



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 995**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)	C07K 14/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)	C12P 21/00 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)	G01N 33/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)	C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)	A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04001078 .7**

96 Fecha de presentación : **20.01.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1439229**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2004**

54 Título: **Oncogén, proteína recombinante derivada del mismo y sus usos.**

30 Prioridad: **20.01.2003 JP 2003-11478**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.01.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.01.2010

73 Titular/es: **NEC CORPORATION**
7-1, Shiba 5-chome
Minato-ku, Tokyo, JP
Masahiko Kuroda

72 Inventor/es: **Saito, Akira y**
Kuroda, Masahiko

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 331 995 T3

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

DESCRIPCIÓN

Oncogén, proteína recombinante derivada del mismo y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo oncogén de seres humanos, que está involucrado en el desarrollo del cáncer cervical humano, a una proteína recombinante derivada del oncogén y a sus usos en aplicaciones médicas.

10 **Antecedentes de la técnica**

Existen numerosos documentos que informan que la inestabilidad cromosómica está involucrada en el desarrollo del cáncer. Además, recientemente se ha demostrado que un defecto en una molécula que controla un punto de control durante la fase G2/M de un ciclo celular causa inestabilidad cromosómica. Sin embargo, debido a que en muchas células de carcinoma, no se observa con frecuencia un defecto en una molécula que controla un punto de control en la célula, el mecanismo para inducir inestabilidad cromosómica, que está sustancialmente involucrado en el comienzo del cáncer, aún no está esclarecido en muchos aspectos.

Es ampliamente conocido que el desarrollo del cáncer cervical involucra la infección con un virus de papiloma humano (HPV) tal como los tipos HPV-16 o HPV-18. En un tejido de cáncer cervical, se ha observado infección con HPV con una frecuencia de 90% o más. En un mecanismo de desarrollo del cáncer cervical inducido por la infección de HPV, los productos génicos E6 y E7 del virus cumplen un importante papel. Específicamente, se sabe que E6 acelera un proceso de digestión de la proteína supresora de tumores p53, mientras que E7 bloquea la actividad inhibidora de la formación de cáncer de pRB (retinoblastoma) que es un producto génico Rb, produciendo estas dos etapas tumorigénicas. Sin embargo, aún no se ha identificado una proteína oncogénica específica activada por la infección de HPV. En particular, E6 y E7, productos génicos virales de HPV, inducen inestabilidad cromosómica y originan cáncer en una célula, pero el detalle de su mecanismo directamente relacionado con lo dicho permanece aún sustancialmente desconocido en una variedad de aspectos. Para abordar el tratamiento del cáncer cervical, en consecuencia, es muy importante identificar una proteína oncogénica como blanco para HPV y un oncogén que la codifique. El cáncer cervical progresa desde un estado precanceroso, es decir displasia (displasia epitelial del cáncer de células escamosas) hasta el cáncer invasivo. Dependiendo del caso, la enfermedad puede permanecer en el estadio de displasia sin avanzar hasta el cáncer. Por otra parte, existe un número considerable de casos en los que la displasia puede progresar rápidamente a cáncer avanzado. En vista de la situación, puede ser importante para un diagnóstico más preciso del cáncer identificar una molécula directamente involucrada en el desarrollo del cáncer cervical.

La entrada a la base de datos de EMBL que tiene No. de acceso AF479418 describe el ARNm de *Homo sapiens* FOE que comprende la secuencia codificadora completa.

Dobie (Genetics 157 (2001), 1623-1637) se ocupa de la identificación de los modificadores de herencia de cromosomas en *Drosophila melanogaster*. Este artículo describe que el polipéptido WAPL puede estar involucrado en la herencia cromosómica fiel, que es una actividad biológica fundamental en la que los errores contribuyen a defectos de nacimiento y progresión del cáncer.

La entrada a la base de datos EMBL que tiene No. de acceso D8745 describe una secuencia codificadora parcial del gen humano KTAA0261.

Descripción de la invención

Como se describió anteriormente, en el proceso en el que la infección de HPV de la célula epitelial cervical induce el desarrollo de un cáncer invasivo por medio de un estado precanceroso, displasia, se consideraría que su origen directo es un mecanismo donde está deteriorada la actividad de inhibición de la expresión de la proteína supresora de tumores p53 o la proteína supresora de tumores pRB, que ha inhibido la expresión de algún oncogén, y el daño lleva al oncogén a un estado de expresión de alto nivel. En consecuencia, se debe identificar en primer término la secuencia de nucleótidos completa del oncogén y una proteína oncogénica codificada de este modo, que abre un camino para desarrollar medios para inhibir las funciones bioquímicas de la proteína oncogénica y además medios para bloquear un mecanismo de formación de cáncer avanzado por la proteína oncogénica.

Por otra parte, la identificación de la secuencia de nucleótidos completa del oncogén y la secuencia de aminoácidos de la proteína oncogénica allí codificada puede permitirnos producir una sonda de ácido nucleico para detectar la expresión de un ARNm transcrito del oncogén o para generar un anticuerpo específico para la proteína oncogénica con el uso de una proteína oncogénica recombinante de esta. En otras palabras, puede permitirnos desarrollar un medio de diagnóstico que utilicen la sonda de ácido nucleico o anticuerpo específico, que sea útil para diagnosticar una etapa temprana del curso de desarrollo hacia un cáncer invasivo a través de un estado precanceroso, la displasia, que es causado por la infección con HPV en el cuello uterino.

Para resolver los problemas anteriores, un propósito de la presente invención es identificar la secuencia de nucleótidos completa de un nuevo oncogén humano y la secuencia de aminoácidos de una proteína oncogénica codificada en el mismo, que está directamente involucrada en un mecanismo de formación de cáncer, por ejemplo cáncer cervical

causado por la infección con HPV en células epiteliales cervicales y también para proporcionar un polinucleótido de longitud completa que codifique una cadena peptídica de la proteína oncogénica, que derive del nuevo oncogén, que se pueda usar para la producción recombinante de la proteína oncogénica, así como la cadena peptídica de la proteína oncogénica producida en forma recombinante con ella.

5

Hemos estudiado intensamente para resolver los problemas anteriores y finalmente hemos hallado y clonado un gen que incrementa la expresión en una célula de cáncer cervical cuando se añade una hormona ambiental a la misma. Hemos concluido que el gen clonado es uno de los oncogenes, porque

- 10 (1) el gen está altamente expresado en una célula de carcinoma;
- (2) el cáncer cervical es causado por la infección con HPV, y la expresión de las proteínas E6 y E7 por transducción de los genes E6 y E7 desde el HPV a la célula potencia la expresión de dicho gen;
- 15 (3) la proteína p53 inhibe la actividad de la región promotora de dicho gen;
- (4) la carencia o mutación de la proteína p53 está efectivamente involucrada en el desarrollo del cáncer cervical;
- (5) la expresión de dicho gen puede ser inhibida por una doble hebra de ARN de interferencia de cadena corta (ARNsi) para detener el crecimiento del cáncer, y después de otras investigaciones, hemos logrado la presente invención.

20

En consecuencia, un polinucleótido del oncogén de acuerdo con la presente invención es un nuevo polinucleótido del oncogén derivado de seres humanos que involucra el desarrollo del cáncer cervical, que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. No.1. En particular, es el polinucleótido en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No.1 es una secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. No.2.

25

La presente descripción también proporciona un péptido o sus sales producidas en forma recombinante, sobre la base del polinucleótido del oncogén anterior de acuerdo con la presente invención. Específicamente, el péptido recombinante de la presente invención es un péptido recombinante o sus sales, que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No.1. En particular, puede ser una proteína oncogénica recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No.1. La presente invención también proporciona un vector recombinante que comprende un polinucleótido que codifica el péptido recombinante, que se puede usar para preparar dicho péptido recombinante con el mismo. Por ejemplo, cuando se dirige a la proteína oncogénica recombinante de la presente invención que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No.1, dicho vector recombinante para el mismo es un vector recombinante que contiene un polinucleótido del oncogén que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1, en particular que contiene un polinucleótido en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1 es una secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. No.2.

30

La presente descripción también proporciona una célula transformada producida por transformación de una célula huésped que utiliza dicho vector recombinante; por ejemplo, una célula transformada producida transformando una célula huésped con el vector recombinante dirigido a dicha proteína oncogénica recombinante de la presente invención. En consecuencia, un proceso para producir el péptido recombinante o sus sales de la presente invención es un proceso para producir un péptido recombinante o sus sales derivado de un oncogén de la presente invención que comprende las etapas de:

45

cultivar la célula transformada anterior para permitir que la célula transformada produzca el péptido recombinante de la presente invención; y

50

recolectar el péptido recombinante producido a partir del cultivo. En particular, puede ser preferentemente un proceso para producir una proteína oncogénica recombinante de la presente invención que comprende las etapas de:

55

cultivar dicha célula transformada en la que se ha transformado el gen de ADN de longitud completa para permitir que la célula transformada produzca la proteína oncogénica recombinante de la presente invención; y

recolectar la proteína oncogénica recombinante producida del cultivo.

60

Con el uso del anterior péptido recombinante de la presente invención, la presente descripción proporciona un anticuerpo que es un anticuerpo específico generado utilizando el péptido recombinante como inmunógeno. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo que exhibe una reactividad específica con la secuencia parcial de aminoácidos de los restos 50 a 66 u 814 a 1037 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No.1.

65

Por otra parte, la presente invención proporciona un kit de anticuerpos reactivos para una reacción antígeno-anticuerpo que comprende dicho anticuerpo específico de la invención, disponible para detectar una proteína oncogénica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1 o un fragmento peptídico derivado de la proteína oncogénica. Alternativamente, la presente invención proporciona un kit para diagnóstico que se puede utilizar para la

detección de una proteína oncogénica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No.1 o un fragmento peptídico derivado de la proteína oncogénica por medio de una reacción antígeno-anticuerpo, que comprende el anticuerpo específico de la presente invención.

5 La presente invención también proporciona un polinucleótido antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos parcial de la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. No.2, que es un fragmento de ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con la porción de ácidos nucleicos Nos. 2511 a 2813 de la SEQ ID NO:2. Además, en lo que hace a un kit de hibridación de sonda de acuerdo con la presente invención, también proporciona un kit de hibridación de sonda disponible para detectar un
10 ARNm que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. No.2, su secuencia parcial de nucleótidos o ADNc preparado por el ARNm, que comprende el anterior polinucleótido antisentido como sonda de ADN. Alternativamente, la presente invención también proporciona un kit de diagnóstico disponible para detectar la expresión de ARNm que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. No.2, que se traduce en una proteína oncogénica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No.1, por medio de un método de hibridación de sonda, que
15 comprende dicho polinucleótido antisentido como sonda de hibridación.

Por otra parte, la presente invención también proporciona un par de cebadores para la amplificación por PCR del ADNc que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. No.2, que consiste en cebadores apareados de:

20 una secuencia de nucleótidos:

5'-TTGGATCCATGACATCCAGATTTGGGAAAACATACAGTAGG-3'; y

25 una secuencia de nucleótidos:

5'-TTGAATTCCTAGCAATGTTCCAAATATTCAATCACTCTAGA-3', y también la presente invención proporciona un par de cebadores para la amplificación por PCR de una cadena parcial en ADNc que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. No.2, que consiste en cebadores apareados de:

30 5'-GAATTCATAGGCACAGCGCTGAACTGTGTG-3'; y

5'-TTGAATTCCTAGCAATGTTCCAAATATTCA-3'.

Por lo demás, en cuanto a una invención de una doble hebra de un ARN de interferencia de cadena corta, la presente
35 invención proporciona una doble hebra de un ARN de interferencia de cadena corta capaz de inhibir la expresión del ARNm que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. No.2 en una célula de cáncer cervical, en la que la doble hebra del ARNsí tiene una secuencia de nucleótidos: CGGACTACCCTTAGCACAA. Además, también se puede aplicar a una composición farmacéutica para inhibir la expresión de ARNm que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID. No.2 en una célula de cáncer cervical para detener el crecimiento de las células del carcinoma, que comprenden dicha cadena doble de ARN de interferencia de cadena corta de la presente invención.
40

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la comparación de una secuencia de aminoácidos entre una dWAPL de *Drosophila* informada y
45 una hWAPL de la presente invención.

La Fig. 2 muestra un alineamiento de aminoácidos idénticos o similares a los de dWAPL en una secuencia de aminoácidos parcial de los aminoácidos 623 a 1185 que se hallan en el lado del extremo C-terminal para la hWAPL de la presente invención.
50

La Fig. 3 muestra muy alta homología entre las secuencias de aminoácidos de una proteína de WAPL humana y una proteína de WAPL de ratón.

La Fig. 4 muestra los resultados del análisis de transferencia Western para extractos de células Saos-2 (calles 2, 3)
55 y células NIH3T3 (calle 1) utilizando un anticuerpo anti-hWAPL-N y un anticuerpo anti-hWAPL-C.

La Fig. 5 muestra (A): La transferencia Northern para evaluar un nivel de expresión de una proteína hWAPL en células de carcinoma (T) de cáncer ovárico, cáncer pulmonar, carcinoma colorrectal, cáncer del cuerpo uterino y cáncer cervical en comparación con las células normales (N) que corresponden a las nombradas; (B): los resultados de la PCR en tiempo real para confirmar la expresión del gen hWAPL en células de carcinoma (T) de cáncer cervical, cáncer del cuerpo uterino, cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer renal, carcinoma colorrectal, células normales (N) en comparación con las correspondientes a las citadas; y (C): los resultados de la detección por RT-PCR de la expresión de ARNm del gen E6/E7 derivado del HPV en células de carcinoma (T).
60

La Fig. 6 muestra (A): transferencia Western para confirmar la expresión de la proteína hWAPL, que es inducida por las proteínas recombinantes E6 y E7 derivadas de HPV 16, y por lo tanto escisión de la proteína supresora p53 en células HDK1; y (B): transferencia Western para confirmar la inhibición de la transcripción de los genes E6 y E7, aumento del nivel de la proteína supresora p53 e inhibición de la expresión de la proteína hWAPL por E2b derivado de HPV.
65

La Fig. 7 muestra (A): inestabilidad cromosómica e incremento de poliploidía; y (B): aumento de la frecuencia de formación de micronúcleos inducida por la sobreexpresión de una proteína fusionada GFP-hWAPL en células HeLa.

La Fig. 8 muestra inestabilidad cromosómica y aumento de la frecuencia de multinucleación inducida por la sobreexpresión de una proteína fusionada GFP-hWAPL en células HeLa.

La Fig. 9 muestra la inducción de formación de cáncer de los fibroblastos NIH 3T3 por la proteína hWAPL, específicamente (A): formación de una estructura focal al cultivar una cepa celular HA-hWAPL 3T3; (B): formación de un tumor en un ratón lampiño, al que se ha inyectado la cepa celular HA-hWAPL 3T3; (C): sobreexpresión de la proteína hWAPL con cola de HA en una región formadora de tumor; y (D): mitosis heterotípica en una célula cancerosa.

La Fig. 10 muestra los resultados de la evaluación del efecto inhibidor del crecimiento celular por ARNsi de hWAPL en células SiHa derivadas del cáncer cervical HPV16-positivo, que se presenta con un gráfico del número de células ($\times 10^3$ unidades) (en ordenadas) en función del tiempo de transducción del ARNsi (horas en unidades) (en abscisas).

Modo óptimo de llevar a la práctica la invención

La presente invención se describirá en detalle de aquí en adelante.

Hemos buscado una proteína derivada de seres humanos que es un factor inductor para la inestabilidad cromosómica, asumiendo que la inestabilidad cromosómica estaría considerablemente involucrada en un mecanismo de formación de cáncer en una célula de cáncer cervical. Hemos buscado en particular una proteína que tiene un elevado potencial para inducir heteroploidía o formación de isogenes entre los eventos de inestabilidad cromosómica.

Hemos notado que se ha informado a la proteína dWAPL como una proteína que controla una estructura de heterocromatina durante una interquinesis del proceso de meiosis, entre una variedad de proteínas derivadas de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), cuyos genes genómicos han sido los más estudiados entre los animales. Específicamente, hemos hallado que cuando la proteína exhibe semejante función para controlar la estructura de heterocromatina que se expresa en un proceso de mitosis en una célula normal, ocasionalmente se puede inducir heteroploidía o formación de isogenes. Hemos estudiado en primer término si una proteína que corresponde a dicha dWAPL es realmente codificada en un gen genómico humano. Sobre la base de la secuencia de nucleótidos informada del gen dWAPL (No. de acceso en GenBank: U40214), hemos buscado fragmentos que muestran semejanza significativa con fragmentos de ADNc registrados en GenBank como fragmentos de genes originados en seres humanos y hemos seleccionado el fragmento KIAA0261 como el que comprende una secuencia de nucleótidos similar al gen dWAPL.

Para identificar un ADNc de longitud completa que comprende el fragmento KIAA0261, hemos buscado en la base de datos EST una secuencia de nucleótidos con marca de expresión derivada de humanos, que puede ser un fragmento que comprende una parte de no traducción que es presumiblemente una secuencia de nucleótidos corriente arriba que se halla en el lado 5' del fragmento KIAA0261, y hemos seleccionado los clones de EST: BE410177, BF79516 y BE257022.

Hemos determinado una secuencia de nucleótidos corriente arriba que se halla en el lado 5' del fragmento KIAA0261, usando un método 5'-RACE con referencia a los clones de EST. Además, debido a que existe una alta probabilidad de que una proteína con una función similar a la dWAPL se exprese realmente en una célula que tiene un proceso de meiosis, hemos clonado un ADNc de longitud completa que comprende la secuencia de nucleótidos del fragmento KIAA0261 así como la secuencia de nucleótidos corriente arriba determinada anteriormente en el lado 5' del mismo, usando una biblioteca de ADNc disponible en el comercio, es decir, un kit de ADNc testicular (Marathon-Ready™ ADNc Kit; Clontech Inc.) como molde.

La secuenciación práctica ha indicado que la región codificadora del ADNc de longitud completa clonado tiene 3570 pares de bases, de la que se deduce una secuencia de aminoácidos con 1190 aminoácidos correspondientes a la misma. Esta se denomina "WAPL humana (hWAPL)" como proteína derivada humana similar a la proteína dWAPL, y el gen correspondiente se denomina "gen hWAPL". La secuencia de nucleótidos de longitud completa que se corresponde con el ORF del gen hWAPL está representada por la SEQ. ID. No.2, y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína hWAPL está representada por la ID. No. 1. La comparación de la secuencia de aminoácidos codificada por el ORF del gen hWAPL de la presente invención, es decir, la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína hWAPL, con la secuencia de aminoácidos de la proteína dWAPL indica, como se muestra en la Fig. 1, que existe una identidad del 35% y una similitud del 53% para una secuencia parcial de los aminoácidos 623 a 1185 que se halla en la región del extremo C-terminal. Los aminoácidos que exhiben tal identidad y similitud se muestran en la Fig. 2.

Además, hemos clonado un ADNc que codifica una homóloga de la misma derivada de ratón, una proteína WAPL de ratón, asumiendo que algunos mamíferos diferentes de los seres humanos también pueden tener una proteína correspondiente. Después de su secuenciación, se compararon las secuencias de aminoácidos allí codificadas. En la práctica, se ha confirmado que la proteína WAPL humana y la proteína WAPL de ratón muestran muy elevada homología entre sí. La Fig. 3 muestra el resultado del alineamiento comparativo. Hemos registrado la secuencia de nucleótidos de longitud completa para la región codificadora del gen WAPL humano con el No. de acceso AB065003 en DDBJ/EMBL/GenBank.

ES 2 331 995 T3

Hemos realizado el análisis de transferencia Western para extractos de células Saos-2 y células NIH3T3, usando un anticuerpo anti-hWAPL-N y un anticuerpo anti-hWAPL-C, que son anticuerpos específicos para la cadena peptídica de la proteína WAPL humana, como se explica en el Ejemplo 6. Como se muestra en la Fig. 4, los resultados han revelado una banda de una proteína reactiva al anticuerpo con aproximadamente 140 kDa. En consecuencia, se ha confirmado que la proteína WAPL humana está realmente presente en alguna medida en la célula derivada de humanos.

Por otra parte, sobre la base de los diversos métodos de confirmación siguientes:

Ejemplo 2: expresión del gen hWAPL en un tejido de cáncer humano;

Ejemplo 3: inducción de la expresión del gen hWAPL por E6 y E7 derivadas del HPV tipo 16;

Ejemplo 4: inhibición de la actividad promotora del producto génico hWAPL por la proteína supresora p53;

Ejemplo 7: inducción de inestabilidad cromosómica por la proteína hWAPL;

Ejemplo 8: inducción de formación de cáncer de fibroblastos NIH 3T3 por la proteína hWAPL, se puede concluir que el gen hWAPL es un oncogén al menos involucrado en un mecanismo de desarrollo del cáncer cervical.

El plásmido pGEMhWAPL que comprende el ADNc de longitud completa del gen hWAPL, que se usa para producir el transformante que contiene el ADNc de longitud completa del gen WAPL; la cepa de *Escherichia coli* DH5 pGEMhWAPL que se obtuvo en el Ejemplo 1, según se describe más adelante, ha sido depositado el 7 de enero de 2003 como fecha de depósito original, en el International Patent Organism Depositary (National Institute of Bioscience and Human-Technology) del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology en Chuo 6th, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaragi, 305-8566, con el número de depósito de FERM BP-8269 en el International Depositary Authority en cumplimiento del Tratado de Budapest.

También hemos confirmado que la expresión de la proteína hWAPL como producto del gen hWAPL es inhibida empleando una doble hebra del ARN de interferencia de cadena corta (ARNsi). Específicamente, una doble hebra del ARN de interferencia de cadena corta (ARNsi) que exhibe semejante actividad de inhibición de expresión puede incluir, por ejemplo, un ARNsi que tiene la secuencia de nucleótidos: CGGACTACCCTTAGCACAA. En tal caso, también se inhibe el crecimiento ulterior de las células de carcinoma, de modo que se puede frenar el desarrollo del cáncer.

En cuanto a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No.1 de la presente invención, sus ejemplos pueden incluir una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de aproximadamente 70% o más, con preferencia aproximadamente 90% o más, más preferiblemente 90% o más, con máxima preferencia aproximadamente 95% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No 1.

En cuanto a la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No 1, puede ser un péptido tal que tenga una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No.1 y posea una actividad sustancialmente equivalente a la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No 1.

La actividad sustancialmente equivalente puede incluir, por ejemplo, la actividad de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No.1, tal como una función para inducir cáncer, actividad enzimática, actividad de transcripción y actividad de unión con una proteína de unión para la misma.

El término “sustancialmente equivalente”, como se usa en la presente, significa que estas actividades son de naturaleza idéntica (por ejemplo, en términos bioquímicos o farmacológicos).

Ejemplos de la secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No.1 incluyen:

- (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No.1;
- (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene supresiones de 1 a 30, preferiblemente 1 a 20, más preferiblemente 1 a 10 aminoácidos, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No.1;
- (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene adición de 1 a 30, preferiblemente 1 a 20, más preferiblemente 1 a 10 aminoácidos, a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No.1;
- (iv) una secuencia de aminoácidos que tiene inserción de 1 a 30, preferiblemente 1 a 20, más preferiblemente 1 a 10 aminoácidos, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No.1;
- (v) una secuencia de aminoácidos que tiene reemplazos de 1 a 30, preferiblemente 1 a 20, más preferiblemente 1 a 10 aminoácidos, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No.1 con otros aminoácidos; y

- (vi) una secuencia de aminoácidos que tiene la modificación combinada de dos o más seleccionados de los anteriores (ii) a iv).

Un ejemplo de una proteína de la presente invención puede ser una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No. 1.

Un péptido parcial puede ser cualquiera de los péptidos parciales de la proteína de la presente invención descritos anteriormente, y en general es un péptido que consiste en al menos 5 o más, o al menos 10 o más, aminoácidos, y también puede tener una actividad equivalente a una proteína de la presente invención.

En una proteína de la presente invención o su péptido parcial, el extremo izquierdo es el extremo N-terminal (extremo amino-terminal) mientras que el extremo derecho es el extremo C-terminal (extremo carboxi-terminal) de acuerdo con la notación convencional para péptidos.

En la proteína de la presente invención que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No.1, se puede seleccionar el extremo C-terminal de carboxi (-COOH), carboxilato (-COO⁻), amida (-CONH₂) y éster (-COOR).

Los ejemplos de R para el éster incluyen alquilos C₁₋₆ tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y n-butilo; cicloalquilos C₃₋₈ tales como ciclopentilo y ciclohexilo; arilos C₆₋₁₂ tales como fenilo y α -naftilo; fenil-alquilos C₁₋₂ tales como bencilo y fenetilo; aralquilos C₇₋₁₄ tales como α -naftil-alquilos C₁₋₂ que incluyen α -naftilmetilo; y pivaloiloximetilo comúnmente usado como éster para aplicación oral.

Cuando una proteína de la presente invención tiene un grupo carboxi (o carboxilato) en una posición diferente del extremo C-terminal, una proteína en la que el grupo carboxi está amidado o esterificado, también es una proteína de la presente invención. El éster de la presente puede ser el éster C-terminal descrito anteriormente.

Por otra parte, ejemplos de una proteína de la presente invención incluyen una proteína en la que un grupo amino de un resto de aminoácido N-terminal (por ejemplo, resto de metionina) está protegido por un grupo protector tal como acilo C₁₋₆ que incluye alcanofilo C₁₋₆ tal como formilo y acetilo; una proteína en la que el resto de ácido glutámico N-terminal formado por la escisión *in vivo* se convierte a la forma de ácido piroglutámico; una proteína en la que un sustituyente de una cadena lateral de un resto de aminoácido de la molécula (por ejemplo, -OH, -SH, amino, imidazol, indol y guanidino) está protegido por un grupo protector apropiado (por ejemplo, tal como acilos C₁₋₆ que incluyen normalmente alcanofilo C₁₋₆ tal como formilo y acetilo); y una proteína conjugada tal como una denominada glicoproteína en la que está unida una cadena de azúcar.

Una sal de una proteína de la presente invención puede ser una sal con un ácido (por ejemplo, ácidos inorgánicos y orgánicos) o base (por ejemplo, una sal de metal alcalino) fisiológicamente aceptable, en particular preferiblemente una sal de adición de ácido fisiológicamente aceptable. Ejemplos de tales sales incluyen sales con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido sulfúrico, y con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metansulfónico y ácido bencensulfónico. De aquí en adelante, tal sal también está incluida en una proteína de la presente invención.

Una proteína de la presente invención o su sal se puede preparar por un proceso conocido para la purificación de una proteína de células humanas o de mamífero de sangre caliente, o alternativamente cultivando un transformante producido por la transformación con un ADN que codifica la proteína que se describe más adelante.

Cuando se produce a partir de tejidos o células humanas o de mamífero, el tejido o las células humanas o de mamífero se homogeneiza y extrae con un ácido. El extracto posteriormente se purifica por procedimientos cromatográficos combinados tales como cromatografía en fase reversa y cromatografía de intercambio iónico para aislar un producto deseado.

Un polinucleótido que codifica una proteína oncogénica de la presente invención puede ser cualquier polinucleótido que comprende la anterior secuencia de nucleótidos que codifica una proteína oncogénica de la presente invención (ADN o ARN, preferiblemente ADN). El polinucleótido puede ser un ADN o ARN tal como un ARNm que codifica una proteína oncogénica de la presente invención, que puede ser monocatenario o bicatenario. Cuando es bicatenario, puede ser ADN bicatenario, un ARN bicatenario o un híbrido de ADN:ARN. Cuando es monocatenario, puede ser una cadena homsentido, es decir, una cadena codificadora, o una cadena antisentido, es decir, una cadena no codificadora.

Un polinucleótido que codifica una proteína de la presente invención se puede usar para cuantificar un ARNm de una proteína de la presente invención, de acuerdo con un método conocido o su modificación, por ejemplo un método descrito en Experimental Medicine Extra Edition "Novel PCRs and their applications", 15 (7), 1997.

Un ADN que codifica una proteína de la presente invención puede ser cualquier ADN que comprende la anterior secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la presente invención, y puede ser un ADN genómico, una biblioteca de ADN genómico, el anterior ADNc derivado de célula/tejido, la biblioteca de ADNc derivada de célula/tejido anterior o un ADN sintético.

Un vector usado para una biblioteca puede ser un bacteriófago, plásmido, cósmido o fagémido. Una preparación de un ARN total o fracción de ARNm de la célula o tejido se puede usar para la amplificación por una Reacción en Cadena de Transcriptasa-Polimerasa Inversa directa (de aquí en adelante, denominada "RT-PCR").

Una secuencia de nucleótidos disponible para un ADN sonda de la presente invención puede ser cualquier secuencia tal como una secuencia de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID. No.2 en condiciones de alta rigurosidad y codifica una proteína que tiene una actividad sustancialmente equivalente a la de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No. 1.

Una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID. No.2 en condiciones de alta rigurosidad puede ser una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de aproximadamente 70% o más, preferiblemente aproximadamente 80% o más, más preferiblemente aproximadamente 90% o más, más preferiblemente aproximadamente 95% o más, con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID. No. 2.

La hibridación se puede realizar de acuerdo con un método conocido o su modificación, por ejemplo un método descrito en Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). Cuando se usa una biblioteca disponible en el comercio, la hibridación se puede realizar de acuerdo con un manual adjunto. Más preferiblemente, se puede realizar en condiciones de alta rigurosidad.

Las condiciones de alta rigurosidad pueden incluir, por ejemplo, una concentración de sodio de aproximadamente 19 a 40 mM, preferiblemente aproximadamente 19 a 20 mM y a temperatura de aproximadamente 50 a 70°C, preferiblemente aproximadamente 60 a 65°C, con máxima preferencia una concentración de sodio de aproximadamente 19 mM y una temperatura de aproximadamente 65°C.

Más específicamente, un ADN que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. No. 1 puede ser un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID. No. 2.

Un ADN que codifica un péptido parcial puede ser cualquier ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anterior péptido parcial, y puede ser un ADN genómico, una biblioteca de ADN genómica, el anterior ADNc derivado de célula/tejido, la biblioteca de ADNc derivado de célula/tejido anterior o un ADN sintético.

Un ADN que codifica un péptido parcial puede ser un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos parcial de un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID. No.2, o un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos parcial de un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID. No.2 en condiciones de alta rigurosidad y codifica una proteína que tiene una actividad sustancialmente equivalente a la de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID. No. 1.

La secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID. No. 2 se define como se describió anteriormente.

Un método de hibridación y las condiciones de alta rigurosidad puede ser como se describió anteriormente.

Un polinucleótido que comprende una parte de una secuencia de ADN que codifica una proteína de la presente invención o su péptido parcial o una parte de una secuencia de nucleótidos complementaria al ADN puede abarcar un ADN así como un ARN que codifica una proteína de la presente invención o su péptido parcial.

De acuerdo con la presente invención, un polinucleótido antisentido (ácido nucleico) capaz de inhibir la replicación o expresión de un gen de la proteína de la presente invención diseñado y sintetizado sobre la base de los datos de la secuencia de nucleótidos en un ADN que codifica la proteína de la presente invención clonada o determinada. Tal polinucleótido (ácido nucleico) se puede hibridar con un ARN de un gen de proteína de la presente invención para inhibir la síntesis o actividades del ARN, o regular o controlar la expresión de un gen de proteína de la presente invención por medio de la interacción con un ARN relacionado con una proteína de la presente invención. Un polinucleótido complementario a una secuencia seleccionada en el ARN relacionado con una proteína de la presente invención y un polinucleótido que se puede hibridar específicamente con el ARN relacionado con una proteína de la presente invención son útiles para regular o controlar la expresión *in vivo* o *in vitro* de un gen de proteína de la presente invención, y para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad. El término "correspondiente a", como se usa en la presente, significa homología o complementación a una secuencia particular de un nucleótido que incluye un gen, una secuencia de nucleótidos o un ácido nucleico. El término "correspondiente a" en términos de relación entre un nucleótido, una secuencia de nucleótidos o un ácido nucleico y un péptido (proteína) generalmente se refiere a un aminoácido de una proteína (péptido), un comando derivado de una secuencia de nucleótidos (ácido nucleico) o su secuencia complementaria. Los ejemplos de un dominio blanco preferible puede incluir un bucle de horquilla 5-terminal, una repetición de 6 pares de bases 5'-terminales, un dominio de no traducción 5'-terminal, un codón de iniciación de traducción de proteínas, un dominio codificador de proteínas, un codón de detención de traducción de ORF, un dominio de no traducción 3'-terminal, un dominio palindrómico 3'-terminal y un bucle de horquilla 3'-terminal en un gen de proteína de la presente invención, pero se puede seleccionar cualquier dominio de un gen de proteína de la presente invención como blanco.

La relación entre un ácido nucleico dado, un polinucleótido complementario con al menos una parte del dominio blanco y entre un blanco y un polinucleótido hibridizable se puede llamar "antisentido". Los ejemplos de un polinucleótido antisentido incluyen un polinucleótido que comprende 2-desoxi-D-ribosa, un polinucleótido que comprende D-ribosa, otros tipos de polinucleótidos como un N-glicósido de la base purina o pirimidina y otros polímeros que comprenden una estructura no nucleotídica (por ejemplo, un ácido nucleico de proteína disponible en el comercio y un polímero de ácido nucleico específico de secuencia sintética) u otro polímero que tiene un enlace especial aunque el polímero comprende un nucleótido que tiene una configuración que puede aceptar el apareamiento de bases o unión de bases que se observa en un ADN o ARN. Estos pueden ser un ADN bicatenario, un ADN monocatenario, un ARN bicatenario, un ARN monocatenario o un híbrido ADN:ARN. También pueden incluir polinucleótidos no modificados (u oligonucleótidos no modificados), los que tienen una modificación conocida tal como una cola conocida en la técnica, una terminación, metilación, reemplazo de al menos un nucleótido natural con un análogo y una modificación de nucleótido intramolecular; los que tienen un enlace no cargado (por ejemplo, metilfosfonato, fosfotriéster, fosforamido y carbamato); los que tienen un enlace cargado o un enlace que contiene azufre (por ejemplo, fosforotioato y fosforoditioato); los que tienen un grupo de cadena lateral que incluye una proteína (una nucleasa, un inhibidor de nucleasa, toxina, un anticuerpo, un péptido señal y poli-L-lisina) o un azúcar (por ejemplo, un monosacárido); los que comprenden un compuesto intercurrente (por ejemplo, acridina y psoraleno); los que comprenden un compuesto quelante (por ejemplo, un metal, un metal radiactivo, boro y un metal oxidante); los que comprenden un agente alquilante; y los que comprenden un enlace modificado (por ejemplo, un ácido nucleico α -anomérico). Los términos "nucleósido", "nucleótido" y "ácido nucleico", como se usan en la presente, pueden incluir no sólo los que contienen las bases purina y pirimidina pero también los que además contienen otra base heterocíclica modificada. Tal sustancia modificada puede contener purina y pirimidina metiladas, purina y pirimidina aciladas u otros heterociclos. Un nucleósido modificado y un nucleótido modificado pueden estar modificados en un resto de azúcar; por ejemplo, uno o más hidroxilos se pueden reemplazar por un grupo halógeno o alifático, o se pueden convertir en otro grupo funcional tal como éter y amina.

Un polinucleótido (ácido nucleico) antisentido de la presente invención es un ARN, ADN o ácido nucleico modificado (ARN, ADN). Los ejemplos de un ácido nucleico modificado incluyen, pero sin limitación, un derivado azufrado o derivado de tiofosfato de un ácido nucleico y los resistentes a la descomposición por una polinucleosidoamida o una oligonucleosidoamida. Un ácido nucleico antisentido de la presente invención se puede diseñar preferiblemente, por ejemplo, de modo que el ácido nucleico antisentido se haga más estable en una célula, que el ácido nucleico antisentido tenga una mayor permeabilidad en una célula, que tenga afinidad por una cadena homsentido blanco o si es tóxico, el ácido nucleico antisentido se torne menos tóxico.

Una variedad de tales modificaciones son bien conocidas en la técnica y han sido descritas, por ejemplo, en J. Kawakami *et al.*, Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke *et al.* ed, Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993.

Un ácido nucleico antisentido de la presente invención puede comprender un azúcar convertido y/o modificado, base y/o enlace, y de este modo se puede suministrar como una forma especial tal como un liposoma y una microesfera, se puede aplicar en terapia génica o se puede suministrar como un aducto. Los ejemplos de tal aducto incluyen un aducto policatiónico tal como polilisina que actúa como neutralizante para una carga de la estructura del fosfato y un aducto hidrófobo tal como un lípido que potencia la interacción con una membrana celular o que aumenta la captación de un ácido nucleico (por ejemplo, un fosfolípido y colesterol). Los ejemplos de un lípido preferible para la adición incluyen colesterol y sus derivados (por ejemplo, cloroformiato de colesterol y ácido cólico). Se puede unir a un extremo 3'- o 5'-terminal de un ácido nucleico por medio de una base, azúcar o enlace nucleosídico intramolecular. Otro grupo disponible puede ser, por ejemplo, un grupo de terminación ubicado en forma específica en un extremo 3'- o 5'-terminal en un ácido nucleico para prevenir la descomposición con una nucleasa tal como exonucleasa y ARNasa. Los ejemplos de tal grupo de terminación incluyen, pero sin limitación, los conocidos como grupo protector de hidroxilos en la técnica, tales como glicoles que incluyen polietilenglicol y tetraetilenglicol.

La inhibición de la actividad del ácido nucleico antisentido se puede determinar usando un transformante de la presente invención, un sistema de expresión génica *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, o un sistema de traducción *in vivo* o *in vitro* de una proteína de la presente invención. El ácido nucleico puede ser aplicado a una célula mediante alguno de los diversos métodos conocidos.

Un ADN que codifica una proteína de la presente invención se puede marcar por un método conocido; por ejemplo, marcación isotópica, marcación fluorescente (por ejemplo, marcación fluorescente con fluoresceína), biotinilación y marcación enzimática.

Un ADN que codifica completamente una proteína de la presente invención se puede clonar por amplificación con una PCR conocida usando un cebador de ADN sintético que comprende una secuencia de nucleótidos parcial en una proteína de la presente invención, o seleccionar un ADN integrado en un vector apropiado por hibridación con el marcado con un fragmento de ADN o ADN sintético que codifica una proteína parcial o de longitud completa de la presente invención. La hibridación se puede realizar, por ejemplo, por un método descrito en Molecular Cloning 2nd, J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. Cuando se usa una biblioteca disponible en el comercio, la hibridación se puede realizar de acuerdo con un manual adjunto.

ES 2 331 995 T3

Una secuencia de ADN se puede transformar usando un kit conocido tal como MutanTM super Express Km (Takara Shuzo Co., Ltd.), MutanTM-K (Takara Shuzo Co., Ltd), por un método conocido tal como ODA-LA PCR, método dúplex con brecha y método de Kunkel o una variación de los mismos.

Dependiendo de la aplicación, un ADN que codifica un péptido clonado se puede usar como tal o, si se desea, se puede usar después de la digestión con una enzima de restricción o adición de un ligador. El ADN puede tener ATG como codón de iniciación de traducción en el extremo 5'-terminal y TAA, TGA o TAG como codón de detención de traducción en el extremo 3'-terminal. El codón de iniciación de traducción o el codón de detención de traducción se pueden agregar usando un ADN adaptador sintético apropiado.

Se puede producir un vector de expresión de una proteína de la presente invención, por ejemplo, (i) escindiendo un fragmento de ADN deseado a partir de un ADN que codifica una proteína de la presente invención y (ii) ligando el fragmento de ADN corriente debajo de un promotor de un vector de expresión apropiado.

Los ejemplos de un vector que se pueden utilizar incluyen plásmidos derivados de *E. coli* (por ejemplo, pBR322, pBR325, pUC12 y pUC13); plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB110, pTP5 y pC194); plásmidos derivados de una levadura (por ejemplo, pSHI9 y pSH15); bacteriófagos tales como el fago λ ; virus de mamíferos tales como retrovirus, virus de vaccinia y baculovirus; pA1-11; pXT1; pRc/CMV; pRc/RSV; y pDNAI/Neo.

Un promotor usado en la presente invención puede ser cualquier promotor apropiado para un huésped utilizado en la expresión de genes. Por ejemplo, cuando se usa una célula de mamífero como huésped, se puede usar un promotor α de SR, un promotor de SV40, un promotor de HIV-LTR, un promotor de CMV o un promotor de HSV-TK.

Entre estos, es preferible usar un promotor de CMV (citomegalovirus) o un promotor α de SR. Cuando el huésped es una *Escherichia coli*, son preferibles un promotor de trp, un promotor de lac, un promotor de recA, un promotor de λ -PL, un promotor de lpp y un promotor de T7; cuando el huésped es un *Bacillus*, son preferibles un promotor de SPO1, un promotor de SPO2 y un promotor de penP; cuando el huésped es una levadura, son preferibles un promotor de PHO5, un promotor de aPGK, un promotor de GAP y un promotor de ADH. Cuando el huésped es una célula de insecto, son preferibles un promotor de polihetrina y un promotor de P10.

Si se desea, se puede utilizar otro vector de expresión, que incluye los que comprenden un potenciador, una señal de empalme, una señal de adición de poli-A, un marcador de selección y/o un origen de replicación SV40 (de aquí en adelante, algunas veces denominado "SV40ori"). Los ejemplos de marcador de selección incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (de aquí en adelante, algunas veces denominado "dhfr") [resistente a metotrexato (MTX)], un gen resistente a ampicilina (de aquí en adelante, algunas veces denominado "Ampr") y un gen resistente a neomicina (de aquí en adelante, algunas veces denominado "Neor", resistente a G418). En particular, cuando se usa el gen de dhfr como marcador de selección usando células de hámster chino con gen de dhfr suprimido, la integración de un gen deseado se puede seleccionar usando un medio deficiente en timidina.

Como marcador de selección, se usa un gen indicador o gen de resistencia a fármacos (New Biochemical Experimental Lectures (Shin Seikagaku Jikken Koza) 2, nucleic acid III, 3.6 Mammalian cell expression vector, p84-103).

Los ejemplos de combinación de un gen de resistencia a fármacos y un fármaco que se pueden usar incluyen:

- (1) una combinación de un gen de puromicina-N-acetiltransferasa y puromicina;
- (2) una combinación de un gen de aminoglicósido fosfotransferasa (APH) y G418;
- (3) una combinación de un gen de higromicina-B fosfotransferasa (HPH) e higromicina-B; y
- (4) una combinación de xantina-guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT) y micofenolato.

Cuando una cepa de célula progenitora es una cepa deficiente en hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) o en timidinaquinasa (TK), se puede usar una combinación de estos genes y HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina).

Se pueden usar el gen de dihidrofolato reductasa o de resistencia a ampicilina como gen marcador de selección.

Si es necesario, se añade una secuencia señal apropiada para un huésped al extremo N-terminal de una proteína de la presente invención. Cuando el huésped es una *Escherichia coli*, se puede usar una secuencia señal PhoA y una secuencia señal OmpA; cuando el huésped es un *Bacillus*, se puede usar una secuencia señal de α -amilasa y se puede usar una secuencia señal subtilisina; cuando el huésped es una levadura, se puede usar una secuencia señal MF α y una secuencia señal SUC2; cuando el huésped es una célula de mamífero, se puede usar una secuencia señal de insulina, una secuencia señal de α -interferón y una secuencia señal de molécula de anticuerpo.

Un vector que comprende un ADN que codifica una proteína de la presente invención construido de este modo se puede usar para producir un transformante.

ES 2 331 995 T3

Un huésped puede ser, por ejemplo, una *Escherichia coli*, un *Bacillus*, una levadura, una célula de insecto, un insecto o una célula de mamífero.

Los ejemplos de *Escherichia coli* incluyen *Escherichia coli* K12DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA), Vol. 60, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, Vol. 9, 309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, Vol.120, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, Vol.41, 459 (1969)] y C600 [Genetics, Vol. 39, 440 (1954)].

Los ejemplos de *Bacillus* incluyen *Bacillus subtilis* MI114 [Gene, Vol. 24, 255 (1983)] y 207-21 [Journal of Biochemistry, Vol. 95, 87 (1984)].

Los ejemplos de levadura incluyen *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D y 20B-12; *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913 y NCYC2036; y *Pichia pastoris* KM71.

En términos de células de insecto, cuando el virus es AcNPV, se puede usar una célula establecida derivada de larvas de oruga militar (célula de *Spodoptera frugiperda*; célula de Sf), una célula de MG1 derivada de intestino medio de *Trichoplusia ni*, una célula High Five™ derivada de un huevo de *Trichoplusia ni*, una célula derivada de *Mamestra brassicae* o una célula derivada de *Estigmena acres*. Cuando el virus es BmNPV, se puede usar una célula establecida derivada de gusano de seda (célula de *Bombyx mori* N; célula de BmN). Los ejemplos de célula Sf que se pueden usar incluyen una célula Sf9 (ATCC CRL1711) y una célula Sf21, que se han descrito en Vaughn, J. L. *et al.*, *In Vivo*, 13, 213-217 (1977)).

Los ejemplos de insecto incluyen larvas de gusano de seda [Maeda *et al.*, Nature, Vol.315, 592 (1985)].

Los ejemplos de célula de mamífero incluyen una célula COS-7 de simio (COST), Vero, una célula de hámster chino CHO (de aquí en adelante, denominada “célula CHO”), una célula de hámster chino CHO con gen dhfr suprimido (de aquí en adelante, denominada “célula CHO(dhfr-)”), una célula L murina, una AtT-20 murina, una célula de mieloma murino, una célula GH3 de rata y una FL humana.

Una *Escherichia coli* se puede transformar de acuerdo, por ejemplo, con un método descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. USA), Vol.69, 2110 (1972) o Gene, Vol.17, 107 (1982).

Un *Bacillus* se puede transformar de acuerdo, por ejemplo, con un método descrito en Molecular & General Genetics), Vol.168, 111 (1979).

Una levadura se puede transformar de acuerdo, por ejemplo, con un método descrito en Methods in Enzymology, Vol.194, 182-187 (1991) o Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.75, 1929 (1978).

Una célula de insecto o un insecto se pueden transformar de acuerdo, por ejemplo, con un método descrito en Bio/Technology, 6, 47-55 (1988).

Una célula de mamífero se puede transformar de acuerdo, por ejemplo, con un método descrito en Cell Technology Extra Issue 8, New Cell Technological Experiment Protocols. 263-267 (1995) (Shuju Co. Ltd.) o Virology, Vol.52, 456 (1973).

En consecuencia, se puede obtener un transformante que se ha transformado con un vector de expresión que comprende un ADN que codifica una proteína de la presente invención.

Cuando se cultiva un transformante para el que un huésped es una *Escherichia coli* o *Bacillus*, un medio apropiado usado para el cultivo es un medio líquido que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, materiales inorgánicos y demás necesarios para el cultivo del transformante. Los ejemplos de fuente de carbono incluyen glucosa, dextrina, almidón soluble y sacarosa. Los ejemplos de fuente de nitrógeno incluyen materiales inorgánicos y orgánicos tales como sales de amonio, nitratos, licor de maíz fermentado, peptona, caseína, extracto de carne, torta de soja y extracto de patata. Los ejemplos de material inorgánico incluyen cloruro de calcio, dihidrógeno fosfato de sodio y cloruro de magnesio. Se puede añadir extracto de levadura, vitaminas y/o factores de aceleración del crecimiento. El medio tiene convenientemente un pH de aproximadamente 5 a 8.

Un ejemplo preferible de medio para cultivar una *Escherichia coli* puede ser un medio M9 que contiene glucosa y ácido casamino [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor LaboHumanory, New York, 1972]. Si es necesario, se puede añadir un agente adicional tal como ácido 3β-indolilacrílico para conseguir una eficiente actividad promotora.

Cuando el huésped es una *Escherichia coli*, el cultivo se realiza generalmente a aproximadamente 15 a 43°C durante aproximadamente 3 a 24 horas bajo aireación y/o agitación, si es necesario.

Cuando el huésped es un *Bacillus*, el cultivo se realiza generalmente a aproximadamente 30 a 40°C durante aproximadamente 6 a 24 horas bajo aireación y/o agitación, si es necesario.

Cuando se cultiva un transformante cuyo huésped es una levadura, los ejemplos de medio de cultivo que se pueden usar incluyen un medio mínimo de Burkholder [Bostian, K. L. *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, 4505 (1980)] y un medio SD que contiene 0,5% de ácido casamino [Bitter, G. A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, 5330 (1984)]. El pH del medio se ajusta preferiblemente a aproximadamente 5 a 8. El cultivo se realiza generalmente a aproximadamente 20 a 35°C durante aproximadamente 24 a 72 horas bajo aireación y/o agitación, si es necesario.

Cuando se cultiva un transformante en el que el huésped es una célula de insecto o insecto, un medio de cultivo puede ser un medio para insecto de Grace (Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)) que contiene aditivos tales como 10% de suero bovino sin complemento, según corresponda. El pH del medio se ajusta preferiblemente a aproximadamente 6,2 a 6,4. El cultivo se realiza generalmente a aproximadamente 27°C durante aproximadamente 3 a 5 días bajo aireación y/o agitación, si es necesario.

Cuando se cultiva un transformante en el que el huésped es una célula de mamífero, los ejemplos de medio de cultivo incluyen un medio MEM que contiene aproximadamente 5 a 10% de suero bovino fetal [Science, Vol.122, 501 (1952)], un medio DMEM (Virology, Vol.8, 396 (1959)], un medio RPMI 1640 [The Journal of the American Medical Association, Vol. 199, 519 (1967)] y un medio 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, Vol. 73, 1(1950)]. El pH del medio se ajusta preferiblemente a aproximadamente 6 a 8. El cultivo se realiza generalmente a aproximadamente 30 a 40°C durante aproximadamente 15 a 60 horas bajo aireación y/o agitación, si es necesario.

Como se describió anteriormente, una proteína de la presente invención se puede producir en una región intracelular, en la membrana celular o en la región extracelular de una célula transformante.

Una proteína de la presente invención se puede aislar y purificar del cultivo anterior, por ejemplo, por el siguiente método.

Una proteína de la presente invención se puede extraer de bacterias o células cultivadas, según corresponda, por un método en que después del cultivo, se recolectan las bacterias o las células por un procedimiento conocido, se suspenden en un tampón apropiado, las bacterias o las células se lisan usando ultrasonido, lisozimas y/o congelamiento y descongelamiento, posteriormente se centrifugan o filtran para dar un extracto bruto de una proteína de la presente invención. El tampón puede contener un modificador de proteínas tal como urea e hidrocloreto de guanidina y un tensioactivo tal como Triton X-100TM. Cuando un péptido se secreta en un medio de cultivo, las bacterias o las células se separan del sobrenadante por un método conocido después de cultivar y posteriormente se recolecta el sobrenadante.

Una proteína de la presente invención contenida en el sobrenadante del cultivo o el extracto obtenido de este modo se puede purificar por una combinación apropiada de métodos de separación/purificación conocidos. Los ejemplos de tales métodos de separación/purificación conocidos son métodos que utilizan la solubilidad, tales como extracción salina o precipitación en disolvente; métodos que utilizan principalmente una diferencia de peso molecular tales como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel y electroforesis en gel de poliácridamida-SDS; métodos que utilizan una diferencia de carga tales como cromatografía de intercambio iónico; métodos que utilizan la afinidad específica tales como cromatografía de afinidad; métodos que utilizan una diferencia de hidrofobicidad tales como cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa; y métodos que utilizan una diferencia de punto isoeléctrico tales como isoelectroenfoque.

Cuando la proteína de la presente invención así obtenida es una forma libre, se puede convertir en una sal por un método conocido o una modificación del mismo. A la inversa, cuando se obtiene como sal, se puede convertir en una forma libre u otra sal por un método conocido o una modificación del mismo.

Antes o después de la purificación, una proteína de la presente invención producida por un recombinante puede ser atacada por una enzima modificadora de proteínas apropiadas modificadas según corresponda o para remover parcialmente un péptido. Los ejemplos de enzima modificadora de proteínas incluyen tripsina, quimiotripsina, arginil-endopeptidasa, proteína quinasa y glicosidasa.

Un anticuerpo contra la proteína de la presente invención puede ser policlonal o monoclonal siempre que sea un anticuerpo que pueda reconocer a un anticuerpo contra una proteína de la presente invención.

El anticuerpo contra una proteína de la presente invención se puede producir por un método conocido para preparar un anticuerpo o antisuero usando una proteína de la presente invención como antígeno.

60 *Preparación de un anticuerpo monoclonal*

(a) Preparación de una célula productora de anticuerpos monoclonales

Una proteína de la presente invención se aplica sola o en combinación con un portador y un diluyente a un sitio en un animal de sangre caliente en el que se puede producir un anticuerpo. Para la aplicación, se puede aplicar un adyuvante de Freund completo o incompleto para aumentar la capacidad para producir anticuerpos. En general se aplica una vez durante 2 a 6 semanas y aproximadamente 2 a 10 veces en total. Los ejemplos de animales de sangre caliente incluyen mono, conejo, perro, cobayo, ratón, rata, oveja, cabra y aves, preferiblemente ratón y rata.

Para preparar una célula productora de anticuerpos monoclonales, se selecciona un individuo que exhiba un título de anticuerpos de un animal de sangre caliente inmunizado por un antígeno tal como ratón y se aísla el bazo o un ganglio linfático 2 a 5 días después de la inmunización final. Una célula productora de anticuerpos contenida en la muestra aislada se puede fusionar a una célula de mieloma del mismo o diferente animal para preparar un hibridoma productivo de anticuerpos monoclonales. Se puede determinar un título de anticuerpos en un antisuero, por ejemplo, haciendo reaccionar un péptido marcado que se describe posteriormente con el antisuero y midiendo posteriormente la actividad del marcador unido a un anticuerpo. La fusión se puede realizar por un método conocido tal como el método de Kaehler-Milstein [Nature, 256, 495 (1975)]. Los ejemplos de acelerador de fusión incluyen polietilenglicol (PEG) y virus Sendai, preferiblemente PEG.

Los ejemplos de célula de mieloma incluyen las de un animal de sangre caliente tales como NS-1, P3U1, SP2/0 y AP-1, preferiblemente P3U1. Una relación numérica preferible de células productoras de anticuerpos (células del bazo) a células de mieloma es aproximadamente 1: 1 a 20:1, se añade PEG (preferiblemente PEG1000 a PEG6000) a una concentración de aproximadamente 10 a 80%, y la fusión celular se puede realizar en forma eficiente por incubación a 20 a 40°C, preferiblemente 30 a 37°C durante 1 a 10 min.

Un hibridoma productivo de anticuerpos monoclonales se puede seleccionar por alguno de varios métodos; por ejemplo, añadiendo un sobrenadante de cultivo de hibridoma a una fase sólida (por ejemplo, una microplaca) en la que se ha adsorbido un antígeno peptídico (proteína) en forma directa o en combinación con un portador, añadiendo posteriormente un anticuerpo anti-inmunoglobulina (cuando una célula usada para la fusión celular es una célula murina, se utiliza un anticuerpo inmunoglobulina anti-ratón) o proteína A marcada con un agente radiactivo o enzima, y detectando finalmente un anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida, o alternativamente añadiendo un sobrenadante de cultivo de hibridoma a una fase sólida en la que se ha adsorbido un anticuerpo o proteína A anti-inmunoglobulina, añadiendo un péptido marcado con un agente radiactivo o enzima, y detectando finalmente un anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida.

Un anticuerpo monoclonal se puede seleccionar por un método conocido o su modificación. En general se puede usar un medio para una célula de mamífero que contiene HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Un medio para la selección y mejoramiento genético puede ser cualquier medio en el que se puede cultivar un hibridoma; por ejemplo, un medio RPMI 1640 que contiene 1 a 20%, preferiblemente 0 a 20% de suero bovino fetal, un medio GIT que contiene 1 a 10% de suero bovino fetal (Wako Pure Chemicals Co. Ltd) y un medio libre de suero para cultivar un hibridoma (SFM-101, Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.). La temperatura de cultivo es generalmente 20 a 40°C, preferiblemente aproximadamente 37°C. El período de cultivo es generalmente 5 días a 3 semanas, preferiblemente 1 a 2 semanas. El cultivo se puede realizar generalmente bajo atmósfera de 5% de dióxido de carbono gaseoso. El título de anticuerpos en un sobrenadante de cultivo de hibridoma se puede determinar como se describe para la determinación de un título de anticuerpos en el antisuero anterior.

(b) Purificación de un anticuerpo monoclonal

Un anticuerpo monoclonal se puede separar y purificar por un método conocido que incluye métodos de separación/purificación para una inmunoglobulina tal como salazón, precipitación con alcohol, precipitación isoeléctrica, electroforesis, un método de adsorción y desorción con un intercambiador de iones (por ejemplo, DEAE), ultracentrifugación, filtración en gel y una purificación específica en la que un anticuerpo es recolectado exclusivamente por un adsorbente activado tal como una fase sólida de unión al antígeno, proteína A o proteína G para disociar el enlace para obtener el anticuerpo.

Preparación de un anticuerpo policlonal

Un anticuerpo policlonal de la presente invención se puede preparar de acuerdo con un método conocido o su modificación. Por ejemplo, se prepara un inmunógeno (antígeno peptídico) o su complejo con una proteína portadora, un animal de sangre caliente se inmuniza con este como se describió para el proceso de preparación para el anterior anticuerpo monoclonal, se recolecta un producto que contiene un anticuerpo contra una proteína de la presente invención del animal inmunizado, y después de la separación y purificación, se puede preparar el anticuerpo.

En términos de un complejo de un inmunógeno y una proteína portadora para inmunizar a un animal de sangre caliente, se puede emplear cualquier tipo de proteínas portadoras y cualquier relación de mezcla del portador al hapteno siempre que se pueda producir eficientemente un anticuerpo contra un hapteno inmunizado por entrecruzamiento con el portador; por ejemplo, aproximadamente 0,1 a 20 partes en peso, preferiblemente aproximadamente 1 a 5 partes en peso de albúmina sérica bovina, tiroglobulina bovina, hemocianina o similares se acoplan a 1 parte en peso del hapteno.

Se pueden usar diversos agentes de condensación para acoplar el hapteno con el portador, que incluyen glutaraldehído, carbodiimida, éster de maleimida activado y éster activado, reactivos que tienen grupos tiol y/o un ditiopiridilo.

Un producto de condensación se aplica solo o en combinación de un portador y un diluyente, a un sitio de un animal de sangre caliente en el que se puede producir un anticuerpo. Para la aplicación, se puede aplicar un adyuvante de Freund completo o incompleto para aumentar la capacidad para producir anticuerpos. En general se aplica una vez durante 2 a 6 semanas y aproximadamente 3 a 10 veces en total.

Un anticuerpo policlonal se puede recolectar de la sangre o ascitis, preferiblemente de la sangre de un animal de sangre caliente inmunizado como se describió anteriormente.

Se puede determinar el título de anticuerpo policlonal en un antisuero como se describió para la determinación del título de anticuerpo en un antisuero. El anticuerpo policlonal se puede separar y purificar como se describió para la separación y purificación de la inmunoglobulina en el curso de la separación/purificación del anterior anticuerpo monoclonal.

Un ADN antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria con un ADN que codifica una proteína de la presente invención (de aquí en adelante, el último ADN se denomina a veces "un ADN de la presente invención", y el primer ADN antisentido se denomina a veces "ADN antisentido") puede ser cualquier ADN antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria con un ADN de la presente invención y capaz de inhibir la expresión del ADN.

Una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a un ADN de la presente invención puede ser, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de aproximadamente 70% o más, preferiblemente aproximadamente 80% o más, más preferiblemente 90% o más, con máxima preferencia aproximadamente 95% o más con la secuencia de nucleótidos total o parcial complementaria a un ADN de la presente invención (es decir, una cadena complementaria a un ADN de la presente invención). De particular preferencia es un ADN antisentido que tiene una homología de aproximadamente 70% o más, preferiblemente aproximadamente 80% o más, más preferiblemente 90% o más, con máxima preferencia aproximadamente 95% o más con una cadena complementaria a una secuencia de nucleótidos de un dominio que codifica el sitio N-terminal de una proteína de la presente invención (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos cercana a un codón de iniciación) en la secuencia de nucleótidos completa de la cadena complementaria a un ADN de la presente invención. Tal ADN antisentido se puede preparar usando, por ejemplo, un sintetizador de ADN conocido.

Se describirán aplicaciones de una proteína oncogénica de acuerdo con la presente invención (que incluye una sal), un ADN de la presente invención, un anticuerpo de la presente invención y un ADN antisentido de la presente invención.

(2) Método de detección de un compuesto que promueve o inhibe la expresión de una proteína oncogénica de acuerdo con la presente invención

Una proteína oncogénica de la presente invención, un oligonucleótido de la presente invención o un anticuerpo de la presente invención se pueden usar para un método de detección de un compuesto que promueve o inhibe la expresión de una proteína de la presente invención.

En forma específica, la presente descripción proporciona

- (i) un método para detectar un compuesto que promueve o inhibe la expresión de una proteína oncogénica de la presente invención que comprende determinar y comparar la cantidad de expresión de una proteína oncogénica de la presente invención o la cantidad de un ARNm que codifica una proteína oncogénica de la presente invención cuando se cultiva una célula o tejido que puede expresar una proteína oncogénica de la presente invención en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo.

Los ejemplos de una célula o tejido que pueden expresar una proteína oncogénica de la presente invención incluyen una célula derivada de seres humanos, de una célula de animal de sangre caliente (por ejemplo, cobayo, rata, ratón, aves, conejo, cerdo, oveja, vaca y mono) (por ejemplo, célula neural, célula endocrina, célula neuroendocrina, célula de glía, célula pancreática β , célula de médula, célula hepática, célula de bazo, célula del mesangio, célula epidérmica, célula epitelial, célula endotelial, fibroblasto, fibrocito, miocito, adipocito, inmunocito (por ejemplo, macrófago, célula T, célula B, célula citolítica natural, mastocito, neutrófilo, célula basófila, leucocito acidofílico, monocito, célula dendrítica), megacariocito, sinoviocito, célula de cartílago, osteocito, osteoblasto, osteoclasto, célula de glándula mamaria, célula intersticial y sus células precursoras, células madre y células de carcinoma, así como todos los tejidos en los que están presentes cualquiera de estas células, tales como cerebro, sitios cerebrales (por ejemplo, bulbo olfatorio, núcleo amigdalóide, cisterna basal, hipocampo, tálamo óptico, hipotálamo, corteza cerebral, médula oblonga, cerebelo), médula espinal, glándula pituitaria, estómago, páncreas, riñón, hígado, glándula genital, glándula tiroides, vesícula biliar, médula ósea, glándula adrenal, piel, músculo, pulmón, tracto gastrointestinal (por ejemplo, intestino grueso e intestino delgado), vaso sanguíneo, corazón, timo, bazo, glándula salival, sangre periférica, glándula prostática, testículo (espermario), ovario, placenta, útero, hueso, cartílago, articulación y músculo esquelético. En la presente, se puede usar una célula establecida o sistema de cultivo primario.

Un compuesto de ensayo puede ser, además de los anteriores compuestos de ensayo, una biblioteca de ADN.

La cantidad de expresión de una célula cancerosa se puede determinar por un método conocido tal como un método inmunoquímico que usa, por ejemplo, un anticuerpo, o alternativamente un ARNm que codifica una proteína oncogénica de la presente invención se puede determinar por un método conocido empleando hibridación Northern, RT-PCR o PCR TaqMan.

Las cantidades de expresión de un ARNm se pueden comparar por hibridación de acuerdo con un método conocido o su modificación, por ejemplo un método descrito en Molecular Cloning 2nd, J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

Específicamente, la cantidad de ARNm que codifica una proteína oncogénica de la presente invención se determina de acuerdo con un método conocido, es decir, poniendo en contacto un ARN extraído de una célula con un polinucleótido de la presente invención o su parte o un polinucleótido antisentido de la presente invención y midiendo posteriormente la cantidad de ARNm unido a un polinucleótido de la presente invención o su parte o un polinucleótido antisentido de la presente invención. Un polinucleótido de la presente invención o su parte o un polinucleótido antisentido de la presente invención se puede marcar, por ejemplo, con un radioisótopo o colorante para facilitar la determinación de la cantidad de ARNm unido a un polinucleótido de la presente invención o su parte o un polinucleótido antisentido de la presente invención. Los ejemplos de radioisótopo incluyen ^{32}P y ^3H , y los ejemplos de colorante incluyen fluorocromos tales como fluoresceína, FAM (PE Biosystems Inc.), JOE (PE Biosystems Inc.), TAMRA (PE Biosystems Inc.), ROX (PE Biosystems Inc.), Cy5 (Amersham Inc.) y Cy3 (Amersham Inc.).

La cantidad de ARNm se puede determinar transformando un ARN extraído de una célula en ADNc usando una transcriptasa inversa y midiendo posteriormente la cantidad de ADNc amplificado por PCR usando un polinucleótido de la presente invención o su parte o un polinucleótido antisentido de la presente invención como cebador.

En consecuencia, un compuesto de ensayo que aumenta la cantidad de ARNm que codifica una proteína oncogénica de la presente invención se puede seleccionar como compuesto que promueve la expresión de una proteína oncogénica de la presente invención, mientras que un compuesto de ensayo que reduce la cantidad de ARNm que codifica una proteína oncogénica de la presente invención se puede seleccionar como compuesto que inhibe la expresión de una proteína oncogénica de la presente invención.

La presente invención también proporciona:

- (ii) un método para detectar un compuesto que promueve o inhibe la actividad promotora, que comprende determinar y comparar una actividad indicadora cuando se cultiva, en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo, un transformante obtenido por transformación con un ADN recombinante en el que un gen indicador se liga corriente abajo de un dominio promotor o potenciador para un gen que codifica una proteína oncogénica de la presente invención.

Los ejemplos de gen indicador que se pueden usar incluyen el de lacZ(β -galactosidasa), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa, factores de crecimiento, β -glucuronidasa, fosfatasa alcalina, proteína fluorescente verde (CFI) y β -lactamasa.

Por determinación de la cantidad de un producto gen indicador (por ejemplo, ARNm y proteína) usando un método conocido, un compuesto de ensayo que incrementa la cantidad del producto gen indicador se puede seleccionar como compuesto que controla (en particular, que promueve) la actividad promotora o potenciadora de una proteína de la presente invención, es decir, como compuesto que promueve la expresión de una proteína de la presente invención. Por el contrario, un compuesto de ensayo que reduce la cantidad del producto gen indicador se puede seleccionar como compuesto que controla (en particular, que inhibe) la actividad promotora o potenciadora de una proteína de la presente invención, es decir, como compuesto que inhibe la expresión de una proteína de la presente invención.

Un compuesto de ensayo puede ser como se describió anteriormente.

Un vector que comprende un gen indicador se puede construir o valorar por una técnica conocida (por ejemplo, véase Molecular Biotechnology 13, 29-43, 1999).

Debido a que un compuesto que inhibe la expresión de una proteína oncogénica de la presente invención puede inhibir las actividades biológicas de una proteína oncogénica de la presente invención, es útil como droga medicinal segura y de baja toxicidad para inhibir las actividades biológicas de una proteína oncogénica de la presente invención. Específicamente, es útil como droga profiláctica o terapéutica para un cáncer tal como cáncer pulmonar, cáncer renal, carcinoma hepático, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer ovárico, cáncer prostático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer rectal y cáncer pancreático, en particular cáncer cervical.

Un compuesto o su sal obtenida usando un método de detección o kit de detección de la presente invención puede ser, por ejemplo, un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un péptido, una proteína, un compuesto no peptídico, un compuesto sintético, un producto de fermentación, un extracto celular, un extracto de planta, un extracto de tejido animal y plasma. Una sal del compuesto puede ser como se describe para una sal de un péptido derivado de una proteína oncogénica de la presente invención.

Cuando se usa un compuesto obtenido utilizando un método de detección o kit de detección de acuerdo con la presente invención como el anterior agente terapéutico o profiláctico, este se puede usar como es usual. Por ejemplo, tal como se describe para un medicamento que comprende una proteína de la presente invención, se puede preparar como comprimido, cápsula, elixir, microcápsula, solución y suspensión estéril.

La dosis del compuesto o su sal depende de varios factores tales como su efecto, la enfermedad a tratar, el receptor y la vía de administración. Por ejemplo, en la administración oral de un compuesto que inhibe la expresión de una proteína de la presente invención para tratar un cáncer, su dosis es aproximadamente 0,1 a 100 mg, preferiblemente aproximadamente 1,0 a 50 mg, más preferiblemente aproximadamente 1,0 a 20 mg por día para un adulto normal (peso: 60 kg). En la administración parenteral, si bien la dosis del compuesto depende de varios factores tales como el receptor y la enfermedad a tratar, su dosis es adecuadamente de aproximadamente 0,01 a 30 mg, preferiblemente aproximadamente 0,1 a 20 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,1 a 10 mg por día por inyección intravenosa cuando un compuesto que inhibe la expresión de una proteína de la presente invención se administra a un adulto normal (peso: 60 kg) para tratar un cáncer. Para otro animal, se puede administrar una cantidad convertida a un peso de 60 kg.

(3) *Valoración de una proteína oncogénica de la presente invención*

Un anticuerpo de la presente invención puede reconocer en forma específica a una proteína oncogénica de la presente invención, de modo que se puede usar para valorar la proteína oncogénica de la presente invención en una solución de ensayo, en particular un ensayo por el método de medición de inmunidad sándwich.

En consecuencia, la presente invención proporciona:

- (i) un proceso para valorar una proteína oncogénica de la presente invención en una solución de ensayo que comprende las etapas de hacer reaccionar competitivamente un anticuerpo de la presente invención con la solución de ensayo y una proteína marcada de la presente invención y determinar posteriormente la proporción de la proteína marcada de la presente invención unida al anticuerpo; y
- (ii) un proceso para valorar una proteína oncogénica de la presente invención en una solución de ensayo que comprende las etapas de hacer reaccionar en forma simultánea o sucesiva la solución de ensayo con un anticuerpo de la presente invención insolubilizado en un portador y otro anticuerpo marcado de la presente invención y determinar posteriormente la actividad del agente marcado en el portador insolubilizado.

En el ensayo descrito en (ii), es conveniente que un anticuerpo sea un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de una proteína oncogénica de la presente invención, mientras que el otro anticuerpo sea un anticuerpo que reacciona con el extremo C-terminal de una proteína oncogénica de la presente invención.

Un anticuerpo monoclonal contra una proteína oncogénica de la presente invención se puede usar para analizar o detectar una proteína oncogénica de la presente invención usando, por ejemplo, tinción de tejido. Para estos fines, se puede usar la propia molécula de anticuerpo o, alternativamente, se puede usar una fracción $F(ab')_2$, Fab' o Fab de la molécula de anticuerpo.

No existen restricciones particulares para un procedimiento para valorar una proteína oncogénica de la presente invención usando un anticuerpo de la presente invención, y puede ser cualquier procedimiento por el cual se pueda detectar la cantidad de un anticuerpo, antígeno o complejo anticuerpo-antígeno correspondiente a la cantidad de un antígeno (por ejemplo, la cantidad de un péptido) en una solución medida por medios químicos o físicos y se puede calcular un valor buscado mediante una curva estándar graficada usando la solución estándar que contiene una cantidad conocida del antígeno. Por ejemplo, se usan adecuadamente nefelometría, un ensayo de competencia, un ensayo inmunoradiométrico y un ensayo sándwich y, en términos de sensibilidad y especificidad, se prefiere particularmente un ensayo sándwich.

Los ejemplos de agente marcador usados en un ensayo mediante tal material de marcación incluyen un radioisótopo, una enzima, una sustancia fluorescente y un material luminiscente. Los ejemplos de radioisótopo incluyen $[^{125}I]$, $[^{131}I]$, $[^3H]$ y $[^{14}C]$. Entre estos, es preferible una enzima estable que exhiba una gran actividad específica, que incluye β -galactosidasa, β -glucuronidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa. Los ejemplos de sustancia fluorescente incluyen fluorescamina e isotiocianato de fluoresceína. Los ejemplos de material luminiscente incluyen luminol, derivados de luminol, luciferina y lucigenina. Se puede usar un sistema biotina-avidina para unir un anticuerpo o antígeno con un agente marcador.

Un antígeno o anticuerpo se puede insolubilizar usando adsorción física, o usando un enlace químico comúnmente usado para insolubilizar o inmovilizar un péptido o enzima. Los ejemplos de portador incluyen polisacáridos insolubles tales como agarosa, dextrano y celulosa; resinas sintéticas tales como poliestireno, poliacrilamida y silicones; y vidrios.

En un ensayo sándwich, un anticuerpo monoclonal de la presente invención insolubilizado se hace reaccionar con una solución de ensayo (primera reacción), y posteriormente se hace reaccionar con otro anticuerpo monoclonal marcado de la presente invención (segunda reacción). Posteriormente, se puede determinar la actividad del agente marcador en el portador insolubilizado para analizar la cantidad de una proteína de la presente invención en la solución de ensayo. La primera y la segunda reacción se pueden realizar en orden inverso, en forma simultánea o sucesiva. Un agente marcador y un método de insolubilización pueden ser los que se describieron anteriormente. En un método de medición de inmunidad usando un ensayo sándwich, no es necesario usar sólo un anticuerpo para una fase sólida o para la marcación, sino que se puede usar una mezcla de dos o más anticuerpos, por ejemplo, para mejorar la sensibilidad de la medición.

En la determinación de una proteína oncogénica de la presente invención con un ensayo sándwich, los anticuerpos monoclonales de la presente invención usados en la primera y segunda reacciones son preferiblemente anticuerpos que tienen un sitio diferente al que se une la proteína oncogénica de la presente invención. Específicamente, en términos de anticuerpos usados en la primera y segunda reacciones, cuando el anticuerpo usado en la segunda reacción reconoce el extremo C-terminal en la proteína oncogénica de la presente invención, el anticuerpo usado en la primera reacción es un anticuerpo que reconoce un sitio diferente del extremo C-terminal, por ejemplo el extremo N-terminal.

Un anticuerpo monoclonal de la presente invención puede usar un sistema de medición diferente de un ensayo sándwich, tal como un ensayo competitivo, inmunometría y nefelometría.

En un ensayo competitivo, un antígeno en una solución de ensayo y un antígeno marcado reaccionan competitivamente con un anticuerpo, el antígeno marcado sin reaccionar (F) se separa del antígeno marcado unido (B) (separación B/F) y la cantidad marcada de B o F se determina para analizar la cantidad de antígeno en la solución de ensayo. Este ensayo de reacción se puede realizar por un método en fase líquida donde se usa un anticuerpo soluble como anticuerpo y polietilenglicol y se usa un anticuerpo secundario contra el anticuerpo anterior en la separación de B/F o, alternativamente, por un método en fase sólida donde se usa un anticuerpo inmovilizado como primer anticuerpo o el primer anticuerpo es soluble y el segundo anticuerpo es un anticuerpo inmovilizado.

En inmunometría, un antígeno en una solución de ensayo y un antígeno inmovilizado reaccionan competitivamente con una cantidad determinada de un anticuerpo marcado, se separan las fases sólida y líquida o, alternativamente, un antígeno en una solución de ensayo se hace reaccionar con una cantidad excesiva de un anticuerpo marcado, se añade un antígeno inmovilizado para permitir que el anticuerpo marcado sin reaccionar se una a la fase sólida y posteriormente las fases sólida y líquida se separan. A continuación, se determina la cantidad de marcador en cada fase para analizar la cantidad de antígeno en la solución de ensayo.

La nefelometría determina la cantidad de un precipitado insoluble resultante de una reacción antígeno-anticuerpo en un gel o solución. Aun cuando la cantidad de un antígeno en una solución de ensayo es pequeña de modo que se forma una pequeña cantidad de precipitado, se usa adecuadamente nefelometría láser que utiliza dispersión láser.

Para aplicar los métodos de medición inmunológica individuales a un ensayo de la presente descripción, no son necesarias condiciones u operaciones especiales. Un sistema de medición para una proteína de la presente invención se puede construir a la luz de las condiciones y operaciones comunes en los métodos individuales con modificaciones conocidas para los expertos en la técnica. Los detalles de estos procedimientos técnicos comunes se hallarán en varias revisiones y textos.

Tal bibliografía puede ser, por ejemplo, "Radioimmunoassay", ed. por Hiroshi Irie, Kodansha, publicado en 1974; "Radioimmunoassay, 2nd", ed. por Hiroshi Irie, Kodansha, publicado en 1979; "Enzyme Immunoassay", ed. por Eiji Ishikawa *et al.*, Igaku-Shoin, publicado en 1978; "Enzyme Immunoassay, 2nd Edition", ed. por Eiji Ishikawa *et al.*, Igaku-Shoin, publicado en 1982; "Enzyme Immunoassay, 3rd Edition", ed. por Eiji Ishikawa *et al.*, Igaku-Shoin, publicado en 1987; "Methods in ENZYMOLOGY", Vol.70 (Immunochemical Techniques (Part A)); *ibid.*, Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B)); *ibid.*, Vol.74 (Immunochemical Techniques (Part C)); *ibid.*, Vol.84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)); *ibid.*, Vol.92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)); e *ibid.*, Vol.121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (estos han sido publicados por Academic Press).

Cuando se detecta reducción del nivel de una proteína oncogénica de la presente invención analizando el nivel usando un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, esto lleva al diagnóstico de que el individuo padece una enfermedad asociada con insuficiencia de la proteína oncogénica de la presente invención o probablemente contraerá la enfermedad en el futuro.

5 Cuando se detecta aumento del nivel de una proteína oncogénica de la presente invención, por ejemplo, esto lleva al diagnóstico de que el individuo padece una enfermedad inducida por la sobreexpresión de la proteína oncogénica de la presente invención, que incluye cánceres tales como cáncer pulmonar, cáncer renal, carcinoma hepático, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer ovárico, cáncer prostático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer rectal y cáncer pancreático (en particular, cáncer cervical), o probablemente contraerá la enfermedad en el futuro.

10 Un anticuerpo de la presente invención se puede usar para detectar una proteína oncogénica de la presente invención presente en una muestra tal como un fluido corporal y un tejido. También se puede usar para preparar una columna de anticuerpo usado para la purificación de una proteína oncogénica de la presente invención, detección de una proteína de la presente invención en cada fracción durante la purificación y análisis del comportamiento de una proteína de la presente invención en una célula de ensayo.

15 (4) *Agente para diagnóstico de genes*

Un polinucleótido o polinucleótido antisentido de la presente invención también se pueden usar, por ejemplo, como sonda de ácido nucleico para detectar una anomalía (defecto de un gen) en un ADN o ARNm que codifica una proteína oncogénica de la presente invención principalmente en seres humanos. Por ejemplo, es útil como agente para diagnóstico de genes para una lesión, mutación o reducción de la expresión del ADN o el ARNm o la sobreexpresión del ARNm.

25 El anterior diagnóstico de genes usando un polinucleótido o polinucleótido antisentido de la presente invención se puede realizar de acuerdo, por ejemplo, con hibridación Northern conocida o PCR-SSCP (Véase, Genomics, Vol.5, pp.874-879 (1989); Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 86, pp.2766-2770 (1989)).

30 Por ejemplo, cuando se detecta reducción de la expresión de un ARNm por hibridación Northern, esto lleva al diagnóstico de que el individuo padece una enfermedad asociada con la insuficiencia de una proteína oncogénica de la presente invención o que probablemente contraerá la enfermedad en el futuro.

35 Cuando se detecta sobreexpresión de un ARNm por hibridación Northern, por ejemplo, esto lleva al diagnóstico de que el sujeto probablemente padezca una enfermedad inducida por la sobreexpresión de la proteína oncogénica de la presente invención, que incluye cánceres tales como cáncer pulmonar, cáncer renal, carcinoma hepático, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer ovárico, cáncer prostático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer rectal y cáncer pancreático (en particular, cáncer cervical), o que probablemente contraerá la enfermedad en el futuro.

40 (5) *Fármaco que contiene un polinucleótido antisentido*

45 Un polinucleótido antisentido de la presente invención que se une en forma complementaria a un polinucleótido de la presente invención (por ejemplo, ADN) y puede inhibir la expresión del polinucleótido (por ejemplo, ADN) es menos tóxico y puede inhibir la actividad *in vivo* de la proteína de la presente invención o el polinucleótido de la presente invención (por ejemplo, ADN). En consecuencia, es útil como agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad inducida por la sobreexpresión de la proteína de la presente invención, por ejemplo un cáncer tal como cáncer pulmonar, cáncer renal, carcinoma hepático, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer ovárico, cáncer prostático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer rectal y cáncer pancreático.

50 Cuando se usa el polinucleótido antisentido como el anterior agente profiláctico o terapéutico, el polinucleótido antisentido se puede formular como se describió el anterior polinucleótido de la presente invención.

55 La formulación así obtenida es menos tóxica y se puede administrar por vía oral o parenteral a un ser humano o mamífero (por ejemplo, rata, conejo, oveja, cerdo, vacuno, gato, perro y mono).

60 El polinucleótido antisentido se puede administrar como tal o en combinación con un portador fisiológicamente aceptable tal como un adyuvante para promover la ingesta, usando una pistola génica o un catéter tal como un catéter de hidrogel.

65 La dosis del polinucleótido antisentido varía de acuerdo con muchos factores tales como la enfermedad por tratar, el receptor y la vía de administración y es, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a 100 mg por día a un adulto (peso: 60 kg) cuando se administra un antisentido nucleótido de la presente invención en forma local a un órgano (por ejemplo, hígado, pulmón, corazón y riñón) para tratar un cáncer.

Por otra parte, el polinucleótido antisentido se puede usar como sonda nucleotídica de diagnóstico para determinar la presencia de un ADN del oncogén de la presente invención en un tejido o célula o su estado de expresión.

La presente descripción también proporciona:

- (i) un ARN bicatenario que comprende una parte de un ARN que codifica una proteína de la presente invención o un ARN complementario a la misma;
- (ii) un fármaco que comprende el ARN bicatenario; cuando sea apropiado,
- (iii) una ribozima que comprende una parte de un ARN que codifica una proteína de la presente invención; y
- (iv) un fármaco que comprende la ribozima.

Este ARN bicatenario (ARNi; método de ARN de interferencia) y la ribozima pueden inhibir la expresión de un polinucleótido (por ejemplo, ADN) de la presente invención como en el anterior polinucleótido antisentido y pueden inhibir *in vivo* las actividades de una proteína oncogénica o polinucleótido (por ejemplo, ADN) de la presente invención. En consecuencia, es útil como agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad inducida por la sobreexpresión de la proteína oncogénica de la presente invención, por ejemplo un cáncer tal como cáncer pulmonar, cáncer renal, carcinoma hepático, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer ovárico, cáncer prostático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer rectal y cáncer pancreático, en particular cáncer cervical.

El ARN bicatenario se puede diseñar y producir sobre la base de la secuencia del polinucleótido de la presente invención de acuerdo con un método conocido (Véase, por ejemplo, Nature, Vol. 411, p.494, 2001).

La ribozima se puede diseñar y producir sobre la base del polinucleótido de la presente invención de acuerdo con un método conocido (Véase, por ejemplo, TRENDS in Molecular Medicine, Vol. 7, p.221, 2001). Por ejemplo, se puede producir ligando una ribozima conocida a una parte de un ARN que codifica una proteína de la presente invención. Un ejemplo de la parte de un ARN que codifica una proteína de la presente invención es una parte (fragmento de ARN) cercana a un sitio de restricción sobre el ARN de la presente invención que puede ser digerido por una ribozima conocida.

Cuando se usan el ARN bicatenario o la ribozima como el anterior agente profiláctico o terapéutico, se pueden formular y administrar como se describió para el polinucleótido antisentido.

(6) *Medicamento que comprende un anticuerpo de la presente invención*

Un anticuerpo de la presente invención capaz de neutralizar la actividad de formación de cáncer de una proteína oncogénica de la presente invención se puede usar como droga profiláctica o terapéutica para una enfermedad inducida por la sobreexpresión de la proteína oncogénica de la presente invención, por ejemplo un cáncer tal como cáncer pulmonar, cáncer renal, carcinoma hepático, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer ovárico, cáncer prostático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer rectal y cáncer pancreático, en particular cáncer cervical.

La anterior droga profiláctica o terapéutica para la enfermedad que comprende el anticuerpo de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral a un ser humano o mamífero (por ejemplo, rata, conejo, oveja, cerdo, ganado vacuno, gato, perro y mono) como tal, es decir, en forma de solución o como forma de dosificación apropiada de una composición farmacéutica. La dosis puede variar dependiendo de varios factores tales como el receptor, la enfermedad por tratar, un síntoma y la vía de administración, y puede ser, por ejemplo, generalmente 0,01 a 20 mg/kg, preferiblemente 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente 0,1 a 5 mg/kg del anticuerpo de la presente invención para una dosis, aproximadamente una a cinco veces al día, preferiblemente una a tres veces al día. Se puede administrar de modo adecuado por inyección intravenosa. En otro tipo de administración parenteral u oral, se puede emplear una dosis similar a la que se describió anteriormente. Si un síntoma es en particular grave, se puede aumentar adicionalmente la dosis, dependiendo del síntoma.

Un anticuerpo de la presente invención se puede administrar como tal o como composición farmacéutica apropiada. Una composición farmacéutica usada para la anterior administración comprende el anterior anticuerpo o su sal y un portador, diluyente o excipiente farmacológicamente aceptable. Dicha composición se proporciona como forma de dosificación apropiada para la administración oral o parenteral.

Específicamente, los ejemplos de composición para administración oral incluyen formas de dosificación sólidas y líquidas que incluyen comprimido, tal como comprimido recubierto con azúcar y comprimido recubierto con película), píldora, gránulo, polvo, cápsula tal como cápsula blanda, jarabe, emulsión y suspensión. Tal composición se prepara mediante un proceso conocido y comprende un portador, diluyente o excipiente comúnmente usado en la técnica farmacéutica. Los ejemplos de portador o excipiente para comprimidos incluyen lactosa, almidón, sacarosa y estearato de magnesio.

Los ejemplos de composición para administración parenteral incluyen una inyección y un supositorio. Los ejemplos de inyección incluyen inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intracutánea, inyección intramus-

cular e inyección por goteo. Tal inyección se puede preparar por un método conocido; por ejemplo, por disolución, suspensión o emulsión del anticuerpo anterior o su sal en un líquido acuoso u oleoso estéril comúnmente usado para inyección. Los ejemplos de líquido acuoso para inyección incluyen una solución salina e isotónica que contiene glucosa u otros adyuvantes, que se puede combinar con un agente de solubilización apropiado que incluye alcoholes tales como etanol; polioles tales como propilenglicol y polietilenglicol; tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 80 y aducto de HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 moles) de aceite de ricino hidrogenado). Los ejemplos de líquido oleoso incluyen aceite de sésamo y aceite de soja, que se puede combinar con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo y alcohol bencílico. Una inyección preparada de este modo se llena generalmente en una ampolla apropiada. Se prepara un supositorio usado para la administración rectal mezclando el anticuerpo anterior o su sal con una base para supositorio común.

La composición farmacéutica oral o parenteral se prepara convenientemente en una forma de dosificación adecuada para una dosis de ingrediente activo. Los ejemplos de tales formas de dosificación incluyen comprimido, píldora, cápsula, inyección (ampolla) y supositorio. Cada forma de dosificación unitaria preferiblemente contiene generalmente 5 a 500 mg del anticuerpo anterior. En particular, una inyección contiene 5 a 100 mg, mientras que otra forma de dosificación contiene 10 a 250 mg.

Cada una de las anteriores composiciones puede contener otros ingredientes activos siempre que estos no produzcan una interacción no deseable cuando se formulan con el anticuerpo.

(7) *Animal con ADN transferido*

La presente invención proporciona un mamífero no humano, por ejemplo un animal “knock-in”, que tiene un ADN que codifica una proteína oncogénica derivada de seres humanos de la presente invención (de aquí en adelante, denominado “un ADN del oncogén de la presente invención”) o su variante de ADN.

Específicamente, la presente invención proporciona:

- (1) un mamífero no humano que tiene un ADN del oncogén derivado de seres humanos de la presente invención o su variante de ADN (animal “knock-in”);
- (2) el animal “knock-in” en el que el mamífero no humano es un roedor;
- (3) el ratón o rata “knock-in” en el que el roedor es ratón o rata; y
- (4) un vector recombinante que comprende el ADN del oncogén derivado de seres humanos de la presente invención o su variante de ADN que se puede expresar en el mamífero no humano.

Un mamífero no humano que tiene un ADN del oncogén derivado de seres humanos de la presente invención se puede producir transfiriendo un ADN deseado a un huevo no fertilizado, a un huevo fertilizado, a un espermatozoide o una célula germinal que incluye sus células iniciales, preferiblemente en una etapa de embriogénesis en el desarrollo del mamífero no humano (también preferiblemente, en una etapa de una sola célula o célula huevo fertilizada y generalmente hasta la fase de 8 células) por un método apropiado tal como un método de fosfato de calcio, un método de pulso eléctrico, lipofección, agregación, microinyección, un método de pistola de partículas y un DEAE-dextrano. Por el método de transferencia de ADN, se puede transferir un ADN extraño deseado de la presente invención a una célula somática, célula de órgano o tejido vivo para usarlo en cultivo celular o cultivo de tejido. Por otra parte, la célula se puede fusionar con la anterior célula germinal por un proceso de fusión celular conocido para producir un animal con ADN transferido de la presente invención.

Los ejemplos de mamífero no humano incluyen ganado vacuno, cerdo, oveja, cabra, conejo, perro, gato, cobayo, hámster, ratón y rata. Entre estos, se prefiere un roedor, en particular un ratón (por ejemplo, una línea pura tal como una cepa C57BL/6 y una cepa DBA2 y una línea híbrida tal como una cepa B6C3F₁, una cepa BDF₁, una cepa B6D2F₁, una cepa BALB/c y una cepa ICR) o rata (por ejemplo, Wistar y SD) porque su ontogénesis y ciclos biológicos son relativamente más cortos a la luz de producir un modelo de animal de enfermedad y se pueden criar fácilmente.

Un “mamífero” en términos de un vector recombinante que se puede expresar en un mamífero puede ser, además del anterior mamífero no humano, un ser humano.

Una variante de ADN para un oncogén derivado de seres humanos no se refiere a un ADN de un homólogo de un oncogén de la presente invención inherente a un mamífero no humano, sino a uno mutado artificialmente.

Una variante de ADN puede ser un ADN de oncogén derivado de seres humanos de la presente invención cuya secuencia de nucleótidos original ha variado (por ejemplo, mutación) tal como un ADN que tiene la adición de una base, supresión o sustitución con otra base o un ADN anormal.

Un ADN anormal se refiere a un ADN que expresa una proteína que es similar a una proteína oncogénica normal de la presente invención pero tiene una actividad diferente; por ejemplo, un ADN que expresa un péptido en el que se inhibe la actividad de una proteína oncogénica normal de la presente invención.

Para transferir un ADN de oncogén de la presente invención a un animal no humano blanco, en general es ventajoso usar el ADN como construcción de ADN unido corriente abajo de un promotor capaz de expresar el ADN en la célula del animal no humano. Por ejemplo, cuando se transfiere un ADN derivado de seres humanos de la presente invención, se puede microinyectar una construcción de ADN (por ejemplo, un vector) al que se ha unido un ADN del oncogén derivado de seres humanos de la presente invención a un huevo fertilizado de un mamífero no humano blanco, por ejemplo un huevo fertilizado murino, corriente abajo de cualquiera de los diversos promotores capaces de expresar un ADN derivado de cualquiera de los diversos mamíferos no humanos que exhiben mayor homología con el ADN de la presente invención (por ejemplo, conejo, perro, gato, cobayo, hámster, rata y ratón), para producir un mamífero no humano con ADN transferido capaz de expresar fuertemente el ADN del oncogén de la presente invención.

Los ejemplos de vector de expresión para una proteína oncogénica de la presente invención incluyen un plásmido derivado de *E. coli*, un plásmido derivado de *Bacillus subtilis*, un plásmido derivado de levadura, un bacteriófago tal como el fago λ , un retrovirus tal como el virus de leucemia Moloney y un virus de mamífero tal como un virus de vaccinia y un baculovirus, preferiblemente un plásmido derivado de *E. coli*, un plásmido derivado de *Bacillus subtilis* y un plásmido derivado de levadura.

Los ejemplos de un promotor para regular la expresión del ADN incluyen:

- (i) promotores para un ADN derivado de un virus (por ejemplo, virus de simio, citomegalovirus, virus de leucemia Moloney, virus JC, virus del tumor mamario y poliovirus);
- (ii) promotores derivados de diversos mamíferos (por ejemplo, ser humano, conejo, perro, gato, cobayo, hámster, rata y ratón); por ejemplo, un promotor para albúmina, insulina II, uroplaquina II, elastasa, eritropoyetina, endotelina, creatina quinasa muscular, proteína ácida fibrilar glial, glutatión S-transferasa, factor de crecimiento derivado de plaquetas β , queratina K1, K10 y K14, colágenos tipo I y II, subunidad $\beta 1$ de proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, distrofina, fosfatasa alcalina resistente al tartrato, factor diurético de sodio atrial, receptor endotelial de tirosina quinasa (generalmente, abreviada "Tie2"), sodio y potasio adenosina trifosfatasa (Na, K-ATPasa), cadena liviana de neurofilamento, metalotionina I y IIA, inhibidor tisular de metaloproteinasas-1, antígeno MHC Clase I (H-2L), H-ras, renina, dopamina- β -hidroxilasa, peroxidasa tiroidea (TPO), factor de elongación de cadena de péptido 1α (EF- 1α), (β -actina, cadena pesada de α - y β -miosina, cadena liviana de miosina 1 y 2, proteína base de mielina, tiroglobulina, Thy-1, inmunoglobulina, parte de la cadena H variable (VNP), componente P amiloide sérico, mioglobina, troponina C, actina α de músculo liso, preproencefalina A y vasopresina. Entre estos, se prefiere un promotor de citomegalovirus, un promotor del factor de elongación de la cadena de péptido 1α (EF- 1α), promotores de β -actina humana y de aves capaces de una mayor expresión en un cuerpo completo.

El vector mencionado preferiblemente comprende una secuencia que termina la transcripción de un ARN mensajero deseado en un mamífero no humano con ADN transferido (generalmente llamado "terminador"). Por ejemplo, se pueden usar secuencias de ADN derivadas de bovinos o de diversos mamíferos, preferiblemente un terminador del virus de simio SV40.

Por otra parte, si se desea, puede ser posible ligar una señal de empalme para cada ADN, una región potenciadora o una parte de un intrón de ADN eucariota en 5' corriente arriba de la región promotora, entre la región promotora y una región de traducción, o en 3' corriente abajo de la región de traducción para una mayor expresión de un ADN del oncogén deseado.

Una región de traducción de una proteína oncogénica normal de la presente invención se puede obtener usando, como material de partida, un ADN complementario preparado como un ADN del genoma total o parcial de, célula de hígado, riñón o glándula tiroidea derivada de humanos, un ADN derivado de fibroblasto y diversas bibliotecas de ADN genómicos disponibles en el comercio, o por un proceso conocido a partir de un ARN derivado de célula de hígado, célula de riñón, célula de glándula tiroidea o fibroblasto. Para producir un ADN anormal inducido por mutación, una región de traducción del péptido normal obtenido de la célula anterior o el tejido se puede mutar por el método de inducción de mutación puntual para producir una región de traducción mutante.

La región de traducción se puede producir como construcción de ADN que se puede expresar en un animal con ADN transferido, por un procedimiento de manipulación genética de un ADN común en el que este se liga corriente abajo del promotor o, si se desea, corriente arriba de un sitio de terminación de transcripción.

La transferencia de un ADN del oncogén derivado de humanos de la presente invención a una célula de huevo fertilizado se realiza de modo que el ADN es portado por todas las células germinales y somáticas de un mamífero no humano blanco. La presencia del ADN del oncogén de la presente invención en las células germinales en un animal producido después de la transferencia del ADN significa que todas las progenies del animal producido portarán el

ADN del oncogén de la presente invención en todas sus células germinales y somáticas. La descendencia de este tipo de animal que hereda el ADN del oncogén de la presente invención porta el ADN del oncogén de la presente invención en todas sus células germinales y somáticas.

Un mamífero no humano al que se ha transferido un ADN del oncogén derivado de humanos de la presente invención se puede cruzar sucesivamente en circunstancias de reproducción comunes como un mamífero que porta el ADN del oncogén, después de confirmar que el mamífero porta en forma estable el ADN del oncogén derivado de humanos después del apareamiento.

La transferencia de un ADN del oncogén derivado de humanos de la presente invención en un estadio de célula de huevo fertilizado se realiza de modo que el ADN es portado en todas las células germinales y somáticas en un mamífero no humano blanco. La presencia del ADN del oncogén derivado de humanos de la presente invención en las células germinales en un mamífero producido después de la transferencia de ADN significa que todas las crías del mamífero producido portarán sucesivamente el ADN del oncogén derivado de humanos de la presente invención en todas sus células germinales y somáticas. La descendencia de este tipo de animal que hereda el ADN del oncogén derivado de humanos de la presente invención porta sucesivamente el ADN del oncogén derivado de humanos de la presente invención en todas sus células germinales y somáticas.

Un animal homocigota que tiene ADN transducido en ambos cromosomas homólogos se puede producir y los animales macho y hembra se pueden aparear para la reproducción sucesiva de modo que todas las crías porten sucesivamente el ADN.

En un mamífero no humano que tiene un ADN del oncogén derivado de humanos de la presente invención, el ADN normal de la presente invención está altamente expresado y se puede promover una actividad del ADN normal intrínseco, produciéndose algunas veces el comienzo de hiperactividad de la proteína de la presente invención. En consecuencia, se puede usar como animal modelo para enfermedad. Por ejemplo, un ADN normal transferido al animal de la presente invención se puede usar para dilucidar un mecanismo de hiperactividad de la proteína oncogénica de la presente invención o de una enfermedad asociada con la proteína oncogénica de la presente invención e investigar una terapia para estas enfermedades.

Por otra parte, debido a que un mamífero no humano al que se ha transferido un ADN del oncogén derivado de humanos de la presente invención muestra un incremento de la proteína libre de la presente invención, se puede usar para seleccionar un agente terapéutico contra una enfermedad asociada con la proteína oncogénica de la presente invención.

Por su parte, un mamífero no humano que tiene un ADN anormal de la presente invención se puede cruzar sucesivamente en circunstancias de cruce comunes como animal portador del ADN, después de confirmar que el animal porta en forma estable el ADN transducido después del apareamiento. Además, se puede incorporar un ADN anormal deseado en el plásmido mencionado usado como material de partida. Se puede producir una construcción de ADN por un procedimiento de manipulación genética de ADN común. La transferencia de un ADN anormal de la presente invención en un estadio de célula de huevo fertilizado se realiza de modo que el ADN es portado en todas las células germinales y somáticas en un mamífero blanco. La presencia del ADN anormal de la presente invención en las células germinales en un animal producido después de la transferencia de ADN significa que todas las crías del animal producido portarán el ADN anormal de la presente invención en todas sus células germinales y somáticas. Las crías de este tipo de animal que hereda el ADN anormal de la presente invención portan el ADN anormal de la presente invención en todas sus células germinales y somáticas. Se pueden producir un animal homocigota que tiene un ADN transducido en los cromosomas homólogos y los animales macho y hembra se pueden aparear para la reproducción sucesiva de modo que todas las crías porten sucesivamente el ADN.

En un mamífero no humano que tiene un ADN anormal de la presente invención, el ADN anormal está altamente expresado, y se puede inhibir una actividad del ADN normal intrínseco, lo que algunas veces produce una refractariedad tipo desactivación de la proteína de la presente invención. En consecuencia, se puede usar como animal modelo para la enfermedad. Por ejemplo, se puede usar un animal con ADN anormal transferido de la presente invención para dilucidar un mecanismo de la refractariedad tipo desactivación de la proteína oncogénica de la presente invención e investigar una terapia para la enfermedad.

Como aplicación específica, un animal que expresa altamente el ADN anormal de la presente invención se puede usar como modelo para dilucidar la inhibición de una actividad normal del péptido (actividad negativa dominante) por el péptido anormal de la presente invención en la refractariedad tipo desactivación de la proteína de la presente invención.

Por otra parte, debido a que un mamífero no humano al que se ha transferido un ADN anormal de la presente invención muestra un incremento de la proteína oncogénica libre de la presente invención, se puede usar para identificar un agente terapéutico para la proteína oncogénica o su refractariedad tipo desactivación.

Un animal con ADN transferido de la presente invención se puede usar para investigar un síntoma clínico de una enfermedad asociada con una proteína oncogénica de la presente invención tal como refractariedad tipo desactivación de la proteína de la presente invención. Por otra parte, el animal puede dar una observación más patológica en cada

órgano en un modelo de enfermedad asociado con la proteína oncogénica de la presente invención y puede contribuir al desarrollo de una nueva terapia e investigación y tratamiento de una enfermedad secundaria debida a la enfermedad anterior.

- 5 Cada órgano se puede extraer de un animal con ADN transferido de la presente invención, se puede cortar y tratar con una proteasa tal como tripsina para obtener una célula con ADN transferido libre. La célula posteriormente se puede cultivar y la célula cultivada se puede someter a un estudio de linaje. Por otra parte, se puede usar para identificar una célula productora de la proteína oncogénica de la presente invención e investigar la asociación con la apoptosis, diferenciación o crecimiento o un mecanismo de transferencia de señales en ella y anomalía en ellas.
- 10 En consecuencia, puede ser un tema de investigación efectivo para dilucidar la proteína oncogénica de la presente invención y su actividad.

- Por otra parte, a fin de desarrollar un agente terapéutico para una enfermedad asociada con una proteína oncogénica de la presente invención tal como una refractariedad tipo desactivación de la proteína de la presente invención, un animal con ADN transferido de la presente invención se puede usar para proporcionar un método efectivo y veloz de detección para el agente terapéutico usando los procesos de análisis y ensayo mencionados.
- 15

- Una célula madre germinal de mamífero no humano en la que un ADN génico homólogo de un oncogén de la presente invención está inactivado, es muy útil para producir un modelo de mamífero no humano que expresa insuficientemente el ADN del oncogén de la presente invención. Un mamífero no humano que expresa insuficientemente un ADN génico homólogo del oncogén de la presente invención no tiene varias actividades biológicas que puedan ser inducidas con la proteína oncogénica de la presente invención. En consecuencia, se puede usar como modelo para una enfermedad causada por la inactivación de las actividades biológicas de la proteína oncogénica de la presente invención. De este modo, puede ser útil para dilucidar la causa de la enfermedad e investigar una terapia para la misma.
- 20
- 25

(8a) Método para detectar un compuesto terapéutico o profiláctico para una enfermedad causada por la supresión o daño en un ADN del oncogén de la presente invención

- 30 Un mamífero no humano que expresa insuficientemente un ADN de la presente invención se puede usar para detectar un compuesto terapéutico o profiláctico para una enfermedad causada por la supresión o daño en un ADN de la presente invención.

- 35 En consecuencia, la presente invención proporciona un método para detectar un compuesto terapéutico o profiláctico o su sal para una enfermedad causada por la supresión o daño en un ADN de la presente invención, que comprende las etapas de administrar un compuesto de ensayo a un mamífero no humano que expresa insuficientemente el ADN de la presente invención y posteriormente observar y/o determinar cambios en el animal.

- 40 Un mamífero no humano que expresa insuficientemente el ADN de la presente invención usado en el proceso de detección puede ser como se describió anteriormente.

- Los ejemplos de un compuesto de ensayo incluyen un péptido, una proteína, un compuesto no peptídico, un compuesto sintético, un producto de fermentación, un extracto celular, un extracto de planta, un extracto de tejido animal y plasma, que puede ser un compuesto nuevo o conocido.
- 45

(8b) Método para detectar un compuesto que promueve o inhibe una actividad promotora a un ADN del oncogén de la presente invención

- 50 La presente descripción proporciona un método para detectar un compuesto o su sal que promueve o inhibe una actividad promotora a un ADN del oncogén de la presente invención, que comprende las etapas de administrar un compuesto de ensayo a un mamífero no humano que expresa insuficientemente el ADN de la presente invención y posteriormente detectar la expresión de un gen indicador.

- 55 En el método de detección, un mamífero no humano que expresa insuficientemente el ADN de la presente invención puede ser, entre los mamíferos no humanos que expresan insuficientemente el ADN de la presente invención, un animal en el que el ADN de la presente invención está inactivado por la transducción de un gen indicador y el gen indicador se puede expresar bajo el control de un promotor para el ADN de la presente invención.
- 60

Los ejemplos de compuesto de ensayo incluyen un péptido, una proteína, un compuesto no peptídico, un compuesto sintético, un producto de fermentación, un extracto celular, un extracto de planta, un extracto de tejido animal y plasma, que puede ser un compuesto nuevo o conocido.

- 65 Un gen indicador que se puede usar puede ser como el descrito anteriormente; resultan convenientes el gen de la β -galactosidasa (lacZ), el gen de la fosfatasa alcalina soluble y el gen de la luciferasa.

En el mamífero no humano que expresa insuficientemente el ADN de la presente invención en que el ADN del oncogén de la presente invención se reemplaza con el gen indicador, el gen indicador existe bajo el control del promotor para el ADN de la presente invención, de modo que se puede rastrear una sustancia codificada por el gen indicador para detectar una actividad del promotor.

Por ejemplo, cuando una parte de un dominio de ADN que codifica una proteína oncogénica de la presente invención está sustituida con el gen de β -galactosidasa (lacZ) derivado de *E. coli*, la β -galactosidasa se expresa en lugar de la proteína oncogénica de la presente invención en un tejido en que la proteína oncogénica de la presente invención se expresa en forma natural. Así, por ejemplo, por tinción con un reactivo que es sustrato para la β -galactosidasa, tal como 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido (X-gal), se puede observar convenientemente un estado de expresión de la proteína oncogénica de la presente invención en un animal vivo. Específicamente, un ratón deficitario en una proteína homóloga de una proteína oncogénica de la presente invención o su sección de tejido se fija, por ejemplo, con glutaraldehído, se lava con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se hace reaccionar con una solución de colorante que contiene X-gal a temperatura ambiente o aproximadamente 37°C durante aproximadamente 30 min a 1 hora. La preparación de tejido así obtenida se lava con solución 1 mM de EDTA/PBS para inactivar la reacción de la β -galactosidasa y posteriormente se puede observar un color. Alternativamente, un ARNm que codifica lacZ se puede detectar de manera usual.

Un compuesto o su sal obtenida usando el método de detección anterior se selecciona de los anteriores compuestos de ensayo, que pueden promover o inhibir una actividad promotora para un ADN del oncogén de la presente invención.

El compuesto seleccionado por el anterior método de detección puede formar una sal, que puede ser una sal con un ácido (por ejemplo, un ácido inorgánico) o base (por ejemplo, una base orgánica) fisiológicamente aceptable, preferiblemente una sal de adición de ácido. Los ejemplos de tal sal incluyen sales con un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido sulfúrico, o con un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metansulfónico y ácido bencensulfónico.

Debido a que un compuesto o su sal que promueve una actividad promotora para un ADN del oncogén de la presente invención promueve la actividad del péptido, es útil como, por ejemplo, droga medicinal tal como un agente profiláctico y agente terapéutico para una enfermedad asociada con insuficiencia de una proteína oncogénica de la presente invención.

Por otra parte, un compuesto o su sal que inhibe una actividad promotora de un ADN que codifica una proteína oncogénica de la presente invención es útil como droga medicinal segura y de baja toxicidad que inhibe la actividad inductora del cáncer de la proteína oncogénica de la presente invención, por ejemplo un agente profiláctico o terapéutico para un cáncer tal como cáncer pulmonar, cáncer renal, carcinoma hepático, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer ovárico, cáncer prostático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer rectal y cáncer pancreático.

También se puede usar un derivado del compuesto seleccionado por el análisis anterior.

Un fármaco que comprende el compuesto o su sal seleccionado por el método de detección se puede preparar en una forma de dosificación adecuada para la administración a un tejido canceroso blanco como en un fármaco que comprende un fármaco anticáncer conocido para un cáncer dado.

Debido a que la formulación así preparada es segura y de baja toxicidad, se puede administrar a un ser humano como sujeto principal o a un mamífero en el que se esperaría un efecto farmacológico similar (por ejemplo rata, ratón, cobayo, conejo, oveja, cerdo, bovino, caballo, gato, perro y mono).

Una dosis del compuesto o su sal depende de varios factores tales como la enfermedad por tratar, el receptor y la vía de administración. Por ejemplo, en la administración oral de un compuesto que inhibe una actividad promotora para un ADN de la presente invención para tratar un cáncer, su dosis es aproximadamente 0,1 a 100 mg, preferiblemente aproximadamente 1,0 a 50 mg, más preferiblemente aproximadamente 1,0 a 20 mg por día a un paciente adulto normal (peso: 60 kg). En la administración parenteral, si bien una dosis del compuesto depende de varios factores tales como el receptor y la enfermedad por tratar, su dosis es en forma adecuada aproximadamente 0,01 a 30 mg, preferiblemente aproximadamente 0,1 a 20 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,1 a 10 mg por día por inyección intravenosa cuando un compuesto que inhibe una actividad promotora para un ADN de la presente invención se administra a un paciente adulto normal (peso: 60 kg) para tratar un cáncer. Para otro animal, se puede administrar una cantidad convertida a un peso de 60 kg.

En consecuencia, un mamífero no humano que expresa insuficientemente un ADN del oncogén de la presente invención es considerablemente útil para detectar un compuesto o su sal que promueve o inhibe una actividad promotora para el ADN del oncogén de la presente invención y, por ende, puede contribuir significativamente a dilucidar las causas de una variedad de enfermedades debidas a la expresión insuficiente del ADN del oncogén de la presente invención y desarrollar agentes profilácticos o terapéuticos para las enfermedades.

Además, usando un ADN que contiene una región promotora para una proteína oncogénica de la presente invención, un gen que codifica una proteína dada se puede ligar a un sitio corriente abajo, y el producto se puede inyectar en una célula huevo animal para producir un llamado animal transgénico (un animal introgresivo), de modo que un mecanismo causa en forma específica la expresión *in vivo* del oncogén a la vez que se evita la formación de cáncer.

5 Por otra parte, un gen indicador apropiado se puede ligar a la región promotora para establecer una cepa de célula transformante que expresa el gen, que se puede usar como sistema de búsqueda *in vitro* para un compuesto de bajo peso molecular que promueve o inhibe específicamente la capacidad de producción *in vivo* de la proteína oncogénica de la presente invención por sí misma.

10 Cuando se usa para la prevención o tratamiento de un cáncer, un compuesto o su sal que regula la actividad de una proteína oncogénica de la presente invención se puede combinar con otro agente anticáncer tal como ifosfamida, UTF, adriamicina, peplomicina, cisplatino, ciclofosfamida, 5-FU, UFT, metotrexato, mitomicina C y mitoxantrona.

15 Ejemplos

La presente invención se describirá más específicamente con referencia a Ejemplos. Estos ejemplos se incluyen en realizaciones más preferidas de la presente invención, pero la presente invención no está limitada a estas realizaciones.

20 Ejemplo 1

Clonación y secuenciación de un ADNc que codifica una hWAPL de ser humano

25 Se realizó PCR usando una biblioteca de ADNc disponible en el comercio, un kit de ADNc testicular humano (Marathon-Ready™ ADNc Kit; Clontech Inc.) como molde y usando dos cebadores:

el cebador 1 (secuencia: TTGGATCCATGACATCCAGATTTGGGAAAACATACAGTAGG); y el cebador 2 (secuencia: TTGAATTCCTAGCAATGTTCCAAATATTCAATCACTCTAGA). En la reacción de PCR, se usó un kit de mezcla de polimerasa Advantage 2 (Clontech Inc) y de acuerdo con las instrucciones del kit, la amplificación se realizó con un ciclo de temperatura:

- (1) 94°C durante 1 min;
- 35 (2) 5 ciclos de 94°C durante 10 seg y 72°C durante 2 min; y
- (3) 25 ciclos de 96°C durante 10 seg y 70°C durante 2 min, y posteriormente seguido por la reacción de elongación realizada a 72°C durante 5 min. Después de la reacción, el producto de amplificación por PCR obtenido de este modo se clonó a un vector plásmido pGEM-T easy (PROMEGA) de acuerdo con las instrucciones para pGEM-T easy (PROMEGA). Este se transdujo a *E. coli* DH5 α (Invitrogen) y usando un gen de resistencia a ampicilina en el vector plásmido pGEM-T easy, se seleccionaron los clones portadores del plásmido en un medio de agar LB que contenía ampicilina.

El plásmido portado por cada uno de los clones seleccionado se secuenció para obtener la secuencia del nuevo ADNc (SEQ. ID: No.2) clonado en el mismo. Una nueva proteína que comprendía una secuencia de aminoácidos (SEQ. ID. No.1) deducida de un ORF de la secuencia de nucleótidos del ADNc se designó WAPL humana (hWAPL). Un transformante portador del ADNc de longitud completa de la hWAPL, que se clonó en el plásmido, se designó pGEMhWAPL de *Escherichia coli* DH5.

50 Ejemplo 2

Expresión de un gen de hWAPL en un tejido canceroso humano

55 Se suministraron muestras de tejidos cancerosos extirpados quirúrgicamente con el consentimiento de los pacientes sometidos a extirpación quirúrgica de tejido canceroso en el Tokyo Medical College Hospital. Las muestras de tejidos cancerosos extirpados quirúrgicamente se examinaron para determinar la presencia de expresión del gen de hWAPL y la cantidad de expresión del mismo por transferencia Northern y PCR en tiempo real.

60 En la transferencia Northern, se identificó un ARNm expresado del gen de hWAPL a partir de los ARN totales preparados, usando un ADN que tenía una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de ácido nucleico Nos. 2511 a 2813 en la secuencia de longitud completa de la hWAPL de la SEQ ID. No. 2, como sonda de detección. Por otra parte, en la PCR de tiempo real, se amplificó un ADNc de la hWAPL, usando un kit de amplificación SYBR Green I (TaKaRa Co. Ltd.) y como cebadores de PCR, un par de cebadores:

65 5'-GAATTCATAGGCACAGCGCTGAACTGTGTG-3' y
5'-TTGAATTCCTAGCAATGTTCCAAATATTCA-3'.

ES 2 331 995 T3

Por otra parte, se usó β -actina como estándar intrínseco. Los cebadores de PCR usados para la amplificación de ADNc de β -actina humana fueron un par de cebadores disponibles en el comercio (Clontech) de:

5'-GGGAAATCGTGCGTGACATTAAG-3' y

5'-TGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3'.

La condición de ciclos de temperatura seleccionada para la PCR en tiempo real fueron las siguientes:

(a) 95°C durante 30 segundos;

(b) 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 68°C durante 30 segundos; y posteriormente

(c) 87°C durante 6 segundos.

Para el ciclo térmico de la reacción de PCR, se usó el Sistema Ciclador Smart (TaKaRa Co. Ltd.). Se detectó la cantidad de ADNc bicatenario por medio de un marcador fluorescente en el mismo para determinar la cantidad de producto de amplificación.

Para las muestras de tejido canceroso mencionadas anteriormente, se prepararon muestras comparativas de ARN total a partir de células normales y células de carcinoma de los tejidos individuales de acuerdo con un procedimiento conocido (Oikawa *et al.*, Cancer Res., 61, 5707-5709 (2001)). Entre las células de carcinoma examinadas de cáncer cervical, cáncer del cuerpo uterino, cáncer ovárico, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer pulmonar, carcinoma colorrectal y cáncer de mama, aproximadamente el 40% de las muestras de células carcinomatosas de cáncer cervical demostraron expresión significativa del gen de hWAPL (Fig. 5).

Las muestras de células carcinomatosas de cáncer cervical se examinaron para determinar la presencia de infección con HPV. Específicamente, se detectó una región del ARNm para el gen E6/E7 derivado de HPV por RT-PCR con sus correspondientes cebadores de acuerdo con un procedimiento conocido (Nakagawa *et al.*, J. Med. Viral., 62, 251-258 (2000)), y en todas las muestras de células de carcinomas invasivos de cáncer cervical, se confirmaron la infección con HPV y la expresión del gen E6/E7. Excepcionalmente, algunas muestras de cáncer gástrico también demostraron elevada expresión del gen de hWAPL.

Ejemplo 3

Inducción de la expresión del gen de hWAPL por E6 y E7 de HPV 16

Un gen E6 de HPV 16 se amplificó y aisló por un método RCR usando un par de cebadores:

16E6attB1:

5'-AAAAAGCAGGCTCCACCATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCC-3', y

16E6attB2:

5'-AGAAAGCTGGGTTACAGCTGGGTTTCTCTACGTG-3',

mientras que un gen E7 de HPV 16 se amplificó y aisló por un método RCR usando un par de cebadores:

16E7attB1:

5'-AAAAAGCAGGCTCCACCATGCATGGAGATACACCTACAT-3' y

16E7attB2:

5'-AGAAAGCTGGGTTATGGTTTCTGAGAACAGATGGGG-3'.

Posteriormente, cada uno de estos genes se clonó en un vector de retrovirus pCLXSN de acuerdo con un procedimiento de Naviaux *et al.* (Naviaux *et al.*, J. Virol., 70, 5701-5705 (1996)), para generar los retrovirus LXSN-16E6 y LXSN-16E7 para producir los recombinantes E6 y E7, respectivamente. Además, se preparó el retrovirus LXSN-16E6E7 para producir los recombinantes E6 y E7 en forma simultánea.

ES 2 331 995 T3

Se ha hallado que un producto del gen E2 derivado de HPV se puede unir a una región promotora de los genes E6 y E7 para poseer una función para la inhibición de su transcripción y que un producto del gen E2 derivado del virus de papiloma bovino (BPV) tiene una función similar para inhibir la transcripción. El fragmento del gen E2 de BPV1 se obtuvo por PCR anidada usando pBPV-MII como molde. En la PCR anidada, el par de cebadores internos usados

5' -AAAAAGCAGGCTCCACCATGGAGACAGCATGCGAAC-3' y 5' -AGAAAGCTGGGTCAGAAGTCCAA GCTGGCTGTAAAG-3',

mientras que el par de cebadores exteriores consistió en:

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3' y 5' -GGGGACAAGTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'.

El fragmento del gen E2 BPV1 obtenido de este modo se clonó en un vector de retrovirus pCMSVpuro, que se basa en un vector de virus pCMSCV(Clontech) para propósitos generales, para preparar un retrovirus MSCV-puro BPV1E2 para producir el recombinante E2 del BPV. El vector de retrovirus pCMSVpuro comprende un gen de resistencia a la puomicina como marcador de selección.

Se infectaron células epidérmicas humanas HDK1 (BioWhittaker) con los retrovirus LXSXN-16E6, LXSXN-16E7 y LXSXN-16E6E7 para producir recombinantes E6 o E7 derivados de HPV 16, respectivamente. Como control negativo, se usó una célula epidérmica humana HDK1 infectada con el vector de retrovirus pCLXSXN. Se seleccionó una línea celular en la que se estableció infección continuada del vector de retrovirus cultivando las células en un medio que contenía G418 a razón de 50 µg/mL durante 3 días. Después de la infección, la expresión del gen de hWAPL inducida por una proteína recombinante de E6 o E7 de HPV 16 se determinó por transferencia Western usando un anticuerpo específico que reconoce una región de la secuencia parcial de aminoácidos 50 a 66 (secuencia de aminoácidos: CNFKPDIQEIPKKPKVEE) en la proteína oncogénica hWAPL (Fig. 6).

Al mismo tiempo, también se determinó la cantidad de expresión de la proteína supresora p53 por transferencia Western. Posteriormente, se confirmó nuevamente que el producto E6 promovió un proceso de escisión de la proteína supresora tumoral p53, lo que dio como resultado la expresión de la proteína oncogénica hWAPL.

Por otra parte, cuando las líneas celulares de carcinoma del cáncer cervical CaSki, SiHa y C33A se infectaron con MSCV-puro BPV1E2, las líneas celulares CaSki y SiHa productoras de E6 y E7 de HPV 16 demostraron aumento de la proteína supresora tumoral p53 remanente como resultado de la inhibición de la transcripción de los genes E6 y E7 por el E2 de BPV. En forma concomitante, se inhibió la expresión de la proteína oncogénica hWAPL (Fig. 6). Por otra parte, en la línea celular C33A, en la que se indujo la formación de cáncer por un mecanismo diferente de esta formación de cáncer originada por la infección con HPV, la cantidad de proteína supresora tumoral p53 remanente o la cantidad de expresión de la proteína oncogénica hWAPL no se vio afectada. Los resultados indican que aunque el aumento de la cantidad de expresión de la proteína oncogénica hWAPL está estrechamente asociado con la formación de cáncer, puede existir un mecanismo independiente que causa aumento de expresión de la proteína oncogénica WAPL, que es diferente del mecanismo de aumento de expresión de la proteína oncogénica hWAPL debido a E6 y E7 de HPV.

Ejemplo 4

Inhibición de la actividad promotora del gen hWAPL por una proteína supresora p53

Se confirmó que la proteína supresora p53 tiene una función para la inhibición de la transcripción del gen de hWAPL a partir de su promotor, de la siguiente manera.

Un promotor del gen de hWAPL se amplificó y aisló por el método de PCR usando un ADN genómico en células DLD-1 como molde con el uso de un par de cebadores:

cebador 1

(secuencia: GTGCATCCCACCCACAGTGGAAGACATGG) y

cebador 2

(secuencia: CCGCTTCCGCCGGTGAATGGTCAGTGCTGG).

Se clonó en primer término un fragmento de ADN del producto de PCR al PGEMT-easy (PROMEGA) y, en forma sucesiva, el fragmento digerido con una enzima de restricción EcoRI posteriormente se clonó a pBluescript

ES 2 331 995 T3

(Stratagene). Una región que comprendía una porción promotora del gen de hWAPL, que se insertó en el plásmido, fue digerida con Sall/XhoI y clonada en el vector pGL3-Basic (PROMEGA).

Después de la purificación con Qiagen Plasmid MaxiKit (Qiagen), el vector obtenido se co-transfectó con un vector de expresión de p53, pHM6 (Roche) como control y un vector pGR3-tK para la estandarización del ensayo de luciferasa, usando LipofectAmine2000 (Invitrogen) en una célula HeLa. Se usó un kit Dual Luciferase (Promega) en el ensayo de luciferasa para determinar la cantidad de proteína marcada, luciferasa, que fue un producto del gen indicador transcrito y traducido bajo el control del promotor del gen de hWAPL.

Como resultado, se confirmó que cuando se transdujo el vector de expresión de p53, el incremento de la cantidad de proteína supresora p53 expresada redujo la cantidad de proteína luciferasa marcada, que fue transcrita y traducida bajo el control del promotor del gen de hWAPL, en un 30% en comparación con el control. En otras palabras, se confirma que la proteína supresora p53 tiene la función de producir la reducción de la actividad del promotor del gen de hWAPL.

Ejemplo 5

Construcción de un vector de expresión para producir proteína hWAPL recombinante

Se transdujeron los sitios de restricción HindIII y EcoRI, respectivamente, en los extremos de la región de las bases Nos. 1 a 2195 en el ADNc que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID. No.2 por mutagénesis específica de sitio usando PCR. El producto de PCR obtenido de este modo se digirió con HindIII/EcoRI, y el correspondiente fragmento de ADN se insertó en un vector de expresión de mamífero marcado con HA, pHM6 (Roche Diagnostics), para construir un vector de expresión para producir un recombinante de la proteína de hWAPL marcada con HA, pHM6-hWAPL. El fragmento también se insertó en un vector de expresión de mamífero, phrGFP-N1 (Stratagene) para expresar una proteína fusionada con un compañero de fusión hrGFP para construir un vector de expresión para producir una proteína recombinante de hWAPL fusionada a GFP, phrGFP-hWAPL.

El vector de expresión para producir un recombinante se transfectó en una célula huésped de mamífero usando LipofectAmine 2000 (Invitrogen). Después de cultivar durante 2 días después de la transfección, se realiza la selección usando EPICS ALYRA HiperSort (Bechman Coulter) sobre la base de la presencia de la expresión de la cola hrGFP. Después del cultivo posterior y la selección adicional, se obtiene una línea celular transformada portadora del vector de expresión deseado para producir la proteína recombinante hWAPL.

Ejemplo 6

Generación de un anticuerpo específico para la proteína hWAPL

Para generar un anticuerpo específico para la proteína oncogénica hWAPL, se preparó una cadena peptídica (hWAPL₅₀₋₆₆) que tenía una secuencia parcial de aminoácidos 50 a 66: CNFKPDIQEIPKKPKVEE que se ubica en la región N-terminal de la proteína oncogénica hWAPL como péptido inmunogénico por síntesis química. Por otra parte, se produjo por recombinación un polipéptido fusionado marcado con 6xH His que comprendía una secuencia parcial de aminoácidos 814-1037 que se halla en la región C-terminal de la proteína oncogénica hWAPL.

De acuerdo con una técnica convencional, estos dos péptidos inmunogénicos se usaron para inmunizar separadamente un conejo para producir anticuerpos policlonales específicos para estos péptidos antigénicos: un anticuerpo anti-hWAPL-N y un anticuerpo anti-hWAPL-C. En la transferencia Western del Ejemplo 3 y demás, la proteína oncogénica hWAPL se detectó usando el anticuerpo específico anti-hWAPL-N para el antígeno hWAPL₅₀₋₆₆.

Ejemplo 7

Inducción de inestabilidad cromosómica por la proteína hWAPL

Una célula HeLa se infecta con el vector de expresión phrGFP-hWAPL para producir una proteína recombinante de hWAPL fusionada a hrGFP. El procedimiento descrito en el Ejemplo 5 se realiza para seleccionar una línea celular positiva para GFP-hWAPL que produce la proteína fusionada GFP-hWAPL y una línea celular negativa para GFP-hWAPL que no produce la proteína fusionada GFP-hWAPL. Después de subcultivar durante cinco generaciones después de la selección, se analiza el contenido de un ADN del gen cromosómico por citometría por barrido láser de acuerdo con el procedimiento de Buse (J. Biol. Chem., 274, 7253-7263 (1999)).

La línea celular negativa para GFP-hWAPL demuestra un contenido del gen cromosómico equivalente a la célula huésped, célula HeLa, en la que la mitad o más está compuesta por un contenido diploide normal y el contenido tetraploide es aproximadamente la mitad del diploide. Por otra parte, en la línea celular positiva para GFP-hWAPL, existe un contenido diploide normal en menor cantidad, la mayor parte demuestra poliploidía, un contenido tetraploide

ligeramente mayor que el diploide, y existe también un octoploide en una proporción del 10,1%. En consecuencia, se puede considerar que la sobreexpresión de una proteína hWAPL induce inestabilidad cromosómica (Fig. 7).

En forma correspondiente, la inducción de atipia nuclear, en particular de multinucleación, también se origina en la sobreexpresión de la proteína hWAPL. Después de subcultivar tres generaciones, las proporciones de multinucleación observadas son sólo del 5% y 4% en la línea celular negativa para GFP-hWAPL y la célula HeLa infectada con el vector pHRGFP-N1 (control), respectivamente, mientras que es 15,6% (tres veces o más) en la línea celular positiva para GFP-hWAPL (Fig. 8).

Por otra parte, en asociación con la anomalía cromosómica tal como atipia nuclear debido a división anormal de centrómeros durante un proceso de separación por mitosis de un gen cromosómico, se produce la inducción de formación de micronúcleos por la sobreexpresión de una proteína hWAPL. Una frecuencia de formación de micronúcleos en la línea celular positiva para GFP-hWAPL es aproximadamente dos veces mayor que la de la línea celular negativa para GFP-hWAPL (Fig. 7).

Ejemplo 8

Inducción de formación de cáncer de un fibroblasto NIH 3T3 por la proteína hWAPL

Se infecta el fibroblasto NIH 3T3 con el vector de expresión pHM6-hWAPL para producir una proteína recombinante de la hWAPL con cola de HA para producir una línea celular recombinante que sobreexpresa la proteína hWAPL con cola de HA, una línea celular HA-hWAPL 3T3. Como control negativo, se produce una línea celular HA-3T3 infectada con un vector pHM6. Cuando se cultiva en una placa, la línea celular HA-3T3 para control negativo forma una capa celular única de tipo confluyente homogénea como en la célula huésped, el fibroblasto NIH 3T3, mientras que la línea celular HA-hWAPL 3T3 forma una estructura focal.

A un ratón lampiño se le inyectó por vía subcutánea la línea celular HA-hWAPL 3T3 y la línea celular HA-3T3. El seguimiento posterior indicó que dentro de los 10 días siguientes se indujo la oncogénesis en todos los sitios de inyección para la línea celular HA-hWAPL 3T3 mientras que no se indujo la oncogénesis en los sitios de inyección para la línea celular HA-3T3. Por transferencia Western, usando el anticuerpo anti-HA y el anticuerpo anti-hWAPL-C, se confirmó que la proteína hWAPL con cola de HA estaba realmente expresada en la célula cancerosa. En la célula cancerosa, se observó mitosis heterotípica; por ejemplo, también se observó la división tripolar.

Ejemplo 9

Inhibición del crecimiento de células de carcinoma por un ARNsi dirigido al gen de hWAPL

Usando un ARNsi dirigido al gen de hWAPL, se confirmó que la inhibición de la expresión de la proteína hWAPL puede producir la inhibición del crecimiento de una célula de carcinoma.

(1) Inhibición in vitro del crecimiento de células de carcinoma por un ARNsi

Usando el kit Silencer de construcción de ARNsi (Ambion), se produjeron ARNsi que se dirigen a la siguiente secuencia génica (ARNsi de hWAPL) y a un control (control negativo), respectivamente:

ARNsi de hWAPL: CGGACTACCCTTAGCACAA

control negativo: ACTACAACCTGGTCGCAACC.

Prácticamente, se prepararon dos oligómeros sintéticos para cada uno; específicamente, para el ARNsi de hWAPL,

AACGGACTACCCTTAGCACAAcctgtctc y

AATTGTGCTAAGGGTAGTCCGcctgtctc,

y, para el control negativo,

AAACTACAACCTGGTCGCAACCcctgtctc y AAGGTTGCGACCAGTTGTAGTcctgtctc.

Posteriormente, en cada oligómero sintético, un cebador promotor T7 se hibridó en la porción de ctgtctc y se trató con ADN polimerasa Klenow para preparar completamente un ADN bicatenario. Posteriormente, este fue transcrito por la ARN polimerasa T7, los ARN de las cadenas antisentido y homsentido preparados se hibridaron entre sí, y posteriormente ambos extremos cohesivos se digirieron con ARNasa para preparar un ARNsi bicatenario con extremos romos.

A una célula SiHa derivada de cáncer cervical, en la que hWAPL estaba altamente expresada, se transdujo el ARNasi de hWAPL y el control negativo de ARNsi a una concentración de 1 nM para evaluar la influencia sobre el crecimiento celular.

Los ARNsi se transfectaron a la célula SiHa derivada de un cáncer cervical positivo para HPV16, en el que se observó alta expresión de hWAPL. La Fig. 10 muestra los resultados de graficar el número de células vivas ($\times 10^3$) en ordenadas en función del tiempo de transducción del ARNsi (horas) en abscisas. En la figura, "ARNsi" para la transfección de un ARNsi dirigido a DIF-2, "cont" para la transfección de un ARNsi control y "TSA" indican los resultados obtenidos cuando se añade un inhibidor de histona desacetilasa, tricostatina A, a un cultivo después de la transfección del ARNsi, respectivamente.

Hasta 20 después de la transfección del ARNasi de hWAPL, se puede observar un aumento del número de células tumorales vivas. Durante el período, la comparación con el control puede indicar la inhibición del crecimiento tumoral. Posteriormente, las células a las que se transdujo ARNasi de hWAPL muestran reducción en el número de células vivas y después de 100 horas, permanecía viva una pequeña cantidad de células. En contraste, cuando se inhibe el avance de la desacetilación para las lisinas acetiladas contenidas en una histona por adición de tricostatina A, se atenúa el efecto de la inhibición del crecimiento celular por el ARNasi de hWAPL.

Estos resultados indican que la muerte celular por inhibición de una hWAPL es causada por inhibición de una modificación de histona tal como acetilación, e implica que la propia hWAPL puede estar involucrada en el control de un código de histona.

(2) Efecto de inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral

A ratones BALB3T3/lampiños de 6 semanas de edad se inocularon 2×10^6 células SiHa. A partir de los 10 días posteriores a la inoculación, a las células tumorales inoculadas se inyectaron ARNasi de hWAPL y un ARNsi como control negativo una vez cada dos días y cinco veces en total, respectivamente.

La variación del tamaño del tumor inoculado se evaluó para 6 animales del grupo de inyección de ARNasi de hWAPL, 6 animales del grupo de inyección de ARNsi como control negativo y 5 animales del grupo no tratado. Los resultados indicaron una reducción del tamaño tumoral promedio de 33% en el grupo de inyección de ARNasi de hWAPL con respecto al grupo no tratado.

Por otra parte, se demostró que la secuencia de nucleótidos del ADNc para la hWAPL, que nosotros clonamos, estaba ubicada en las posiciones 10q23.31 a q23.32 del genoma humano. La secuencia de nucleótidos del mismo se muestra a continuación, junto con la secuencia de nucleótidos de la región no traducida 5' y la región promotora del gen de hWAPL dilucidado así como la secuencia de nucleótidos del ADNc para la WAPL de ratón mencionada. En los ORF de los ADNc, la región que va desde el codón de iniciación ATG hasta el codón de detención TAG aparece escrita en mayúscula, mientras que en la región promotora, la región posterior a un punto de iniciación de transcripción putativa se escribe con mayúsculas basándose en la comparación con EST.

Secuencia de ADNc de la hWAPL

```

gcgagcggcgtgttggaggaaggaggtgggggcccgggagcgcaaattggcggttgagatggt
ycargggccctgttcaaactccagcactgaccattcacccggcggaagcggcgccgagga
ggcggcgccgcccagcgggggcacacagcaggctctgttaccagctccagcagtgggcg
gccagcgagagctaggcccgsgcccgccggcgggcgctcgaggcggggaggggaagtgc
ggggccgcccgtcctgccccccaaccggggttcctatttaccgaaagcagagtccttc
gcctctctcgggtcttcacctgccggccctgctctcccgcgcgagggttcgcgcccggcc

```

ES 2 331 995 T3

cgcgggccgtarggagcgggagaaaggcggargcgccccgtggccaaagcaccgcag
5 gcttccgaggagaatatgaaactggtgtcaaaATGACATCCAGATTTGGGAAAACATAC
AGTAGGAAAGGTGGAAATGGCAGTTCAAAATTCGATGAAGTCTTTTCCAACAAACGGAC
10 TACCCTTAGCACAAAATGGGGAGAGACCACATTTATGGCTAAATTAGGGCAGAAGAGGC
CCAATTTCAAACCAGATATCCAAGAAATTCGAAGAAACCTAAAGTGGAAGAAGAAAGT
15 ACTGGAGATCCTTTTGGATTTGATAGTGATGATGAGTCTCTACCAGTTTCTTCAAAGAA
TTTAGCCCAGGTTAAGTGTTCCTCTTATTCAGAATCTAGTGAAGCTGCTCAGTTGGAAG
20 AGGTCACTTCAGTACTTGAAGCTAATAGCAAAATTAGTCATGTGGTCGTTGAAGACACT
GTCGTTTCTGATAAATGCTTCCCTTTGGAGGACACTTTACTTGGGAAAGAAAAGAGCAC
25 AAACCGAATTGTAGAAGATGATGCAAGCATAAGTAGCTGTAATAAATTAATAACTTCAG
ATAAAGTGGAGAATTTTCATGAAGAACATGAAAAGAATAGTCACCATATTACAAAAAT
30 GCTGATGACAGTACTAAGAAACCCAATGCAGAACTACAGTGGCTTCTGAAATCAAGGA
AACAAATGATACTTGGAACTCCCAGTTTGGGAAAAGGCCAGAATCACCATCAGAAATAT
35 CTCCAATCAAGGGATCTGTTAGAACTGGTTTGTGTTGAATGGGATAATGATTTTGAAGAT
ATCAGATCAGAAGACTGTATTTTAAGTTTGGATAGTGATCCCCTTTTGGAGATGAAGGA
40 TGACGATTTTAAAAATCGATTGGAAAATCTGAATGAAGCCATTGAGGAAGATATTGTAC
AAAGTGTCTTAGGCCAACCAACTGTAGGACGTACTGTAGGGCCAATAAAACGAAATCC
45 TCCCAAGGAGCATCAAATTTTGATAAGCTGATGGACGGCACCAGTCAGGCCTTAGCCAA
AGCAAAACAGTGAATCGAGTAAAGATGGCCTGAATCAGGCAAAGAAAGGGGGTGTAAGTT
50 GTGGGACCAGTTTTAGAGGGACAGTTGGACGGACTAGAGATTACACTGTTTTACATCCA
TCTTGCTTGTGTCAGTTTGTAATGTTACCATACAGGATACTATGGAACGCAGCATGGATGA
55 GTTCACTGCATCCACTCCTGCAGATTTGGGAGAAGCTGGTCGTCTCAGAAAAAAGGCAG
ATATTGCAACTTCTAAGACTACTACTAGATTTTCGACCTAGTAATACTAAATCCAAAAAG
60 GATGTTAACTTGAATTTTTTGGTTTTGAAGATCATGAGACAGGAGGTGATGAAGGAGG
TTCTGGAAGTTCTAATTACAAAATTAAGTATTTTGGCTTTGATGATCTCAGTGAAAGCG

65

ES 2 331 995 T3

AAGATGATGAAGATGATGACTGTCAAGTAGAAAGAAAGACAAGCAAAAAAGAAGCTAAA
 ACAGCTCCATCACCTCCTTGCAGCCTCCCCCAGAAAGCAATGATAATTCCCAGGACAG
 5 TCAGTCTGGTACTAACAATGCAGAAAACCTTGGATTTTACAGAGGACTTGCCTGGTGTGC
 CTGAAAGTGTGAAGAAGCCCATAAATAAACAAGGAGATAAATCAAAGGAAAATACCAGA
 10 AAGATTTTTAGTGGCCCCAAACGGTCACCCACAAAAGCTGTATATAATGCCAGACATTG
 GAATCATCCAGATTTCAGAAGAAGCTGCCTGGGCCACCAGTAGTAAAACCTCAGAGTGTCA
 15 CAGTGAGGCTGTCTTCAAAGGAACCAAATCAAAAAGATGATGGAGTTTTTAAGGCTCCT
 GCACCACCATCCAAAGTGATAAAAACTGTGACAATACCTACTCAGCCCTACCAAGATAT
 20 AGTTACTGCACTGAAATGCAGACGAGAAGACAAAGAATTATATACTGTTGTTTCAGCACG
 TGAAGCACTTCAACGATGTTGTAGAATTTGGTGAAAATCAAGAGTTCACTGATGACATT
 25 GAGTACTTGTAAAGTGGCTTAAAGAGCACTCAGCCTCTAAACACACGTTGCCTTAGTGT
 TATTAGCTTGGCTACTAAATGTGCCATGCCCAGTTTTTCGAATGCACCTGAGAGCACATG
 30 GGATGGTAGCAATGGTCTTTAAACCTTGGATGATTCCCAGCACCATCAGAATCTGTCC
 CTCTGTACAGCTGCCCTCATGTATATACTGAGTAGAGATCGTTTGAACATGGATCTTGA
 35 TAGAGCTAGCTTAGATCTAATGATTCGACTTTTGGAAGTGAACAAGATGCTTCATCAG
 CCAAGCTACTGAATGAAAAAGACATGAACAAAATTAAAGAAAAAATCCGAAGGCTCTGT
 40 GAAACTGTACACAACAAGCATCTTGATCTAGAAAATATAACGACTGGGCATTTAGCTAT
 GGAGACATTATTATCCCTTACTTCTAAACGAGCAGGAGACTGGTTTAAAGAAGAACTCC
 45 GGCTTTTGGGTGGTCTGGATCATATTGTAGATAAAGTAAAAGAATGTGTGGATCATTTA
 AGTAGAGATGAGGATGAAGAGAACTGGTAGCCTCACTATGGGGAGCAGAGAGATGTTT
 50 ACGAGTTTTAGAAAGTGTAAGTGTGCATAATCCCGAAAATCAAAGCTACTTGATAGCAT
 ATAAAGATTCCCAACTTATTGTTTCATCAGCTAAAGCATTACAGCATTGTGAAGAACTG
 55 ATTCAGCAGTACAACCGTGCTGAGGACAGCATATGCTTAGCTGACAGTAAGCCTCTGCC
 TCACCAGAATGTAAGTAAACCATGTAGGCAAAGCAGTGGAGGACTGCATGAGGGCCATCA
 60 TCGGGGTGTTGCTTAATTTAACTAATGATAATGAGTGGGGCAGCACCAAAACAGGAGAG

ES 2 331 995 T3

CAGGACGGTCTCATAGGCACAGCGCTGAACTGTGTGCTTCAGGTCCAAAGTACCTACC
 TCAGGAGCAGAGATTTGATATTCGAGTGCTGGGCTTAGGTCTGCTGATAAATCTAGTGG
 5 AGTATAGTGCTCGGAATCGGCACTGTCTTGTCAACATGGAAACATCGTGCTCTTTTGAT
 TCTTCCATCTGTAGTGGAGAAGGGGATGATAGTTTAAAGGATAGGTGGACAAGTTCATGC
 10 TGTCCAGGCTTTAGTGCAGCTATTCCTTGAGCGAGAGCGGGCAGCCCAGCTAGCAGAAA
 GTAAAACAGATGAGTTGATCAAAGATGCTCCCACCACTCAGCATGATAAGAGTGAGAG
 15 TGGCAAGAAACAAGTGGAGAAAATACAGTGGGTGTCAACTGAAAAGACTGATGGTACAGA
 AGAGAAACATAAGAAGGAGGAGGAGGATGAAGAACTTGACCTCAATAAAGCCCTTCAGC
 20 ATGCCGGCAAACACATGGAGGATTGCATTGTGGCCTCCTACACGGCACTACTTCTTGGG
 TGTCTCTGCCAGGAAAGTCCAATCAATGTAACCACTGTGCGGGAATATCTGCCAGAAGG
 25 AGACTTTTCAATAATGACAGAGATGCTCAAAAAATTTTTGAGTTTATGAATCTCACTT
 GTGCTGTTGGAACAACTGGCCAGAAATCTATCTCTAGAGTGATTGAATATTTGGAACAT
 30 TGCTAGctgctttacctttgcttcaggtgctcggtaatgctggagctatccttagacaa
 agaaaagtcaagtcatgaaagaagtccttgaagatataccaagaacattcatcagtatc
 35 attcgtgtttgatttttaaggccacctgatttcttcgtcatgcattcggcatttgcta
 aatgacagttactacatcaatctgcaactatcaaaaatgaggggaaaaggttcaggctg
 40 ttaacaattccatgcagtatTTaaatacatTTactttggcagagtttataccctccct
 tgttttcttgctttattctgggcaagtttgaaggggaaaatttgctgctgctgttagtgc
 45 aactgctgtgtatggttgagccactggtgtcatgccagccaggtgcaaaggcagcttagc
 tactgaggtagcgaatgttctgaggacattctagacaacagcttagttcctttttcagg
 ctcatTTtgcttttgcttttttggtgaatgattccaatcgtaaataaagcttttaataat
 50 tttgtgaattttttgggttggtgttcctgaactactgtctatatTTaaaattagatgga
 atccaaagatacacgggattaatagtatatTTTTttattcttgattaggtttgggttat
 55 tgaactatTTTTtacttttgagaccacaaccatattcaatatcataccataatgtgtca
 tagctataggcacaagaaaaacaacagtttgagagaatattatataagatgatgtgccc

60

65

ES 2 331 995 T3

tgttaaaaggaggaggcaaaatagtcaaaccagggtagtttacacttaatgctagggga
 5 ggctcttaaaacattatttagatttttgaggaaagactctctagatatattttcctaagt
 cagtacaataaatataaggaagctaaaacaccaatgtggaattcctgtttccagataac
 10 atgtatattcttctatagagtgcaggatcaattgcataagcgcaaagccttaaattgc
 tggtttagagaagacccttttttcattcagattctttgttcgtagagcagttatttgaa
 15 aaacagttatggaacacaaaacattttatagatttaatatcataacattgcaaattttt
 cttgtattattgttcacaccactgggtataacttttttttttcccttttttattgattggg
 20 cctgaatacaggctttctagagatctttttcattaatacttttaaatacctttcaggta
 gttacatcatgtttcttcattggatttgtaaaacttgaagccataaaaaatattagtttg
 25 gtgtgtattggggaaaatagctaaaagtctaatttttaccatttagactttgttattt
 ccttgataaaagtgacaaatcggggctcttgatcagtgccagctgtaatgtttttaaa
 30 tgcagtggtgccttctattgtcttccctatttttgataatgcagattggtgggaaatct
 gtaaggaagtaactgattccaggcaaattgttttcttcccttctaccaccccaaccct
 35 acccatcaccttttaagaacatagtagccagtgtaacgtgggaaccattgagattgta
 tttgccctgagtattaaagctagcttagcaaaatacttttaaaaacatattggtaaatg
 40 ataccataaaaattaaattagttatattttatttttaaaatgcaaaatacattgatattt
 attaatcattggatttagggaaagggacagatttttggtgaacctgacttgtggcagat
 45 ggtaaggaatattataaaacatttggtatgagaacaatcagggcgaactgcatttttctg
 ttacactggtaatcatttgaaaattgatttacctcagtgtttaacagttttttgttttg
 50 ttttgtttttttaataataactaattgtcgagcactgatagagatgcagattttggtgg
 ggggaggtggtgggggagataatcacttcaccaactgcagtgcatgtgtgtttttaa
 55 ccctcagagaactctgcatttttaggggtacttgaggctgacttaactaaaagttttaag
 taacctttttccattgtaaatatttctgtaaatactaccaattggaaattagaacagt
 60 agagtacttttctgaatccaatcctattttttattttatacagtatctctcagctgtgat
 ctttgagcaaaagccaacggcaggaaaaaatagtttgtaccagtttcatgaagtatgt
 65 ctttggttttttgtaataattttaactcaataaaaattgctactttcaatac

ES 2 331 995 T3

Secuencia de la región promotora del gen de hWAPL

5 at t t t t t a g t a g a g a c g g g g t t t c a c c g t g t t a g c c a g g a t g g t c t c g a t c t c c t g a c c t
cat g a t c c g c c t g c c t c g g c c t c t c a a a g t g c t a g g a t t a c a g g c g t g a g c c a c c g t g c
ct g g c c g c t g a a c a c a a t t t a a a g c t t c a a t t a a t c c a g g t a t t c a g t c a a c a a t a t t
10 t a t a g c a c a c t t t t c t g t g t g t g a g g c a c t a t t c t a g g t g t g c t t g g c a t a t a a a t g a a
c a a a a g t c a g c c a t c c t c g t c c t c a t g g a g t t t a t a t t c t t g t g a a a c g a a a t a g a t a a
15 t a a a c a a g t t c a t a c a c a a a g c a a a c g t a a t g a c t a t g t t a t g g a g a a a a g c a g c a g g g
a a a a g g a g a t a c a g g g t g c t g g a t g a c c t t a a a t a g c a t g g c c a a g g a a a a c a t t a c t g
20 a g a g a c a c a c t t g a g c a a a g a c c t g a a a g c a t g c a g g g a a t g a g t t g t g t g t g t c t c t t
g a g g a c t a a c a g a g g g a a c a a g t a c g a a g a g g g c c c a c a g g c a g g a g c t g g c t t g g c a t
25 g t t c t a g t a g t a g a c a g a g g c a g g c c c g g c a a g g t a g g a a g g g a t a g g a g t a c t c a g g g
g c c a g a t c a t g c a g g g c c t t t t c a c c g t t a a g a a c t t t g g a t t t t a g t a t t a c a g g a g g
30 a c c c t t c a g g g t g t t t g a c t a g g c g g g t a t c a t a c a g t a t t a a g g g t g a g g a t c c t g a a
t a a a a a g g g c t g t t t c c a g g a c a a g g g t c a g g a a g c c a g a c t t c t t c g a g g t t g c t t g
35 t a c c g g t c c t t g t c a g g c a a t g t g t c c t a g a g a a t t t c c t t t g c t t t g t g t t t c a t c t
a c c t a g a c a g c a g t g t a t t c c c c a g a g g a c g t c a c t a t c t c c a g a g a a c a t a t t c c a a t
40 t a t c c t g g g a a a t a t g a t a a t t g g g a t t a t a a c a g t a c t c a t t t t c t c a a t t c t c a g a a
t g a a a c c t a t c c a a g g c a a g a a c a a a a g t t c t c c a g a a a g c a c t c c c c t c c c a a t t g t
45 g a a a a c c c a g t t a a c a t t t t a t t a g a g c t a c c a g g t t a t g t g a a a c t g t t g a t a g t t t t
a t c a c t t t c c t t t c a a g a t a t a g g c a g g g g c a g t g g c t c a t g c c t g t a a t t c c a g c a c t
50 t t g g g a g g c c a a g g t a g g t g g a t g g c t t g a g c c c a g a a g t t c a a g a c c a g c c t g g g c a a
c a a g g t g a a a c c c t a t c t c t a c c a a a a a t a c a a a a a t t a g t g g g g c a t g a t a g c a t g g a
55 c a t g t a g t c c c a g c t a c t t g g g a g g c t g a g g t g g g a g g a t g g c t t g a a c c c t g g a g g t g

60

65

ES 2 331 995 T3

gaggttgacagtgattggagatcgtgccactacattccagcctgggcgacagagcaagac
 5 tctgtcaccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaatgtggccaggcatggtagct
 cacacctgtaatcccagcactttgggaggctgagccaggcggatcacaagggtcaagaga
 10 tcgaaaccatcctggccaacatgcaaacaccatctctactaaaatacaaaaaatgagc
 tgggtgtggtggtgtgcgctgtagtcccagctactggggaggctgaggcaggggaatc
 15 gcttgaaccaggaggagcagagattgcagtgagccgagatcgcgccactgcactccagcc
 tgggtgacagagcgagactccgtctaaaaaaaaaaaaaaaaaaatatatatatatata
 20 tataatatatgtatataattttacatgaaagaaggaaataaatgggtgcttttattcaa
 caaatattttattgagcacctactcttgtgccaggcagctcttctaggtgctaggggtgca
 25 gcagaaaacaagacaggcagagatccctgccttcagagggagcacaacatttaagataa
 acatgcaaaatgcctgatatgttagatgggaagataaatgcccttaaagaaagtaaagc
 agggacagtgcacatttaggagtgaggatgttgcaacaatttaagataggttggtcaggg
 30 gagattcattgaaaagtcccatctgagtgaacacctagaggagagaattgaagcaggct
 ggtatctgggggagttgttaggcagaggggaataggaaatacaaaaggccctaaggtgggga
 35 aacagcaaggagtcagggtgtgggcagagcagaaagttggggctgcatgagcaaagggca
 gggcctggcccacatctcgtagagctttgtaatataaccacaacatgcaagtgtacaat
 40 ttaacattttattccacatccgatggcaaagaaaaattgactgctaccaatatggtagt
 ttctgacctgtagttccctaaatagaattctataagttgtaatacactttactacacat
 45 tatcagaaaaagactaaaagttctatttagtaactccaattctgacagttctcatgtct
 gggctagaacaagggcattggcaatggcagaacagatgtcttctattttctttgcaggat
 50 tttcttttttcagaggaaagtacagggtatggggccactcaagtggagctccaggttagg
 gggttctgtcctcaccaggcagcacacaggaggggcagaggccctcctaagggtacta
 55 caaacttggctctgatccatgatctcagtttctgacaaacacaacattcagtgggggaa
 agaaaatcaggtatctgagagcttgacacaggcattctagcaaaacaaaagcaccta
 60 ctggctacttgatgttagtgtgaagattctcatgaaatggagacaaccattctaggggt

ES 2 331 995 T3

tgaggtggccagggggatggagcctgagctgagagaactaagaaaacaaaaacaataca
 aaaaaagctgttcagccatgtgttaccacactggagttctgtttgctcattctggtg
 5 tggaaaccagggccctggtaagggaatgaggggacttcagggcatttgcttgccctcagt
 ggaagcagggaggttaaggggttaaggtggtggtacagcctgcagggccaggagtctgaa
 10 ctccctccaggagggggcccgaggggtgtcttttagtgtgagccacacaaggggtacagagc
 ccagaagagctctgcttaatatctatataactaagcttccacagactaaatacacacaca
 15 cacacacacacacacacactcacacacactttacttctcaaatacatgtaccactttc
 taccagattcaagaacaccaagaagtactaaaggggtatccaaccgtcaagaaaaagttt
 20 gactccctcatttagttgtaacatacaagttctcccatcttcttacttgtaagatagagt
 aatggactgggaagcagacaaggccctgaacagcctagcatcttacctgatgcatagg
 25 aggttcttaatacatctcccttctctccctcactcctaacgaaaaatactagattgctgt
 caaatgctatgggtatactttaaatcagtgcttggtcaaactttaatgtgcagcccaatc
 30 agctgggggaatcctgttaaaatgcaggttctgattcagtgaggctgggggtgagggata
 ggaattatgcgttccttacaggcttccagggtgatgctacactgctgattggggatcatt
 35 ctttgagtggcaagaatttgacactactaagtttcttacttaacacaaccatcacata
 aaagccctcaaaaggcaccagtctaaacaataagcccttccacttcagcctcatgcagg
 40 cactgaccctgccaagtgtccagcactagagaggccaggcataatagacatatcctttg
 gtcttgggaggatcacgacaccctcctacaggaagatcttgcaattgtttcctcacctc
 45 ttctgggttttttgatcttaccttttgccctctgatgataattaccctttaattaccaccc
 accaccttgtcatctaaataattatagtaagtgcagcctgcacctctgccagaagatct
 50 ttaaacaaaatgataaaaaacaagttcctaaactgccaattaaaaaaagagacaaaactg
 acccaaataaaacagtcattgtgcaccccccacagtgggaagacatggacttgttttc
 55 atataaactacagaagaagttgatttattttgaaacaagaaaaagtactgattcagtat
 ttaggaaattgtaaatgtcagaatataaattctgcagtcaggtaggcaaaacaatccaa
 60 ccacactaaaatccaccttaaattcctcttgggaagagctgcaggggtctctgaactatt

ES 2 331 995 T3

tttcctttatattggagtttccccgattataaccggaggagctggataacttctgggtgc
 5 attaaaagcaaattatccatttgtgggagaagggcgggcttctcactgaaagcaattag
 tagtttttctaatttcccaggtgggtctccattaaccgcctaacaaacaccaaggctgtc
 10 ggagtcgcgacgaatcatgcacctctcttagggggaactgggttgcgctactctttagaac
 gctgttttcccatggtagccttaaaaaaaacttaccaattttctgaattaggtaacaca
 15 ttgaatgggaaaaacctaagatagcacaaaaaggcgtacagcgaaaaattaagactcct
 tcctcccgctcatccgccacctcactgtcctccctagaggcaatcgtgggttacttctt
 20 taaactttttattatggaaaatttcagatacacaagtaaagagactgtatgatgagcac
 atatgctcgcatacgcagcttcaacgatgaaaaacgttctgccagcttggtttattcc
 25 tctccccagttttcataggcgtattttacagtcctgacaccagatcactctgtcaaca
 catcagtaggtcttaaaaaaaaaaaaaaaccataaccacattaccgttaccaca
 cccaacaaagttaatgataattgctcaataccatccaatattctcggggccactttcaa
 30 tcggtgaggggcagacggacttagaggaaggactgcagggctggaggggcgcgaaaaag
 cgaggggcgacgctgctcgtggcctcgggtgtccggcgccctcgcggtccccgccatcgt
 35 cacctacgccggggccaggaccgaccaggccaggctcgagggcggtctctgaccacgcgcc
 ccctgcctcccagctccccggggcgggcctccgcaggcccgccacagctgcacagcccg
 40 cgggtccccaggcaccggcggggtccctggaggggaagcgattgatacagctgcctgact
 gcgccaccgcgccggctgcccattctcgtggcacctgcgtctccggctgggcccggag
 45 ctagaagtggctgccgagaccgggagggcccgccagtcgcccgtcccgtcccgcgc
 ctggccctcggccccgcacctcgcggacctggactacaactcccgtggggctccgacgg
 50 ccggggccaatggcgggcgccccggagcatgcggggcgagcgccctgcgcggcggtttgag
 taagcggctgcgcgattggctgcggggtcggggcgccgcgcggggactgtgggaagcgg
 55 agtgacggaGCGAGCGGCTGTTGGAGGAAGGAGGTGGGGGCCGGGAGCGCAAATGGCGT
 TGAGATGGTTCAGGGCCCTGTTCAAACCTCCAGCACTGACCATTACCGGCGGAAGCG

ES 2 331 995 T3

Secuencia del ADNc de la WAPL de ratón

ncggccgcccagggaggcctaggccctgtccggccggcgcgccctgaggtggggaggggaag
5 ttgcgggggccgcccgtcaccccccaccccccctgtcgcccgagcttctctatttaccgaa
gcgagagccgaggactgtgacggcagcagagccccctcgccccctctcggtggcaccggtcg
10 gcaactggtctctctcgcgggggctccccgccccgccccggggcccgttgggagccggagag
gcgagggcgggcccgaggccaaagcaccgcgaggcgccgaggggaatatgaaacagggtg
15 tcaaaATGACATCCAGATTTGGAAAACTTACAGTAGGAAAGGAGGAAATGGCAGTTCA
AAATTTGATGAAGTTTTTTCCAACAAACGGACTACTCTTAGTACAAAATGGGGTGAGAC
20 CACATTTATGGCTAAATTAGGGCAGAAGAGGCCCAATTTCAAACCAGATATTCAAGAAA
TTCCGAAGAAACCTAAAGTAGAAGAAGAAGATACTGGAGATCCCTTTGGTTTTGATAGT
25 GATGATGAGTCTCTACCTGTTTCTTCAAAAAATTTAGCCCAGGGTAAGGGTTCATCTTA
CTCAGAATCTAGTGAGGCTGCTCAGCTGgAAGAAGTCACTTCTGTATTTGAAGCTAATA
30 GCAAATGTAGTCATGTGGTGGGTGAAGACAGTTTTGCTTCCGACAGATGCTTACTTGTG
GAGGATACTTTAATTGGGAAAGAGAAGAGCATAaGTAGAATTCCAGAAGACAACGCCAAA
35 CAAAAGTAGTTGCACTAAGTTGCTAACTTCAGATAAAGTGGAGAATTTTAGTGAAGAAC
ATGAAAAAAATAGTCACCACTTTCACAAAAATGCTGAAGATAGTACTAAGAAACCCAAT
40 GCAGAAACCGCAGTGGCTTCTGAATATAAAGCTGATGAAACTAAAGAAACAAATGATAC
TTGGAACCTCCAGTCTGGAAAAAGAACAGAGTCTCCATCTGAAAGTTGTCCAGTCAAAG
45 GATCTGTAAGAACTGGTTTATATGAATGGGATAATGATTTTGAAGATATCAGGTCAGAA
GACTGTATTTTAAGTTTGGATAATGAGTCTCTTTTGGAGATGAAAGACGAGGATTTAAA
50 AAATCGGATTGGAGGATTGGAAAATCTAAATGAAACCTTTGAAGAAGATATCATACAAA
GTGTTCTTAGGCCAAGCAACTGTAGGACGTACTGTAGGGCCAATAAAGCGAGATCCTCA
55 CAGGGAGCATCAAATTTTGATAAGCTAATGGATGGCACCAGTCAGTCCTTAGCCAAAGC
AAACAGTGAATCAAGTAAAGATGGCCTGAATCAGGCAAAGAAAGGTAGTGCAAGTTGTG
60 GGACCAGTTTTTCGAGGAACAGTTGGACGGACTAGAGATTACACTGTTTTACATCCATCT

65

ES 2 331 995 T3

TGCTTGTCAAGTGTGTAATGTTACCATCCAGGATACTATGGAACGGAGTATGGATGAGTT
 CACCGCATCCACTCCTGCAGATTTAGGAGAGGCTGGCCGGCTCAGAAAAAGGCAGATA
 5 TTGCAACCTCCAAGACCACTACTAGATTTTCGACCTAGTAATACTAAATCCAAAAAGGAT
 GTTAAACTTGAATTTTTTGGTTTTGAAGATCATGATGAGACAGGAGGTGATGAAGGGGG
 10 TTCTGGAAGTTCTAATTACAAAATTAAATATTTTGGCTTTGACGATCTCAGCGAAAGTG
 AAGATGATGATGATGACGACTGTCAAGTGGAAAGAAAGAAAGACAAAAAAGAACTAAA
 15 ACAGCTCCATCACCTTCCCAGCAGCCTCCTCCTGAAAGCAGCGACAATTCCCAGGATAG
 TCAGTCTAGTACTAATAATGCAGAAAACTTGGATTTTACAGAGGACTTGCCTGGTGTGC
 20 CTGAGAGTGTGAAGAAGCCCATAAGTAAACAAGGAGATAAATCCAAGGAAAAATACCAGA
 AAGATTTTTAGTGGCCCCAAACGGTCACCTACAAAAGCTGTATATAATGCCAGGCATTG
 25 GAACCATCCAGACTCGGAAGAATTGCCTGGACCACCAATAGCAAAACCTCAGCGTGTCA
 CAGTGAGGCTGTCTTCAAAGGAACCAAATCAAAAAGATGATGGAGTTTTTAAGGCTCCT
 30 GCACCACCACTCAAAGTGATAAAAACTGTGACAATACCTACTCAGCCCTACCAAGAAAT
 AGTTACTGCACTGAAATGCAGAAAAGAAGACAAAGAATTATATACGGTTGTTTCAGCACG
 35 TGAAACACTTCAATGATGTGGTGGGAATTTGGTGAAAATCAAGAGTTCACTGATGACATT
 GAATACTTGTTAAGTGGCTTAAAGAGTACTCAGCCTCTAAACACACGTTGCCTTAGTGT
 40 TATCAGCTTAGCTACTAAATGTGCCATGCCAGTTTTTCGGATGCATCTGAGGGCACATG
 GGATGGTTGCAATGGTCTTTAAAACTCTGGATGATTCCCAGCATCATCAGAATCTGTCC
 CTCTGTACAGCTGCTCTCATGTACATATTGAGTAGAGACCGTTTGAACATGGATCTTGA
 45 TAGGGCCAGCCTAGATCTCATGATTCGGCTTGTGGAGTTGGAACAAGATGCCTCTTCAG
 CTAAGCTACTGAATGAAAAAGACATGAACAAGATCAAGAAAAGATCCGAAGACTCTGT
 50 GAAACTGTGCACAACAAGCATCTTGATCTAGAAAACATAACGACTGGTCATTTAGCTAT
 GGAGACATTGCTGTCCCTCACTTCCAAACGAGCAGGAGATTGGTTTTAAAGAAGAGCTCC
 55 GACTTCTGGGTGGTCTGGATCATATTGTAGATAAAGTAAAAGAGTGTGTGGATCATTTA
 AGTAGAGATGATGAGGACGAAGAGAACTAGTAGCCTCATTATGGGGAGCAGAGAGATG

ES 2 331 995 T3

TTTACGAGTTT TAGAGAGTGTAACAGTGCATAATCCAGAGAATCAAAGCTACTTGATAG
 5 CCTATAAAGATT CACAACCTCATTATTTTCATCAGCTAAAGCATTACAGCATtGTGAAGAC
 CTGAATCAGCAGTACAACCGTGCTGAGAACAGCATCTGTGTAGCAGACAGTAACCCCTCT
 10 GCCTTACCAGAATGTAAC TAACCATGtgGGcaAAGCAGTGGAGGACTGCaTGAGGGGCTA
 TAATTGGAGTATTGCTCAATTTAACTAATGATAATGAGTGGGGCAGCACAAAGACAGGA
 15 GAACAAGAAGGACTCATAGGCACAGCGATGAACTGTGTTCTTCAGGTTCCAAAGTACCT
 ACCTCAGGAGCAGAGATT TGATATTCGAGTGCTGGGATTGGGTCTACTCATAAACCTGG
 TGGAGTATAGTGcCCGGAATCGACACTGCCTTGTC AACATGCAAACATCCTGTTCCCTTT
 20 GATTCCTCCTTCTCTAGTGGAGAAGGCGATCATAGTTTAAGGCTAGCCGGACAAGTTCA
 TGCTGTTCAAGCTTTAGTGCAGCTATTTCTCGAACGAGAGAGAGCAGCACAAATTGGCAG
 25 AAAGTAAACAGATGAATTGATTAAAGATGCTCCTACC ACTCAGCATGATAAGAGTGGA
 GAGTGGCAAGAAACAAGTGGAGAAATACAGTGGGTATCAACTGAAAAGACTGATGGTGC
 30 AGAGGAGAAGCAGAAGAAGGAGGAGGAGGATGAAGAACTTGACCTCAATAAAGCCCTTC
 AGCATGCTGGCAAACACATGGAGGATTGCATCGTAGCCTCCTACACAGCCCTGCTTCTT
 35 GGGTGTCTCTGCCAGGAAAGTCCAATCAATGTA ACTACAGTAAGGGAATATCTTCCAGA
 AGGAGATTTCTCCATAATGACAGAGATGCTTAAAAAGTTCTTAAGCTTCATGAATCTTA
 40 CGTGTGCTGTTGGAACAACAGGCCAGAAGTCTATCTCTAGAGTGATTGAATATTTGGAA
 CATTGCTAGctgctttacctttgcttcaggtgcttggtaatgctgaagctatccttaga
 45 caaagaaaattggatttttatgatcaccgatttcttcatcatgcattctgcgtttgct
 aatgacagttactacatcaatctgcagctatcaaaaatgagggaaaagggttcaggctg
 50 ttaacaatcccatgcagtat ttaatacacttac

55 En la descripción y los dibujos, cuando se abrevian los nucleótidos y/o aminoácidos, las abreviaturas están de acuerdo con la Comisión IUPAC-IUB de Nomenclatura Bioquímica o las abreviaturas convencionales de la técnica. Se enumeran ejemplos a continuación. Cuando existen isómeros ópticos en un aminoácido, se indica el isómero L a menos que se indique específicamente lo contrario.

60 ADN: ácido desoxirribonucleico;
 ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario;
 A: adenina;
 65 T: timina;
 G: guanina;

ES 2 331 995 T3

	C:	citosa;
	I:	inosina;
5	R:	adenina (A) o guanina (G);
	Y:	timina (T) o citosina (C);
	M:	adenina (A) o citosina (C);
10	K:	guanina (G) o timina (T);
	S:	guanina (G) o citosina (C);
15	W:	adenina (A) o timina (T);
	B:	guanina (G), guanina (G) o timina (T);
	D:	adenina (A), guanina (G) o timina (T);
20	V:	adenina (A), guanina (G) o citosina (C);
	N:	adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T) o base desconocida u otra;
25	ARN:	ácido ribonucleico;
	ARNm:	ácido ribonucleico mensajero;
	dATP:	trifosfato de desoxiadenosina;
30	dTTP:	trifosfato de desoxitimidina;
	dGTP:	trifosfato de desoxiguanosina;
	dCTP:	trifosfato de desoxicitidina;
35	ATP:	trifosfato de adenosina;
	EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético;
40	SDS:	dodecilsulfato sódico;
	BHA:	benzohidrilamina;
	pMBHA:	p-metilbenzohidrilamina;
45	Tos:	p-toluensulfonilo;
	Bzl:	bencilo;
50	Bom:	benciloximetilo;
	Boc:	t-butiloxicarbonilo;
	DCM:	diclorometano;
55	HOBt:	1-hidroxibenzotriazol;
	DCC:	N,N'-diciclohexilcarbodiimida;
60	TFA:	ácido trifluoroacético;
	DIEA:	diisopropiletilamina;
	Gly o G:	glicina;
65	Ala o A:	alanina;
	Val o V:	valina;

	Leu o L:	leucina;
	Ile o I:	isoleucina;
5	Ser o S:	serina;
	Thr o T:	treonina;
	Cys o C:	cisteína;
10	Met o M:	metionina;
	Glu o E:	ácido glutámico;
15	Asp o D:	ácido aspártico;
	Lys o K:	lisina;
	Arg o R:	arginina;
20	His o H:	histidina;
	Phe o F:	fenilalanina;
25	Tyr o Y:	tirosina;
	Trp o W:	triptofano;
	Pro o P:	prolina;
30	Asn o N:	asparagina;
	Gln o Q:	glutamina;
35	pGlu:	ácido piroglutámico;
	Tyr(I):	3-yodotirosina;
	DMF:	N,N-dimetilformamida;
40	Fmoc:	N-9-fluorenilmetoxycarbonilo;
	Trt:	tritilo;
45	Pbf:	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo;
	Clt:	2-clorotritilo
	Bu ^t :	t-butilo; y
50	Met(O):	sulfóxido de metionina.

Aplicabilidad industrial

55 La secuencia de nucleótidos de longitud completa de un oncogén de hWAPL de acuerdo con la presente invención permite producir un recombinante de una proteína oncogénica hWAPL codificada por el oncogén hWAPL, e investigar un mecanismo de formación de cáncer inducido por la sobreexpresión de la proteína oncogénica hWAPL en una cepa celular derivada de alguna de varias células epiteliales. Por otra parte, en la presente invención, una región promotora del oncogén de hWAPL identificado puede proporcionar un nuevo blanco para estudiar la prevención o terapia del

60 cáncer sobre la base de un mecanismo de inhibición del mecanismo de formación de cáncer inducido por la sobreexpresión del oncogén de hWAPL, por inhibición de la transcripción del oncogén. Por otra parte, la producción de un recombinante de la secuencia de nucleótidos de longitud completa del oncogén de hWAPL de acuerdo con la presente invención, la proteína oncogénica hWAPL, permite la preparación de una sonda de ácido nucleico o cebador de PCR

65 para detectar la expresión de ARNm por transcripción del oncogén de hWAPL o un anticuerpo específico para detectar un péptido de la proteína oncogénica hWAPL traducida. En consecuencia, permite usar varios kits para diagnóstico que detectan la sobreexpresión del oncogén de hWAPL directamente involucrado en el comienzo de un cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína oncogénica que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y
- (b) una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2;

como secuencia codificadora para ser traducida a la proteína oncogénica que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

2. Un polinucleótido que está compuesto por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, una región promotora que consiste en la siguiente secuencia de nucleótidos (a) y la región 5'-UTR que consiste en la siguiente secuencia de nucleótidos (b), donde la región promotora y la región 5'-UTR están ligadas en forma sucesiva al extremo 5'-terminal de la molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2;

(a) secuencia de la región promotora del gen de hWAPL:

```

atTTTtagtagagacgggggtTcacCGtgTtagccaggatggTctcgaTctcctgacctcatgatccgcctgcctcgg
cctctcaaagTgctaggattacaggcgtgagccacCGTgcctggccgctgaacacaattTaaagctTcaattaat
ccagglattcagTcaacaaatattTatagcacactTctgtgtgTgaggcactattctaggTgtgctTggcatataaa
atgaacaaaagTcagccatccTcgtccTcatggagTtataTctTgtgaaacgaaatagataafaaacaagTtca
tacacaaagcaaacgtaatgactatgttatggagaaaagcagcagggaaaaggagatacagggTgctggat
gacctTaaatagcatggccaaggaaaacattactgagagacacactTgagcaaagacctgaaagcatgcag
ggaatgagTtgTgtgtctctTgaggactaacagaggggaacaagTacgaagagggccacaggcaggagct
ggctTggcatgtTctagtagtagacagaggcaggcccggaaggtaggaaggataggagtactcaggggcc
agatcatgcagggccTttTcacCGtTaaagaactTtggaTtttagTattacaggaggaccctTcagggTgtTgactag
gCGggtatcatacagTattaagggTgaggatcctgaataaaaaagggcTgtTccaggacaagggTcaggaag
ccagactTctcagggTgctTgtaccggTcctTgtcaggcaatgtgTctcctagagaattTcctTgtTgtTgtTcatct

```

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 331 995 T3

gcttcccatttcttacttgaagatagagtaatggactgggaagcagacaaggccccctgaacagcctagcatc
 5 ttacctgatgcataggagggttcttaatacatctcccttccctctccctcatcctaacgaaaaatactagattgctgtcaaa
 tgcctatggglatactttaaatcagtgctgtgcaaaactttaatgtgcagcccaatcagctgggggaatcctgttaaaat
 gcaggttctgattcagtgaggctgggtgagggataggaattatgcgttccctacaggctccagggtgatgtaca
 10 ctgctgatggggatcattctttagtggcaagaatttgacactactaagtttcattacttaacacaaccatcacata
 aaagccctcaaaaggcaccagcttaaaacaataagcccttccacttcagccctcatgcaggcactgaccctgcc
 agtgtccagcactagagaggccaggcataatagacataccttgggttgggaggatcacgacaccctcctac
 15 aggaagaicttgcaattgttccctcaccctctctgggtttttagtcttaccttttgcctctgtatgataattacctttaattac
 caccaccaccttgcatacctaaataattatagtaagtcagcctgcacctctgccagaagatctttaacaaaaatg
 ataaaaacaagttcctaaactgccaatfaaaaaagagacaaaacagcccaataaaacagtcagtgcat
 20 cccaccacagtggaagacatggacttgttttcatataaactacagaagaagtgtatttttgaacaagaaa
 aagtactgattcaglattttaggaattgtlaaatgtcagaatataaattctgcagtcaggtaggcaaaacaatcca
 accacactaaaatccaccttaaatctcttgggaagagctgcagggtctctgaactatttttcccttatttggagttc
 25 cccgattataccggaggggagctggataactctgggtgcattaaaagcaaatatccatttggggagaagggc
 gggcttctcactgaaagcaattagtagttttctaatctccagggtgggtctccattaaccgcctaacaacaccaag
 30 gctgtcggagtcggacgaatcatgcacctctcttagggggaactgggtgcgctactctttagaacgctgttttccat
 ggtagccttaaaaaaaacttaccatatttctgaattaggaacacattgaatgggaaaaacctaagatagcaca
 aaaaggcgtacagcgaaaaattaagactccttccctcccgctacccgccacctcactgtcctccctagaggcaat
 35 cgctggttacttctttaaacttttattatggaaaatttcagatcacacaagtaaagagactgtatgatgagcacatat
 gctcgcatacgcagcttcaacgatgaaaaacggtctgccagcttgttttattcctctccccagtttcataggcgt
 40 attttacagtcctgacaccagatcactctgtcaacacatcagtaggtcttaaaaaaaaaaaaaacaaaaaccat
 aaccacattaccgttaccacaccaacaaagttaatgataattgctcaataccatccaatatttctggggccactt
 tcaatcgggtgaggggcagacggacttagaggaaggactgcaggggtggaggggcgcgaaaaagcgaggg
 45 gcgacgctgtctgtggcctcgggtgtccggcgctcgggtcccgccatcgtcacctacgcccgggcccaggac
 cgaccaggccaggctcagggcggtcttaccacgcgccccctgcctccagctcccgggcgggcggtccg
 caggcccggcacagctgcacagccccgggtccccaggcaccggcggggtccctggaggggaagcgattgat
 50 acagctgcctgcactgcgccaccgcccgggtgcccatctccgtggcacctgcgtctcccggtgggcccggga
 gctagaagtggtgctccgagaccgggagggcccgccagtcgccgctcccgctcccgcgcttggccctcgg
 55 cccgcgacctcgggacctggaclacaactcccggtggggclccgacggccgggccaatggcgggcgcccg
 agcatgcggggcgagcgccctgcggcggttttaglaagcggtgcgcatgtgctgcggggctggggcggc
 cgcgcggggactgtgggaagcgagtgacgga;

(b) la secuencia de la región 5'-UTR del gen de hWAPL:

gcgagcggctgttggaggaaggaggtgggggcccgggagcgcaaatggcgttgagatggtycarggccctgtt

caaactccagcactgaccattaccggcggaagcgggcggcaggaggcgggcgggccagcgggggc
 acacagcagggtctgttaccagctccagcagtgggcgccagcgagagctaggcccgsgcccgccggcg
 5 cgctcgaggcggggaggggaagtgcggggcgccgctcctgccccccaaccggggttctattaccgaaa
 gcagagtcctctgcctctctcggctctcacctgccggccctgctctccgcgcgaggggtccgcgcccgcgc
 gggccgtarggagcgggaggaaggcggargccggccccgtggccaaagcaccgccagggttcgaggaga
 10 atatgaaactgggtgtcaaa.

3. Un vector recombinante que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2.

15 4. Una proteína recombinante que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 codificada por el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1.

20 5. Un anticuerpo generado utilizando el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de los restos 50 a 66 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como inmunógeno, donde el anticuerpo es generado por inmunización de un conejo con dicho péptido, y el anticuerpo es reactivo con la secuencia de aminoácidos parcial de los restos 50 a 66 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

25 6. Un anticuerpo generado utilizando el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de los restos 814 a 1037 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como inmunógeno, donde el anticuerpo es generado por inmunización de un conejo con dicho polipéptido, y el anticuerpo es reactivo con la secuencia de aminoácidos parcial de los restos 814 a 1037 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

30 7. Un kit de reactivos para anticuerpos para una reacción antígeno-anticuerpo que comprende el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, disponible para detectar una proteína oncogénica que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o un fragmento peptídico derivado de la proteína oncogénica.

35 8. Un kit para diagnóstico utilizable para la detección de una proteína oncogénica que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o un fragmento peptídico derivado de la proteína oncogénica por medio de una reacción antígeno-anticuerpo, que comprende el anticuerpo de la reivindicación 5 o 6.

40 9. Un polinucleótido antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos parcial de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, que es un fragmento de ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de ácido nucleico entre los Nos. 2511 y 2813 de SEQ ID NO: 2.

10. Un kit de hibridación con sonda disponible para detectar un ARNm que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, su secuencia de nucleótidos parcial o ADNc preparado por el ARNm, que comprende el polinucleótido antisentido de la reivindicación 9 como sonda de ADN del mismo.

45 11. Un kit para diagnóstico disponible para detectar la expresión del ARNm que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, que es traducido a una proteína oncogénica que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, por medio de un método de hibridación con sonda, que comprende el polinucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 9 como sonda de hibridación.

50 12. Un par de cebadores para la amplificación por PCR del ADNc que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, que consiste en los cebadores apareados de:

una secuencia de nucleótidos:

55 5'-TTGGATCCATGACATCCAGATTTGGGAAAACATACAGTAGG-3'; y

una secuencia de nucleótidos:

60 5'-TTGAATTCCTAGCAATGTTCCAAATATTCAATCACTCTAGA-3'.

13. Un par de cebadores para amplificar por PCR una cadena parcial del ADNc que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, que consiste en los cebadores apareados de:

65 5'-GAATTCATAGGCACAGCGCTGAAGTGTGTG-3' y

5'-TTGAATTCCTAGCAATGTTCCAAATATTCA-3'.

ES 2 331 995 T3

14. Una doble hebra de ARN de interferencia de cadena corta capaz de inhibir la expresión del ARNm que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 en una célula de cáncer cervical de ser humano, donde el ARNsi tiene una secuencia de nucleótidos:

5 CGGACTACCCTTAGCACAA.

15. Una composición farmacéutica que comprende la doble hebra del ARN de interferencia de cadena corta de acuerdo con la reivindicación 14.

10 16. Una composición para diagnóstico que comprende el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, o el polinucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 9.

15 17. Uso de la doble hebra del ARN de interferencia de cadena corta de acuerdo con la reivindicación 14 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la expresión del ARNm que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 en una célula de cáncer cervical de ser humano para detener el crecimiento de la célula de cáncer cervical.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

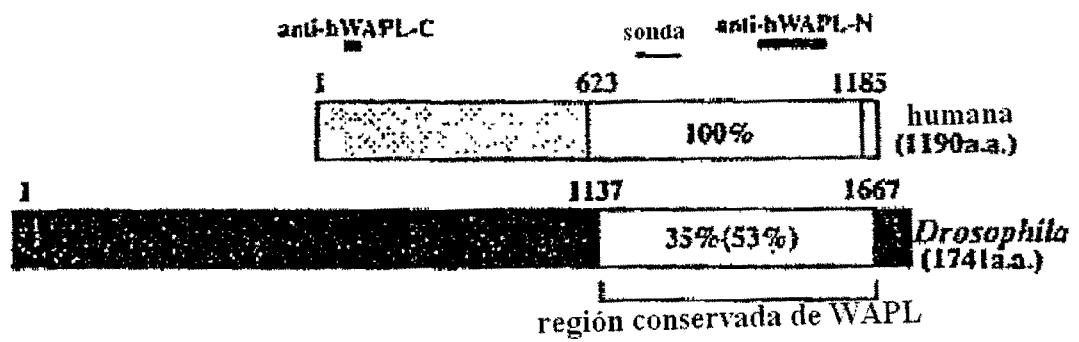


Figura 2

hWAPL: 623 LKCRREDKELYTVVQHVKHFNDVVEFGENQEFTDDIEYLLSGLKSTQPLNTRCLSVISLA 682
 ++ R+ K+ Y VV++VK + + E GE QE DD+EY+L L+ P TRCLS + LA
 dWAPL: 1137 IRVDRKTKDYYPVVRNVKTAHQIQEIGEYQEMDDOVEYILDALQPHNPPATRCLSALQLA 1196

hWAPL: 683 TKCAMP5FRMHLRAHGMVAMVFKTLDDSQHHQNLSLCTAALMYILSRDRINMDLDRASLD 742
 KC MP+FRMH+RAHG+V FK L D+ +L LCT+A+MYILS++ LNMOLDLDR SL+
 dWAPL: 1197 AKCMMPAFRMHVRAHGVTKEFKALSDANKDLSLGLCTSAIMYILSQEGLNMDLDRDSLE 1256

hWAPL: 743 LMIRLLELEQDASSAKL--LNEKDMNKIKEKIRRLCETV---HNKHLLENITTGHLAM 796
 LMI LLE + S + + ++ K+K+R LCE + HL++++T G LAM
 dWAPL: 1257 LMNLLLEADGVGGSTETGHSORAGYDRNKQKVRELCEEIKAQKGTHLNVDSLTVGTLM 1316

hWAPL: 797 ETLLSLTSKRAGDNFKEELRLGLGLDHIVDKVKE-CVDHLSRDED---EEKLVASLWGAE 852
 ETLLSLTSKRAG+WFKE+LR LGGL+HI+ + + C ++ D + + L+ ++
 dWAPL: 1317 ETLLSLTSKRAGENWFKEIRKLGGLLEHIKTIISDFCRPVIACOTEIDWQPTLLDNMQTV 1376

hWAPL: 853 RCLRVLESVTVHNPNQSYLIAYKDSQLIVSSAKALQHCEELIQYNRAEDSICLADSKP 912
 RCLRVLE+VT HN NQ Y++ + + E L Q Y I L S
 dWAPL: 1377 RCLRVLENVTQHNETNQRYMLTSGQGKAV-----ETLCQLYRLCSRQIMLHPSD- 1425

hWAPL: 913 LPHQNVTHVKGAVEDCMRAIGVLLNLTND-NE----WGSTKTGEQDGLIGTALNCVLQ 967
 + H G A+ + + ++ VL+NLT+ NE G+ G++ ++ T+ +L
 dWAPL: 1426 -GGGSNKEHPGVAMRELLVPVLKVLINLTHTFNEAQPSLGAELLGQRGDVETSFRLLLL 1484

hWAPL: 968 VPKYLPQEQRFDIRVLGLGLLINLVEYSARNRHCLVNMETSCSFDSSICSGEGDDSLRIG 1027
 Y+P + F++ +L L LLINL ++ NR L+ + + D+
 dWAPL: 1485 SANYIPDQCVFELSILVLTLLINLCMHTVPNRAALMQAAAPAEYVA-----DNPPAQ 1536

hWAPL: 1028 GQVHAVQALVQLFLERERAAQLAESKTDELIKDAPTTHDKSGENQETSGEIQMVSTEXT 1087
 G V A+QAL++ F + E A+L E TD ++ ++K + QE E
 dWAPL: 1537 GSVSALQALLEFYKCEELARLVEKNTDAFLE-----SNEKGKKKQEEVEE----- 1582

hWAPL: 1088 DGTEEKHKKEEEDLDLNKALQHAGKHMEDCIVASYTALLGCLCQESPINVTTVREYL 1147
 +N +Q AG HME + SY A+L+G L ++ + + VR L
 dWAPL: 1583 -----TVNNLVQRAGHMEHTLKGSYAAILVGNLIADNHELYESVVRRL 1626

hWAPL: 1148 PEGDFSIMTEMLKKFLSFMNLT---AVGTTGQKSISRVE 1185
 F + +L+K+ +FMNLT A KS R+I+
 dWAPL: 1627 RGN5FKEIIGVLEKYHTFMNLTSSLEAAFVAHMKSTKRIID 1667

>pir:T13610 T13610

proteína de cromátides hermanas paralela - mosca de la fruta
 Longitud=1741

Identities = 204/581 (35%), Positives = 309/581 (53%), Brechas = 68/581 (11%)

Figura 3

```

1  VTSRFGKTYSRGCGNGSSHEVEFSNRATTLSTRWGCTTFMARLCAFRPNTKPDICETFM
1  VTSRFGKTYSRGCGNGSSHEVEFSNRATTLSTRWGCTTFMARLCAFRPNTKPDICETFM
61  KPKVEESCTGDFGFDSDDESLEPVSSNHLAQVCSYSSESSFAAQLEEVTSWPEANSKCS
61  KPKVEESCTGDFGFDSDDESLEPVSSNHLAQVCSYSSESSFAAQLEEVTSWPEANSKCS
121  HVVVEETVYSECTVLEDTLCKERSHRIVEDPRTSSCKMTSDKVENPDEEHKNS
121  HVVVEETVYSECTVLEDTLCKERSHRIVEDPRTSSCKMTSDKVENPDEEHKNS
181  HHINKNAQSTKSPHAETVASETGTN----DTWNSQPKRKEPSEIETKGSVRTC
181  HHINKNAQSTKSPHAETVASETGTN----DTWNSQPKRKEPSEIETKGSVRTC
237  UGEWNDFFEDIRSEDCILSLDGLPFLLEKQDQW---ALENLNEALESDTVQSVLRKNS
241  UGEWNDFFEDIRSEDCILSLDGLPFLLEKQDQW---ALENLNEALESDTVQSVLRKNS
294  ERTYCRAMVTSQTCASNFDKLDGTSGLAKANSESSKDCLNQAKKQVSCGTSFSGTV
301  ERTYCRAMVTSQTCASNFDKLDGTSGLAKANSESSKDCLNQAKKQVSCGTSFSGTV
354  GRTRDYTVLRPSCLSVCNVFIQOTMERSMDEFTASTPADLGEAGRLRKADIATSTTTT
361  GRTRDYTVLRPSCLSVCNVFIQOTMERSMDEFTASTPADLGEAGRLRKADIATSTTTT
414  FRPSHTKSKLEVELEFFGFEDL EYCC-DEGCGSSSNYKIKYFGFDLSESEDD-DDDCQV
421  FRPSHTKSKLEVELEFFGFEDL EYCC-DEGCGSSSNYKIKYFGFDLSESEDD-DDDCQV
473  ERVTSKRRTTAPSPPLPPPESSDNSQDSSTSTNAENLDFTECLPGVPESSVKPRLK
481  ERVTSKRRTTAPSPPLPPPESSDNSQDSSTSTNAENLDFTECLPGVPESSVKPRLK
533  GCKSKENTRKIFSGPRSPPTAVYNARHWHFDSLELPGPVAKPKSVTVRLSSKEENQV
541  GCKSKENTRKIFSGPRSPPTAVYNARHWHFDSLELPGPVAKPKSVTVRLSSKEENQV
593  DDGVFFAPAPFSKYIKTVTIPTQFYCLVLTALKCEDEKELYTVQHVKNFNDVVEFGK
601  DDGVFFAPAPFSKYIKTVTIPTQFYCLVLTALKCEDEKELYTVQHVKNFNDVVEFGK
653  QFTDDIEYLLSGLNSTQPLNTRCLSVISLATRCAMPSPRMHLRAHGMVAVETLDDSC
661  QFTDDIEYLLSGLNSTQPLNTRCLSVISLATRCAMPSPRMHLRAHGMVAVETLDDSC
713  HHQNLSLCTAALNYILSRDLNRDLDRAOLDLMLRLVELEQDASSAKLLNEKDMYKIKER
721  HHQNLSLCTAALNYILSRDLNRDLDRAOLDLMLRLVELEQDASSAKLLNEKDMYKIKER
773  IRRLCETVNRKSLDLENITTCGLAMETLLSLTSKRAGDNFKESLRLGLDLDHIVDKVKEC
781  IRRLCETVNRKSLDLENITTCGLAMETLLSLTSKRAGDNFKESLRLGLDLDHIVDKVKEC
833  VDHL SRL-DEEHLVASLWGAERCLRVLESVTVHNPENQSYLIAYKDSQLITSSAFALQH
841  VDHL SRL-DEEHLVASLWGAERCLRVLESVTVHNPENQSYLIAYKDSQLITSSAFALQH
892  CEELIQYNRAFSIQVADSPLNCHVNTNHVCKAVEDCMGALIGULLNLTHDENGSTK
901  CEELIQYNRAFSIQVADSPLNCHVNTNHVCKAVEDCMGALIGULLNLTHDENGSTK
952  TGEFGLICTANCVLQVPKYLQEQRFDIRVLGLGLLNLVETSARHKKGLVNMCTSCS
961  TGEFGLICTANCVLQVPKYLQEQRFDIRVLGLGLLNLVETSARHKKGLVNMCTSCS
1012  FDSSTGSGGSDSLRICQVHAVQALVQLFLERERAAQLAESKTDENIKDAPTTHQDRSG
1021  FDSSTGSGGSDSLRICQVHAVQALVQLFLERERAAQLAESKTDENIKDAPTTHQDRSG
1072  EAGETSGEIQVSTERTDCEERKKEEEDDELDLNAKALQACQJDEDCIVASYTALLC
1081  EAGETSGEIQVSTERTDCEERKKEEEDDELDLNAKALQACQJDEDCIVASYTALLC
1132  CLCQESPINVTTVREYLFEGDPSIMTEMLKKFLSFMILTCAVGITGQKSI SRVIEYLEHC
1141  CLCQESPINVTTVREYLFEGDPSIMTEMLKKFLSFMILTCAVGITGQKSI SRVIEYLEHC

```

Las filas superior e inferior son las secuencias de las WAPL humana y de ratón, respectivamente. Las partes blanca y gris indican aminoácidos iguales y similares, respectivamente.

La parte del marco es una región que tiene semejanza con la WAPL de *Drosophila*.

Figura 4

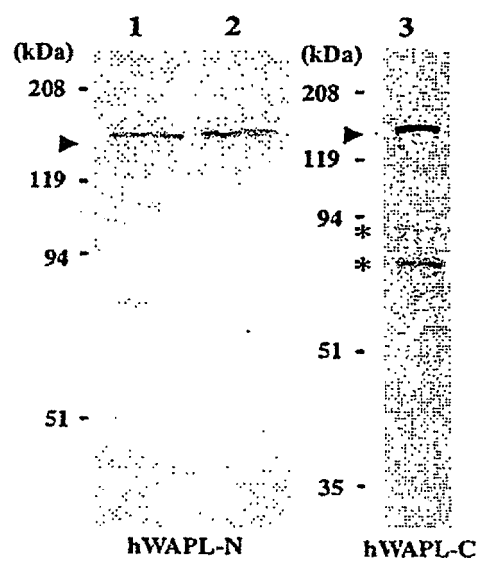


Figura 5

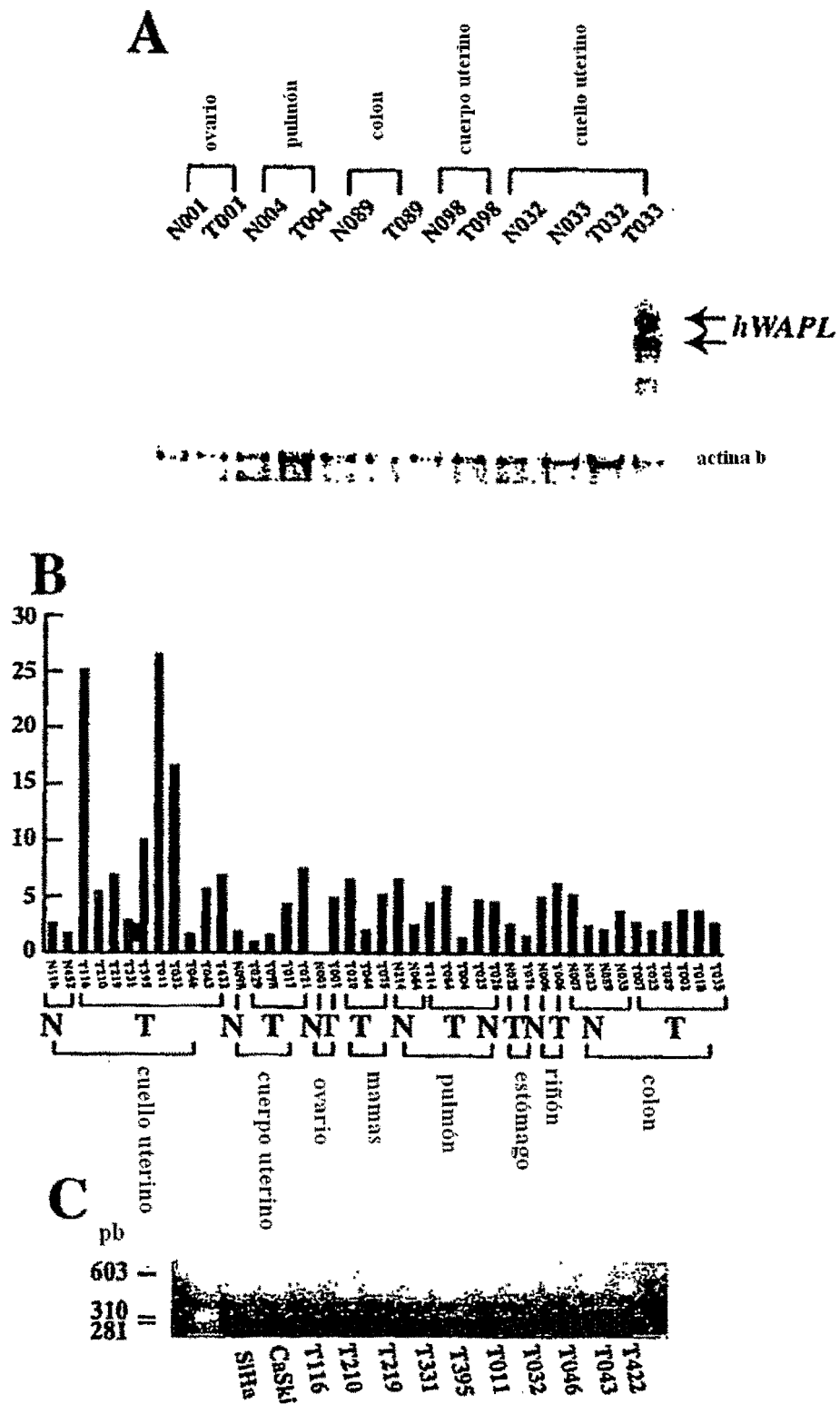
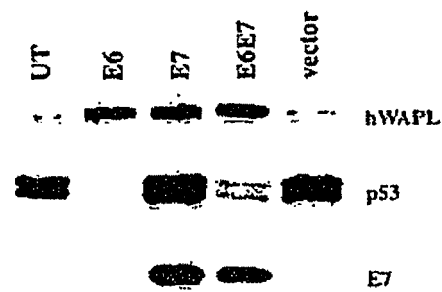


Figura 6

A



B

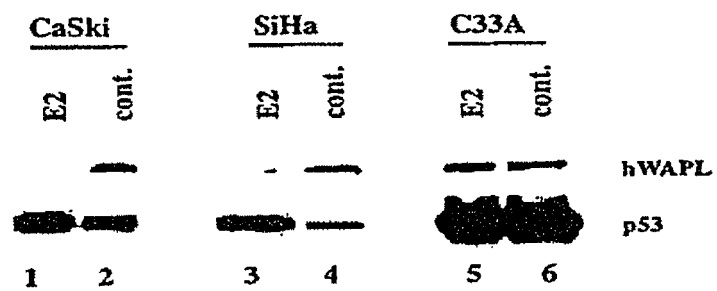
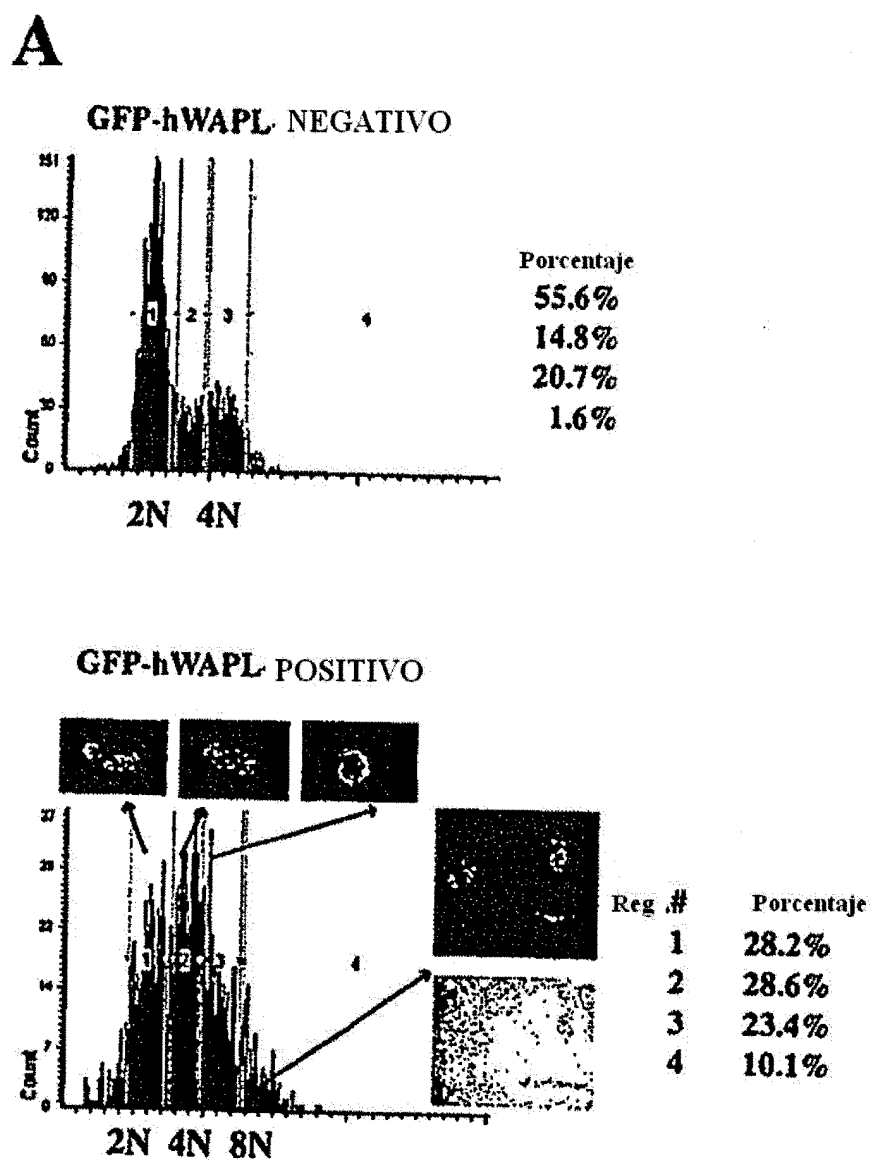


Figura 7

**B**

Micronúcleos	+	-	total
GFP-hWAPL-NEGATIVO	60	940	1000
CFP-hWAPL-POSITIVO	124	876	1000

 $p < 0,01$

Figura 8

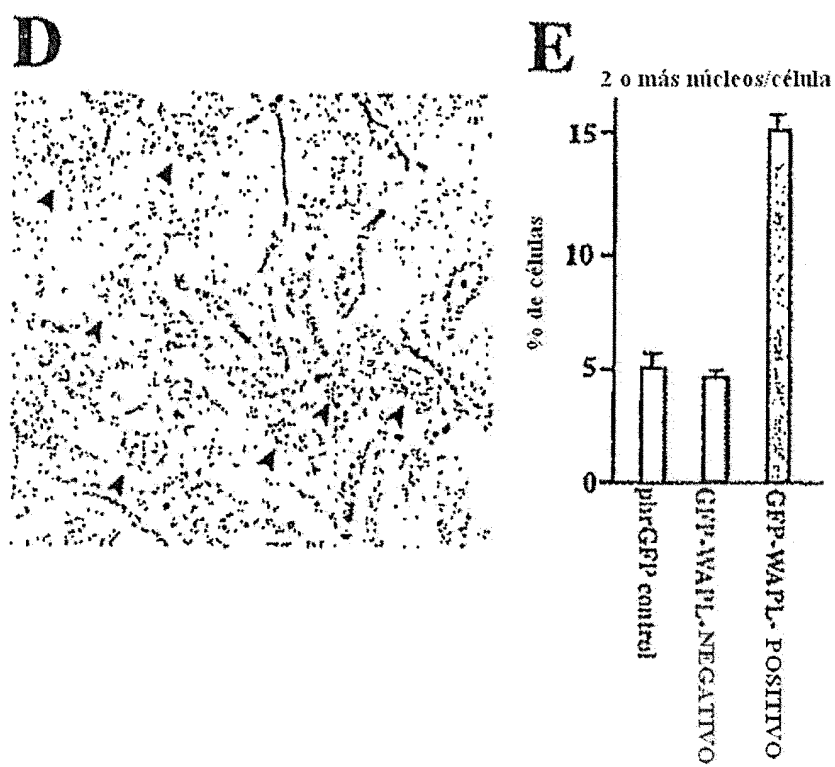


Figura 9

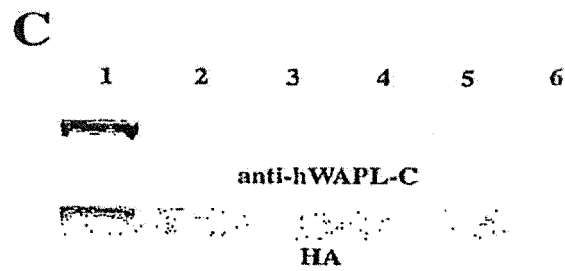
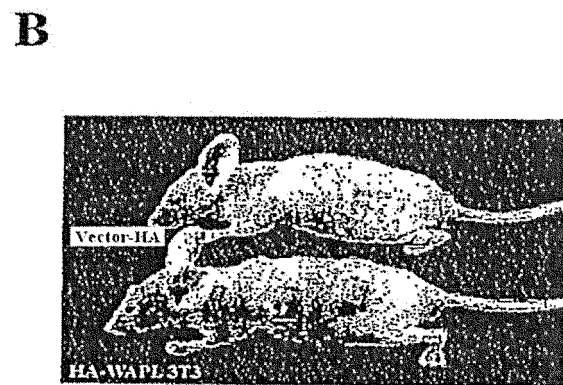
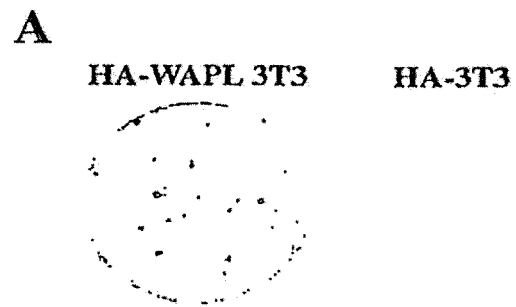
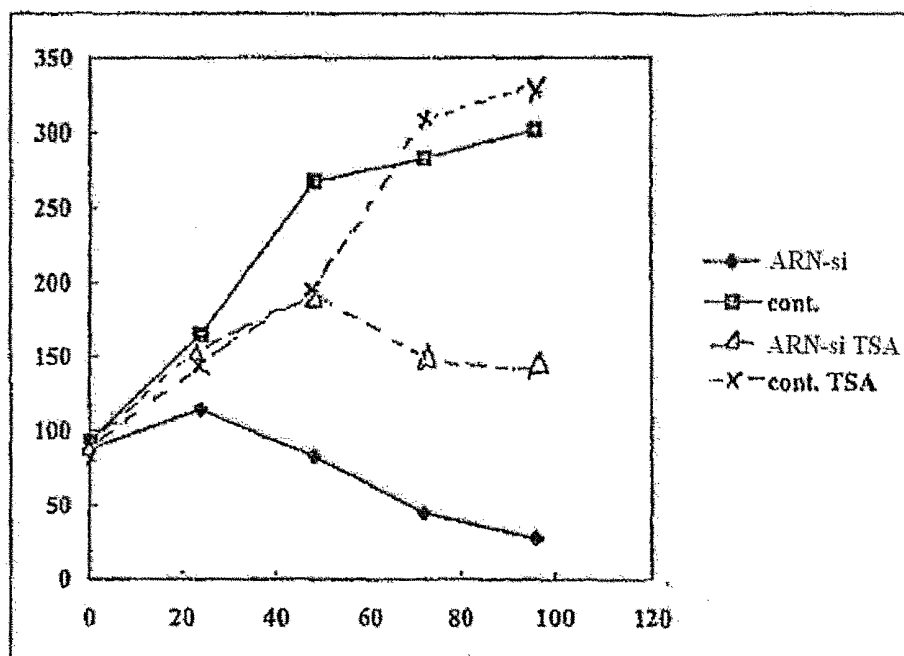


Figura 10



ES 2 331 995 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NEC Corporation y Dr. Masahiko KURODA

5 <120> Nuevo gen del cáncer y su uso

<130>

<160> 2

10 <210> 1

<211>

<212> PRT

<213> Humana

15

<400> 1

20

Met Thr Ser Arg Phe Gly Lys Thr Tyr Ser Arg Lys Gly Gly Asn Gly

1

5

10

15

25

Ser Ser Lys Phe Asp Glu Val Phe Ser Asn Lys Arg Thr Thr Leu Ser

20

25

30

30

Thr Lys Trp Gly Glu Thr Thr Phe Met Ala Lys Leu Gly Gln Lys Arg

35

40

45

35

Pro Asn Phe Lys Pro Asp Ile Gln Glu Ile Pro Lys Lys Pro Lys Val

50

55

60

40

Glu Glu Glu Ser Thr Gly Asp Pro Phe Gly Phe Asp Ser Asp Asp Glu

65

70

75

80

45

Ser Leu Pro Val Ser Ser Lys Asn Leu Ala Gln Val Lys Cys Ser Ser

50

55

60

65

ES 2 331 995 T3

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

ES 2 331 995 T3

	Arg Pro Thr Asn Cys Arg Thr Tyr Cys Arg Ala Asn Lys Thr Lys Ser
5	290 295 300
	Ser Gln Gly Ala Ser Asn Phe Asp Lys Leu Met Asp Gly Thr Ser Gln
10	305 310 315 320
	Ala Leu Ala Lys Ala Asn Ser Glu Ser Ser Lys Asp Gly Leu Asn Gln
15	325 330 335
	Ala Lys Lys Gly Gly Val Ser Cys Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Val
20	340 345 350
	Gly Arg Thr Arg Asp Tyr Thr Val Leu His Pro Ser Cys Leu Ser Val
25	355 360 365
	Cys Asn Val Thr Ile Gln Asp Thr Met Glu Arg Ser Met Asp Glu Phe
30	370 375 380
	Thr Ala Ser Thr Pro Ala Asp Leu Gly Glu Ala Gly Arg Leu Arg Lys
35	385 390 395 400
	Lys Ala Asp Ile Ala Thr Ser Lys Thr Thr Thr Arg Phe Arg Pro Ser
40	405 410 415
	Asn Thr Lys Ser Lys Lys Asp Val Lys Leu Glu Phe Phe Gly Phe Glu
45	420 425 430
	Asp His Glu Thr Gly Gly Asp Glu Gly Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr
50	435 440 445
	Lys Ile Lys Tyr Phe Gly Phe Asp Asp Leu Ser Glu Ser Glu Asp Asp
55	450 455 460
	Glu Asp Asp Asp Cys Gln Val Glu Arg Lys Thr Ser Lys Lys Arg Thr
60	465 470 475 480
	Lys Thr Ala Pro Ser Pro Ser Leu Gln Pro Pro Pro Glu Ser Asn Asp
65	

ES 2 331 995 T3

	485	490	495
5	Asn Ser Gln Asp Ser Gln Ser Gly Thr Asn Asn Ala Glu Asn Leu Asp		
	500	505	510
10	Phe Thr Glu Asp Leu Pro Gly Val Pro Glu Ser Val Lys Lys Pro Ile		
	515	520	525
15	Asn Lys Gln Gly Asp Lys Ser Lys Glu Asn Thr Arg Lys Ile Phe Ser		
	530	535	540
20	Gly Pro Lys Arg Ser Pro Thr Lys Ala Val Tyr Asn Ala Arg His Trp		
	545	550	555
25	Asn His Pro Asp Ser Glu Glu Leu Pro Gly Pro Pro Val Val Lys Pro		
	565	570	575
30	Gln Ser Val Thr Val Arg Leu Ser Ser Lys Glu Pro Asn Gln Lys Asp		
	580	585	590
35	Asp Gly Val Phe Lys Ala Pro Ala Pro Pro Ser Lys Val Ile Lys Thr		
	595	600	605
40	Val Thr Ile Pro Thr Gln Pro Tyr Gln Asp Ile Val Thr Ala Leu Lys		
	610	615	620
45	Cys Arg Arg Glu Asp Lys Glu Leu Tyr Thr Val Val Gln His Val Lys		
	625	630	635
50	His Phe Asn Asp Val Val Glu Phe Gly Glu Asn Gln Glu Phe Thr Asp		
	645	650	655
55	Asp Ile Glu Tyr Leu Leu Ser Gly Leu Lys Ser Thr Gln Pro Leu Asn		
	660	665	670
60	Thr Arg Cys Leu Ser Val Ile Ser Leu Ala Thr Lys Cys Ala Met Pro		
	675	680	685
65			

ES 2 331 995 T3

Ser Phe Arg Met His Leu Arg Ala His Gly Met Val Ala Met Val Phe

690 695 700

Lys Thr Leu Asp Asp Ser Gln His His Gln Asn Leu Ser Leu Cys Thr

705 710 715 720

Ala Ala Leu Met Tyr Ile Leu Ser Arg Asp Arg Leu Asn Met Asp Leu

725 730 735

Asp Arg Ala Ser Leu Asp Leu Met Ile Arg Leu Leu Glu Leu Glu Gln

740 745 750

Asp Ala Ser Ser Ala Lys Leu Leu Asn Glu Lys Asp Met Asn Lys Ile

755 760 765

Lys Glu Lys Ile Arg Arg Leu Cys Glu Thr Val His Asn Lys His Leu

770 775 780

Asp Leu Glu Asn Ile Thr Thr Gly His Leu Ala Met Glu Thr Leu Leu

785 790 795 800

Ser Leu Thr Ser Lys Arg Ala Gly Asp Trp Phe Lys Glu Glu Leu Arg

805 810 815

Leu Leu Gly Gly Leu Asp His Ile Val Asp Lys Val Lys Glu Cys Val

820 825 830

Asp His Leu Ser Arg Asp Glu Asp Glu Glu Lys Leu Val Ala Ser Leu

835 840 845

Trp Gly Ala Glu Arg Cys Leu Arg Val Leu Glu Ser Val Thr Val His

850 855 860

Asn Pro Glu Asn Gln Ser Tyr Leu Ile Ala Tyr Lys Asp Ser Gln Leu

865 870 875 880

Ile Val Ser Ser Ala Lys Ala Leu Gln His Cys Glu Glu Leu Ile Gln

ES 2 331 995 T3

	885	890	895
5	Gln Tyr Asn Arg Ala Glu Asp Ser Ile Cys Leu Ala Asp Ser Lys Pro		
	900	905	910
10	Leu Pro His Gln Asn Val Thr Asn His Val Gly Lys Ala Val Glu Asp		
	915	920	925
15	Cys Met Arg Ala Ile Ile Gly Val Leu Leu Asn Leu Thr Asn Asp Asn		
	930	935	940
20	Glu Trp Gly Ser Thr Lys Thr Gly Glu Gln Asp Gly Leu Ile Gly Thr		
	945	950	955
25	Ala Leu Asn Cys Val Leu Gln Val Pro Lys Tyr Leu Pro Gln Glu Gln		
	965	970	975
30	Arg Phe Asp Ile Arg Val Leu Gly Leu Gly Leu Leu Ile Asn Leu Val		
	980	985	990
35	Glu Tyr Ser Ala Arg Asn Arg His Cys Leu Val Asn Met Glu Thr Ser		
	995	1000	1005
40	Cys Ser Phe Asp Ser Ser Ile Cys Ser Gly Glu Gly Asp Asp Ser Leu		
	1010	1015	1020
45	Arg Ile Gly Gly Gln Val His Ala Val Gln Ala Leu Val Gln Leu Phe		
	1025	1030	1035
50	Leu Glu Arg Glu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Glu Ser Lys Thr Asp Glu		
	1045	1050	1055
55	Leu Ile Lys Asp Ala Pro Thr Thr Gln His Asp Lys Ser Gly Glu Trp		
	1060	1065	1070
60	Gln Glu Thr Ser Gly Glu Ile Gln Trp Val Ser Thr Glu Lys Thr Asp		
	1075	1080	1085
65			

ES 2 331 995 T3

Gly Thr Glu Glu Lys His Lys Lys Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Asp

5 1090 1095 1100

Leu Asn Lys Ala Leu Gln His Ala Gly Lys His Met Glu Asp Cys Ile

10 1105 1110 1115 1120

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

15 1125 1130 1135

Pro Ile Asn Val Thr Thr Val Arg Glu Tyr Leu Pro Glu Gly Asp Phe

20 1140 1145 1150

Ser Ile Met Thr Glu Met Leu Lys Lys Phe Leu Ser Phe Met Asn Leu

25 1155 1160 1165

Thr Cys Ala Val Gly Thr Thr Gly Gln Lys Ser Ile Ser Arg Val Ile

30 1170 1175 1180

Glu Tyr Leu Glu His Cys

35 1185 1190

40 <210> 2
<211> 3570
<212> ADN
45 <213> Humano

<400> 2

50 atgacatcca gatitgggaa aacatcacgt aggaaagggtg gaaatggcag ttcaaaatc 60

gatgaagict ttccaacaa acggactacc cttagcacia aatggggaga gaccacattt 120

atggctaat tagggcagaa gagggccaat ttcaaaccag atalccaaga aatccgaag 180

60 aaacctaaag tggaagaaga aagtactgga galccttttg gatitgalag tgatgatgag 240

65

ES 2 331 995 T3

tcctaccag ttcttcaaa gaatttagcc caggtaaagt gtctcttla ttcagaatct 300
 5 agtgaagctg ctcaattgga agaggctact tcagtacttg aagctaatag caaaattagt 360
 catgtggtcg ttgaagacac tgcgtttct gataaatgct tcccttgga ggacacttta 420
 10 ctgggaaag aaaagagcac aaaccgaatt gtagaagatg atgcaagcat aagtagctgt 480
 aataaattaa taacttcaga taaagtggag aattttcatg aagaacatga aaagaatagt 540
 15 caccatattc acaaaaaatgc tgatgacagt actaagaaac ccaatgcaga aactacagtg 600
 gcttctgaaa tcaaggaaac aaatgatact tggaactccc agtttgggaa aaggccagaa 660
 20 tcaccatcag aaatatctcc aatcaaggga tctgttagaa ctggtttgti tgaatgggat 720
 aatgatttg aagatatcag atcagaagac tgaatttaa gtttgatag tgatcccctt 780
 25 ttggagatga aggatgacga ttttaaaaat cgattggaaa atctgaatga agccattgag 840
 gaagatatg tacaagigt tcttaggcca accaactgta ggacgtactg tagggccaat 900
 30 aaaacgaaat cctcccaagg agcatcaaat ttgataagc tgatggacgg caccagtcag 960
 gccttagcca aagcaaacag tgaatcgagt aaagatggcc tgaatcaggc aaagaaaggg 1020
 35 ggtglaagti gtgggaccag ttttagaggg acagittggac ggactagaga ttacacgti 1080
 ttacatccat ctgcttgc agtttgaat gtaccatac aggatactat ggaacgcagc 1140
 atggatgagt tcaatgcac cactcctgca gatttgggag aagctggctg tctcagaaaa 1200
 40 aaggcagata ttgcaactc taagactact actagattc gacctagtaa tactaaatcc 1260
 aaaaaggatg ttaaactlga atttttggg ttgaagatc atgagacagg aggtgatgaa 1320
 45 ggaggttctg gaagtictaa ttacaaaatt aaglatittg gctttgatga tctcagtga 1380
 agcgaagatg atgaagaiga tgactgtcaa gtagaagaa agacaagcaa aaaaagaact 1440
 50 aaaacagctc catcacctc ctgcagcct ccccgagaa gcaatgataa ttcccaggac 1500
 agtcagctg gtactaaca igtcaaaaac ttgatitla cagaggactt gcctgggtg 1560
 55 cctgaaagtg tgaagaagcc cataaataa caaggagata aatcaaagga aaataccaga 1620
 aagattitla gtggcccaa acggcaccc acaaaagctg tatataatgc cagacattg 1680
 60 aatcatccag atcagaaga actgcctggg ccaccagtag taaaacctca gattgtcaca 1740

ES 2 331 995 T3

gtgaggctgt ctcaaagga accaaatcaa aaagatgatg gagtttttaa ggctcctgca 1800
 5 ccacatcca aagtataaa aactgtgaca atacctactc agccctacca agatatagtt 1860
 actgcactga aatgcagacg agaagacaaa gaattatata ctgttgttca gcacgtgaag 1920
 10 cacticaacg atgttgtaga atttggtgaa aatcaagagt tcactgatga cattgagtac 1980
 ttgtaagtg gcttaaagag cactcagcct cttaaaccac gtgtccctag tgitattagc 2040
 15 ttggtacta aatgtgcat gccagttt cgaatgcacc tgagagcaca tgggatggta 2100
 gcaatggct ttaaaacctt ggaatgattc cagcaccatc agaatctgtc cctctgtaca 2160
 20 gctgccctca tglatatact gagtagagat cgttgaaca tggatcttga tagagctagc 2220
 ttagatctaa tgattcgact ttggaactg gaacaagatg ctctatcagc caagctactg 2280
 25 aatgaaaaag acatgaacaa aattaaagaa aaaatccgaa ggctctgtga aactgtacac 2340
 aacaagcatt ttgatctaga aaatataacg actgggcatt tagctatgga gacattatta 2400
 30 tcccttactt cttaacgagc aggagactgg tttaaagaag aactccggct ttgggtgggt 2460
 ctggatcata ttgtagataa agtaaaagaa tgtgtggaic atttaagtag agatgaggat 2520
 35 gaagagaaac tggtagcctc actatgggga gcagagagat gtttactgagt tttagaaagt 2580
 gtaactgtgc ataattccga aaatcaaagc tacttgatag catataaaga ttcccaactt 2640
 40 attgtttcat cagctaaagc attacagcat tgtgaagaac tgattcagca gtacaacctt 2700
 gctgaggaca gcataatgctt agctgacagt aagcctctgc ctaccagaa tgaactaac 2760
 45 catgtaggca aagcagtgga ggactgcatg agggccatca tgggggtgtt gcttaattta 2820
 actaatgata atgagtgggg cagcaccaaa acaggagagc aggacggctt cataggcaca 2880
 50 gcgctgaact gtgtgttca ggttccaaag tacttacctc aggagcagag attgatatt 2940
 cgagtgttgg gcttaggctt gctgataaat ctagtggagt atagtgtctg gaatcggcac 3000
 55 tgtctgtca acatggaac atcgtgtctt ttgattctt ccactgtag tggagaaggg 3060
 gatgatagtt taaggatagg tggacaagtt catgtgttcc aggttttagt gcagctattc 3120
 60 cttagcagag agcgggcagc ccagctagca gaaagtaaaa cagatgagtt gatcaaagat 3180
 65 gctcccacca ctacagatga taagagtgga gagtggcaag aaacaagtgg agaaatcacg 3240

ES 2 331 995 T3

tgggtgtcaa ctgaaaagac tgatgtaca gaagagaaac ataagaagga ggaggaggat 3300

5 gaagaacttg acctcaataa agcccttcag catgccggca aacacatgga ggattgcatt 3360

gtggcctcct acacggcact acttcttggg tgctctgcc aggaaagtc aatcaatga 3420

10 accactgtgc gggaatatct gccagaagga gactttcaa taatgacaga gatgctcaaa 3480

aaattttga gttttatgaa tctcacttgt gctgttgga caactggcca gaaatctatc 3540

15 tctagagtga ttgaatatct ggaacattgc 3570

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65