic Acids Res. 17, 3373-3386 (1989); R. Walder and J. Walder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5011-5015 (1988).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a procedimientos de selección diseñados para identificar compuestos que modulan la activación por BLIP de λ/ιPKC, o que modulan la activación de NF-κB. Por el término "modulación" se entiende que habrá un aumento o una reducción de la activación de NF-κB en presencia del compuesto (en comparación con la que se observaría en ausencia del compuesto); tal actividad generalmente se producirá por la unión de un ligando del compuesto a BLIP, λ/ιPKC, el tándem de BLIP y λ/ιPKC, o al propio NF-κB.

En términos generales, tales procedimientos de selección implican administrar un compuesto de ensayo a una célula y detectar la activación relacionada con BLIP de NF-κB, en comparación con una célula de control en la que está ausente el compuesto de ensayo (o la proteína BLIP funcional). La activación de NF-κB puede evaluarse usando un gen mensajero dependiente de κB (tal como el gen de la luciferasa), o midiendo la translocación de NF-κB al núcleo celular (usando procedimientos que son conocidos en la técnica, por ejemplo, el uso de anticuerpos anti-Rel65 para detectar el NF-κB nuclear). Tales procedimientos de selección pueden comprender

además la detección de si dicho compuesto de ensayo se une a λ/ιPKC (o a BLIP, o a NF-κB), por ejemplo, preparando extractos celulares e inmunoprecipitando la proteína de interés, y realizando una inmunotransferencia usando un anticuerpo dirigido al compuesto de ensayo.

La capacidad de los compuestos de modular la actividad de autofosforilación de BLIP también puede usarse como un procedimiento para seleccionar compuestos con respecto a la activación de NF-κB o efectos inhibidores. En términos generales, tales procedimientos de selección implican la administración de un compuesto de ensayo a una célula y la detección de la autofosforilación de BLIP, en comparación con una célula de control en la que está ausente el compuesto de ensayo.

La presente invención también incluye dentro de su alcance los compuestos que se identifican como compuestos que poseen una actividad de modulación de NF-κB útil, por los procedimientos de selección mencionados anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de compuestos que inhiben o aumentan la activación de NF-κB (incluyendo los compuestos identificados por las técnicas de selección mencionadas anteriormente), en el tratamiento o profilaxis de trastornos que responden a

la modulación de la actividad BLIP o la modulación de la actividad NF-κB, en un paciente mamífero (preferiblemente un ser humano).

Así pues, la presente invención proporciona un procedimiento para inhibir (o aumentar) la activación de NF-κB en una célula, proporcionando a la célula un compuesto que inhibe (o aumenta) la activación de NF-κB dependiente de BLIP. Un ejemplo de tal compuesto inhibidor es un mutante de BLIP sin actividad quinasa (por ejemplo, una proteína de la SEC ID NO: 5), o un nucleótido antisentido como se ha descrito anteriormente, donde el compuesto inhibidor se proporciona en una cantidad eficaz como para reducir la activación de NF-κB dependiente de BLIP endógena en la célula (en comparación con la activación de NF-κB que se produciría en la célula en ausencia del compuesto inhibidor). Los compuestos que aumentan la activación de NF-κB se proporcionan en una cantidad eficaz para aumentar la activación de NF-κB dependiente de BLIP endógena en la célula (en comparación con la activación de NF-κB que se produciría en la célula en ausencia del compuesto). La etapa de proporción puede realizarse por cualquier medio adecuado, tal como mediante la liberación del compuesto inhibidor dentro de la célula o mediante la liberación dentro de la célula de un ácido nucleico que codifica y expresa el compuesto inhibidor.

Los compuestos que inhiben la activación relacionada con BLIP de NF-κB tendrán efectos terapéuticos beneficiosos en patologías en las que tal activación está regulada positivamente. En muchas células del sistema inmune, el NF-κB se activa en respuesta a diversas señales patógenas, e induce la transcripción de una diversidad de genes que codifican proteínas inmunológicamente relevantes. Baeuerle y Henkel, *Annu Rev. Immunol.* 12:141 (1994). La interferencia con la activación o actividad de NF-κB puede suprimir reacciones inmunológicas, incluyendo las vistas en el choque tóxico/séptico, en reacciones del hospedador frente a injertos, en reacciones inflamatorias agudas y en lesiones producidas por radiación. En células cancerosas o neoplásicas, tanto la quimioterapia como la terapia con radiación pueden activar el NF-κB que, a su vez, reduce los efectos apoptóticos de la terapia. Se ha informado que la inhibición de la activación de NF-κB en tumores aumenta el potencial apoptótico de los tratamientos del cáncer. Wang y col., *Nature Medicine* 5:412 (1999).

Por consiguiente, la activación de NF-κB mediada por BLIP está implicada en enfermedades inmunológicas y neoplásicas. Por lo tanto, la inhibición de la activación de NF-κB mediada por BLIP proporcionará una ventaja terapéutica positiva cuando se desee una supresión inmune o cuando se deseen efectos antineoplásicos. En particular, tales compuestos

inhibidores tendrán utilidad para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos tales como el choque tóxico/séptico, reacciones del hospedador frente a injertos, reacciones inflamatorias agudas y lesiones producidas por radiación. Tales compuestos además tendrán utilidad como agentes antineoplásicos en el tratamiento de tumores o cánceres y como adyuvantes en la quimioterapia o terapia de radiación de crecimientos neoplásicos. Por ejemplo, la liberación adenoviral en células cancerígenas de un mutante sin actividad quinasa de BLIP (u otro inhibidor de la activación de NF-κB dependiente de BLIP) será útil como adyuvante en la quimioterapia de cánceres, para aumentar los efectos apoptóticos de las quimioterapias.

Los compuestos que aumentan o inducen la activación relacionada con BLIP de NF-κB tendrán efectos terapéuticos beneficiosos en patologías en las que tal activación está reducida, o cuando se desee regular positivamente la activación de NF-κB. Tales compuestos son útiles como inmunoestimuladores y como inhibidores de la muerte celular.

Los compuestos moduladores de NF-κB, incluyendo los identificados de acuerdo con los procedimientos de selección indicados anteriormente, pueden formularse con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales como es rutinario en la técnica farmacéutica y como se describe adicionalmente en

Remmington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, 17ª Ed, 1985, cuya descripción se incluye aquí en su totalidad por referencia.

Los compuestos pueden administrarse mediante rutas entéricas o parenterales tales como por vía oral, bucal, anal, pulmonar, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, tópica u otras rutas de administración apropiadas.

La presente invención se describirá a continuación a modo de ejemplo en la sección experimental adjunta.

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Reactivos y Cultivos de Células: el TNFα humano recombinante se adquirió de Promega; el anticuerpo monoclonal 12CA5 anti-Hemaglutinina (anti-HA) de Boehringer; el anticuerpo monoclonal contra λPKC de Transduction Laboratories; el anticuerpo policlonal de cabra anti-p65 (NF-κB) de Santa Cruz Biotechnologies, Inc. El anti-LIP purificado por afinidad de conejo ya se ha descrito (Díaz-Meco y col., 1996). Las células HEK293 y HeLa humanas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Los cultivos de células HEK293 se mantuvieron en medio de Eagle Modificado de Dulbecco con alto contenido de glucosa, que contenía un 10% de suero de ternero fetal, penicilina G (100 μg/ml) y estreptomicina (100 μg/ml) (Flow). Las células Hela se

mantuvieron en medio esencial mínimo de Eagle suplementado con aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1,0 mM y un 10% de suero de ternero fetal. Las células subconfluentes se transfectaron por el procedimiento de fosfato cálcico (Clontech Laboratories, Inc.).

Plásmidos: Para clonar el ADNc para la secuencia codificante de BLIP, se usó un ADNc de cerebro humano Marathon Ready (Clontech Laboratories, Inc.) siguiendo los procedimientos del fabricante. Este ADNc se subclonó en el sitio NotI del vector pCDNA3-HA para obtener la construcción pCDNA3-HA-BLIP. pCDNA3-HA-BLIT^{MUT} (D1066A; N1071K) se obtuvo por mutagénesis de localización dirigida (Quick Change, Stratagene). pCDNA3-HA-λ/ιPKC y pCDNA3-HA-λ/ιPKC^{MUT} se han descrito previamente (Díaz-Meco y col., 1996).

Inmunoprecipitaciones: Para las inmunoprecipitaciones de proteínas endógenas, se usaron células HEKI293. Algunas células se estimularon con 30 ng/ml de YNF-α. Las células después se recogieron y lisaron en tampón PD [Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, Nonidet P-40 al 0,1%, EDTA 6 mM, EGTA 6 mM, β-glicerofosfato 10 mM, NaF 10 mM, PNPP 10 mM, Na_3VO_4 300 μM, benzamidina 1 mM, PMSF 2 M, 10 μg/ml de aprotinina, 1 μg/ml de leupeptina, 1 μg/ml de pepstatina, DTT 1 mM] y 1 mg de lisado de células enteras se diluyó en tampón PD y se incubó con 10 μg del anticuerpo monoclonal anti-λ/ιPKC. Esta

mezcla de reacción se incubó en hielo durante 2 horas y después se añadieron 25 µl de proteína A o perlas G y la mezcla se dejó incubar con rotación suave durante 1 hora más a 41°C. Después los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con tampón PD. Las muestras se fraccionaron en SDS-PAGE al 8%, se transfirieron a membrana ECL de nitrocelulosa (Amersham) y se sometieron a un análisis de transferencia de Western con anti-LIP. Las proteínas se detectaron con el reactivo ECL (Amersham).

Ensayos del Mensajero de Luciferasa: Cultivos subconfluentes de células HEK293 se transfectaron con diferentes cantidades del plásmido pCDNA3-HA-BLIP o pCDNA3-HA-BLIP^{MUT}, junto con el plásmido mensajero κB-Luc, con o sin vectores de expresión para el tipo silvestre y λ/ιPKC dominante negativo (pCDNA3-HA-λ/ιPKC y pCDNA3-HA-λ/ιPKC^{MUT}). Después de 24 horas, las células se estimularon con TNF-α durante 4 horas. Se prepararon extractos y se determinó la actividad luciferasa como se describe (Díaz-Meco y col., 1996).

Inmunofluorescencia: Las células HeLa se desarrollaron en cubreobjetos de vidrio en medio de crecimiento. Las células subconfluentes se transfectaron con 5 µg de HA-BLIP^{MUT}. Veinte horas después de la transfección, las células se estimularon con TNF-α (30 ng/ml) durante 20 minutos. Las células se lavaron rápidamente dos veces en PBS enfriado con hielo y se fijaron en formaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las

células se lavaron 4 veces con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1%. Los grupos aldehído libres se inactivaron con NH_4Cl 50 mM. La actividad peroxidasa endógena se inactivó mediante tratamiento con un 1% de H_2O_2 en PBS durante 15 minutos. Las células fijadas se bloquearon en solución bloqueante. Las células se incubaron con diferentes anticuerpos durante 1 hora a 37°C. La proteína marcada con HA transfectada se visualizó con el anticuerpo monoclonal 12CA5 anti-HA (Boehringer Mannheim) y un anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC (Cappel), y la p65 endógena con un anticuerpo policlonal de cabra (Santa Cruz Biotech), y el sistema de amplificación de tetrametil-rodamina tiramida TSA-Direct (NEN Life Science Products). Los cubreobjetos de vidrio se montaron en un Mowiol y se examinaron con un sistema confocal MRC 1024 Bio-Rad (Bio-Rad Richmond, CA) montado en un microscopio Zeiss Axiovert 135 (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Ejemplo 2

Detección de BLIP

En el transcurso de una serie de análisis de inmunotransferencia para determinar la expresión de LIP en diferentes órganos y tejidos murinos, los presentes inventores observaron que LIP se expresaba en tejidos de testículo y cardíacos, pero no en otros tejidos investigados (hígado, ovarios, bazo, timo, cerebro, pulmón y riñón). Sin embargo, inesperadamente se detectó una banda que reaccionaba con el anticuerpo LIP y que

tenía un peso molecular mayor de 200 kDa (resultados no mostrados).

Después se determinó la expresión de LIP y de la banda recién identificada en dos líneas de células humanas diferentes usadas rutinariamente en el laboratorio (células HEK293 y células HeLa). Se observó que las dos bandas eran detectables en las dos líneas celulares, aunque la proporción variaba, siendo la proteína de alto peso molecular más abundante en células HEK293 que en células HeLa (resultados no mostrados).

Ejemplo 3

Unión de BLIP a λ/ιPKC

Los presentes inventores evaluaron si BLIP se podía unir a λ/ιPKC in vivo. Usando células HEK293, las células se dejaron sin tratar (control) o se estimularon con TNFα durante diversos tiempos, después de lo cual se prepararon extractos celulares, se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-λ/ιPKC selectivo y se analizaron por inmunotransferencia con el anticuerpo anti-LIP (resultados no mostrados). Bajo condiciones de reposo, hubo una asociación pequeña o nula de BLIP (o LIP; tampoco mostrada) con λ/ιPKC. Sin embargo, tras la estimulación con TNFα, hubo una interacción rápida y sostenida de BLIP con λ/ιPKC. Esto indica que BLIP presenta una asociación inducida por estímulos con λ/ιPKC.

Ejemplo 4

LIP Inhibe la Transcripción Dependiente de NF-κB

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de LIP (SEC ID NO: 6) sobre la activación de NF-κB, se transfectaron células HEK293 con un gen mensajero dependiente de κB (luciferasa) junto con concentraciones crecientes de un plásmido de expresión para LIP (0,2, 0,5, 1,0 y 2,0 μg/pocillo de 60 mm de diámetro). Veinte horas después de la transfección, las células se dejaron sin tratar o se estimularon con 30 ng/ml de TNFα. Los resultados (media ± SD de tres experimentos independiente con incubación por duplicado; **Figura 1**) demuestran que la expresión de LIP reduce la actividad mensajera dependiente de κB inducida por TNFα.

Ejemplo 5

Clonación de BLIP

Los presentes inventores después clonaron y caracterizaron molecularmente la proteína BLIP humana. El clon BLIP (SEC ID NO: 3) expandió la secuencia de LIP presentada previamente por Diaz-Meco y col., (1996). Se descubrió que BLIP era una proteína de 2392 aminoácidos (**Fig. 2A**, SEC ID NO: 4) con un peso molecular previsto de 269 kDa. La región que abarca los aminoácidos 881-1209 de BLIP presenta un alto grado de homología con los dominios PI 3-quinasa de FRAP y ATM (**Figs. 3A y 3B**). La alineación de los dominios semejantes a PI 3-quinasa de BLIP, FRAP y ATM indica que BLIP tiene actividad

quinasa, ya que los motivos DXXXXN y DFG que constituyen restos críticos del sitio catalítico conservado en todos los miembros de la familia ATM con actividad quinasa, también se conservan en BLIP. A diferencia de FRAP y ATM, sin embargo, la región quinasa de BLIP no está localizada en la parte más cercana al extremo C-terminal de la molécula, sino aproximadamente en el medio (**Fig. 2B**). La porción C-terminal de BLIP es la secuencia correspondiente a LIP. Por lo tanto, LIP constituye un dominio de BLIP (**Fig. 2B**), lo que revela una organización de dominios que difiere de otras PI 3-quinasas. Cadena arriba del dominio PI 3-quinasa de FRAP hay una serie de módulos de interacción de proteína-proteína denominados dominios HEAT (Dennis y col., 1999). Tales dominios (u otras regiones a través de las cuales se podrían predecir interacciones con otras proteínas) están ausentes en la molécula BLIP, con la excepción de la región LIP por la que interacciona λ/ιPKC (Dennis y col., 1999). Otra característica de FRAP que está ausente en LIP es el dominio FRB; este dominio es la región responsable de la interacción de FRAP con el complejo FKB/rapamicina (Dennis y col., 1999). Esto sugiere que BLIP es insensible a rapamicina.

Ejemplo 6

Dominio Quinasa de BLIP

Para investigar si el dominio quinasa de tipo FRAP/ATM de BLIP juega un papel en la activación de NF-κB, se transfectaron células HEK293 con un gen mensajero

dependiente de κB junto con concentraciones crecientes (0,2, 0,5, 1,0 y 2,0 μg/pocillo de 60 mm de diámetro) de plásmidos de expresión para BLIP (de tipo silvestre (SEC ID NO: 4) o un mutante quinasa-inactivo (SEC ID NO:5)). Como control positivo, las células también se transfectaron con un vector de expresión RIP (Proteína de Interacción con el Receptor) (RIP es un activador potente de NF-κB). Los resultados (**Figura 4A**) indican que la expresión de BLIP de tipo silvestre (pero no de BLIP mutante) es suficiente como para activar la actividad del mensajero dependiente de κB en un grado comparable al de RIP.

Ejemplo 7

Activación de NF-κB relacionada con BLIP y λ/ιPKC

Para determinar si el efecto de la activación de NF-κB de BLIP es dependiente de λ/ιPKC, se transfectaron células HEK293 con un plásmido mensajero de luciferasa dependiente de κB y uno de los siguientes: un vector de control negativo, un plásmido de expresión para λ/ιPKC de tipo silvestre o un plásmido de expresión para λ/ιPKC quinasa-inactivo. Después de 24 horas se evaluó la actividad luciferasa en las células sin BLIP (control) y con concentraciones crecientes (0,5, 1,0, 2,0 μg/diámetro de 60 mm) de BLIP de tipo silvestre (BLIP). Los resultados se muestran en la **Figura 4B**. La co-expresión de λ/ιPKC de tipo silvestre coopera con BLIP para activar NF-κB, mientras que la expresión del

mutante λ/ιPKC quinasa-inactivo abroga este efecto de BLIP.

Ejemplo 8

Translocación de RelA al Núcleo Celular

Para demostrar adicionalmente que BLIP controla la translocación real de RelA al núcleo, se transfectaron células HeLa con el vector de expresión mutante de BLIP marcado con HA ($BLIP^{MUT}$); como células de control se usaron células HeLa no transfectadas. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se estimularon con TNFα durante 20 minutos o se dejaron sin tratar (control). Las células después se analizaron mediante inmunofluorescencia doble usando un anticuerpo anti p65 (RelA) y un anticuerpo anti HA para detectar las células que expresaban la construcción (datos no mostrados). El análisis de las células indica que más de un 80% de las células transfectadas con el mutante BLIP de tipo silvestre tenían una translocación inducida por TNFα de p65, en comparación con aproximadamente el 20% de las células transfectadas con el mutante BLIP (**Figura 5**).

Ejemplo 9

Procedimientos de Selección

Usando una línea de células de mamífero apropiada (tal como células HEK293 o células HeLa), se administra un compuesto de ensayo a las células de ensayo; no se administra compuesto de ensayo a las células de control. Después, las células se estimulan con TNFα durante

diversos tiempos, después de lo cual se preparan los extractos celulares, se inmunoprecipitan con un anticuerpo anti-λ/ιPKC selectivo y se analizan mediante inmunotransferencia con el anticuerpo anti-BLIP. Un aumento en la asociación de BLIP con λ/ιPKC en las células de ensayo (en comparación con la asociación encontrada en las células de control) indica que el compuesto de ensayo aumenta la activación de λ/ιPKC dependiente de BLIP (y, por lo tanto, la activación de NF-κB); una reducción indica que el compuesto de ensayo inhibe la activación de λ/ιPKC dependiente de BLIP (y, por lo tanto, la activación de NF-κB).

Alternativamente, las células pueden transfectarse con un gen mensajero dependiente de κB, tal como luciferasa, y la actividad del gen mensajero puede evaluarse como una medida de la activación de NF-κB en presencia de un compuesto de ensayo, en comparación con las células de control.

Referencias

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition. CSH Laboratory Press. (1989)

2. Akimoto, K., K. Mizuno, S. Osada, S. Hirai, S. Tanuma, K. Suzuki, and S. Ohno. 1994. A new member of the third class in the Protein Kinase C Family, PKC, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. J. Biol. Chem. 269: 12677-12683.

3. Baeuerle, P.A., and T. Henkel. 1994. Function and activation of NF-κB in the immune system. Annu. Rev. Immunol. 12: 141-179.

4. Baldwin, A.S. 1996. The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights. Annu. Rev. Immunol. 14: 649-683.

5. Berghe, W.V., S. Plaisance, E. Boone, K. De Bosscher, M.L. Schmitz, W. Fiers, and G. Haegeman. 1998. p38 and the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-κB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. J. Biol. Chem. 273: 3285-3290.

6. Berra, E., M.T. Diaz-Meco, J. Lozano, S. Frutos, M.M. Municio, P. Sanchez, L. Sanz, and J. Moscat. 1995. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C ç. EMBO J. 14: 6157-6163.

7. Bjorkoy, G., A. Overvatn, M.T. Díaz-Meco, J. Moscat, and T. Johansen. 1995. Evidence for a bifurcation of the mitogenic signaling pathway activated by ras and phosphatidylcholina-hidrolyzing. J. Biol. Chem. 270: 21299-21306.

8. Dennis, PB., S. Fumagalli, and G. Thomas. 1999. Target of rapamacyn (TOR): balancing the opposite forces of protein synthesis and degradation. Curr. Opin. Gen. & Devel. 9: 49-54.

9. Diaz-Meco, M.T., E. Berra, M.M. Municio, L. Sanz, J. Lozano, V. Díaz-Golpe, M.T. Lain de Lera, J. Alcamí, C.V. Payá, F. Arenzana-Seisdedos, J.L. Virelizier, and J. Moscat. 1993. A dominant negative protein kinase C ς subspecies blocks NF-κB activation. Mol. Cell. Biol. 13: 4770-4775.

10. Díaz-Meco, M-T., J. Lozano, M.M. Municio, E. Berra, S. Frutos, L. Sanz, and J. Moscat. 1994. ςPKC Induces Phosforylation and Inactivation of IκB-α In Vitro. EMBO J. 13: 2842-2848.

11. Díaz-Meco, M.T., J. Lozano, M.M. Municio, E. Berra, S. Frutos, L. Sanz, and J. Moscat. 1994. Evidence for the in vitro interaction of Ras with protein kinase C ς. J. Biol. Chem. 269: 31706-31710.

12. Diaz-Meco, M.T., M.M. Municio, P. Sanchez, J. Lozano, and J. Moscat. 1996. Lambda-interacting protein, a novel protein that specifically interacts with the zinc finger domain of the atypical protein kinase C isotype λ/ι and stimulates its kinase activity *in vitro* and *in vivo*. Mol. Cell. Biol, 16: 105-114.

13. DiDonato, J.A., M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, E. Zandi, and M. Karin. 1997. A citokine-responsive IκB kinase that activates the transcription factor NF-κB. Nature 388: 548-554.

14. Dominguez, I., L. Sanz, F. Arenzana-Seisdedos, M.T. Díaz-Meco, J.L. Virelizier, and J. Moscat. 1993. Inhibition of protein kinase ς subspecies blocks the activation of a NF-κB-like activity in *Xenopus laevis* oocytes. Mol. Cell. Biol. 13:1290-1295.

15. Folgueira, L., J.A. McElhinny, G.D. Bren, W.S. MacMorran, M.T. Díaz-Meco, J. Moscat, and C.V. Payá. 1996. Protein kinase C-ς mediates NF-κB activation in human immunodeficiency virus-infected monocytes. J. Virol. 70: 223-231.

16. Jung, M., Y. Zhang. S. Lee and A. Dritschilo. 1995. Correction of radiation sensitivity in ataxia telangiectasia cells by a truncated I kappa B-alpha. Science 268:1619-21.

17. Lallena, M.J., M.T. Diaz-Meco, G. Bren, C.V. Payá, and J. Moscat. 1999. Activation of IκB kinase b by Protein Kinase C Isoforms. Mol. Cell. Biol. 19: 2180-2188.

18. Lenardo, M., and D. Baltimore. 1989. NF-κB: a pleitropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. Cell 58: 227-229.

19. Liao, D.F., B. Monia, N. Dean, and B.C. Berk. 1997. Protein kinase C-ς mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 272: 6146-6150.

20. Lozano, J., E. Berra, M.M. Municio, M.T. Diaz-Meco, I. Dominguez, L. Sanz, and J. Moscat. 1994. Protein kinase C ς isoform is critical for κB-dependent promoter activation by sphingomyelinase. J. Biol. Chem. 269:19200-19202.

21. Malinin, N.L., M.P. Boldin, A.V. Kovalenko, and D. Wallach. 1997. MAP3K-related kinase inolved in NF-κB induction by TNF, CD95 and IL-1. Nature 385:540-544.

22. Mercurio, F., H. Zhu, B.W. Murray, A. Shevchenko, B.L. Bennett, J.W. Li, D.B. Young, M. Barbosa, M. Mann, A. Manning, and A. Rao. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IκB kinases essential for NF-κB activation. Science 278: 860-866.

23. Müller, G., M. Ayoub, P. Storz, J.Rennecke, D. Fabbro, and K. Pfizenmaier. 1995. PKCς is a molecular switch in signal transduction of TNFα, bifuncionally regulated by ceramide and arachidonic acid. EMBO J. 14: 1961-1969.

24. Murray, N.R. and A.P. Fields. 1997. Atypical protein kinase C iota protects human leukemina cells

against drug-induced apoptosis. J. Biol. Chem. 272: 27521-27524.

25. Nakanishi, H., K.A. Brewer, and J.H. Exton. (1993). Activation of the isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate J. Biol. Chem. 268: 13-16.

26. Régimer, C.H., H.Y. Song, X. Gao, D.V. Goeddel, Z. Cao, and M. Rothe. 1997. Identification and characterization of an IκB kinase. Cell 90: 373-383.

27. Romanelli, A. K. A. Martin, A. Toker, and J. Blenis. 1999. P70 S6 kinase is regulated by protein kinase c zeta and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex. Mol. Cell. Biol. 19-2921-8.

28. Rzymkiewicz, D.M., T. Tetsuka, D. Daphna-Iken, S. Srivastava, and A.R. Morrison. 1996. Interleukin-1β activates protein kinase C ς in renal mesangial cells. J. Biol. Chem. 271: 17241-17246.

29. Schönwasser, D.C., R.M. Marais, C.J. Marshall, and P. J. Parker. 1998. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. Mol. Cell. Biol. 18: 790-798.

30. Sontag, E. J.M. Sontag, and A. Garcia. 1997. Protein phosphatasa 2A is a critical regulator of protein kinase C ς signaling targeted by SV40 small t to ptomote cell growth and NF-κB activation. EMBO J. 16: 5662-5671.

31. Stancovski, I., and D. Baltimore. 1997. NF-κB activation: The IκB kinase revealed? Cell 91:299-302.

32. Takeda, H. T. Matozaki, T. Takada, T. Noguchi, T. Yamao, M. Tsuda, F. Ochi, K. Fukunaga, K. Inagaki, and M. Kasuga. 1999. PI 3-kinase gamma and protein kinase C-ς mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. EMBO J 18:386-395.

33. Thanos, D., and T. Maniatis. 1995. NF-κB: a lesson in family values. Cell 80: 529-532.

34. Verma, I.M., J.K. Stevenson, E.M. Schwarz, D. VanAntwerp, and S. Miyamoto. 1995. Rel/NF-κB/IκB family: intimate tales of association and dissociation. Genes Dev. 9: 2723-2735.

35. Woronicz, J.D., X. Gao, Z. Cao, M. Rothe and D.V. Goeddel. 1997. IκB kinase-β: NF-κB activation and complex formation with IκB kinase-α and NIK. Science 278: 866-869.

36. Zandi, E., D.M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa, and M. Karin. 1997. The IκB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKα and IKKβ, necessary for IκB phosphorylation and NF-κB activation. Cell 91: 243-252.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína BLIP humana aislada o una variante de la misma.

2. Una proteína aislada que tiene una secuencia seleccionada entre:
(a) SEC ID NO: 4; y
(b) secuencias que tienen al menos una homología del 70% con la SEC ID NO:4, y donde la proteína es una proteína BLIP.

3. Un mutante quinasa inactivo de una proteína BLIP de acuerdo con la reivindicación 2.

4. Un mutante quinasa inactivo de una proteína BLIP que tiene la SEC ID NO:5.

5. Una proteína aislada que tiene una secuencia seleccionada entre:
(a) SEC ID NO: 6; y
(b) secuencias que tienen una homología de secuencia de al menos aproximadamente un 90% con la SEC ID NO:6, y donde la proteína es una proteína LIP.

6. Una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:
(a) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la SEC ID NO: 4;

(b) una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia de (a) anterior bajo condiciones representadas por una rigurosidad de lavado de NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M y SDS al 0,1% a 60°C, y que codifica una proteína BLIP; y

(c) una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de los puntos (a) - (b) anteriores.

7. Una molécula de nucleótido aislada de acuerdo con la reivindicación 6, que es una secuencia de ADNc.

8. Un ácido nucleico aislado que codifica una proteína BLIP que tiene la secuencia de aminoácidos indicada aquí como SEC ID NO: 4.

9. Una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la SEC ID NO: 6;

(b) una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia del punto (a) anterior bajo condiciones representadas por una rigurosidad de lavado de NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M y SDS al 0,1% a 60°C, y que codifica una proteína LIP con una homología de secuencia de al menos aproximadamente un 90% con la SEC ID NO: 6; y

(c) una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de los puntos (a) - (b) anteriores.

10. Un ácido nucleico aislado que codifica una proteína LIP que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en este documento como SEC ID NO: 6.

11. Una construcción de ácido nucleico que tiene un promotor y un ácido nucleico heterólogo unido operativamente a dicho promotor, donde dicho ácido nucleico heterólogo es un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6-10.

12. Una célula que contiene una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11.

13. Una célula que contiene una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11, y capaz de expresar la proteína codificada.

14. Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que es capaz de expresar la proteína codificada.

15. Una línea de células de acuerdo con la reivindicación 13, que es una línea de células HEK293 o HeLa modificadas.

16. Un procedimiento para producir una proteína BLIP que comprende introducir en una línea de células apropiada un vector adecuado que comprende una secuencia

de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 6, bajo condiciones adecuadas para obtener la expresión de la secuencia de nucleótidos.

17. Un anticuerpo que se une específicamente a una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6.

18. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17, que es un anticuerpo monoclonal.

19. Un procedimiento para seleccionar compuestos con respecto a la capacidad de modular la activación de NFκB dependiente de BLIP, que comprende administrar un compuesto de ensayo a una célula de ensayo y detectar cualquier aumento o reducción en la activación de NF-κB dependiente de BLIP en la célula de ensayo, en comparación con una célula de control a la que no se administró el compuesto de ensayo.

20. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicha detección de la activación de NF-κB dependiente de BLIP utiliza un gen mensajero dependiente de κB.

21. Un compuesto identificado por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19.

22. Un procedimiento para inhibir la activación de NF-κB en una célula, que comprende administrar a la célula un inhibidor de la activación de NF-κB relacionada con BLIP, en una cantidad eficaz para inhibir la activación de NF-κB en comparación con la activación de NF-κB que se produciría en ausencia de dicho inhibidor.

23. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que dicho inhibidor es un mutante de BLIP sin actividad quinasa o una proteína LIP.

24. Un procedimiento de tratamiento o profilaxis de un trastorno que responde a la inhibición de la activación de NF-κB dependiente de BLIP en un sujeto mamífero, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la activación de NF-κB dependiente de BLIP.

25. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, en el que dicho trastorno se selecciona entre trastornos neoplásicos, inflamatorios e inmunes.

26. El uso de un compuesto que modula la activación de NF-κB dependiente de BLIP en un procedimiento de formulación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un trastorno que es responsable de la modulación de la activación de NF-κB dependiente de BLIP.

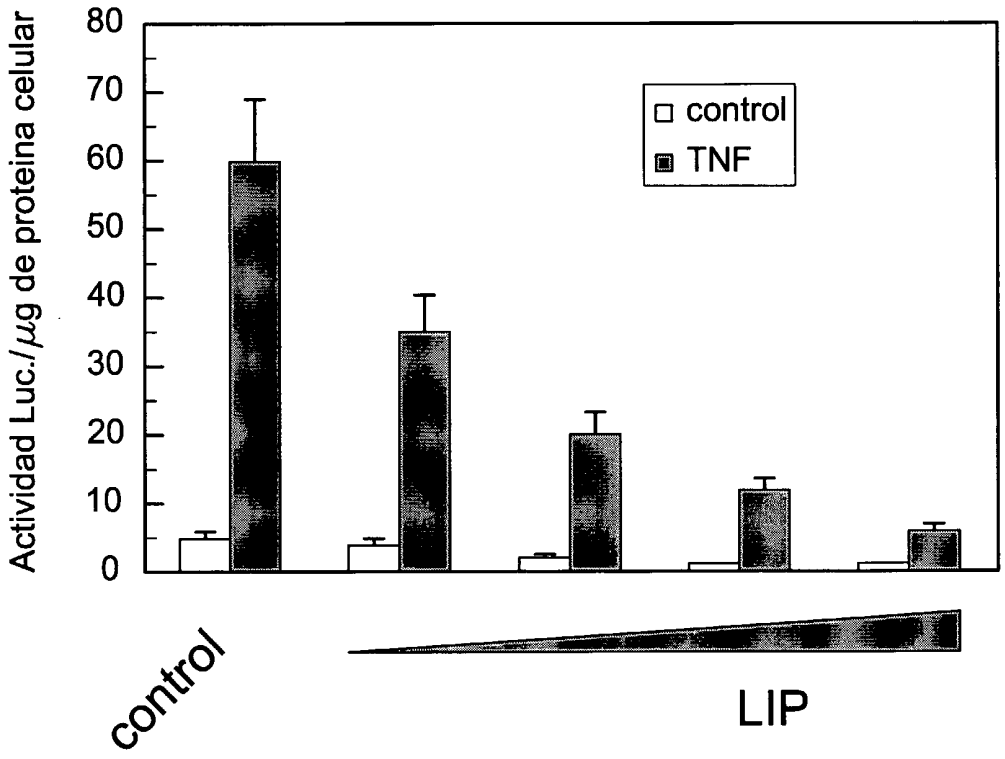

Actividad Luc./µg de proteina celular
80
70
60
50
40
30
20
10
0
control
TNF
control
LIP

FIG. 1

```
MKKLLPNMLS PDPRELQKSI EVQLLRSSVC LATALNPIEQ DQKWQSITEN VVKYLKQTSR    60
IAIGPLRLST LTVSQSLPVL STLQLYCSSA LENTVSNRLS TEDCLIPLFS EALRSCKQHD   120
VRPWMQALRY TMYQNQLLEK IKEQTVPIRS HLMELGLTAA KFARKRGNVS LATRLLAQCS   180
EVQLGKTTTA QDLVQHFKKL STQGQVDEKW GPELDIEKTK LLYTAGQSTH AMEMLSSCAI   240
SFCKSVKAEY AVAKSILTLA KWIQAEWKEI SGQLKQVYRA QHQQNFTGLS TLSKNILTLI   300
ELPSVNTMEE EYPRIESEST VHIGVGEPDF ILGQLYHLSS VQAPEVAKSW AALASWAYRW   360
GRKVVDNASQ GEGVRLLPRE KSEVQNLLPD TITEEEKERI YGILGQAVCR PAGIQDEDIT   420
LQITESEDNE EDDMVDVIWR QLISSCPWLS ELDESATEGV IKVWRKVVDR IFSLYKLSCS   480
AYFTFLKLNA GQIPLDEDDP RLHLSHRVEQ STDDMIVMAT LRLLRLLVKH AGELRQYLEH   540
GLETTPTAPW RGIIPQLFSR LNHPEVYVRQ SICNLLCRVA QDSPHLILYP AIVGTISLSS   600
ESQASGNKFS TAIPTLLGNI QGEELLVSEC EGGSPPASQD SNKDEPKSGL NEDQAMMQDC   660
YSKIVDKLSS ANPTMVLQVQ MLVAELRRVT VLWDELWLGV LLQQHMYVLR RIQQLEDEVK   720
RVQNNNTLRK EEKIAIMREK HTALMKPIVF ALEHVRSITA APAETPHEKW FQDNYGDAIE   780
NALEKLKTPL NPAKPGSSWI PFKEIMLNLQ QRAQKRASYI LRLEEISPWL AAMTNTEIAL   840
PGEVSARDTV TIHSVGGTIT ILPTKTKPKK LLFLGSDGKS YPYLFKGLED LHLDERIMQF   900
LSIVNTMFAT INRQETPRFH ARHYSVTPLG TRSGLIQWVD GATPLFGLYK RWQQREAALQ   960
AQKAQDSYQT PQNPGIVPRP SELYYSKIGP ALKTVGLSLD VSRRDWPLHV MKAVLEELME  1020
ATPPNLLAKE LWSSCTTPDE WWRVTQSYAR STAVMSMVGY IIGLGDRHLD NVLIDMTTGE  1080
VVHIDYNVCF EKGKSLRVPE KVPFRMTQNI ETALGVTGVE GVFRLSCEQV LHIMRRGRET  1140
LLTLLEAFVY DPLVDWTAGG EAGFAGAVYG GGGQQAESKQ SKREMEREIT RSLFSSRVAE  1200
IKVNWFKNRD EMLVVLPKLD GSLDEYLSLQ EQLTDVEKLQ GKLLEEIEFL EGAEGVDHPS  1260
HTLQHRYSEH TQLQTQQRAV QEAIQVKLNE FEQWITHYQA AFNNLEATQL ASLLQEISTQ  1320
MDLGPPSYVP ATAFLQNAGQ AHLISQCEQL EGEVGALLQQ RRSVLRGCLE QLHHYATVAL  1380
QYPKAIFQKH RIEQWKTWME ELICNTTVER CQELYRKYEM QYAPQPPPTV CQFITATEMT  1440
LQRYAADINS RLIRQVERLK QEAVTVPVCE DQLKEIERCI KVFLHENGEE GSLSLASVII  1500
SALCTLTRRN LMMEGAASSA GEQLVDLTSR DGAWFLEELC SMSGNVTCLV QLLKQCHLVP  1560
QDLDIPNPME ASETVHLANG VYTSLQELNS NFRQIIFPEA LRCLMKGEYT LESMLHELDG  1620
LIEQTTDGVP LQTLVESLQA YLRNAAMGLE EETHAHYIDV ARLLHAQYGE LIQPRNGSVD  1680
ETPKMSAGQM LLVAFDGMFA QVETAFSLLV EKLNKMEIPI AWRKIDIIRE ARSTQVNFFD  1740
DDNHRQVLEE IFFLKRLQTI KEFFRLCGTF SKTLSGSSSL EDQNTVNGPV QIVNVKTLFR  1800
NSCFSEDQMA KPIKAFTADF VRQLLIGLPN QALGLTLCSF ISALGVDIIA QVEAKDFGAE  1860
SKVSVDDLCK KAVEHNIQIG KFSQLVMNRA TVLASSYDTA WKKHDLVRRL ETSISSCKTS  1920
LQRVQLHIAM FQWQHEDLLI NRPQAMSVTP PPRSAILTSM KKKLHTLSQI ETSIATVQEK  1980
LAALESSIEQ RLKWAGGANP ALAPVLQDFE ATIAERRNLV LKESQRASQV TFLCSNIIHF  2040
ESLRTRTAEA LNLDAALFEL IKRCQQMCSF ASQFNSSVSE LELRLLQRVD TGLEHPIGSS  2100
EWLLSAHKQL TQDMSTQRAI QTEKEQQIET VCETIQNLVD NIKTVLTGHN RQLGDVKHLL  2160
KAMAKDEEAA LADGEDVPYE NSVRQFLGEY KSWQDNIQTV LFTLVQAMGQ VRSQEHVEML  2220
QEITPTLKEL KTQSQSIYNN LVSFASPLVT DATNECSSPT SSATYQPSFA AAVRSNTGQK  2280
TQPDVMSQNA RKLIQKNLAT SADTPPSTVP GTGKSVACSP KKAVRDPKTG KAVQERNSYA  2340
VSVWKRVKAK LEGRDVDPNR RMSVAEQVDY VIKEATNLDN LAQLYEGWTA WV          2392
```

FIG. 2A

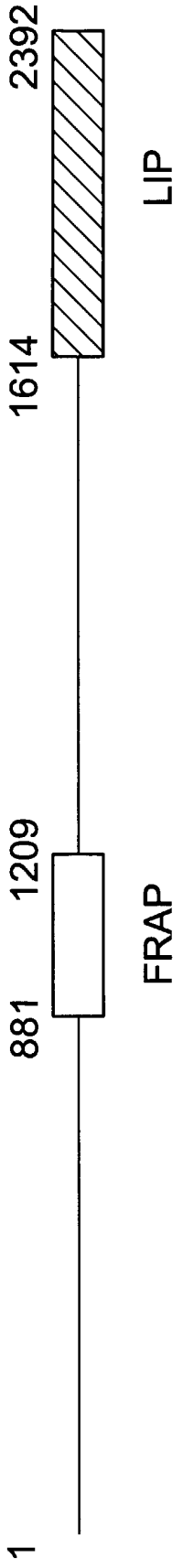


FIG. 2B

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

```
BLIB    821 LRLEEISPWLAAMTNTEIALPGEVSARDTVT-IHSVGGTITILPTKTKPKKLLFLGSDGK
FRAP   2121 LELQYVSPKLLMCRDLELAVPGTYDPNQPIIRIQSIAPSLQVITSKQRPRKLTLMGSNGH
            * *   ** *      * * **          * *          *  * **   ** *

BLIP    880 SYPYLFKGLEDLHLDERIMQFLSIVNTMFATINRQETPRFHARHYSVTPLGTRSGLIQWV
FRAP   2181 EFVFLLKGHEDLRQDERVMQLFGLVNTLLANDPTSLRKNLSIQRYAVIPLSTNSGLIGWV
               * ** ***  *** **    ***  *               * * ** * **** **

BLIP    940 DGATPLFGLYKRWQQREAALQAQKAQDSYQTPQNPGIVPRPSELYYSKIGPALKTVGLSL
FRAP   2241 PHCDTLHALIRDYREKKK-----------------ILLNIEHRIMLRMAPDYDHLTLMQ
                 *  *                              *             *      *

BLIP   1000 DVSRRDWPLHVMKAVLEELMEATPPNLLAKELWSSCTTPDEWWRVTQSYARSTAVMSMVG
FRAP   2283 KVE----------VFEHAVNNTAGDDLAKLLWLKSPSSEVWFDRRTNYTRSLAVMSMVG
             *            * *     *    *** **         *      * ** *******

BLIP   1060 YIIGLGDRHLDNVLIDMTTGEVVHIDYNVCFEKGKSL-RVPEKVPFRMTQNIETALGVTG
FRAP   2332 YILGLGDRHPSNLMLDRLSGKILHIDFQDCFEVAMTREKFPEKIPFRLTRMLTNAMEVTG
            ** ******  *   *   *   ***   ***         *** *** *     *  ***

BLIP   1119 VEGVFRLSCEQVLHIMRRGRETLLTLLEAFVYDPLVDW
FRAP   2392 LDGNYRITCHTVMEVLREHKDSVMAVLEAFVYDPLLNW
              *  *  *  *    *         *********  *
```

FIG. 3A

```
BLIP  1038 PDEWWRVTQSYARSTAVMSMVGYIIGLGDRHLDNVLIDMTTGEVVHIDYNVCFEKGKSLR
ATM   2842 PAIWFEKRLAYTRSVATSSIVGYILGLGDRHVQNILINEQSAELVHIDLGVAFEQGKILP
               *  *     * ** *  * ***** ******* *  **     * ***** * ** ** * *

BLIP  1098 VPEKVPFRMTQNIETALGVTGVEGVFRLSCEQVLHIMRRGRETLLTLLEAFVYDPLVDWT
ATM   2902 TPETVPFRLTRDIVDGMGITGVEGVFRRCCEKTMEVMRNSQETLLTIVEVLLYDPLFDWT
             ** ***** *  *    * ********  **     **   ******  *   **** ***
```

FIG. 3B

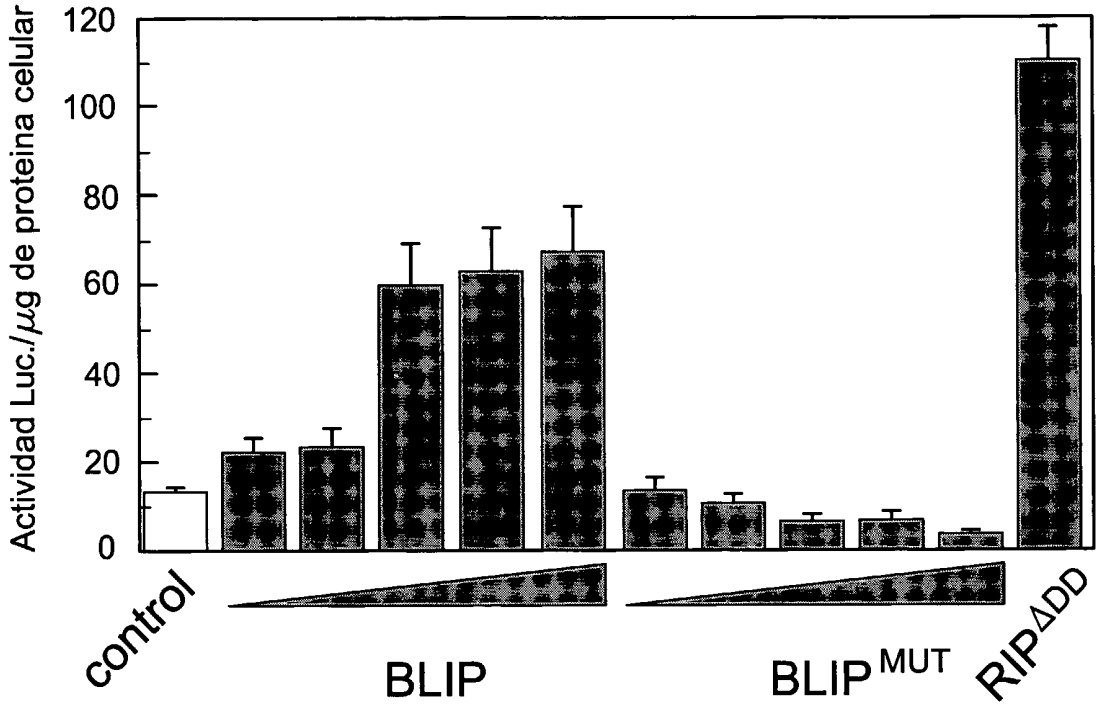

Actividad Luc./μg de proteina celular
120
100
80
60
40
20
0
control
BLIP
BLIP MUT
RIPΔDD

FIG. 4A

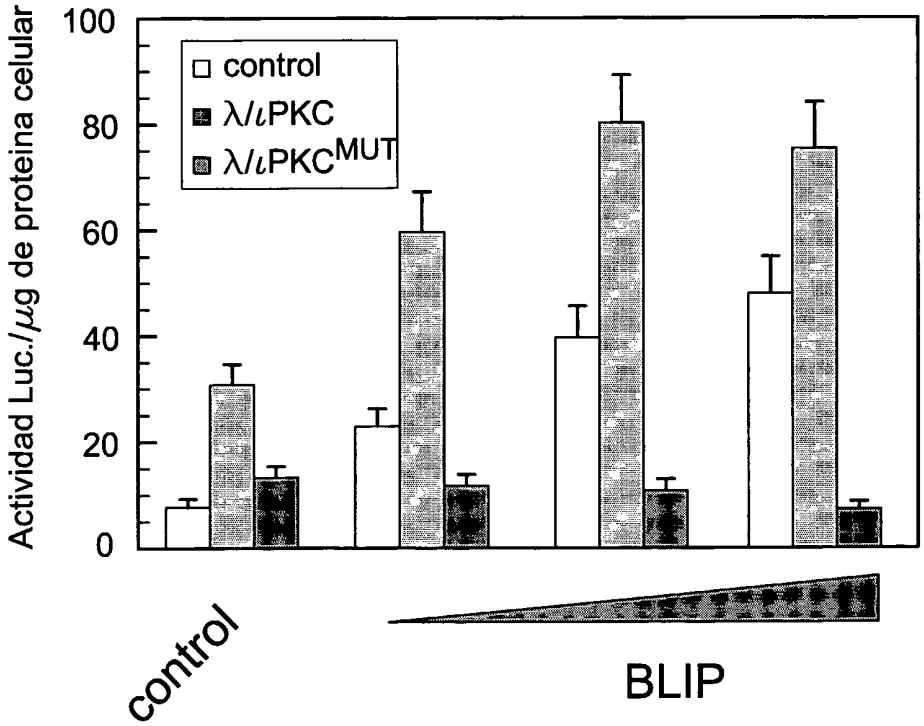

Actividad Luc./μg de proteina celular
100
80
60
40
20
0
control
λ/ιPKC
λ/ιPKCMUT
control
BLIP

FIG. 4B

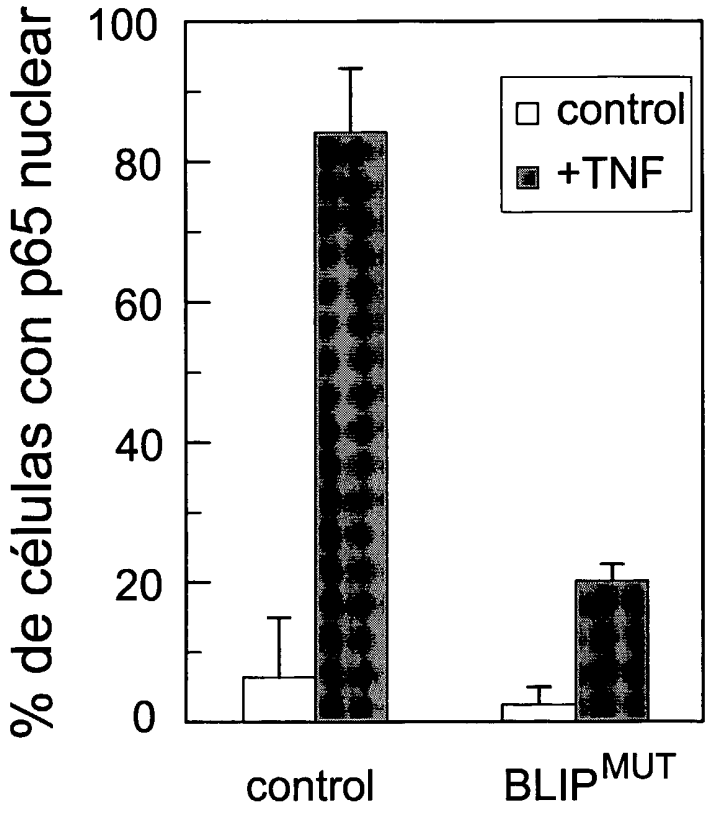

% de células con p65 nuclear
100
80
60
40
20
0
control
+TNF
control
BLIP^MUT

FIG. 5

```
AGAAAAAATA GAGTTTCACT CTGTTGCCCA GGCTGGAGTG CAGTGACGCA ATCTCGGCTC   60
ACTGCAGCCT CTGCCCTCTG AGTTCAAGTG ATTCTCCTGC CTCAGCCTCC TGAGTAGCTG  120
GGATTACAGG TGTCTGCCAC CGTGCCCAGA CATGAAAAAA CTGCTTCCTA ACATGTTAAG  180
TCCGGATCCG AGGGAACTTC AGAAATCCAT TGAAGTTCAA TTGTTAAGAA GTTCTGTTTG  240
TTTGGCAACT GCTTTAAACC CGATAGAACA AGATCAGAAG TGGCAGTCTA TAACTGAAAA  300
TGTGGTAAAG TACTTGAAGC AAACATCCCG CATCGCTATT GGACCTCTGA GACTTTCTAC  360
TTTAACAGTT TCACAGTCTT TGCCAGTTCT AAGTACCTTG CAGCTGTATT GCTCATCTGC  420
TTTGGAGAAC ACAGTTTCTA ACAGACTTTC AACAGAGGAC TGTCTTATTC CACTCTTCAG  480
TGAAGCTTTA CGTTCATGTA AACAGCATGA CGTGAGGCCA TGGATGCAGG CATTAAGGTA  540
TACTATGTAC CAGAATCAGT TGTTGGAGAA AATTAAAGAA CAAACAGTCC CAATTAGAAG  600
CCATCTCATG GAATTAGGTC TAACAGCAGC AAAATTTGCT AGAAAACGAG GGAATGTGTC  660
CCTTGCAACA AGACTGCTGG CACAGTGCAG TGAAGTTCAG CTGGGAAAGA CCACCACTGC  720
ACAGGATTTA GTCCAACATT TTAAAAAACT ATCAACCCAA GGTCAAGTGG ATGAAAAATG  780
GGGGCCCGAA CTTGATATTG AAAAAACCAA ATTGCTTTAT ACAGCAGGCC AGTCAACACA  840
TGCAATGGAA ATGTTGAGTT CTTGTGCCAT ATCTTTCTGC AAGTCTGTGA AAGCTGAATA  900
TGCAGTTGCT AAATCAATTC TGACACTGGC TAAATGGATC CAGGCAGAAT GGAAAGAGAT  960
TTCAGGACAG CTGAAACAGG TTTACAGAGC TCAGCACCAA CAGAACTTCA CAGGTCTTTC 1020
TACTTTGTCT AAAAACATAC TCACTCTAAT AGAACTGCCA TCTGTTAATA CGATGGAAGA 1080
AGAGTATCCT CGGATCGAGA GTGAATCTAC AGTGCATATT GGAGTTGGAG AACCTGACTT 1140
CATTTTGGGA CAGTTGTATC ACCTGTCTTC AGTACAGGCA CCTGAAGTAG CCAAATCTTG 1200
GGCAGCGTTG GCCAGCTGGG CTTATAGGTG GGGCAGAAAG GTGGTTGACA ATGCCAGTCA 1260
GGGAGAAGGT GTTCGTCTGC TGCCTAGAGA AAAATCTGAA GTTCAGAATC TACTTCCAGA 1320
CACTATAACT GAGGAAGAGA AAGAGAGAAT ATATGGTATT CTTGGACAGG CTGTGTGTCG 1380
GCCGGCGGGG ATTCAGGATG AAGATATAAC ACTTCAGATA ACTGAGAGTG AAGACAACGA 1440
AGAAGATGAC ATGGTTGATG TTATCTGGCG TCAGTTGATA TCAAGCTGCC CATGGCTTTC 1500
AGAACTTGAT GAAAGTGCAA CTGAAGGAGT TATTAAAGTG TGGAGGAAAG TTGTAGATAG 1560
AATATTCAGC CTGTACAAAC TCTCTTGCAG TGCATACTTT ACTTTCCTTA AACTCAACGC 1620
TGGTCAAATT CCTTTAGATG AGGATGACCC TAGGCTGCAT TTAAGTCACA GAGTGGAACA 1680
GAGCACTGAT GACATGATTG TGATGGCCAC ATTGCGCCTG CTGCGGTTGC TCGTGAAGCA 1740
CGCTGGTGAG CTTCGGCAGT ATCTGGAGCA CGGCTTGGAG ACAACACCCA CTGCACCATG 1800
GAGAGGAATT ATTCCGCAAC TTTTCTCACG CTTAAACCAC CCTGAAGTGT ATGTGCGCCA 1860
AAGTATTTGT AACCTTCTCT GCCGTGTGGC TCAAGATTCC CCACATCTCA TATTGTATCC 1920
TGCAATAGTG GGTACCATAT CGCTTAGTAG TGAATCCCAG GCTTCAGGAA ATAAATTTTC 1980
CACTGCAATT CCAACTTTAC TTGGCAATAT TCAAGGAGAA GAATTGCTGG TTTCTGAATG 2040
TGAGGGAGGA AGTCCTCCTG CATCTCAGGA TAGCAATAAG GATGAACCTA AAAGTGGATT 2100
AAATGAAGAC CAAGCCATGA TGCAGGATTG TTACAGCAAA ATTGTAGATA AGCTGTCCTC 2160
TGCAAACCCC ACCATGGTAT TACAGGTTCA GATGCTCGTG GCTGAACTGC GCAGGGTCAC 2220
TGTGCTCTGG GATGAGCTCT GGCTGGGAGT TTTGCTGCAA CAACACATGT ATGTCCTGAG 2280
ACGAATTCAG CAGCTTGAAG ATGAGGTGAA GAGAGTCCAG AACAACAACA CCTTACGCAA 2340
AGAAGAGAAA ATTGCAATCA TGAGGGAGAA GCACACAGCT TTGATGAAGC CCATCGTATT 2400
```

FIG. 6

TGCTTTGGAG CATGTGAGGA GTATCACAGC GGCTCCTGCA GAAACACCTC ATGAAAAATG 2460
GTTTCAGGAT AACTATGGTG ATGCCATTGA AAATGCCCTA GAAAAACTGA AGACTCCATT 2520
GAACCCTGCA AAGCCTGGGA GCAGCTGGAT TCCATTTAAA GAGATAATGC TAAATTTGCA 2580
ACAGAGAGCA CAGAAACGTG CAAGTTACAT CTTGCGTCTT GAAGAAATCA GTCCATGGTT 2640
GGCTGCCATG ACTAACACTG AAATTGCTCT TCCTGGGGAA GTCTCAGCCA GAGACACTGT 2700
CACAATCCAT AGTGTGGGCG GAACCATCAC AATCTTACCG ACTAAAACCA AGCCAAAGAA 2760
ACTTCTCTTT CTTGGATCAG ATGGGAAGAG CTATCCTTAT CTTTTCAAAG GACTGGAGGA 2820
TTTACATCTG GATGAGAGAA TAATGCAGTT CCTATCTATT GTGAATACCA TGTTTGCTAC 2880
AATTAATCGC CAAGAAACAC CCCGGTTCCA TGCTCGACAC TATTCTGTAA CACCACTAGG 2940
AACAAGATCA GGACTAATCC AGTGGGTAGA TGGAGCCACA CCCTTATTTG GTCTTTACAA 3000
ACGATGGCAA CAACGGGAAG CTGCCTTACA AGCACAAAAG GCCCAAGATT CCTACCAAAC 3060
TCCTCAGAAT CCTGGAATTG TACCCCGTCC TAGTGAACTT TATTACAGTA AAATTGGCCC 3120
TGCTTTGAAA ACAGTTGGGC TTAGCCTGGA TGTGTCCCGT CGGGATTGGC CTCTTCATGT 3180
AATGAAGGCA GTATTGGAAG AGTTAATGGA GGCCACACCC CCGAATCTCC TTGCCAAAGA 3240
GCTCTGGTCA TCTTGCACAA CACCTGATGA ATGGTGGAGA GTTACGCAGT CTTATGCAAG 3300
ATCTACTGCA GTCATGTCTA TGGTTGGATA CATAATTGGC CTTGGAGACA GACATCTGGA 3360
TAATGTTCTT ATAGATATGA CGACTGGAGA AGTTGTTCAC ATAGATTACA ATGTTTGCTT 3420
TGAAAAAGGT AAAAGCCTTA GAGTTCCTGA GAAAGTACCT TTTCGAATGA CACAAAACAT 3480
TGAAACAGCA CTGGGTGTAA CTGGAGTAGA AGGTGTATTT AGGCTTTCAT GTGAGCAGGT 3540
TTTACACATT ATGCGGCGTG GCAGAGAGAC CCTGCTGACG CTGCTGGAGG CCTTTGTGTA 3600
CGACCCTCTG GTGGACTGGA CAGCAGGAGG CGAGGCTGGG TTTGCTGGTG CTGTCTATGG 3660
TGGAGGTGGC CAGCAGGCCG AGAGCAAGCA GAGCAAGAGA GAGATGGAGC GAGAGATCAC 3720
CCGCAGCCTG TTTTCTTCTA GAGTAGCTGA GATTAAGGTG AACTGGTTTA AGAATAGAGA 3780
TGAGATGCTG GTTGTGCTTC CCAAGTTGGA CGGTAGCTTA GATGAATACC TAAGCTTGCA 3840
AGAGCAACTG ACAGATGTGG AAAAACTGCA GGGCAAACTA CTGGAGGAAA TAGAGTTTCT 3900
AGAAGGAGCT GAAGGGGTGG ATCATCCTTC TCATACTCTG CAACACAGGT ATTCTGAGCA 3960
CACCCAACTA CAGACTCAGC AAAGAGCTGT TCAGGAAGCA ATCCAGGTGA AGCTGAATGA 4020
ATTTGAACAA TGGATAACAC ATTATCAGGC TGCATTCAAT AATTTAGAAG CAACACAGCT 4080
TGCAAGCTTG CTTCAAGAGA TAAGCACACA AATGGACCTT GGTCCTCCAA GTTACGTGCC 4140
AGCAACAGCC TTTCTGCAGA ATGCTGGTCA GGCCCACTTG ATTAGCCAGT GCGAGCAGCT 4200
GGAGGGGGAG GTTGGTGCTC TCCTGCAGCA GAGGCGCTCC GTGCTCCGTG GCTGTCTGGA 4260
GCAACTGCAT CACTATGCAA CCGTGGCCCT GCAGTATCCG AAGGCCATAT TTCAGAAACA 4320
TCGAATTGAA CAGTGGAAGA CCTGGATGGA AGAGCTCATC TGTAACACCA CAGTAGAGCG 4380
TTGTCAAGAG CTCTATAGGA AATATGAAAT GCAATATGCT CCCCAGCCAC CCCCAACAGT 4440
GTGTCAGTTC ATCACTGCCA CTGAAATGAC CCTGCAGCGA TACGCAGCAG ACATCAACAG 4500
CAGACTTATT AGACAAGTGG AACGCTTGAA ACAGGAAGCT GTCACTGTGC CAGTTTGTGA 4560
AGATCAGTTG AAAGAAATTG AACGTTGCAT TAAAGTTTTC CTTCATGAGA ATGGAGAAGA 4620
AGGATCTTTG AGTCTAGCAA GTGTTATTAT TTCTGCCCTT TGTACCCTTA CAAGGCGTAA 4680
CCTGATGATG GAAGGTGCAG CGTCAAGTGC TGGAGAACAG CTGGTTGATC TGACTTCTCG 4740
GGATGGAGCC TGGTTCTTGG AGGAACTCTG CAGTATGAGC GGAAACGTCA CCTGCTTGGT 4800
TCAGTTACTG AAGCAGTGCC ACCTGGTGCC ACAGGACTTA GATATCCCGA ACCCCATGGA 4860

FIG. 6 CONTINUACION

AGCGTCTGAG ACAGTTCACT TAGCCAATGG AGTGTATACC TCACTTCAGG AATTGAATTC 4920
GAATTTCCGG CAAATCATAT TTCCAGAAGC ACTTCGATGT TTAATGAAAG GGGAATACAC 4980
GTTAGAAAGT ATGCTGCATG AACTGGACGG TCTTATTGAG CAGACCACCG ATGGCGTTCC 5040
CCTGCAGACT CTAGTGGAAT CTCTTCAGGC CTACTTAAGA AACGCAGCTA TGGGACTGGA 5100
AGAAGAAACA CATGCTCATT ACATCGATGT TGCCAGACTA CTACATGCTC AGTACGGTGA 5160
ATTAATCCAA CCGAGAAATG GTTCAGTTGA TGAAACACCC AAAATGTCAG CTGGCCAGAT 5220
GCTTTTGGTA GCATTCGATG GCATGTTTGC TCAAGTTGAA ACTGCTTTCA GCTTATTAGT 5280
TGAAAAGTTG AACAAGATGG AAATTCCCAT AGCTTGGCGA AAGATTGACA TCATAAGGGA 5340
AGCCAGGAGT ACTCAAGTTA ATTTTTTTGA TGATGATAAT CACCGGCAGG TGCTAGAAGA 5400
GATTTTCTTT CTAAAAAGAC TACAGACTAT TAAGGAGTTC TTCAGGCTCT GTGGTACCTT 5460
TTCTAAAACA TTGTCAGGAT CAAGTTCACT TGAAGATCAG AATACTGTGA ATGGGCCTGT 5520
ACAGATTGTC AATGTGAAAA CCCTTTTTAG AAACTCTTGT TTCAGTGAAG ACCAAATGGC 5580
CAAACCTATC AAGGCATTCA CAGCTGACTT TGTGAGGCAG CTCTTGATAG GGCTACCCAA 5640
CCAAGCCCTC GGACTCACAC TGTGCAGTTT TATCAGTGCT CTGGGTGTAG ACATCATTGC 5700
TCAAGTAGAG GCAAAGGACT TTGGTGCCGA AAGCAAAGTT TCTGTTGATG ATCTCTGTAA 5760
GAAAGCGGTG GAACATAACA TCCAGATAGG GAAGTTCTCT CAGCTGGTTA TGAACAGGGC 5820
AACTGTGTTA GCAAGTTCTT ACGACACTGC CTGGAAGAAG CATGACTTGG TGCGAAGGCT 5880
AGAAACCAGT ATTTCTTCTT GTAAGACAAG CCTGCAGCGG GTTCAGCTGC ATATTGCCAT 5940
GTTTCAGTGG CAACATGAAG ATCTACTTAT CAATAGACCA CAAGCCATGT CAGTCACACC 6000
TCCCCCACGG TCTGCTATCC TAACCAGCAT GAAAAAGAAG CTGCATACCC TGAGCCAGAT 6060
TGAAACTTCT ATTGCGACAG TTCAGGAGAA GCTAGCTGCA CTTGAATCAA GTATTGAACA 6120
GCGACTCAAG TGGGCAGGTG GTGCCAACCC TGCATTGGCC CCTGTACTAC AAGATTTTGA 6180
AGCAACGATA GCTGAAAGAA GAAATCTTGT CCTTAAAGAG AGCCAAAGAG CAAGTCAGGT 6240
CACATTTCTC TGCAGCAATA TCATTCATTT TGAAAGTTTA CGAACAAGAA CTGCAGAAGC 6300
CTTAAACCTG GATGCGGCGT TATTTGAACT AATCAAGCGA TGTCAGCAGA TGTGTTCGTT 6360
TGCATCACAG TTTAACAGTT CAGTGTCTGA GTTAGAGCTT CGTTTATTAC AGAGAGTGGA 6420
CACTGGTCTT GAACATCCTA TTGGCAGCTC TGAATGGCTT TTGTCAGCAC ACAAACAGTT 6480
GACCCAGGAT ATGTCTACTC AGAGGGCAAT TCAGACAGAG AAAGAGCAGC AGATAGAAAC 6540
GGTCTGTGAA ACAATTCAGA ATCTGGTTGA TAATATAAAG ACTGTGCTCA CTGGTCATAA 6600
CCGACAGCTT GGAGATGTCA AACATCTCTT GAAAGCTATG GCTAAGGATG AAGAAGCTGC 6660
TCTGGCAGAT GGTGAAGATG TTCCCTATGA GAACAGTGTT AGGCAGTTTT TGGGTGAATA 6720
TAAATCATGG CAAGACAACA TTCAAACAGT TCTATTTACA TTAGTCCAGG CTATGGGTCA 6780
GGTTCGAAGT CAAGAACACG TTGAAATGCT CCAGGAAATC ACTCCCACCT TGAAAGAACT 6840
GAAAACACAA AGTCAGAGTA TCTATAATAA TTTAGTGAGT TTTGCATCAC CCTTAGTCAC 6900
CGATGCAACA AATGAATGTT CGAGTCCAAC GTCATCTGCT ACTTATCAGC CATCCTTCGC 6960
TGCAGCAGTC CGGAGTAACA CTGGCCAGAA GACTCAGCCT GATGTCATGT CACAGAATGC 7020
TAGAAAGCTG ATCCAGAAAA ATCTTGCTAC ATCAGCTGAT ACTCCACCAA GCACCGTTCC 7080
AGGAACTGGC AAGAGTGTTG CTTGTAGTCC TAAAAAGGCA GTCAGAGACC CTAAAACTGG 7140
GAAAGCGGTG CAAGAGAGAA ACTCCTATGC AGTGAGTGTG TGGAAGAGAG TGAAAGCCAA 7200
GTTAGAGGGC CGAGATGTTG ATCCGAATAG GAGGATGTCA GTTGCTGAAC AGGTTGACTA 7260
TGTCATTAAG GAAGCAACTA ATCTAGATAA CTTGGCTCAG CTGTATGAAG GTTGGACAGC 7320

FIG. 6 CONTINUACION

```
CTGGGTGTGA ATGGCAAGAC AGTAGATGAG TCTGGTTAAG CGAGGTCAGA CATCCACCAG 7380
AATCAACTCA GCCTCAGGCA TCCAAAGCCA CACCACAGTC GGTGGTGATG CAACTGGGGG 7440
CTTACTCTGA GGAAACCTAG GAAATCTCGG TGCACTAGGA AGTGAATCCC GCAGGACAGC 7500
TGCACTCAGG GATACGCCCA ACACCATGGC CTGCAACCCC AGGGTCAAGG GTGAAGGAAA 7560
GCAAGCTCAC CGCCTGAACA CGGAGATTGT CTTTCTGCCA CAGAACAGCA GCAGACGTGT 7620
CGGGAGGTTA GCTGCGGAAA GAAATCGGGA TGCCGCGGAG CACAGAGTGA TTTGGAACTC 7680
CATTCCACCT GACCCTGTGT GTACAATCCA GGAAAAAAAC AAACCCCACT CAGAAACAGA 7740
GAAAACTGGG GTCGCGAAGA AATCACAGCC AAGGAAGATT TGATGCATTC AGATTCTCGT 7800
GTAACACTTG TTGCTTGGCA ACAGTACTGG TTGGGTTGAC CAGTAAGTAG AAAAAGGCTA 7860
AAGGCTATGC GATATGAATT TCAGAAATGG ACTGAAAATG GAGAGCTATG TAACAGATAC 7920
ACTACAGTAG AAGAACTTAC TTCTGAAATG AAGGGAAAAA AACCACCCCA TCGTTCCCTA 7980
CTCCTCCCCA CCACTTACCC GTTCCCCCTT TACCTAATCT AGTAGATTAG CCATCTTTCA 8040
AATTCACTTT TATTTCAGTC CTTATATTTC ATATACTTCC GTCTCGATGC TGTTAACAAC 8100
TTCTGATAAC ATGGAAAATT CAAGGATTGT TTAAAGGTCT GATGATCACA CACAAAATGT 8160
AATTCCGGTT ATTTAAGTCA TTTCTGTGAT TCTATCATGT ACAGTTTCCA GAATTGTCAC 8220
TGTGCATTCA AAAGTAATGA ATCTAACAGA CATTTGATTT AATGTACACT CCCTTTTGCT 8280
TATAGTGTGC ATTTTTTTTG GAGGTCATTC AAATTTTCCC TCTTCTGTGA TAGCTGTAGT 8340
TTCTTTCATA GAAAGTAGCT AATCCAGTGT AATCTTTTAC CTTTTTAAAA ACCAAGATAG 8400
AGTATCTATT AGAGTTTTAC ATTGTTGATG ATAGATTAAC AATAAAGTGA TGTTCTGGTG 8460
GAGGTAGACT GAAATTTTTT TAATTCATGT TTTTCATTTG ATACTTTTAA TTTACACTTA 8520
GTAAATTAAA AGTTGTTTAA TTTACTTGGC ATTTTAGGAC ATGTACATGA AACAGTGAAA 8580
ATGAGATCCA CCAACATCTT TTATTAAGTT CAGTTATTAG TCTGTGAAGT GCTTTACTTT 8640
TTGCACAATT TTAATAGCTT GCTATTCAGT AATACATTAT AGTGAATTCA TGATCAAGGT 8700
TTCCTTAAAT TTAGCATTGC ATTTCAGTAC TGACTGTGTA AGCTAAATTG CTGATCCAAA 8760
ATAAAAACCC AGACTAGAAT AGGGTTCTTA AAATCAAGTA TCAATACAAA ATAGAACACA 8820
ATTAAAATCT TAATTGTTGG CTGGGCACAG TGGCTCACGC CTGTAATCCC AGCACTTTGG 8880
GAGGCCGAGG CGGGCGGATC ATGAGGTTAG GAGAGCGAGA CCATCCTGGC GAACACGGTG 8940
AAACCCCGTC TTTACTAAAA TACAAAAAAA ATTAGCCGGG TGTGGTGGCG GGCGCCTGTA 9000
GTCCCAGCTA CTCGGGAGGC TGAGGCAGGA GAATGGCGTG AACCCAGGAG GCGGAGCTTG 9060
CAGTGAGCCG AGATTGTGCC ACTGCACTCC AGCCTGGGCA ACAGAGCTAG ACTCTGTGTC 9120
AAAAATAAAT GACTAGAT                                           9138
```

FIG. 6 CONTINUACION

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Glaxo Wellcome, S.A.

<120> Proteína de Interacción con Proteína Quinasa C Implicada en la Activación de NF-KB

<130> PI 3718

<140>
<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 309
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro Lys Leu Leu Met Cys Arg Asp Leu
1 5 10 15

Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Pro Ile Ile Arg
20 25 30

Ile Gln Ser Ile Ala Pro Ser Leu Gln Val Ile Thr Ser Lys Gln Arg
35 40 45

Pro Arg Lys Leu Thr Leu Met Gly Ser Asn Gly His Glu Phe Val Phe
50 55 60

Leu Leu Lys Gly His Glu Asp Leu Arg Gln Asp Glu Arg Val Met Gln
65 70 75 80

Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu Leu Ala Asn Asp Pro Thr Ser Leu
85 90 95

Arg Lys Asn Leu Ser Ile Gln Arg Tyr Ala Val Ile Pro Leu Ser Thr
100 105 110

Asn Ser Gly Leu Ile Gly Trp Val Pro His Cys Asp Thr Leu His Ala
115 120 125

Leu Ile Arg Asp Tyr Arg Glu Lys Lys Lys Ile Leu Leu Asn Ile Glu
130 135 140

His Arg Ile Met Leu Arg Met Ala Pro Asp Tyr Asp His Leu Thr Leu
145 150 155 160

Met Gln Lys Val Glu Val Phe Glu His Ala Val Asn Asn Thr Ala Gly
165 170 175

Asp Asp Leu Ala Lys Leu Leu Trp Leu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Val
180 185 190

Trp Phe Asp Arg Arg Thr Asn Tyr Thr Arg Ser Leu Ala Val Met Ser
195 200 205

Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Asp Arg His Pro Ser Asn Leu
210 215 220

Met Leu Asp Arg Leu Ser Gly Lys Ile Leu His Ile Asp Phe Gly Asp
225 230 235 240

Cys Phe Glu Val Ala Met Thr Arg Glu Lys Phe Pro Glu Lys Ile Pro
245 250 255

Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Asn Ala Met Glu Val Thr Gly Leu
260 265 270

Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr Cys His Thr Val Met Glu Val Leu Arg
275 280 285

Glu His Lys Asp Ser Val Met Ala Val Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp
290 295 300

Pro Leu Leu Asn Trp
305

<210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Pro Ala Ile Trp Phe Glu Lys Arg Leu Ala Tyr Thr Arg Ser Val Ala
1 5 10 15

Thr Ser Ser Ile Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Asp Arg His Val
20 25 30

Gln Asn Ile Leu Ile Asn Glu Gln Ser Ala Glu Leu Val His Ile Asp
35 40 45

Leu Gly Val Ala Phe Glu Gln Gly Lys Ile Leu Pro Thr Pro Glu Thr
50 55 60

Val Pro Phe Arg Leu Thr Arg Asp Ile Val Asp Gly Met Gly Ile Thr
65 70 75 80

Gly Val Glu Gly Val Phe Arg Arg Cys Cys Glu Lys Thr Met Glu Val
85 90 95

Met Arg Asn Ser Gln Glu Thr Leu Leu Thr Ile Val Glu Val Leu Leu
100 105 110

Tyr Asp Pro Leu Phe Asp Trp Thr
115 120

<210> 3
<211> 9138
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (152)..(7327)

<400> 3
agaaaaaata gagtttcact ctgttgccca ggctggagtg cagtgacgca atctcggctc 60

actgcagcct ctgccctctg agttcaagtg attctcctgc ctcagcctcc tgagtagctg 120

ggattacagg tgtctgccac cgtgcccaga c atg aaa aaa ctg ctt cct aac 172
Met Lys Lys Leu Leu Pro Asn
1 5

atg tta agt ccg gat ccg agg gaa ctt cag aaa tcc att gaa gtt caa 220
Met Leu Ser Pro Asp Pro Arg Glu Leu Gln Lys Ser Ile Glu Val Gln
10 15 20

ttg tta aga agt tct gtt tgt ttg gca act gct tta aac ccg ata gaa 268
Leu Leu Arg Ser Ser Val Cys Leu Ala Thr Ala Leu Asn Pro Ile Glu
25 30 35

caa gat cag aag tgg cag tct ata act gaa aat gtg gta aag tac ttg 316
Gln Asp Gln Lys Trp Gln Ser Ile Thr Glu Asn Val Val Lys Tyr Leu
40 45 50 55

aag caa aca tcc cgc atc gct att gga cct ctg aga ctt tct act tta 364
Lys Gln Thr Ser Arg Ile Ala Ile Gly Pro Leu Arg Leu Ser Thr Leu
60 65 70

```
aca gtt tca cag tct ttg cca gtt cta agt acc ttg cag ctg tat tgc   412
Thr Val Ser Gln Ser Leu Pro Val Leu Ser Thr Leu Gln Leu Tyr Cys
             75                  80                  85

tca tct gct ttg gag aac aca gtt tct aac aga ctt tca aca gag gac   460
Ser Ser Ala Leu Glu Asn Thr Val Ser Asn Arg Leu Ser Thr Glu Asp
         90                  95                 100

tgt ctt att cca ctc ttc agt gaa gct tta cgt tca tgt aaa cag cat   508
Cys Leu Ile Pro Leu Phe Ser Glu Ala Leu Arg Ser Cys Lys Gln His
    105                 110                 115

gac gtg agg cca tgg atg cag gca tta agg tat act atg tac cag aat   556
Asp Val Arg Pro Trp Met Gln Ala Leu Arg Tyr Thr Met Tyr Gln Asn
120                 125                 130                 135

cag ttg ttg gag aaa att aaa gaa caa aca gtc cca att aga agc cat   604
Gln Leu Leu Glu Lys Ile Lys Glu Gln Thr Val Pro Ile Arg Ser His
                140                 145                 150

ctc atg gaa tta ggt cta aca gca gca aaa ttt gct aga aaa cga ggg   652
Leu Met Glu Leu Gly Leu Thr Ala Ala Lys Phe Ala Arg Lys Arg Gly
            155                 160                 165

aat gtg tcc ctt gca aca aga ctg ctg gca cag tgc agt gaa gtt cag   700
Asn Val Ser Leu Ala Thr Arg Leu Leu Ala Gln Cys Ser Glu Val Gln
        170                 175                 180

ctg gga aag acc acc act gca cag gat tta gtc caa cat ttt aaa aaa   748
Leu Gly Lys Thr Thr Thr Ala Gln Asp Leu Val Gln His Phe Lys Lys
    185                 190                 195

cta tca acc caa ggt caa gtg gat gaa aaa tgg ggg ccc gaa ctt gat   796
Leu Ser Thr Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Trp Gly Pro Glu Leu Asp
200                 205                 210                 215

att gaa aaa acc aaa ttg ctt tat aca gca ggc cag tca aca cat gca   844
Ile Glu Lys Thr Lys Leu Leu Tyr Thr Ala Gly Gln Ser Thr His Ala
                220                 225                 230

atg gaa atg ttg agt tct tgt gcc ata tct ttc tgc aag tct gtg aaa   892
Met Glu Met Leu Ser Ser Cys Ala Ile Ser Phe Cys Lys Ser Val Lys
            235                 240                 245

gct gaa tat gca gtt gct aaa tca att ctg aca ctg gct aaa tgg atc   940
Ala Glu Tyr Ala Val Ala Lys Ser Ile Leu Thr Leu Ala Lys Trp Ile
        250                 255                 260
```

```
cag gca gaa tgg aaa gag att tca gga cag ctg aaa cag gtt tac aga   988
Gln Ala Glu Trp Lys Glu Ile Ser Gly Gln Leu Lys Gln Val Tyr Arg
    265                 270                 275

gct cag cac caa cag aac ttc aca ggt ctt tct act ttg tct aaa aac   1036
Ala Gln His Gln Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ser Thr Leu Ser Lys Asn
280                 285                 290                 295

ata ctc act cta ata gaa ctg cca tct gtt aat acg atg gaa gaa gag   1084
Ile Leu Thr Leu Ile Glu Leu Pro Ser Val Asn Thr Met Glu Glu Glu
                300                 305                 310

tat cct cgg atc gag agt gaa tct aca gtg cat att gga gtt gga gaa   1132
Tyr Pro Arg Ile Glu Ser Glu Ser Thr Val His Ile Gly Val Gly Glu
            315                 320                 325

cct gac ttc att ttg gga cag ttg tat cac ctg tct tca gta cag gca   1180
Pro Asp Phe Ile Leu Gly Gln Leu Tyr His Leu Ser Ser Val Gln Ala
        330                 335                 340

cct gaa gta gcc aaa tct tgg gca gcg ttg gcc agc tgg gct tat agg   1228
Pro Glu Val Ala Lys Ser Trp Ala Ala Leu Ala Ser Trp Ala Tyr Arg
    345                 350                 355

tgg ggc aga aag gtg gtt gac aat gcc agt cag gga gaa ggt gtt cgt   1276
Trp Gly Arg Lys Val Val Asp Asn Ala Ser Gln Gly Glu Gly Val Arg
360                 365                 370                 375

ctg ctg cct aga gaa aaa tct gaa gtt cag aat cta ctt cca gac act   1324
Leu Leu Pro Arg Glu Lys Ser Glu Val Gln Asn Leu Leu Pro Asp Thr
                380                 385                 390

ata act gag gaa gag aaa gag aga ata tat ggt att ctt gga cag gct   1372
Ile Thr Glu Glu Glu Lys Glu Arg Ile Tyr Gly Ile Leu Gly Gln Ala
            395                 400                 405

gtg tgt cgg ccg gcg ggg att cag gat gaa gat ata aca ctt cag ata   1420
Val Cys Arg Pro Ala Gly Ile Gln Asp Glu Asp Ile Thr Leu Gln Ile
        410                 415                 420

act gag agt gaa gac aac gaa gaa gat gac atg gtt gat gtt atc tgg   1468
Thr Glu Ser Glu Asp Asn Glu Glu Asp Asp Met Val Asp Val Ile Trp
    425                 430                 435

cgt cag ttg ata tca agc tgc cca tgg ctt tca gaa ctt gat gaa agt   1516
Arg Gln Leu Ile Ser Ser Cys Pro Trp Leu Ser Glu Leu Asp Glu Ser
440                 445                 450                 455

gca act gaa gga gtt att aaa gtg tgg agg aaa gtt gta gat aga ata   1564
```

```
Ala Thr Glu Gly Val Ile Lys Val Trp Arg Lys Val Val Asp Arg Ile
                460                 465                 470

ttc agc ctg tac aaa ctc tct tgc agt gca tac ttt act ttc ctt aaa   1612
Phe Ser Leu Tyr Lys Leu Ser Cys Ser Ala Tyr Phe Thr Phe Leu Lys
            475                 480                 485

ctc aac gct ggt caa att cct tta gat gag gat gac cct agg ctg cat   1660
Leu Asn Ala Gly Gln Ile Pro Leu Asp Glu Asp Asp Pro Arg Leu His
        490                 495                 500

tta agt cac aga gtg gaa cag agc act gat gac atg att gtg atg gcc   1708
Leu Ser His Arg Val Glu Gln Ser Thr Asp Asp Met Ile Val Met Ala
    505                 510                 515

aca ttg cgc ctg ctg cgg ttg ctc gtg aag cac gct ggt gag ctt cgg   1756
Thr Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Lys His Ala Gly Glu Leu Arg
520                 525                 530                 535

cag tat ctg gag cac ggc ttg gag aca aca ccc act gca cca tgg aga   1804
Gln Tyr Leu Glu His Gly Leu Glu Thr Thr Pro Thr Ala Pro Trp Arg
                540                 545                 550

gga att att ccg caa ctt ttc tca cgc tta aac cac cct gaa gtg tat   1852
Gly Ile Ile Pro Gln Leu Phe Ser Arg Leu Asn His Pro Glu Val Tyr
            555                 560                 565

gtg cgc caa agt att tgt aac ctt ctc tgc cgt gtg gct caa gat tcc   1900
Val Arg Gln Ser Ile Cys Asn Leu Leu Cys Arg Val Ala Gln Asp Ser
        570                 575                 580

cca cat ctc ata ttg tat cct gca ata gtg ggt acc ata tcg ctt agt   1948
Pro His Leu Ile Leu Tyr Pro Ala Ile Val Gly Thr Ile Ser Leu Ser
    585                 590                 595

agt gaa tcc cag gct tca gga aat aaa ttt tcc act gca att cca act   1996
Ser Glu Ser Gln Ala Ser Gly Asn Lys Phe Ser Thr Ala Ile Pro Thr
600                 605                 610                 615

tta ctt ggc aat att caa gga gaa gaa ttg ctg gtt tct gaa tgt gag   2044
Leu Leu Gly Asn Ile Gln Gly Glu Glu Leu Leu Val Ser Glu Cys Glu
                620                 625                 630

gga gga agt cct cct gca tct cag gat agc aat aag gat gaa cct aaa   2092
Gly Gly Ser Pro Pro Ala Ser Gln Asp Ser Asn Lys Asp Glu Pro Lys
            635                 640                 645

agt gga tta aat gaa gac caa gcc atg atg cag gat tgt tac agc aaa   2140
Ser Gly Leu Asn Glu Asp Gln Ala Met Met Gln Asp Cys Tyr Ser Lys
```

```
                650                 655                 660

att gta gat aag ctg tcc tct gca aac ccc acc atg gta tta cag gtt   2188
Ile Val Asp Lys Leu Ser Ser Ala Asn Pro Thr Met Val Leu Gln Val
    665                 670                 675

cag atg ctc gtg gct gaa ctg cgc agg gtc act gtg ctc tgg gat gag   2236
Gln Met Leu Val Ala Glu Leu Arg Arg Val Thr Val Leu Trp Asp Glu
680                 685                 690                 695

ctc tgg ctg gga gtt ttg ctg caa caa cac atg tat gtc ctg aga cga   2284
Leu Trp Leu Gly Val Leu Leu Gln Gln His Met Tyr Val Leu Arg Arg
                700                 705                 710

att cag cag ctt gaa gat gag gtg aag aga gtc cag aac aac aac acc   2332
Ile Gln Gln Leu Glu Asp Glu Val Lys Arg Val Gln Asn Asn Asn Thr
            715                 720                 725

tta cgc aaa gaa gag aaa att gca atc atg agg gag aag cac aca gct   2380
Leu Arg Lys Glu Glu Lys Ile Ala Ile Met Arg Glu Lys His Thr Ala
        730                 735                 740

ttg atg aag ccc atc gta ttt gct ttg gag cat gtg agg agt atc aca   2428
Leu Met Lys Pro Ile Val Phe Ala Leu Glu His Val Arg Ser Ile Thr
    745                 750                 755

gcg gct cct gca gaa aca cct cat gaa aaa tgg ttt cag gat aac tat   2476
Ala Ala Pro Ala Glu Thr Pro His Glu Lys Trp Phe Gln Asp Asn Tyr
760                 765                 770                 775

ggt gat gcc att gaa aat gcc cta gaa aaa ctg aag act cca ttg aac   2524
Gly Asp Ala Ile Glu Asn Ala Leu Glu Lys Leu Lys Thr Pro Leu Asn
                780                 785                 790

cct gca aag cct ggg agc agc tgg att cca ttt aaa gag ata atg cta   2572
Pro Ala Lys Pro Gly Ser Ser Trp Ile Pro Phe Lys Glu Ile Met Leu
            795                 800                 805

aat ttg caa cag aga gca cag aaa cgt gca agt tac atc ttg cgt ctt   2620
Asn Leu Gln Gln Arg Ala Gln Lys Arg Ala Ser Tyr Ile Leu Arg Leu
        810                 815                 820

gaa gaa atc agt cca tgg ttg gct gcc atg act aac act gaa att gct   2668
Glu Glu Ile Ser Pro Trp Leu Ala Ala Met Thr Asn Thr Glu Ile Ala
    825                 830                 835

ctt cct ggg gaa gtc tca gcc aga gac act gtc aca atc cat agt gtg   2716
Leu Pro Gly Glu Val Ser Ala Arg Asp Thr Val Thr Ile His Ser Val
840                 845                 850                 855
```

```
ggc gga acc atc aca atc tta ccg act aaa acc aag cca aag aaa ctt   2764
Gly Gly Thr Ile Thr Ile Leu Pro Thr Lys Thr Lys Pro Lys Lys Leu
                860                 865                 870

ctc ttt ctt gga tca gat ggg aag agc tat cct tat ctt ttc aaa gga   2812
Leu Phe Leu Gly Ser Asp Gly Lys Ser Tyr Pro Tyr Leu Phe Lys Gly
            875                 880                 885

ctg gag gat tta cat ctg gat gag aga ata atg cag ttc cta tct att   2860
Leu Glu Asp Leu His Leu Asp Glu Arg Ile Met Gln Phe Leu Ser Ile
        890                 895                 900

gtg aat acc atg ttt gct aca att aat cgc caa gaa aca ccc cgg ttc   2908
Val Asn Thr Met Phe Ala Thr Ile Asn Arg Gln Glu Thr Pro Arg Phe
    905                 910                 915

cat gct cga cac tat tct gta aca cca cta gga aca aga tca gga cta   2956
His Ala Arg His Tyr Ser Val Thr Pro Leu Gly Thr Arg Ser Gly Leu
920                 925                 930                 935

atc cag tgg gta gat gga gcc aca ccc tta ttt ggt ctt tac aaa cga   3004
Ile Gln Trp Val Asp Gly Ala Thr Pro Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Arg
                940                 945                 950

tgg caa caa cgg gaa gct gcc tta caa gca caa aag gcc caa gat tcc   3052
Trp Gln Gln Arg Glu Ala Ala Leu Gln Ala Gln Lys Ala Gln Asp Ser
            955                 960                 965

tac caa act cct cag aat cct gga att gta ccc cgt cct agt gaa ctt   3100
Tyr Gln Thr Pro Gln Asn Pro Gly Ile Val Pro Arg Pro Ser Glu Leu
        970                 975                 980

tat tac agt aaa att ggc cct gct ttg aaa aca gtt ggg ctt agc ctg   3148
Tyr Tyr Ser Lys Ile Gly Pro Ala Leu Lys Thr Val Gly Leu Ser Leu
    985                 990                 995

gat gtg tcc cgt cgg gat tgg cct ctt cat gta atg aag gca gta ttg   3196
Asp Val Ser Arg Arg Asp Trp Pro Leu His Val Met Lys Ala Val Leu
1000                1005                1010                1015

gaa gag tta atg gag gcc aca ccc ccg aat ctc ctt gcc aaa gag ctc   3244
Glu Glu Leu Met Glu Ala Thr Pro Pro Asn Leu Leu Ala Lys Glu Leu
                1020                1025                1030

tgg tca tct tgc aca aca cct gat gaa tgg tgg aga gtt acg cag tct   3292
Trp Ser Ser Cys Thr Thr Pro Asp Glu Trp Trp Arg Val Thr Gln Ser
            1035                1040                1045
```

tat gca aga tct act gca gtc atg tct atg gtt gga tac ata att ggc 3340
Tyr Ala Arg Ser Thr Ala Val Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Ile Gly
1050 1055 1060

ctt gga gac aga cat ctg gat aat gtt ctt ata gat atg acg act gga 3388
Leu Gly Asp Arg His Leu Asp Asn Val Leu Ile Asp Met Thr Thr Gly
1065 1070 1075

gaa gtt gtt cac ata gat tac aat gtt tgc ttt gaa aaa ggt aaa agc 3436
Glu Val Val His Ile Asp Tyr Asn Val Cys Phe Glu Lys Gly Lys Ser
1080 1085 1090 1095

ctt aga gtt cct gag aaa gta cct ttt cga atg aca caa aac att gaa 3484
Leu Arg Val Pro Glu Lys Val Pro Phe Arg Met Thr Gln Asn Ile Glu
1100 1105 1110

aca gca ctg ggt gta act gga gta gaa ggt gta ttt agg ctt tca tgt 3532
Thr Ala Leu Gly Val Thr Gly Val Glu Gly Val Phe Arg Leu Ser Cys
1115 1120 1125

gag cag gtt tta cac att atg cgg cgt ggc aga gag acc ctg ctg acg 3580
Glu Gln Val Leu His Ile Met Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Leu Thr
1130 1135 1140

ctg ctg gag gcc ttt gtg tac gac cct ctg gtg gac tgg aca gca gga 3628
Leu Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro Leu Val Asp Trp Thr Ala Gly
1145 1150 1155

ggc gag gct ggg ttt gct ggt gct gtc tat ggt gga ggt ggc cag cag 3676
Gly Glu Ala Gly Phe Ala Gly Ala Val Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Gln
1160 1165 1170 1175

gcc gag agc aag cag agc aag aga gag atg gag cga gag atc acc cgc 3724
Ala Glu Ser Lys Gln Ser Lys Arg Glu Met Glu Arg Glu Ile Thr Arg
1180 1185 1190

agc ctg ttt tct tct aga gta gct gag att aag gtg aac tgg ttt aag 3772
Ser Leu Phe Ser Ser Arg Val Ala Glu Ile Lys Val Asn Trp Phe Lys
1195 1200 1205

aat aga gat gag atg ctg gtt gtg ctt ccc aag ttg gac ggt agc tta 3820
Asn Arg Asp Glu Met Leu Val Val Leu Pro Lys Leu Asp Gly Ser Leu
1210 1215 1220

gat gaa tac cta agc ttg caa gag caa ctg aca gat gtg gaa aaa ctg 3868
Asp Glu Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Gln Leu Thr Asp Val Glu Lys Leu
1225 1230 1235

cag ggc aaa cta ctg gag gaa ata gag ttt cta gaa gga gct gaa ggg 3916

Gln Gly Lys Leu Leu Glu Glu Ile Glu Phe Leu Glu Gly Ala Glu Gly
1240 1245 1250 1255

gtg gat cat cct tct cat act ctg caa cac agg tat tct gag cac acc 3964
Val Asp His Pro Ser His Thr Leu Gln His Arg Tyr Ser Glu His Thr
1260 1265 1270

caa cta cag act cag caa aga gct gtt cag gaa gca atc cag gtg aag 4012
Gln Leu Gln Thr Gln Gln Arg Ala Val Gln Glu Ala Ile Gln Val Lys
1275 1280 1285

ctg aat gaa ttt gaa caa tgg ata aca cat tat cag gct gca ttc aat 4060
Leu Asn Glu Phe Glu Gln Trp Ile Thr His Tyr Gln Ala Ala Phe Asn
1290 1295 1300

aat tta gaa gca aca cag ctt gca agc ttg ctt caa gag ata agc aca 4108
Asn Leu Glu Ala Thr Gln Leu Ala Ser Leu Leu Gln Glu Ile Ser Thr
1305 1310 1315

caa atg gac ctt ggt cct cca agt tac gtg cca gca aca gcc ttt ctg 4156
Gln Met Asp Leu Gly Pro Pro Ser Tyr Val Pro Ala Thr Ala Phe Leu
1320 1325 1330 1335

cag aat gct ggt cag gcc cac ttg att agc cag tgc gag cag ctg gag 4204
Gln Asn Ala Gly Gln Ala His Leu Ile Ser Gln Cys Glu Gln Leu Glu
1340 1345 1350

ggg gag gtt ggt gct ctc ctg cag cag agg cgc tcc gtg ctc cgt ggc 4252
Gly Glu Val Gly Ala Leu Leu Gln Gln Arg Arg Ser Val Leu Arg Gly
1355 1360 1365

tgt ctg gag caa ctg cat cac tat gca acc gtg gcc ctg cag tat ccg 4300
Cys Leu Glu Gln Leu His His Tyr Ala Thr Val Ala Leu Gln Tyr Pro
1370 1375 1380

aag gcc ata ttt cag aaa cat cga att gaa cag tgg aag acc tgg atg 4348
Lys Ala Ile Phe Gln Lys His Arg Ile Glu Gln Trp Lys Thr Trp Met
1385 1390 1395

gaa gag ctc atc tgt aac acc aca gta gag cgt tgt caa gag ctc tat 4396
Glu Glu Leu Ile Cys Asn Thr Thr Val Glu Arg Cys Gln Glu Leu Tyr
1400 1405 1410 1415

agg aaa tat gaa atg caa tat gct ccc cag cca ccc cca aca gtg tgt 4444
Arg Lys Tyr Glu Met Gln Tyr Ala Pro Gln Pro Pro Pro Thr Val Cys
1420 1425 1430

cag ttc atc act gcc act gaa atg acc ctg cag cga tac gca gca gac 4492
Gln Phe Ile Thr Ala Thr Glu Met Thr Leu Gln Arg Tyr Ala Ala Asp

```
                1435                1440                1445

atc aac agc aga ctt att aga caa gtg gaa cgc ttg aaa cag gaa gct   4540
Ile Asn Ser Arg Leu Ile Arg Gln Val Glu Arg Leu Lys Gln Glu Ala
     1450                1455                1460

gtc act gtg cca gtt tgt gaa gat cag ttg aaa gaa att gaa cgt tgc   4588
Val Thr Val Pro Val Cys Glu Asp Gln Leu Lys Glu Ile Glu Arg Cys
  1465                1470                1475

att aaa gtt ttc ctt cat gag aat gga gaa gaa gga tct ttg agt cta   4636
Ile Lys Val Phe Leu His Glu Asn Gly Glu Glu Gly Ser Leu Ser Leu
1480                1485                1490                1495

gca agt gtt att att tct gcc ctt tgt acc ctt aca agg cgt aac ctg   4684
Ala Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Cys Thr Leu Thr Arg Arg Asn Leu
               1500                1505                1510

atg atg gaa ggt gca gcg tca agt gct gga gaa cag ctg gtt gat ctg   4732
Met Met Glu Gly Ala Ala Ser Ser Ala Gly Glu Gln Leu Val Asp Leu
          1515                1520                1525

act tct cgg gat gga gcc tgg ttc ttg gag gaa ctc tgc agt atg agc   4780
Thr Ser Arg Asp Gly Ala Trp Phe Leu Glu Glu Leu Cys Ser Met Ser
     1530                1535                1540

gga aac gtc acc tgc ttg gtt cag tta ctg aag cag tgc cac ctg gtg   4828
Gly Asn Val Thr Cys Leu Val Gln Leu Leu Lys Gln Cys His Leu Val
  1545                1550                1555

cca cag gac tta gat atc ccg aac ccc atg gaa gcg tct gag aca gtt   4876
Pro Gln Asp Leu Asp Ile Pro Asn Pro Met Glu Ala Ser Glu Thr Val
1560                1565                1570                1575

cac tta gcc aat gga gtg tat acc tca ctt cag gaa ttg aat tcg aat   4924
His Leu Ala Asn Gly Val Tyr Thr Ser Leu Gln Glu Leu Asn Ser Asn
               1580                1585                1590

ttc cgg caa atc ata ttt cca gaa gca ctt cga tgt tta atg aaa ggg   4972
Phe Arg Gln Ile Ile Phe Pro Glu Ala Leu Arg Cys Leu Met Lys Gly
          1595                1600                1605

gaa tac acg tta gaa agt atg ctg cat gaa ctg gac ggt ctt att gag   5020
Glu Tyr Thr Leu Glu Ser Met Leu His Glu Leu Asp Gly Leu Ile Glu
     1610                1615                1620

cag acc acc gat ggc gtt ccc ctg cag act cta gtg gaa tct ctt cag   5068
Gln Thr Thr Asp Gly Val Pro Leu Gln Thr Leu Val Glu Ser Leu Gln
  1625                1630                1635
```

gcc tac tta aga aac gca gct atg gga ctg gaa gaa gaa aca cat gct 5116
Ala Tyr Leu Arg Asn Ala Ala Met Gly Leu Glu Glu Glu Thr His Ala
1640 1645 1650 1655

cat tac atc gat gtt gcc aga cta cta cat gct cag tac ggt gaa tta 5164
His Tyr Ile Asp Val Ala Arg Leu Leu His Ala Gln Tyr Gly Glu Leu
1660 1665 1670

atc caa ccg aga aat ggt tca gtt gat gaa aca ccc aaa atg tca gct 5212
Ile Gln Pro Arg Asn Gly Ser Val Asp Glu Thr Pro Lys Met Ser Ala
1675 1680 1685

ggc cag atg ctt ttg gta gca ttc gat ggc atg ttt gct caa gtt gaa 5260
Gly Gln Met Leu Leu Val Ala Phe Asp Gly Met Phe Ala Gln Val Glu
1690 1695 1700

act gct ttc agc tta tta gtt gaa aag ttg aac aag atg gaa att ccc 5308
Thr Ala Phe Ser Leu Leu Val Glu Lys Leu Asn Lys Met Glu Ile Pro
1705 1710 1715

ata gct tgg cga aag att gac atc ata agg gaa gcc agg agt act caa 5356
Ile Ala Trp Arg Lys Ile Asp Ile Ile Arg Glu Ala Arg Ser Thr Gln
1720 1725 1730 1735

gtt aat ttt ttt gat gat gat aat cac cgg cag gtg cta gaa gag att 5404
Val Asn Phe Phe Asp Asp Asp Asn His Arg Gln Val Leu Glu Glu Ile
1740 1745 1750

ttc ttt cta aaa aga cta cag act att aag gag ttc ttc agg ctc tgt 5452
Phe Phe Leu Lys Arg Leu Gln Thr Ile Lys Glu Phe Phe Arg Leu Cys
1755 1760 1765

ggt acc ttt tct aaa aca ttg tca gga tca agt tca ctt gaa gat cag 5500
Gly Thr Phe Ser Lys Thr Leu Ser Gly Ser Ser Ser Leu Glu Asp Gln
1770 1775 1780

aat act gtg aat ggg cct gta cag att gtc aat gtg aaa acc ctt ttt 5548
Asn Thr Val Asn Gly Pro Val Gln Ile Val Asn Val Lys Thr Leu Phe
1785 1790 1795

aga aac tct tgt ttc agt gaa gac caa atg gcc aaa cct atc aag gca 5596
Arg Asn Ser Cys Phe Ser Glu Asp Gln Met Ala Lys Pro Ile Lys Ala
1800 1805 1810 1815

ttc aca gct gac ttt gtg agg cag ctc ttg ata ggg cta ccc aac caa 5644
Phe Thr Ala Asp Phe Val Arg Gln Leu Leu Ile Gly Leu Pro Asn Gln
1820 1825 1830

gcc ctc gga ctc aca ctg tgc agt ttt atc agt gct ctg ggt gta gac 569
Ala Leu Gly Leu Thr Leu Cys Ser Phe Ile Ser Ala Leu Gly Val Asp
1835 1840 1845

atc att gct caa gta gag gca aag gac ttt ggt gcc gaa agc aaa gtt 574
Ile Ile Ala Gln Val Glu Ala Lys Asp Phe Gly Ala Glu Ser Lys Val
1850 1855 1860

tct gtt gat gat ctc tgt aag aaa gcg gtg gaa cat aac atc cag ata 578
Ser Val Asp Asp Leu Cys Lys Lys Ala Val Glu His Asn Ile Gln Ile
1865 1870 1875

ggg aag ttc tct cag ctg gtt atg aac agg gca act gtg tta gca agt 583
Gly Lys Phe Ser Gln Leu Val Met Asn Arg Ala Thr Val Leu Ala Ser
1880 1885 1890 1895

tct tac gac act gcc tgg aag aag cat gac ttg gtg cga agg cta gaa 588
Ser Tyr Asp Thr Ala Trp Lys Lys His Asp Leu Val Arg Arg Leu Glu
1900 1905 1910

acc agt att tct tct tgt aag aca agc ctg cag cgg gtt cag ctg cat 593
Thr Ser Ile Ser Ser Cys Lys Thr Ser Leu Gln Arg Val Gln Leu His
1915 1920 1925

att gcc atg ttt cag tgg caa cat gaa gat cta ctt atc aat aga cca 598
Ile Ala Met Phe Gln Trp Gln His Glu Asp Leu Leu Ile Asn Arg Pro
1930 1935 1940

caa gcc atg tca gtc aca cct ccc cca cgg tct gct atc cta acc agc 603
Gln Ala Met Ser Val Thr Pro Pro Pro Arg Ser Ala Ile Leu Thr Ser
1945 1950 1955

atg aaa aag aag ctg cat acc ctg agc cag att gaa act tct att gcg 608
Met Lys Lys Lys Leu His Thr Leu Ser Gln Ile Glu Thr Ser Ile Ala
1960 1965 1970 1975

aca gtt cag gag aag cta gct gca ctt gaa tca agt att gaa cag cga 613
Thr Val Gln Glu Lys Leu Ala Ala Leu Glu Ser Ser Ile Glu Gln Arg
1980 1985 1990

ctc aag tgg gca ggt ggt gcc aac cct gca ttg gcc cct gta cta caa 618
Leu Lys Trp Ala Gly Gly Ala Asn Pro Ala Leu Ala Pro Val Leu Gln
1995 2000 2005

gat ttt gaa gca acg ata gct gaa aga aga aat ctt gtc ctt aaa gag 623
Asp Phe Glu Ala Thr Ile Ala Glu Arg Arg Asn Leu Val Leu Lys Glu
2010 2015 2020

agc caa aga gca agt cag gtc aca ttt ctc tgc agc aat atc att cat 628

```
Ser Gln Arg Ala Ser Gln Val Thr Phe Leu Cys Ser Asn Ile Ile His
  2025                2030                2035

ttt gaa agt tta cga aca aga act gca gaa gcc tta aac ctg gat gcg   6316
Phe Glu Ser Leu Arg Thr Arg Thr Ala Glu Ala Leu Asn Leu Asp Ala
2040                2045                2050                2055

gcg tta ttt gaa cta atc aag cga tgt cag cag atg tgt tcg ttt gca   6364
Ala Leu Phe Glu Leu Ile Lys Arg Cys Gln Gln Met Cys Ser Phe Ala
                2060                2065                2070

tca cag ttt aac agt tca gtg tct gag tta gag ctt cgt tta tta cag   6412
Ser Gln Phe Asn Ser Ser Val Ser Glu Leu Glu Leu Arg Leu Leu Gln
          2075                2080                2085

aga gtg gac act ggt ctt gaa cat cct att ggc agc tct gaa tgg ctt   6460
Arg Val Asp Thr Gly Leu Glu His Pro Ile Gly Ser Ser Glu Trp Leu
      2090                2095                2100

ttg tca gca cac aaa cag ttg acc cag gat atg tct act cag agg gca   6508
Leu Ser Ala His Lys Gln Leu Thr Gln Asp Met Ser Thr Gln Arg Ala
  2105                2110                2115

att cag aca gag aaa gag cag cag ata gaa acg gtc tgt gaa aca att   6556
Ile Gln Thr Glu Lys Glu Gln Gln Ile Glu Thr Val Cys Glu Thr Ile
2120                2125                2130                2135

cag aat ctg gtt gat aat ata aag act gtg ctc act ggt cat aac cga   6604
Gln Asn Leu Val Asp Asn Ile Lys Thr Val Leu Thr Gly His Asn Arg
                2140                2145                2150

cag ctt gga gat gtc aaa cat ctc ttg aaa gct atg gct aag gat gaa   6652
Gln Leu Gly Asp Val Lys His Leu Leu Lys Ala Met Ala Lys Asp Glu
          2155                2160                2165

gaa gct gct ctg gca gat ggt gaa gat gtt ccc tat gag aac agt gtt   6700
Glu Ala Ala Leu Ala Asp Gly Glu Asp Val Pro Tyr Glu Asn Ser Val
      2170                2175                2180

agg cag ttt ttg ggt gaa tat aaa tca tgg caa gac aac att caa aca   6748
Arg Gln Phe Leu Gly Glu Tyr Lys Ser Trp Gln Asp Asn Ile Gln Thr
  2185                2190                2195

gtt cta ttt aca tta gtc cag gct atg ggt cag gtt cga agt caa gaa   6796
Val Leu Phe Thr Leu Val Gln Ala Met Gly Gln Val Arg Ser Gln Glu
2200                2205                2210                2215

cac gtt gaa atg ctc cag gaa atc act ccc acc ttg aaa gaa ctg aaa   6844
His Val Glu Met Leu Gln Glu Ile Thr Pro Thr Leu Lys Glu Leu Lys
```

2220 2225 2230

aca caa agt cag agt atc tat aat aat tta gtg agt ttt gca tca ccc 6892
Thr Gln Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Asn Leu Val Ser Phe Ala Ser Pro
2235 2240 2245

tta gtc acc gat gca aca aat gaa tgt tcg agt cca acg tca tct gct 6940
Leu Val Thr Asp Ala Thr Asn Glu Cys Ser Ser Pro Thr Ser Ser Ala
2250 2255 2260

act tat cag cca tcc ttc gct gca gca gtc cgg agt aac act ggc cag 6988
Thr Tyr Gln Pro Ser Phe Ala Ala Ala Val Arg Ser Asn Thr Gly Gln
2265 2270 2275

aag act cag cct gat gtc atg tca cag aat gct aga aag ctg atc cag 7036
Lys Thr Gln Pro Asp Val Met Ser Gln Asn Ala Arg Lys Leu Ile Gln
2280 2285 2290 2295

aaa aat ctt gct aca tca gct gat act cca cca agc acc gtt cca gga 7084
Lys Asn Leu Ala Thr Ser Ala Asp Thr Pro Pro Ser Thr Val Pro Gly
2300 2305 2310

act ggc aag agt gtt gct tgt agt cct aaa aag gca gtc aga gac cct 7132
Thr Gly Lys Ser Val Ala Cys Ser Pro Lys Lys Ala Val Arg Asp Pro
2315 2320 2325

aaa act ggg aaa gcg gtg caa gag aga aac tcc tat gca gtg agt gtg 7180
Lys Thr Gly Lys Ala Val Gln Glu Arg Asn Ser Tyr Ala Val Ser Val
2330 2335 2340

tgg aag aga gtg aaa gcc aag tta gag ggc cga gat gtt gat ccg aat 7228
Trp Lys Arg Val Lys Ala Lys Leu Glu Gly Arg Asp Val Asp Pro Asn
2345 2350 2355

agg agg atg tca gtt gct gaa cag gtt gac tat gtc att aag gaa gca 7276
Arg Arg Met Ser Val Ala Glu Gln Val Asp Tyr Val Ile Lys Glu Ala
2360 2365 2370 2375

act aat cta gat aac ttg gct cag ctg tat gaa ggt tgg aca gcc tgg 7324
Thr Asn Leu Asp Asn Leu Ala Gln Leu Tyr Glu Gly Trp Thr Ala Trp
2380 2385 2390

gtg tgaatggcaa gacagtagat gagtctggtt aagcgaggtc agacatccac 7377
Val

cagaatcaac tcagcctcag gcatccaaag ccacaccaca gtcggtggtg atgcaactgg 7437

gggcttactc tgaggaaacc taggaaatct cggtgcacta ggaagtgaat cccgcaggac 7497

agctgcactc agggatacgc ccaacaccat ggcctgcaac cccagggtca agggtgaagg 7557

aaagcaagct caccgcctga acacggagat tgtctttctg ccacagaaca gcagcagacg 7617

tgtcgggagg ttagctgcgg aaagaaatcg ggatgccgcg gagcacagag tgatttggaa 7677

ctccattcca cctgaccctg tgtgtacaat ccaggaaaaa aacaaacccc actcagaaac 7737

agagaaaact ggggtcgcga agaaatcaca gccaaggaag atttgatgca ttcagattct 7797

cgtgtaacac ttgttgcttg gcaacagtac tggttgggtt gaccagtaag tagaaaaagg 7857

ctaaaggcta tgcgatatga atttcagaaa tggactgaaa atggagagct atgtaacaga 7917

tacactacag tagaagaact tacttctgaa atgaagggaa aaaaaccacc ccatcgttcc 7977

ctactcctcc ccaccactta cccgttcccc ctttacctaa tctagtagat tagccatctt 8037

tcaaattcac ttttatttca gtccttatat ttcatatact tccgtctcga tgctgttaac 8097

aacttctgat aacatggaaa attcaaggat tgtttaaagg tctgatgatc acacacaaaa 8157

tgtaattccg gttatttaag tcatttctgt gattctatca tgtacagttt ccagaattgt 8217

cactgtgcat tcaaaagtaa tgaatctaac agacatttga tttaatgtac actccctttt 8277

gcttatagtg tgcatttttt ttggaggtca ttcaaatttt ccctcttctg tgatagctgt 8337

agtttctttc atagaaagta gctaatccag tgtaatcttt tacctttta aaaaccaaga 8397

tagagtatct attagagttt tacattgttg atgatagatt aacaataaag tgatgttctg 8457

gtggaggtag actgaaattt ttttaattca tgtttttcat ttgatacttt taatttacac 8517

ttagtaaatt aaaagttgtt taatttactt ggcattttag gacatgtaca tgaaacagtg 8577

aaaatgagat ccaccaacat cttttattaa gttcagttat tagtctgtga agtgctttac 8637

tttttgcaca attttaatag cttgctattc agtaatacat tatagtgaat tcatgatcaa 8697

ggtttcctta aatttagcat tgcatttcag tactgactgt gtaagctaaa ttgctgatcc 8757

aaaataaaaa cccagactag aatagggttc ttaaaatcaa gtatcaatac aaaatagaac 8817

acaattaaaa tcttaattgt tggctgggca cagtggctca cgcctgtaat cccagcactt 8877

tgggaggccg aggcgggcgg atcatgaggt taggagagcg agaccatcct ggctaacacg 8937

gtgaaacccc gtctttacta aaatacaaaa aaaattagcc gggtgtggtg gcgggcgcct 8997

gtagtcccag ctactcggga ggctgaggca ggagaatggc gtgaacccag gaggcggagc 9057

ttgcagtgag ccgagattgt gccactgcac tccagcctgg gcaacagagc tagactctgt 9117

gtcaaaaata aatgactaga t 9138

<210> 4
<211> 2392
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Lys Leu Leu Pro Asn Met Leu Ser Pro Asp Pro Arg Glu Leu
1 5 10 15

Gln Lys Ser Ile Glu Val Gln Leu Leu Arg Ser Ser Val Cys Leu Ala
20 25 30

Thr Ala Leu Asn Pro Ile Glu Gln Asp Gln Lys Trp Gln Ser Ile Thr
35 40 45

Glu Asn Val Val Lys Tyr Leu Lys Gln Thr Ser Arg Ile Ala Ile Gly
50 55 60

Pro Leu Arg Leu Ser Thr Leu Thr Val Ser Gln Ser Leu Pro Val Leu
65 70 75 80

Ser Thr Leu Gln Leu Tyr Cys Ser Ser Ala Leu Glu Asn Thr Val Ser
85 90 95

Asn Arg Leu Ser Thr Glu Asp Cys Leu Ile Pro Leu Phe Ser Glu Ala
100 105 110

Leu Arg Ser Cys Lys Gln His Asp Val Arg Pro Trp Met Gln Ala Leu
115 120 125

Arg Tyr Thr Met Tyr Gln Asn Gln Leu Leu Glu Lys Ile Lys Glu Gln
130 135 140

Thr Val Pro Ile Arg Ser His Leu Met Glu Leu Gly Leu Thr Ala Ala
145 150 155 160

Lys Phe Ala Arg Lys Arg Gly Asn Val Ser Leu Ala Thr Arg Leu Leu
165 170 175

Ala Gln Cys Ser Glu Val Gln Leu Gly Lys Thr Thr Thr Ala Gln Asp
180 185 190

Leu Val Gln His Phe Lys Lys Leu Ser Thr Gln Gly Gln Val Asp Glu
195 200 205

Lys Trp Gly Pro Glu Leu Asp Ile Glu Lys Thr Lys Leu Leu Tyr Thr
210 215 220

Ala Gly Gln Ser Thr His Ala Met Glu Met Leu Ser Ser Cys Ala Ile
225 230 235 240

Ser Phe Cys Lys Ser Val Lys Ala Glu Tyr Ala Val Ala Lys Ser Ile
245 250 255

Leu Thr Leu Ala Lys Trp Ile Gln Ala Glu Trp Lys Glu Ile Ser Gly
260 265 270

Gln Leu Lys Gln Val Tyr Arg Ala Gln His Gln Gln Asn Phe Thr Gly
275 280 285

Leu Ser Thr Leu Ser Lys Asn Ile Leu Thr Leu Ile Glu Leu Pro Ser
290 295 300

Val Asn Thr Met Glu Glu Glu Tyr Pro Arg Ile Glu Ser Glu Ser Thr
305 310 315 320

Val His Ile Gly Val Gly Glu Pro Asp Phe Ile Leu Gly Gln Leu Tyr
325 330 335

His Leu Ser Ser Val Gln Ala Pro Glu Val Ala Lys Ser Trp Ala Ala
340 345 350

Leu Ala Ser Trp Ala Tyr Arg Trp Gly Arg Lys Val Val Asp Asn Ala
355 360 365

Ser Gln Gly Glu Gly Val Arg Leu Leu Pro Arg Glu Lys Ser Glu Val
370 375 380

Gln Asn Leu Leu Pro Asp Thr Ile Thr Glu Glu Glu Lys Glu Arg Ile
385 390 395 400

Tyr Gly Ile Leu Gly Gln Ala Val Cys Arg Pro Ala Gly Ile Gln Asp
405 410 415

Glu Asp Ile Thr Leu Gln Ile Thr Glu Ser Glu Asp Asn Glu Glu Asp
420 425 430

Asp Met Val Asp Val Ile Trp Arg Gln Leu Ile Ser Ser Cys Pro Trp
435 440 445

Leu Ser Glu Leu Asp Glu Ser Ala Thr Glu Gly Val Ile Lys Val Trp
450 455 460

Arg Lys Val Val Asp Arg Ile Phe Ser Leu Tyr Lys Leu Ser Cys Ser
465 470 475 480

Ala Tyr Phe Thr Phe Leu Lys Leu Asn Ala Gly Gln Ile Pro Leu Asp
485 490 495

Glu Asp Asp Pro Arg Leu His Leu Ser His Arg Val Glu Gln Ser Thr
500 505 510

Asp Asp Met Ile Val Met Ala Thr Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val
515 520 525

Lys His Ala Gly Glu Leu Arg Gln Tyr Leu Glu His Gly Leu Glu Thr
530 535 540

Thr Pro Thr Ala Pro Trp Arg Gly Ile Ile Pro Gln Leu Phe Ser Arg
545 550 555 560

Leu Asn His Pro Glu Val Tyr Val Arg Gln Ser Ile Cys Asn Leu Leu
565 570 575

Cys Arg Val Ala Gln Asp Ser Pro His Leu Ile Leu Tyr Pro Ala Ile
580 585 590

Val Gly Thr Ile Ser Leu Ser Ser Glu Ser Gln Ala Ser Gly Asn Lys
595 600 605

Phe Ser Thr Ala Ile Pro Thr Leu Leu Gly Asn Ile Gln Gly Glu Glu
610 615 620

Leu Leu Val Ser Glu Cys Glu Gly Gly Ser Pro Pro Ala Ser Gln Asp
625 630 635 640

Ser Asn Lys Asp Glu Pro Lys Ser Gly Leu Asn Glu Asp Gln Ala Met
645 650 655

Met Gln Asp Cys Tyr Ser Lys Ile Val Asp Lys Leu Ser Ser Ala Asn
660 665 670

Pro Thr Met Val Leu Gln Val Gln Met Leu Val Ala Glu Leu Arg Arg
675 680 685

Val Thr Val Leu Trp Asp Glu Leu Trp Leu Gly Val Leu Leu Gln Gln
690 695 700

His Met Tyr Val Leu Arg Arg Ile Gln Gln Leu Glu Asp Glu Val Lys

705 710 715 720

Arg Val Gln Asn Asn Asn Thr Leu Arg Lys Glu Glu Lys Ile Ala Ile
725 730 735

Met Arg Glu Lys His Thr Ala Leu Met Lys Pro Ile Val Phe Ala Leu
740 745 750

Glu His Val Arg Ser Ile Thr Ala Ala Pro Ala Glu Thr Pro His Glu
755 760 765

Lys Trp Phe Gln Asp Asn Tyr Gly Asp Ala Ile Glu Asn Ala Leu Glu
770 775 780

Lys Leu Lys Thr Pro Leu Asn Pro Ala Lys Pro Gly Ser Ser Trp Ile
785 790 795 800

Pro Phe Lys Glu Ile Met Leu Asn Leu Gln Gln Arg Ala Gln Lys Arg
805 810 815

Ala Ser Tyr Ile Leu Arg Leu Glu Glu Ile Ser Pro Trp Leu Ala Ala
820 825 830

Met Thr Asn Thr Glu Ile Ala Leu Pro Gly Glu Val Ser Ala Arg Asp
835 840 845

Thr Val Thr Ile His Ser Val Gly Gly Thr Ile Thr Ile Leu Pro Thr
850 855 860

Lys Thr Lys Pro Lys Lys Leu Leu Phe Leu Gly Ser Asp Gly Lys Ser
865 870 875 880

Tyr Pro Tyr Leu Phe Lys Gly Leu Glu Asp Leu His Leu Asp Glu Arg
885 890 895

Ile Met Gln Phe Leu Ser Ile Val Asn Thr Met Phe Ala Thr Ile Asn
900 905 910

Arg Gln Glu Thr Pro Arg Phe His Ala Arg His Tyr Ser Val Thr Pro
915 920 925

Leu Gly Thr Arg Ser Gly Leu Ile Gln Trp Val Asp Gly Ala Thr Pro
930 935 940

Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Arg Trp Gln Gln Arg Glu Ala Ala Leu Gln
945 950 955 960

Ala Gln Lys Ala Gln Asp Ser Tyr Gln Thr Pro Gln Asn Pro Gly Ile
965 970 975

Val Pro Arg Pro Ser Glu Leu Tyr Tyr Ser Lys Ile Gly Pro Ala Leu
980 985 990

Lys Thr Val Gly Leu Ser Leu Asp Val Ser Arg Arg Asp Trp Pro Leu
995 1000 1005

His Val Met Lys Ala Val Leu Glu Glu Leu Met Glu Ala Thr Pro Pro
1010 1015 1020

Asn Leu Leu Ala Lys Glu Leu Trp Ser Ser Cys Thr Thr Pro Asp Glu
025 1030 1035 1040

Trp Trp Arg Val Thr Gln Ser Tyr Ala Arg Ser Thr Ala Val Met Ser
1045 1050 1055

Met Val Gly Tyr Ile Ile Gly Leu Gly Asp Arg His Leu Asp Asn Val
1060 1065 1070

Leu Ile Asp Met Thr Thr Gly Glu Val Val His Ile Asp Tyr Asn Val
1075 1080 1085

Cys Phe Glu Lys Gly Lys Ser Leu Arg Val Pro Glu Lys Val Pro Phe
1090 1095 1100

Arg Met Thr Gln Asn Ile Glu Thr Ala Leu Gly Val Thr Gly Val Glu
105 1110 1115 1120

Gly Val Phe Arg Leu Ser Cys Glu Gln Val Leu His Ile Met Arg Arg
1125 1130 1135

Gly Arg Glu Thr Leu Leu Thr Leu Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro
1140 1145 1150

Leu Val Asp Trp Thr Ala Gly Gly Glu Ala Gly Phe Ala Gly Ala Val
1155 1160 1165

Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Gln Ala Glu Ser Lys Gln Ser Lys Arg Glu
1170 1175 1180

Met Glu Arg Glu Ile Thr Arg Ser Leu Phe Ser Ser Arg Val Ala Glu
185 1190 1195 1200

Ile Lys Val Asn Trp Phe Lys Asn Arg Asp Glu Met Leu Val Val Leu
1205 1210 1215

Pro Lys Leu Asp Gly Ser Leu Asp Glu Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Gln
1220 1225 1230

Leu Thr Asp Val Glu Lys Leu Gln Gly Lys Leu Leu Glu Glu Ile Glu

1235 1240 1245

Phe Leu Glu Gly Ala Glu Gly Val Asp His Pro Ser His Thr Leu Gln
1250 1255 1260

His Arg Tyr Ser Glu His Thr Gln Leu Gln Thr Gln Gln Arg Ala Val
265 1270 1275 1280

Gln Glu Ala Ile Gln Val Lys Leu Asn Glu Phe Glu Gln Trp Ile Thr
1285 1290 1295

His Tyr Gln Ala Ala Phe Asn Asn Leu Glu Ala Thr Gln Leu Ala Ser
1300 1305 1310

Leu Leu Gln Glu Ile Ser Thr Gln Met Asp Leu Gly Pro Pro Ser Tyr
1315 1320 1325

Val Pro Ala Thr Ala Phe Leu Gln Asn Ala Gly Gln Ala His Leu Ile
1330 1335 1340

Ser Gln Cys Glu Gln Leu Glu Gly Glu Val Gly Ala Leu Leu Gln Gln
345 1350 1355 1360

Arg Arg Ser Val Leu Arg Gly Cys Leu Glu Gln Leu His His Tyr Ala
1365 1370 1375

Thr Val Ala Leu Gln Tyr Pro Lys Ala Ile Phe Gln Lys His Arg Ile
1380 1385 1390

Glu Gln Trp Lys Thr Trp Met Glu Glu Leu Ile Cys Asn Thr Thr Val
1395 1400 1405

Glu Arg Cys Gln Glu Leu Tyr Arg Lys Tyr Glu Met Gln Tyr Ala Pro
1410 1415 1420

Gln Pro Pro Pro Thr Val Cys Gln Phe Ile Thr Ala Thr Glu Met Thr
425 1430 1435 1440

Leu Gln Arg Tyr Ala Ala Asp Ile Asn Ser Arg Leu Ile Arg Gln Val
1445 1450 1455

Glu Arg Leu Lys Gln Glu Ala Val Thr Val Pro Val Cys Glu Asp Gln
1460 1465 1470

Leu Lys Glu Ile Glu Arg Cys Ile Lys Val Phe Leu His Glu Asn Gly
1475 1480 1485

Glu Glu Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Cys
1490 1495 1500

Thr Leu Thr Arg Arg Asn Leu Met Met Glu Gly Ala Ala Ser Ser Ala
505 1510 1515 1520

Gly Glu Gln Leu Val Asp Leu Thr Ser Arg Asp Gly Ala Trp Phe Leu
1525 1530 1535

Glu Glu Leu Cys Ser Met Ser Gly Asn Val Thr Cys Leu Val Gln Leu
1540 1545 1550

Leu Lys Gln Cys His Leu Val Pro Gln Asp Leu Asp Ile Pro Asn Pro
1555 1560 1565

Met Glu Ala Ser Glu Thr Val His Leu Ala Asn Gly Val Tyr Thr Ser
1570 1575 1580

Leu Gln Glu Leu Asn Ser Asn Phe Arg Gln Ile Ile Phe Pro Glu Ala
585 1590 1595 1600

Leu Arg Cys Leu Met Lys Gly Glu Tyr Thr Leu Glu Ser Met Leu His
1605 1610 1615

Glu Leu Asp Gly Leu Ile Glu Gln Thr Thr Asp Gly Val Pro Leu Gln
1620 1625 1630

Thr Leu Val Glu Ser Leu Gln Ala Tyr Leu Arg Asn Ala Ala Met Gly
1635 1640 1645

Leu Glu Glu Glu Thr His Ala His Tyr Ile Asp Val Ala Arg Leu Leu
1650 1655 1660

His Ala Gln Tyr Gly Glu Leu Ile Gln Pro Arg Asn Gly Ser Val Asp
665 1670 1675 1680

Glu Thr Pro Lys Met Ser Ala Gly Gln Met Leu Leu Val Ala Phe Asp
1685 1690 1695

Gly Met Phe Ala Gln Val Glu Thr Ala Phe Ser Leu Leu Val Glu Lys
1700 1705 1710

Leu Asn Lys Met Glu Ile Pro Ile Ala Trp Arg Lys Ile Asp Ile Ile
1715 1720 1725

Arg Glu Ala Arg Ser Thr Gln Val Asn Phe Phe Asp Asp Asp Asn His
1730 1735 1740

Arg Gln Val Leu Glu Glu Ile Phe Phe Leu Lys Arg Leu Gln Thr Ile
745 1750 1755 1760

Lys Glu Phe Phe Arg Leu Cys Gly Thr Phe Ser Lys Thr Leu Ser Gly
1765 1770 1775

Ser Ser Ser Leu Glu Asp Gln Asn Thr Val Asn Gly Pro Val Gln Ile
1780 1785 1790

Val Asn Val Lys Thr Leu Phe Arg Asn Ser Cys Phe Ser Glu Asp Gln
1795 1800 1805

Met Ala Lys Pro Ile Lys Ala Phe Thr Ala Asp Phe Val Arg Gln Leu
1810 1815 1820

Leu Ile Gly Leu Pro Asn Gln Ala Leu Gly Leu Thr Leu Cys Ser Phe
825 1830 1835 1840

Ile Ser Ala Leu Gly Val Asp Ile Ile Ala Gln Val Glu Ala Lys Asp
1845 1850 1855

Phe Gly Ala Glu Ser Lys Val Ser Val Asp Asp Leu Cys Lys Lys Ala
1860 1865 1870

Val Glu His Asn Ile Gln Ile Gly Lys Phe Ser Gln Leu Val Met Asn
1875 1880 1885

Arg Ala Thr Val Leu Ala Ser Ser Tyr Asp Thr Ala Trp Lys Lys His
1890 1895 1900

Asp Leu Val Arg Arg Leu Glu Thr Ser Ile Ser Ser Cys Lys Thr Ser
905 1910 1915 1920

Leu Gln Arg Val Gln Leu His Ile Ala Met Phe Gln Trp Gln His Glu
1925 1930 1935

Asp Leu Leu Ile Asn Arg Pro Gln Ala Met Ser Val Thr Pro Pro Pro
1940 1945 1950

Arg Ser Ala Ile Leu Thr Ser Met Lys Lys Lys Leu His Thr Leu Ser
1955 1960 1965

Gln Ile Glu Thr Ser Ile Ala Thr Val Gln Glu Lys Leu Ala Ala Leu
1970 1975 1980

Glu Ser Ser Ile Glu Gln Arg Leu Lys Trp Ala Gly Gly Ala Asn Pro
985 1990 1995 2000

Ala Leu Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Glu Ala Thr Ile Ala Glu Arg
2005 2010 2015

Arg Asn Leu Val Leu Lys Glu Ser Gln Arg Ala Ser Gln Val Thr Phe

2020 2025 2030

Leu Cys Ser Asn Ile Ile His Phe Glu Ser Leu Arg Thr Arg Thr Ala
2035 2040 2045

Glu Ala Leu Asn Leu Asp Ala Ala Leu Phe Glu Leu Ile Lys Arg Cys
2050 2055 2060

Gln Gln Met Cys Ser Phe Ala Ser Gln Phe Asn Ser Ser Val Ser Glu
065 2070 2075 2080

Leu Glu Leu Arg Leu Leu Gln Arg Val Asp Thr Gly Leu Glu His Pro
2085 2090 2095

Ile Gly Ser Ser Glu Trp Leu Leu Ser Ala His Lys Gln Leu Thr Gln
2100 2105 2110

Asp Met Ser Thr Gln Arg Ala Ile Gln Thr Glu Lys Glu Gln Gln Ile
2115 2120 2125

Glu Thr Val Cys Glu Thr Ile Gln Asn Leu Val Asp Asn Ile Lys Thr
2130 2135 2140

Val Leu Thr Gly His Asn Arg Gln Leu Gly Asp Val Lys His Leu Leu
145 2150 2155 2160

Lys Ala Met Ala Lys Asp Glu Glu Ala Ala Leu Ala Asp Gly Glu Asp
2165 2170 2175

Val Pro Tyr Glu Asn Ser Val Arg Gln Phe Leu Gly Glu Tyr Lys Ser
2180 2185 2190

Trp Gln Asp Asn Ile Gln Thr Val Leu Phe Thr Leu Val Gln Ala Met
2195 2200 2205

Gly Gln Val Arg Ser Gln Glu His Val Glu Met Leu Gln Glu Ile Thr
2210 2215 2220

Pro Thr Leu Lys Glu Leu Lys Thr Gln Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Asn
225 2230 2235 2240

Leu Val Ser Phe Ala Ser Pro Leu Val Thr Asp Ala Thr Asn Glu Cys
2245 2250 2255

Ser Ser Pro Thr Ser Ser Ala Thr Tyr Gln Pro Ser Phe Ala Ala Ala
2260 2265 2270

Val Arg Ser Asn Thr Gly Gln Lys Thr Gln Pro Asp Val Met Ser Gln
2275 2280 2285

Asn Ala Arg Lys Leu Ile Gln Lys Asn Leu Ala Thr Ser Ala Asp Thr
2290 2295 2300

Pro Pro Ser Thr Val Pro Gly Thr Gly Lys Ser Val Ala Cys Ser Pro
305 2310 2315 2320

Lys Lys Ala Val Arg Asp Pro Lys Thr Gly Lys Ala Val Gln Glu Arg
2325 2330 2335

Asn Ser Tyr Ala Val Ser Val Trp Lys Arg Val Lys Ala Lys Leu Glu
2340 2345 2350

Gly Arg Asp Val Asp Pro Asn Arg Arg Met Ser Val Ala Glu Gln Val
2355 2360 2365

Asp Tyr Val Ile Lys Glu Ala Thr Asn Leu Asp Asn Leu Ala Gln Leu
2370 2375 2380

Tyr Glu Gly Trp Thr Ala Trp Val
385 2390

<210> 5
<211> 2392
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial:
proteína BLIP quinasa inactiva

<400> 5
Met Lys Lys Leu Leu Pro Asn Met Leu Ser Pro Asp Pro Arg Glu Leu
1 5 10 15

Gln Lys Ser Ile Glu Val Gln Leu Leu Arg Ser Ser Val Cys Leu Ala
20 25 30

Thr Ala Leu Asn Pro Ile Glu Gln Asp Gln Lys Trp Gln Ser Ile Thr
35 40 45

Glu Asn Val Val Lys Tyr Leu Lys Gln Thr Ser Arg Ile Ala Ile Gly
50 55 60

Pro Leu Arg Leu Ser Thr Leu Thr Val Ser Gln Ser Leu Pro Val Leu
65 70 75 80

Ser Thr Leu Gln Leu Tyr Cys Ser Ser Ala Leu Glu Asn Thr Val Ser

85 90 95

Asn Arg Leu Ser Thr Glu Asp Cys Leu Ile Pro Leu Phe Ser Glu Ala
100 105 110

Leu Arg Ser Cys Lys Gln His Asp Val Arg Pro Trp Met Gln Ala Leu
115 120 125

Arg Tyr Thr Met Tyr Gln Asn Gln Leu Leu Glu Lys Ile Lys Glu Gln
130 135 140

Thr Val Pro Ile Arg Ser His Leu Met Glu Leu Gly Leu Thr Ala Ala
145 150 155 160

Lys Phe Ala Arg Lys Arg Gly Asn Val Ser Leu Ala Thr Arg Leu Leu
165 170 175

Ala Gln Cys Ser Glu Val Gln Leu Gly Lys Thr Thr Thr Ala Gln Asp
180 185 190

Leu Val Gln His Phe Lys Lys Leu Ser Thr Gln Gly Gln Val Asp Glu
195 200 205

Lys Trp Gly Pro Glu Leu Asp Ile Glu Lys Thr Lys Leu Leu Tyr Thr
210 215 220

Ala Gly Gln Ser Thr His Ala Met Glu Met Leu Ser Ser Cys Ala Ile
225 230 235 240

Ser Phe Cys Lys Ser Val Lys Ala Glu Tyr Ala Val Ala Lys Ser Ile
245 250 255

Leu Thr Leu Ala Lys Trp Ile Gln Ala Glu Trp Lys Glu Ile Ser Gly
260 265 270

Gln Leu Lys Gln Val Tyr Arg Ala Gln His Gln Gln Asn Phe Thr Gly
275 280 285

Leu Ser Thr Leu Ser Lys Asn Ile Leu Thr Leu Ile Glu Leu Pro Ser
290 295 300

Val Asn Thr Met Glu Glu Glu Tyr Pro Arg Ile Glu Ser Glu Ser Thr
305 310 315 320

Val His Ile Gly Val Gly Glu Pro Asp Phe Ile Leu Gly Gln Leu Tyr
325 330 335

His Leu Ser Ser Val Gln Ala Pro Glu Val Ala Lys Ser Trp Ala Ala
340 345 350

Leu Ala Ser Trp Ala Tyr Arg Trp Gly Arg Lys Val Val Asp Asn Ala
355 360 365

Ser Gln Gly Glu Gly Val Arg Leu Leu Pro Arg Glu Lys Ser Glu Val
370 375 380

Gln Asn Leu Leu Pro Asp Thr Ile Thr Glu Glu Glu Lys Glu Arg Ile
385 390 395 400

Tyr Gly Ile Leu Gly Gln Ala Val Cys Arg Pro Ala Gly Ile Gln Asp
405 410 415

Glu Asp Ile Thr Leu Gln Ile Thr Glu Ser Glu Asp Asn Glu Glu Asp
420 425 430

Asp Met Val Asp Val Ile Trp Arg Gln Leu Ile Ser Ser Cys Pro Trp
435 440 445

Leu Ser Glu Leu Asp Glu Ser Ala Thr Glu Gly Val Ile Lys Val Trp
450 455 460

Arg Lys Val Val Asp Arg Ile Phe Ser Leu Tyr Lys Leu Ser Cys Ser
465 470 475 480

Ala Tyr Phe Thr Phe Leu Lys Leu Asn Ala Gly Gln Ile Pro Leu Asp
485 490 495

Glu Asp Asp Pro Arg Leu His Leu Ser His Arg Val Glu Gln Ser Thr
500 505 510

Asp Asp Met Ile Val Met Ala Thr Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val
515 520 525

Lys His Ala Gly Glu Leu Arg Gln Tyr Leu Glu His Gly Leu Glu Thr
530 535 540

Thr Pro Thr Ala Pro Trp Arg Gly Ile Ile Pro Gln Leu Phe Ser Arg
545 550 555 560

Leu Asn His Pro Glu Val Tyr Val Arg Gln Ser Ile Cys Asn Leu Leu
565 570 575

Cys Arg Val Ala Gln Asp Ser Pro His Leu Ile Leu Tyr Pro Ala Ile
580 585 590

Val Gly Thr Ile Ser Leu Ser Ser Glu Ser Gln Ala Ser Gly Asn Lys
595 600 605

Phe Ser Thr Ala Ile Pro Thr Leu Leu Gly Asn Ile Gln Gly Glu Glu

610 615 620

Leu Leu Val Ser Glu Cys Glu Gly Gly Ser Pro Pro Ala Ser Gln Asp
625 630 635 640

Ser Asn Lys Asp Glu Pro Lys Ser Gly Leu Asn Glu Asp Gln Ala Met
645 650 655

Met Gln Asp Cys Tyr Ser Lys Ile Val Asp Lys Leu Ser Ser Ala Asn
660 665 670

Pro Thr Met Val Leu Gln Val Gln Met Leu Val Ala Glu Leu Arg Arg
675 680 685

Val Thr Val Leu Trp Asp Glu Leu Trp Leu Gly Val Leu Leu Gln Gln
690 695 700

His Met Tyr Val Leu Arg Arg Ile Gln Gln Leu Glu Asp Glu Val Lys
705 710 715 720

Arg Val Gln Asn Asn Asn Thr Leu Arg Lys Glu Glu Lys Ile Ala Ile
725 730 735

Met Arg Glu Lys His Thr Ala Leu Met Lys Pro Ile Val Phe Ala Leu
740 745 750

Glu His Val Arg Ser Ile Thr Ala Ala Pro Ala Glu Thr Pro His Glu
755 760 765

Lys Trp Phe Gln Asp Asn Tyr Gly Asp Ala Ile Glu Asn Ala Leu Glu
770 775 780

Lys Leu Lys Thr Pro Leu Asn Pro Ala Lys Pro Gly Ser Ser Trp Ile
785 790 795 800

Pro Phe Lys Glu Ile Met Leu Asn Leu Gln Gln Arg Ala Gln Lys Arg
805 810 815

Ala Ser Tyr Ile Leu Arg Leu Glu Glu Ile Ser Pro Trp Leu Ala Ala
820 825 830

Met Thr Asn Thr Glu Ile Ala Leu Pro Gly Glu Val Ser Ala Arg Asp
835 840 845

Thr Val Thr Ile His Ser Val Gly Gly Thr Ile Thr Ile Leu Pro Thr
850 855 860

Lys Thr Lys Pro Lys Lys Leu Leu Phe Leu Gly Ser Asp Gly Lys Ser
865 870 875 880

Tyr Pro Tyr Leu Phe Lys Gly Leu Glu Asp Leu His Leu Asp Glu Arg
885 890 895

Ile Met Gln Phe Leu Ser Ile Val Asn Thr Met Phe Ala Thr Ile Asn
900 905 910

Arg Gln Glu Thr Pro Arg Phe His Ala Arg His Tyr Ser Val Thr Pro
915 920 925

Leu Gly Thr Arg Ser Gly Leu Ile Gln Trp Val Asp Gly Ala Thr Pro
930 935 940

Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Arg Trp Gln Gln Arg Glu Ala Ala Leu Gln
945 950 955 960

Ala Gln Lys Ala Gln Asp Ser Tyr Gln Thr Pro Gln Asn Pro Gly Ile
965 970 975

Val Pro Arg Pro Ser Glu Leu Tyr Tyr Ser Lys Ile Gly Pro Ala Leu
980 985 990

Lys Thr Val Gly Leu Ser Leu Asp Val Ser Arg Arg Asp Trp Pro Leu
995 1000 1005

His Val Met Lys Ala Val Leu Glu Glu Leu Met Glu Ala Thr Pro Pro
1010 1015 1020

Asn Leu Leu Ala Lys Glu Leu Trp Ser Ser Cys Thr Thr Pro Asp Glu
1025 1030 1035 1040

Trp Trp Arg Val Thr Gln Ser Tyr Ala Arg Ser Thr Ala Val Met Ser
1045 1050 1055

Met Val Gly Tyr Ile Ile Gly Leu Gly Ala Arg His Leu Asp Lys Val
1060 1065 1070

Leu Ile Asp Met Thr Thr Gly Glu Val Val His Ile Asp Tyr Asn Val
1075 1080 1085

Cys Phe Glu Lys Gly Lys Ser Leu Arg Val Pro Glu Lys Val Pro Phe
1090 1095 1100

Arg Met Thr Gln Asn Ile Glu Thr Ala Leu Gly Val Thr Gly Val Glu
1105 1110 1115 1120

Gly Val Phe Arg Leu Ser Cys Glu Gln Val Leu His Ile Met Arg Arg
1125 1130 1135

Gly Arg Glu Thr Leu Leu Thr Leu Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro
1140 1145 1150

Leu Val Asp Trp Thr Ala Gly Gly Glu Ala Gly Phe Ala Gly Ala Val
1155 1160 1165

Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Gln Ala Glu Ser Lys Gln Ser Lys Arg Glu
1170 1175 1180

Met Glu Arg Glu Ile Thr Arg Ser Leu Phe Ser Ser Arg Val Ala Glu
1185 1190 1195 1200

Ile Lys Val Asn Trp Phe Lys Asn Arg Asp Glu Met Leu Val Val Leu
1205 1210 1215

Pro Lys Leu Asp Gly Ser Leu Asp Glu Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Gln
1220 1225 1230

Leu Thr Asp Val Glu Lys Leu Gln Gly Lys Leu Leu Glu Glu Ile Glu
1235 1240 1245

Phe Leu Glu Gly Ala Glu Gly Val Asp His Pro Ser His Thr Leu Gln
1250 1255 1260

His Arg Tyr Ser Glu His Thr Gln Leu Gln Thr Gln Gln Arg Ala Val
1265 1270 1275 1280

Gln Glu Ala Ile Gln Val Lys Leu Asn Glu Phe Glu Gln Trp Ile Thr
1285 1290 1295

His Tyr Gln Ala Ala Phe Asn Asn Leu Glu Ala Thr Gln Leu Ala Ser
1300 1305 1310

Leu Leu Gln Glu Ile Ser Thr Gln Met Asp Leu Gly Pro Pro Ser Tyr
1315 1320 1325

Val Pro Ala Thr Ala Phe Leu Gln Asn Ala Gly Gln Ala His Leu Ile
1330 1335 1340

Ser Gln Cys Glu Gln Leu Glu Gly Glu Val Gly Ala Leu Leu Gln Gln
1345 1350 1355 1360

Arg Arg Ser Val Leu Arg Gly Cys Leu Glu Gln Leu His His Tyr Ala
1365 1370 1375

Thr Val Ala Leu Gln Tyr Pro Lys Ala Ile Phe Gln Lys His Arg Ile
1380 1385 1390

Glu Gln Trp Lys Thr Trp Met Glu Glu Leu Ile Cys Asn Thr Thr Val

1395 1400 1405

Glu Arg Cys Gln Glu Leu Tyr Arg Lys Tyr Glu Met Gln Tyr Ala Pro
1410 1415 1420

Gln Pro Pro Pro Thr Val Cys Gln Phe Ile Thr Ala Thr Glu Met Thr
1425 1430 1435 1440

Leu Gln Arg Tyr Ala Ala Asp Ile Asn Ser Arg Leu Ile Arg Gln Val
1445 1450 1455

Glu Arg Leu Lys Gln Glu Ala Val Thr Val Pro Val Cys Glu Asp Gln
1460 1465 1470

Leu Lys Glu Ile Glu Arg Cys Ile Lys Val Phe Leu His Glu Asn Gly
1475 1480 1485

Glu Glu Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Cys
1490 1495 1500

Thr Leu Thr Arg Arg Asn Leu Met Met Glu Gly Ala Ala Ser Ser Ala
1505 1510 1515 1520

Gly Glu Gln Leu Val Asp Leu Thr Ser Arg Asp Gly Ala Trp Phe Leu
1525 1530 1535

Glu Glu Leu Cys Ser Met Ser Gly Asn Val Thr Cys Leu Val Gln Leu
1540 1545 1550

Leu Lys Gln Cys His Leu Val Pro Gln Asp Leu Asp Ile Pro Asn Pro
1555 1560 1565

Met Glu Ala Ser Glu Thr Val His Leu Ala Asn Gly Val Tyr Thr Ser
1570 1575 1580

Leu Gln Glu Leu Asn Ser Asn Phe Arg Gln Ile Ile Phe Pro Glu Ala
1585 1590 1595 1600

Leu Arg Cys Leu Met Lys Gly Glu Tyr Thr Leu Glu Ser Met Leu His
1605 1610 1615

Glu Leu Asp Gly Leu Ile Glu Gln Thr Thr Asp Gly Val Pro Leu Gln
1620 1625 1630

Thr Leu Val Glu Ser Leu Gln Ala Tyr Leu Arg Asn Ala Ala Met Gly
1635 1640 1645

Leu Glu Glu Glu Thr His Ala His Tyr Ile Asp Val Ala Arg Leu Leu
1650 1655 1660

His Ala Gln Tyr Gly Glu Leu Ile Gln Pro Arg Asn Gly Ser Val Asp
1665 1670 1675 1680

Glu Thr Pro Lys Met Ser Ala Gly Gln Met Leu Leu Val Ala Phe Asp
1685 1690 1695

Gly Met Phe Ala Gln Val Glu Thr Ala Phe Ser Leu Leu Val Glu Lys
1700 1705 1710

Leu Asn Lys Met Glu Ile Pro Ile Ala Trp Arg Lys Ile Asp Ile Ile
1715 1720 1725

Arg Glu Ala Arg Ser Thr Gln Val Asn Phe Phe Asp Asp Asp Asn His
1730 1735 1740

Arg Gln Val Leu Glu Glu Ile Phe Phe Leu Lys Arg Leu Gln Thr Ile
1745 1750 1755 1760

Lys Glu Phe Phe Arg Leu Cys Gly Thr Phe Ser Lys Thr Leu Ser Gly
1765 1770 1775

Ser Ser Ser Leu Glu Asp Gln Asn Thr Val Asn Gly Pro Val Gln Ile
1780 1785 1790

Val Asn Val Lys Thr Leu Phe Arg Asn Ser Cys Phe Ser Glu Asp Gln
1795 1800 1805

Met Ala Lys Pro Ile Lys Ala Phe Thr Ala Asp Phe Val Arg Gln Leu
1810 1815 1820

Leu Ile Gly Leu Pro Asn Gln Ala Leu Gly Leu Thr Leu Cys Ser Phe
1825 1830 1835 1840

Ile Ser Ala Leu Gly Val Asp Ile Ile Ala Gln Val Glu Ala Lys Asp
1845 1850 1855

Phe Gly Ala Glu Ser Lys Val Ser Val Asp Asp Leu Cys Lys Lys Ala
1860 1865 1870

Val Glu His Asn Ile Gln Ile Gly Lys Phe Ser Gln Leu Val Met Asn
1875 1880 1885

Arg Ala Thr Val Leu Ala Ser Ser Tyr Asp Thr Ala Trp Lys Lys His
1890 1895 1900

Asp Leu Val Arg Arg Leu Glu Thr Ser Ile Ser Ser Cys Lys Thr Ser
1905 1910 1915 1920

Leu Gln Arg Val Gln Leu His Ile Ala Met Phe Gln Trp Gln His Glu
1925 1930 1935

Asp Leu Leu Ile Asn Arg Pro Gln Ala Met Ser Val Thr Pro Pro Pro
1940 1945 1950

Arg Ser Ala Ile Leu Thr Ser Met Lys Lys Lys Leu His Thr Leu Ser
1955 1960 1965

Gln Ile Glu Thr Ser Ile Ala Thr Val Gln Glu Lys Leu Ala Ala Leu
1970 1975 1980

Glu Ser Ser Ile Glu Gln Arg Leu Lys Trp Ala Gly Gly Ala Asn Pro
1985 1990 1995 2000

Ala Leu Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Glu Ala Thr Ile Ala Glu Arg
2005 2010 2015

Arg Asn Leu Val Leu Lys Glu Ser Gln Arg Ala Ser Gln Val Thr Phe
2020 2025 2030

Leu Cys Ser Asn Ile Ile His Phe Glu Ser Leu Arg Thr Arg Thr Ala
2035 2040 2045

Glu Ala Leu Asn Leu Asp Ala Ala Leu Phe Glu Leu Ile Lys Arg Cys
2050 2055 2060

Gln Gln Met Cys Ser Phe Ala Ser Gln Phe Asn Ser Ser Val Ser Glu
2065 2070 2075 2080

Leu Glu Leu Arg Leu Leu Gln Arg Val Asp Thr Gly Leu Glu His Pro
2085 2090 2095

Ile Gly Ser Ser Glu Trp Leu Leu Ser Ala His Lys Gln Leu Thr Gln
2100 2105 2110

Asp Met Ser Thr Gln Arg Ala Ile Gln Thr Glu Lys Glu Gln Gln Ile
2115 2120 2125

Glu Thr Val Cys Glu Thr Ile Gln Asn Leu Val Asp Asn Ile Lys Thr
2130 2135 2140

Val Leu Thr Gly His Asn Arg Gln Leu Gly Asp Val Lys His Leu Leu
2145 2150 2155 2160

Lys Ala Met Ala Lys Asp Glu Glu Ala Ala Leu Ala Asp Gly Glu Asp
2165 2170 2175
Val Pro Tyr Glu Asn Ser Val Arg Gln Phe Leu Gly Glu Tyr Lys Ser
2180 2185 2190

Trp Gln Asp Asn Ile Gln Thr Val Leu Phe Thr Leu Val Gln Ala Met
2195 2200 2205

Gly Gln Val Arg Ser Gln Glu His Val Glu Met Leu Gln Glu Ile Thr
2210 2215 2220

Pro Thr Leu Lys Glu Leu Lys Thr Gln Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Asn
2225 2230 2235 2240

Leu Val Ser Phe Ala Ser Pro Leu Val Thr Asp Ala Thr Asn Glu Cys
2245 2250 2255

Ser Ser Pro Thr Ser Ser Ala Thr Tyr Gln Pro Ser Phe Ala Ala Ala
2260 2265 2270

Val Arg Ser Asn Thr Gly Gln Lys Thr Gln Pro Asp Val Met Ser Gln
2275 2280 2285

Asn Ala Arg Lys Leu Ile Gln Lys Asn Leu Ala Thr Ser Ala Asp Thr
2290 2295 2300

Pro Pro Ser Thr Val Pro Gly Thr Gly Lys Ser Val Ala Cys Ser Pro
2305 2310 2315 2320

Lys Lys Ala Val Arg Asp Pro Lys Thr Gly Lys Ala Val Gln Glu Arg
2325 2330 2335

Asn Ser Tyr Ala Val Ser Val Trp Lys Arg Val Lys Ala Lys Leu Glu
2340 2345 2350

Gly Arg Asp Val Asp Pro Asn Arg Arg Met Ser Val Ala Glu Gln Val
2355 2360 2365

Asp Tyr Val Ile Lys Glu Ala Thr Asn Leu Asp Asn Leu Ala Gln Leu
2370 2375 2380

Tyr Glu Gly Trp Thr Ala Trp Val
2385 2390

<210> 6
<211> 779
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Leu His Glu Leu Asp Gly Leu Ile Glu Gln Thr Thr Asp Gly Val
1 5 10 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 00/00308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER [6]:

IPC7 : C12N 9/12, 15/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 : C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STRAND, WPI, EPODOC, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARIA T. DIAZ-MECO ET AL. "Lambda -Interactin Protein, a Novel Protein That Specifically Interacts with the Zinc Finger Domain of the Atypical Protein Kinase C Isotype 9/7 and Stimulates Its Kinase activity in Vitro and Vivo". Molecular and Cellular Biology, Jan. 1996, pages 105-114. Cited in the application.	5, 9-15
A		1-8, 16-26
A	LABORATORIO GLAXO WELLCOME-CSIC DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR, "Localization of atypical Protein Kinase C into Lysosome- Targeted Endosomes throug Interaction with p62", Molecular and Cellular Biology, May 1998, pages 3069-3080. Cited in the application	1-26
A	BROWNE . J. et al. "A Mamalian Protein Targeted by G1-arresting Rapamycin-Receptor Complex. Nature" (1994) 369: 756-758.	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 December 2000 (20.12.00)	08 January 2001 (08.01.01)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 00/00308

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims 24 and 25 relate to an object which this Authority is not obliged to search, namely: although they relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compounds.

2. ☐ Claims 5, 9-15 relate to elements in the international application which do not comply with established requirements in such a way that a meaningful search cannot be carried, more precisely: although seq. ID 16 is not included as such in the description nor in the section dealing with the lists of sequences, it was deduced from seq. ID 14.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 00/00308

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP[7] C12N 9/12, 15/54
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP[7] C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

STRAND, WPI, EPODOC, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	MARIA T. DIAZ-MECO ET AL. "Lambda-Interactin Protein, a Novel Protein That Specifically Interacts with the Zinc Finger Domain of the Atypical Protein Kinase C Isotype 9/7 and Stimulates Its Kinase activity In Vitro and Vivo". Molecular and Cellular Biology, Jan. 1996, pág., 105-114. Citado en el documento	5,9-15
A		1-8, 16-26
A	LABORATORIO GLAXO WELLCOME-CSIC DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR,"Localization of atypical Protein Kinase C into Lysosome-Targeted Endosomes throug Interaction with p62", Molecular and Cellular Biology, May 1998, pág. 3069-3080. Citado en el documento	1-26
A	BROWNE. J. et al. "A Mamalian Protein Targeted by G1-arresting Rapamycin-Receptor Complex. Nature" (1994) 369:756-758.	1-26

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 20 Diciembre 2000 (20.12.2000)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 08 ENE 2001 08. 01. 01
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. nº de fax +34 91 3495304	Funcionario autorizado MARTA HERNÁNDEZ CUELLAR nº de teléfono + 34 91 34955545

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 00/00308

Recuadro I **Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 1 de la primera hoja)**

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones nºs: 24 y 25
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber: aunque se refieren a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, la búsqueda se ha realizado y se ha basado en los efectos atribuídos a los compuestos.

2. ☐ Las reivindicaciones nºs: 5, 9-15
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente: aunque la seq. Id 6 no aparece como tal en la memoria descriptiva, ni en el apartado de listas de secuencias, se ha deducido a partir de la seq. Id 4.

3. ☐ Las reivindicaciones nºs:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II **Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nºs

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones nºs:

Indicación en cuanto a la reserva

☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.