



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 326 704**

(51) Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **96919472 .9**

(96) Fecha de presentación : **14.06.1996**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0914325**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.1999**

(54)

Título: **Moduladores de la función de receptores FAS y otras proteínas.**

(30)

Prioridad: **16.07.1995 IL 114615**
17.08.1995 IL 114986
14.09.1995 IL 115319
27.12.1995 IL 116588
16.04.1996 IL 117932

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2009

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2009

(73)

Titular/es:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co., Ltd.
The Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
Rehovot 76100, IL

(72)

Inventor/es: **Wallach, David;**
Boldin, Mark;
Goncharov, Tanya y
Goltsev, Yury, V.

(74)

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 326 704 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

Moduladores de la función de receptores FAS y otras proteínas.

5 **Campo del invento**

El presente invento está generalmente en el campo de los receptores que pertenecen a la superfamilia de receptores TNF/NGF y el control de sus funciones biológicas. La superfamilia de receptores de TNF/NGF incluye receptores tales como los receptores p55 y p75 de factor de necrosis tumoral (TNF-Rs, de aquí en adelante llamados p55-R y p75-R) y el receptor del ligando de FAS (también llamado FAS/APO1 o FAS-R y de aquí en adelante llamado FAS-R) y otros. Más específicamente, el presente invento tiene que ver con proteínas nuevas que se unen a la proteína MORT-1 (O FADD), y más específicamente, se refiere a las isoformas de una proteína tal como la proteína de unión a MORT-1, aquí designada como MACH siendo dichas isoformas capaces de inhibir la muerte celular.

Por consiguiente, aquí están descritas, en general, nuevas proteínas que son capaces de modular o mediar la función de MORT-1 o de otras proteínas que se unen a MORT-1 directa o indirectamente. En particular, el presente invento tiene que ver con diversas isoformas nuevas de MACH, su preparación y los usos de la misma. Dichas isoformas nuevas son capaces de inhibir la muerte celular.

20 **Antecedentes de la técnica anterior**

El factor de necrosis tumoral (TNF-a) y la linfotóxina (TNF-b) (de aquí en adelante, TNF, se refiere tanto a TNF-a como a TNF-b) son citoquinas proinflamatorias multifuncionales formadas principalmente por fagocitos mononucleares, que tienen muchos efectos en las células (Wallach, D. (1986) en: Interferon 7 (Ion gresser, ed.), pp. 83-122, Academic Press, Londres; y Beutler y Cerami (1987)). Ambos TNF-a y TNF-b inician sus efectos uniéndose a receptores específicos de superficie celular. Algunos de los efectos es probable que sean beneficiosos para el organismo: pueden destruir, por ejemplo, células tumorales o células infectadas por virus y aumentan las actividades antibacterianas de los granulocitos. De esta manera, TNF contribuye a la defensa de los organismo frente a tumores y agentes infecciosos y contribuye a la recuperación por lesión. Así, TNF puede ser usado como un agente antitumoral en cuya aplicación se une a su receptor en la superficie de células tumorales e inicia de ese modo eventos que conducen a la muerte de las células tumorales. TNF puede también ser usado como un agente anti-infeccioso.

Sin embargo, tanto el TNF-a como TNF-b también tienen efectos nocivos. Hay evidencias de que la sobreproducción de TNF-a puede jugar un papel patogénico principal en varias enfermedades. Por ejemplo, efectos de TNF-a, principalmente en la vasculatura, son conocidos como una causa principal para los síntomas del shock séptico (Tracey y otros, 1986). En algunas enfermedades, el TNF puede causar pérdida excesiva de peso (caquexia) suprimiendo actividades de adipocitos y causando anorexia, y el TNF-a fue así llamado caquetina. Fue también descrito como mediador del daño a tejidos en enfermedades reumatoides (Beutler y Cerami, 1987) y como un mediador principal del daño observado en reacciones de injerto contra paciente (Piquete y otros, 1987). Además, TNF se conoce que está implicado en el proceso de inflamación y en muchas otras enfermedades.

Dos receptores distintos, expresados de modo independiente, los TNF-Rs p55 y p75, que se unen específicamente tanto a TNF-a como a TNF-b, inician y/o median los efectos biológicos anteriormente mencionados del TNF. Estos dos receptores tienen dominios intracelulares estructuralmente diferentes sugiriendo que señalizan de modo diferente (Véase Omán y otros, 1989; Engelmann y otros, 1990; Brockhaus y otros, 1990; Leotscher y otros, 1990; Schall y otros, 1990; Nophar y otros, 1990; Smith y otros, 1990; y Heller y otros, 1990). Sin embargo, el mecanismo celular, por ejemplo, las diversas proteínas y posiblemente otros factores, que están implicados en la señalización intracelular de los TNF-Rs p55 y p75 aún no han sido elucidados. Es en esta señalización intracelular, que tiene lugar normalmente después de la unión del ligando, es decir, TNF (a o b), al receptor, que es responsable del comienzo de la cascada de reacciones que dan como resultado final la respuesta observada de la célula a TNF.

En lo que se refiere al efecto citocida de TNF anteriormente mencionado, en la mayoría de las células estudiadas hasta ahora, este efecto es desencadenado principalmente por el TNF-R p55. Los anticuerpos frente al dominio extracelular (dominio de unión al ligando) del TNF-R p55 pueden desencadenar ellos mismos el efecto citocida (véase la patente europea EP 412486) que se relaciona con la efectividad de la reacción entrecruzada del receptor por los anticuerpos, que se cree que es la primera etapa en la generación del proceso de señalización intracelular. Además, los estudios mutacionales (Brakebusch y otros, 1992; Tartaglia y otros, 1993) han mostrado que la función biológica del TNF-R p55 depende de la integridad de su dominio intracelular, y por consiguiente se ha sugerido que el inicio de la señalización intracelular que lleva al efecto citocida de TNF tiene lugar como consecuencia de la asociación de dos o más dominios intracelulares del p55 TNF-R. Por otro lado, el TNF (a y b) está presente como un heterotrímero, y como tal, se ha sugerido que induce la señalización intracelular vía el p55 TNF-R por medio de su habilidad para unirse a y reaccionar entrecruzadamente con las moléculas receptoras, es decir, causando la agregación del receptor.

Otro miembro de la superfamilia de receptores TNF/NGF es el receptor FAS (FAS-R) que ha sido también llamado el antígeno FAS, una proteína de superficie celular expresada en diversos tejidos y que comparte homología con un número de receptores de superficie celular incluyendo TNF-R y NGF-R. El FAS-R media la muerte celular en forma de apoptosis (Itoh y otros, 1991), y parece que sirve como un selector negativo de células T autoreactivas, es decir, durante la maduración de células T, el FAS-R media la muerte celular por apoptosis de las células T reco-

nociendo autoantígenos. También se ha encontrado que las mutaciones en el gen de FAS-R (lpr) causa un trastorno linfoproliferativo en ratones que se parece a la enfermedad autoinmune humana de lupus eritematoso sistémico (SLE) (Watanabe-Fukunaga y otros, 1992). El ligando para FAS-R parece ser una molécula asociada a la superficie celular expresada por, entre otras, células T asesinas (o linfocitos T citotóxicos-CTLs), y de ahí que cuando tales CTLs entran en contacto con células que llevan FAS-R, estas sean capaces de inducir muerte celular por apoptosis de las células que llevan FAS-R. Además, se ha preparado un anticuerpo monoclonal que es específico para FAS-R, este anticuerpo monoclonal es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis en células que llevan FAS-R, incluyendo células de ratón transformadas por cADN que codifican para FAS-R humano (Itoh y otros, 1991).

Mientras que algunos de los efectos citotóxicos de los linfocitos están mediados por la interacción de un ligando producido por linfocitos, con el receptor de superficie celular FAS-R (CD95) presente de manera amplia, que tiene la capacidad de desencadenar la muerte celular, se ha encontrado también que diversas otras células, aparte de los linfocitos T, expresan el FAS-R en su superficie y pueden ser destruidos por la reacción desencadenada por este receptor. La inducción descontrolada de tal proceso de muerte se supone que contribuye al daño celular en ciertas enfermedades, por ejemplo, la destrucción de células de hígado en la hepatitis aguda. Por consiguiente, encontrar medios para contener la actividad citotóxica de FAS-R puede tener un potencial terapéutico.

Por el contrario, puesto que también se ha encontrado que ciertas células malignas y células infectadas por VIH llevan el FAS-R en su superficie, los anticuerpo frente a FAS-R, o el ligando de FAS-R, pueden ser usados para desencadenar los efectos citotóxicos mediados por FAS-R en estas células y de ese modo proporcionar un medio para combatir tales células malignas o células infectadas por VIH (véase Itoh y otros, 1991). Encontrar aún otros modos para potenciar la actividad citotóxica de FAS-R puede por lo tanto tener también un potencial terapéutico.

Ha sido una necesidad durante mucho tiempo proporcionar un medio para modular la respuesta celular al TNF (a o b) y el ligando de FAS-R. Por ejemplo, en las situaciones patológicas anteriormente mencionadas, en las que TNF o el ligando de FAS-R están sobreexpresados, es deseable inhibir los efectos citocidas inducidos por TNF o el ligando de FAS-R, mientras que en otras situaciones, por ejemplo, aplicaciones de curación de heridas, es deseable potenciar el efecto de TNF, o en el caso de FAS-R, en células tumorales o células infectadas por VIH, es deseable potenciar el efecto mediado por FAS-R.

Un número de aproximaciones han sido hechas por el laboratorio de la solicitud (por ejemplo, las solicitudes Europeas N°s EP 186833, EP 308378, EP 398327 y EP 412486) para regular los efectos deletéreos del TNF mediante la inhibición de la unión del TNF a sus receptores usando anticuerpo anti-TNF o usando receptores de TNF solubles (siendo esencialmente los dominios extracelulares de los receptores solubles) para competir con la unión del TNF a los TNF-Rs unidos a la superficie celular. Además, en base a que la unión del TNF a sus receptores es requerida para los efectos celulares inducidos por TNF, las aproximaciones por el laboratorio de los solicitantes (véase por ejemplo el documento EPO 568925) han sido hechas para modular el efecto del TNF modulando la actividad de los TNF-Rs.

Brevemente, el documento EPO 568925 se refiere a un método para modular la transducción de señales y/o el corte en TNF-Rs mediante el cual los péptidos u otras moléculas pueden interaccionar bien con el receptor mismo o bien con las proteínas efectoras que interaccionan con el receptor, por tanto, modular la función normal de TNF-Rs. En el documento de patente EPO 568925, se describe la construcción y caracterización de diversos p55 TNF-Rs mutantes, que tienen mutaciones en los dominios extracelulares, transmembranas e intracelulares del TNF-R p55. De esta manera, se identificó que las regiones dentro de los dominios por encima del p55TNF-R son esenciales para el funcionamiento del receptor, es decir, la unión del ligando (TNF) y la subsiguiente transducción de señales y señalización intracelular que da como resultado final el efecto del TNF observado en las células. Además, se ha descrito también un número de aproximaciones para aislar e identificar proteínas, péptidos y otros factores que son capaces de unirse a las diversas regiones en los dominios anteriores del TNF-R, proteínas, péptidos y otros factores que pueden estar implicados en regular o modular la actividad del TNF-R. Un número de aproximaciones para aislar y clonar las secuencias de ADN que codifican tales proteínas y péptidos; para construir vectores de expresión para la producción de estas proteínas y péptidos; y para la preparación de anticuerpos o fragmentos de las mismas que interaccionan con el TNF-R o con las proteínas y péptidos anteriormente que se unen a diversas regiones del TNF-R, son también expuestas en el documento de patente EPO 568925. Sin embargo, el documento de patente EPO 568925 no especifica las proteínas y péptidos precisos que se unen a los dominios intracelulares de los TNF-Rs (por ejemplo p55-TNF-R) ni describe la aproximación de doble híbrido de levadura para aislar e identificar tales proteínas o péptidos que se unen a los dominios intracelulares de TNF-Rs. De igual manera, hasta este momento no ha habido una descripción de proteínas o péptidos capaces de unir el dominio intracelular de FAS-R.

Así, cuando se desea inhibir el efecto de TNF, o el ligando de FAS-R, sería deseable disminuir la cantidad o actividad de los TNF-Rs o FAS-R en la superficie celular, mientras que un aumento en la cantidad de actividad de TNF-Rs o FAS-R se desearían cuando se busca un efecto potenciado de TNF o ligando de FAS-R. En este extremo los promotores tanto de p55 TNF-R y de p75 TNF-R han sido secuenciados, analizados y se ha encontrado que un número de motivos de secuencias clave que son específicos de diversos factores reguladores de la transcripción, y como tales la expresión de estos TNF-Rs pueden ser controlados a su nivel de promotor, es decir, inhibición de la transcripción a partir de los promotores para una disminución en el número de receptores, y un potenciamiento de la transcripción a partir de los promotores para un aumento en el número de receptores (documento de patente EP 606869 y el documento de patente WO 9531206). Estudios correspondientes que se refieren al control de FAS-R al nivel del promotor del gen FAS-R aún no han sido documentados.

Mientras que se sabe que los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), y el receptor de FAS-R relacionado estructuralmente desencadenada en las células, tras la estimulación con ligando producidos por leucocitos, actividades destructivas que llevan a su propia destrucción, los mecanismos de esta reacción desencadenada son aún poco conocidos. Estudios mutacionales indica que en la señalización de FAS-R y el receptor p55 TNF (p55-R) para la citotoxicidad implica distintas regiones dentro de los dominios intracelulares (Brakebusch y otros, 1992; Tartaglia y otros 1993; Itoh y Nagata, 1993). Estas regiones (los “dominios de la muerte”) tiene similitud de secuencia. Los “dominios de muerte” de tanto FAS-R y p55-R tienden a autoasociarse. Esta autoasociación promueve aparentemente esa agregación del receptor que es necesaria para la iniciación de la señalización, (véase Song y otros, 1994; Wallach y otros, 1994; Boldin y otros, 1995), y a niveles elevados de la expresión del receptor puede dar como resultado el desencadenamiento de la señalización independiente de ligando (Holding y otros, 1995).

Así, previamente al documento WO 9531544 y el presente invento, no se han proporcionado proteínas que pueden regular el efecto de los ligandos que pertenecen a la superfamilia TNF/NGF, tal como el efecto de TNF o el ligando de FAS-R en las células, mediante la mediación del proceso de señalización intracelular, señalización que se cree que está ampliamente gobernada por los dominios intracelulares (ICs) del receptor que pertenece a la superfamilia de receptores TNF/NGF, tales como los de los dominios intracelulares de TNF-Rs, es decir el p55 y p75 TNF-R (p55IC y p75IC, respectivamente), así como el FAS-IC.

Algunos de los efectos citotóxicos de los linfocitos están mediados por la interacción de un ligando producido por linfocitos con FAS-R (CD95), con un receptor de superficie celular ampliamente expresado que tiene la habilidad de desencadenar la muerte celular (véase Nagata y Golstein, 1995). La muerte celular producida por fagocitos mononucleares implica un acoplamiento ligando-receptor, el TNF y su receptor p55-R (CD120), que está estructuralmente relacionado con el FAS-R y su ligando (véase también Vandenabeele y otros, 1995). Al igual que otros efectos inducidos por receptor, la inducción de la muerte celular por los receptores de TNF y el FAS-R tiene lugar vía una serie de interacciones proteína-proteína, que llevan a la unión del ligando-receptor hasta la eventual activación de las funciones enzimáticas efectoras, que en el caso de estos receptores particulares resulta en una muerte celular. Estudios previos han elucidado interacciones proteína proteína no enzimáticas que inician la señalización para la muerte celular: la unión de las moléculas de TNF trimérico o FAS-R a los receptores, las interacciones resultantes de sus dominios intracelulares (Brakebusch y otros, 1992; Tartaglia y otros, 1993; Itoh y Nagata, 1993) aumentadas por una propensión de los motivos de los dominios de muerte a autoasociarse, (Holding y otros, 1995a), e indujeron la unión de dos proteínas citoplasmáticas (que pueden también unirse entre sí) a los dominios intracelulares de los receptores-MORT-1 (o FADD) a FAS-R (Holding y otros, 1995b; Chinnaiyan y otros, 1995; Kischkel y otros, 1995) y TRADD a p55-R (Hsu y otros, 1995; Hsu y otros, 1996).

Tres proteínas que se unen al dominio intracelular de FAS-R y p55-R en la región del “dominio de muerte” implicada en la inducción de muerte celular por los receptores a través de la heteroasociación de las regiones homólogas y que de modo independiente son también capaces de desencadenar la muerte celular fueron identificadas mediante el procedimiento de cribado de doble híbrido de levadura. Una de éstas es la proteína, MORT-1 (Boldin y otros, 1995) también conocida como FADD (Chinnaiyan y otras, 1995), que se une específicamente a FAS-R. Una segunda, TRADD (véase también Hsu y otros, 1995, 1996), se une a p55-R, y la tercera, RIP (véase también Stranger y otros, 1995), se une tanto a ambos FAS-R como a p55-R. Además de su unión a FAS-R y p55-R, estas proteínas son también capaces de unirse entre sí, lo cual proporciona una comunicación entrecruzada “Cross-talk” funcional entre FAS-R y p55-R. Estas uniones tienen lugar a través de un motivo de secuencia conservada, el “módulo de dominio de muerte” común a los receptores y sus proteínas asociadas. Además, aunque en el ensayo de doble híbrido de levadura MORT-1 demostró unirse espontáneamente a FAS-R, en células de mamífero esta unión tiene lugar sólo tras la estimulación del receptor, sugiriendo que MORT-1 participa en los eventos de iniciación de señalización por FAS-R. MORT-1 no contiene ningún motivo de secuencia característico de actividad enzimática, y por lo tanto, su capacidad para desencadenar la muerte celular parece no implicar una actividad intrínseca de MORT-1 mismo, sino más bien, la activación de alguna(s) otra(s) proteína(s) que se unen a MORT-1 y actúan aguas mas abajo en la cascada de señalización. la expresión celular de los mutantes MORT-1 que carecen de la parte N-terminal de la molécula han demostrado bloquear la inducción de citotoxicidad por FAS/APO1 (FAS-R) o p55-R (Hsu y otros, 1996; Chinnaiyan y otros, 1996), indicando que esta región N-terminal transmite la señalización para el efecto citocida de ambos receptores a través de las interacciones proteína-proteína.

Estudios recientes han implicado un grupo de tiolproteasas citoplasmáticas que están estructuralmente relacionadas con la proteasa CED3 de *Caenorhabditis elegans* y a la enzima convertidora de interleuquina -1b (ICE) de mamífero en el inicio de diversos procesos de muerte celular fisiológica (revisados en Kumar, 1995 y Henkart, 1996). Ha habido otras indicaciones de que la(s) proteasa(s) de esta familia puede tomar parte en la citotoxicidad celular inducida por FAS-R y TNF-Rs. Se encontró que inhibidores peptídicos específicos de las proteasas y dos proteínas codificadas por virus que bloquean su función, la proteína crmA de cowpox y la proteína de Baculovirus p35, proporcionan protección a las células frente a la citotoxicidad celular (Enari y otros, 1995; Los y otros, 1995; Tewari y otros, 1995; Xue y otros, 1995; Beidler y otros, 1995). El corte rápido de ciertas proteínas celulares específicas, mediadas aparentemente por proteasa(s) de la familia CED3/ICE, fue observado en células al poco tiempo de la estimulación de FAS-R o TNF-Rs. Hasta este momento, no se ha presentado información para identificar las proteasas CED3/ICE específicas implicadas, ni el del mecanismo de activación de estas proteasas por los receptores.

Compendio del invento

Es un objetivo del invento proporcionar nuevas proteínas MACH o fragmentos de las mismas, que son capaces de inhibir la muerte celular y la unión a MORT-1, la cual se une al dominio intracelular de FAS-R, cuyas proteínas nuevas afectan al proceso de señalización intracelular iniciado por la unión del ligando de FAS a su receptor. Específicamente las proteínas nuevas MACH o fragmentos de las mismas son capaces de inhibir la muerte celular.

Otro objetivo del invento es proporcionar anticuerpos a las proteínas nuevas anteriores o fragmentos de las mismas, que pueden ser usados para inhibir el proceso de señalización, o, más específicamente, la citotoxicidad celular, cuando se desea.

Un aspecto adicional descrito aquí es el de usar las proteínas nuevas anteriores, o fragmentos de las mismas, para aislar y caracterizar proteínas o factores adicionales que pueden estar implicados en la regulación de la actividad del receptor, por ejemplo, otras proteasas que cortan las proteínas nuevas para hacerlas biológicamente activas, y/o aislar e identificar otros receptores aguas mas arriba en el proceso de señalización a los cuales estas proteínas nuevas, o fragmentos de las mismas se unen (por ejemplo, otros FAS-R o receptores relacionados), y de ahí, en cuya función estén implicadas.

Un objetivo adicional mas descrito aquí es proporcionar inhibidores que puedan ser introducido en las células para unirse o interactuar con las proteasas MACH e inhibir su actividad proteolítica.

Por otro lado, es un objetivo del presente invento usar las proteínas nuevas anteriormente mencionadas, o fragmentos de las mismas como antígenos para la preparación de anticuerpo policlonales y/o monoclonales para estos. Los anticuerpos, a su vez, pueden ser usados, por ejemplo, para la purificación de las nuevas proteínas para las diferentes fuentes, tales como extractos celulares o líneas celulares transformadas.

Además, estos anticuerpos pueden ser usados para propósitos de diagnóstico, por ejemplo, para identificar trastornos relacionados con el funcionamiento anormal de los efectos celulares mediados por FAS-R u otros receptores relacionados.

Un objetivo adicional del invento es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas nuevas anteriores o fragmentos de las mismas, así como composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anteriormente anotados.

Los presentes inventores descubrieron una proteína nueva, MACH, que es capaz de unirse a, o interactuar con, MORT-1, que por sí misma se une al dominio intracelular de FAS-R así como a isoformas MACH llamadas MACHa3, MACHb1, MACHb3, MACHb4 y MACHb5 que están sujetas al presente invento. MACH probablemente funciona como un componente efector de la ruta de muerte celular iniciada por la unión del ligando de FAS a FAS-R en la superficie celular, y esto por virtud del hecho de que al menos algunas de las isoformas de MACH parecen ser proteasas intracelulares activas. Las proteasas de la familia CED3/ICE han sido implicadas en el proceso apoptótico desencadenado por FAS-R. MORT-1 (o FADD) se une al dominio intracelular de FAS-R tras la activación de este receptor y la proteína MACH nueva del presente invento se une a MORT-1. La proteína MACH, clonada y caracterizada aquí existe en realidad en múltiples isoformas, algunas de las cuales tiene una región de homología CED3/ICE, que tiene una actividad proteolítica (dominios proteolíticos), y causa la muerte de las células cuando son expresadas en las células. Así, la activación de este homólogo CED3/ICE nuevo (es decir, las diversas isoformas MACH, que tienen el dominio proteolítico) por FAS-R (vía interacción con MORT-1) parece constituir un componente efector de la ruta de muerte celular mediada por FAS-R.

Por otro lado, MACH también parece funcionar como un componente efector de la ruta de muerte celular iniciada por la unión de TNF a p55-R en la superficie celular, esto por medio de un mecanismo indirecto de unión de MORT-1 a TRADD, una proteína que se une al dominio intracelular de p55-R (Hsu y otros, 1995), seguido por o junto con la unión de MACH a MORT-1, con la activación de MACH en una proteasa activa implicada en afectar la muerte celular.

También debería notarse que mientras que MACH, en particular la isoforma MACHa1, muestra unas características de secuencia críticas para la función de las proteasas CED3/ICE, tiene sin embargo algunas características de secuencia distintivas en sí misma que pueden posiblemente dotarla con un modo de acción específico de tejido/célula.

MORT-1 (por "Mediador de la toxicidad del receptor", Boldin y otros, 1995b), previamente designado como HF-1, es capaz de unirse al dominio intracelular del ligando de FAS-R. Esta proteína de unión FAS-IC parece actuar como un mediador o modulador del efecto del ligando de FAS-R sobre las células mediando o modulando el proceso de señalización intracelular que normalmente tiene lugar tras la unión de ligando de FAS-R en la superficie celular. Además de su especificidad a la unión de FAS-IC, MORT-1 demostró tener otras características (véase el Ejemplo 1), por ejemplo, tiene una región homóloga al de las regiones del "dominio de muerte" (DD) del p55-TNF-R y FAS-R (p55-DD y FAS-DD), y de ese modo es también capaz de autoasociación. MORT-1 es también capaz de activar la citotoxicidad celular por si mismo, una actividad posiblemente relacionada a su capacidad de autoasociación. Se ha encontrado recientemente que la coexpresión de la región en MORT-1 (HF-1) que contiene la homología de secuencia de los "dominios de muerte" (MORT-DD, presente en la parte C-terminal de MORT-1) interfiere en gran medida con la muerte celular inducida por FAS, como se esperaría por su capacidad para unirse al "dominio de muerte" del FAS-

IC. Además, en las mismas condiciones experimentales, se ha encontrado que la co-expresión de la parte de MORT-1 que no contiene la región MORT-DD (la parte N-terminal de MORT-1, aminoácidos 1-117, "cabeza de MORT-1") resultó en la no interferencia de la muerte celular inducida por FAS, y en todo caso, una citotoxicidad celular inducida por FAS algo potenciada.

Por consiguiente, es posible que MORT-1 también se una a otras proteínas implicadas en los procesos de señalización intracelular. Estas proteínas de unión a MORT-1 puede por lo tanto actuar como mediadores o moduladores indirectos del efecto del ligando de FAS-R en las células mediando o modulando la actividad de MORT-1; o estas proteínas de unión de MORT-1 pueden actuar directamente como mediadores o moduladores del proceso de señalización intracelular asociado a MORT-1 mediando o modulando la actividad de MORT-1, que, como se observa anteriormente, tiene una capacidad aparentemente independiente para activar la citotoxicidad celular. Estas proteínas de unión a MORT-1 pueden también ser usadas en cualquiera de los procedimientos de cribado estándar para aislar, identificar y caracterizar proteínas, péptidos, factores, anticuerpos, etc. adicionales, que pueden estar implicados en el proceso de señalización asociado con MORT-1 o asociado a FAS-R o pueden ser elementos de otros procesos de señalización intracelular. Tales proteínas de unión a MORT-1 han sido aisladas y descritas aquí (véase los ejemplos 2 y ejemplo 3). Una de estas proteínas de unión MORT-1, aquí designada MACH, fue inicialmente clonada, secuenciada, y parcialmente caracterizada por tener las siguientes propiedades. El cADN MACH codifica el marco de lectura abierta ORF-B; MACH se une a MORT-1 en una manera muy fuerte y específica; el sitio de unión a MACH en MORT-1 tiene lugar aguas arriba del motivo de "dominio de muerte" MORT-1; la región ORF-B de MACH es la parte de interacción de MORT-1 de la misma; y MACH es capaz de autoasociación y de inducir citotoxicidad celular en sí misma.

Según el presente invento, se ha demostrado ahora, que MACH en realidad existe en un número de isoformas. Por otro lado, el MACH ORF-B observado anteriormente es de hecho una de las isoformas designadas aquí como MACHb1 (a continuación).

Por consiguiente, la presente descripción proporciona una secuencia de ADN que codifica una proteína o fragmento de la misma, capaz de unirse a o interactuar con MORT-1, dichas proteínas o fragmentos de las mismas son capaces de mediar el efecto intracelular mediado por FAS-R o p55-TNF-R. Específicamente dicha proteína o fragmento de la misma es capaz de inhibir la muerte celular.

En particular, el presente invento proporciona una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en

(a) una secuencia de ADN de las SEQ ID N°s: 4, 19, 21, 23, 24 ó 33;

(b) una secuencia de cADN que codifica una proteína MACH que es capaz de inhibir la muerte celular que comprende la SEQ ID N°: 5, 8, 20, 22, 25 ó 34;

(c) una secuencia de ADN capaz de hibridar en condiciones moderadamente rigurosas a la secuencia de (a) o (b), en la que la secuencia de ADN codifica una proteína MACH, que es capaz de inhibir la muerte celular;

(d) una secuencia de ADN que es degenerada como resultado del código genético a las secuencias de ADN definidas en (a) o (b) y que codifican una proteína MACH que es capaz de inhibir la muerte celular, y

(e) un fragmento del ADN de una cualquiera de (a) a (d) que codifica una proteína que es capaz de inhibir la muerte celular.

Las secuencias de ADN anteriormente mencionadas de las SEQ ID N°: 4, 19, 23, 24 ó 33 pertenecen a MACHb1, MACH a3, MACHb3, MACH b4 y MACH b5, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos anteriormente mencionadas de las SEQ ID N°: 5, 8, 20, 22, 25 ó 34 pertenecen a MACHb1, MACHb3, MACH a3, MACH b2, MACH b4 y MACH b5 respectivamente.

También proporcionados por el presente invento están los vectores que codifican las proteínas MACH anteriores que son capaces de inhibir la muerte celular, que contiene la secuencia de ADN anterior del invento, estos vectores son capaces de ser expresados en células hospedantes eucarióticas o procarióticas adecuadas. Las células hospedantes eucarióticas o procarióticas transformadas contienen tales vectores; y un método para producir la proteína MACH que es capaz de inhibir la muerte celular, creciendo tales hospedantes transformados en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína, llevando a cabo las modificaciones postraduccionales de dicha proteína según sea necesario para obtener dicha proteína y extraer dicha proteína expresada, del medio de cultivo de dichas células transformadas o de los extractos celulares de dichas células transformadas. Las definiciones anteriores pretenden incluir las isoformas de la proteína MACH en el presente invento.

En otro aspecto, el presente invento también proporciona anticuerpos o derivados activos o fragmentos de los mismos específicos para la proteína MACH que son capaces de inhibir la muerte celular, del invento.

Mediante otro aspecto más del invento, se proporciona el uso de las secuencias de ADN anteriores o las proteínas que codifican, según el invento para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el daño tisular en shock séptico, rechazo de injerte contra paciente o hepatitis aguda.

El presente invento también proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo uno cualquier de los siguientes:

(i) una proteína de unión a MORT-1 según el invento, y mezclas biológicamente activas de la misma;

(ii) un vector de virus animal recombinante que codifica una proteína capaz de unirse a un receptor de superficie celular y codificar una proteína MACH que es capaz de inhibir la muerte celular según el invento; También descrito está una secuencia de oligonucleótidos que codifican una secuencia antisentido de la proteína MACH capaz de inhibir la secuencia de muerte celular según el invento, en la que dicho oligonucleótido puede ser la segunda secuencia del vector del virus animal recombinantes de (ii) anterior.

Como surge de todo lo anteriormente mencionado, así como de la descripción detallada aquí a continuación, MACH puede ser usada en una forma independiente de MORT-1 para tratar células o tejidos. El aislamiento de las proteínas de unión MORT-1, su identificación y caracterización puede ser llevada a cabo por cualquier de las técnicas de cribado estándar usadas para aislar e identificar proteínas, por ejemplo, el método de doble híbrido de levaduras, métodos de cromatografía de afinidad, y cualquier de los otros procedimientos estándar bien conocidos usados para este propósito.

Otros aspectos y realizaciones del presente invento son también proporcionados como que surgen de la siguiente descripción detallada del invento.

Debería observarse que, donde se usa, los siguientes términos: “Modulación del efecto de ligando FAS o de TNF en las células”; y “Modulación del efecto de la proteína de unión a MORT-1 o More-1 en las células” se entiende que comprende un tratamiento *in vitro* así como *in vivo*.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la interacción de MORT-1 con FAS-IC y la autoasociación de MORT-1 en levaduras transformadas según se evalúa mediante un ensayo de expresión de b-galactosidasa de doble híbrido.

La Figura 2 describe esquemáticamente el nucleótido preliminar (SEQ ID N°: 1) y la secuencia aminoacídica deducida (SEQ ID N°: 2) de MORT-1 (HF1) en el que el “dominio de muerte” está subrayado ya que es un posible sitio de iniciación de la traducción, es decir, el residuo de metionina subrayado en la posición 49 (en negrita, subrayado M). El asterisco indica la traducción del codon stop (nucleótidos 769-771). Al principio y en mitad de cada línea se proporcionan dos números que proporcionan las posiciones relativas de los nucleótidos y aminoácidos de la secuencia con respecto al inicio de la secuencia (extremo 5'), en el que el primer número indica el nucleótido y el segundo número indica el aminoácido.

La Figura 3 es una secuencia nucleotídica parcial preliminar que codifica una proteína de unión MORT-1 obtenida a partir del clon de cADN.

La figura 4A-C describe esquemáticamente el cADN MACH y su proteína codificada, en el que en la Fig. 4a se muestra la estructura del cADN MACH que codifica dos marcos de lectura abierta MACH (ORF-A y ORF-B), el área rayada del ORF-B indica la región de la misma que tiene homología con la proteína MORT-1; en la Fig. 4B, se muestra la secuencia aminoacídica deducida (SEQ ID N°: 5) para l región MACH ORF-B, los residuos aminoácidos subrayados son la región que tiene homología con MORT-1 (correspondiente a la región rayada de Fig. 4a); y en la Fig. 4C, se muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID N°: 4) de la molécula de cADN MACH entera (designada MACH b1). La Figura 5 describe los resultados que ilustran la interacción de MORT-1 y MACH en las células de levadura transfectadas.

La Figura 6 describe gráficamente el desencadenamiento independiente de ligando de los efectos citocidas en células HeLa transfectadas con vectores de expresión controlados por tetraciclina que codifican MACH, comparados con los efectos en estas células transfectadas con tales vectores que codifican otras proteínas tales como luciferasa (luc, testigo negativo), FAS-IC, MORT-1, y células cotransfectadas con vectores que codifican MORT-1 y MACH.

Las Figuras 7A y 7B muestran la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N:5) de MACH B1 (Fig. 7A). La Fig. 7B muestra la homología de secuencias del modulador MORT en MACH b1, MORT-1 y PEA-15 (SEQ ID N°: 6).

La Figura 8 es una representación diagramática del receptor y las interacciones diana que participan en la inducción de muerte celular por FAS/APO y p55, el módulo del dominio de muerte está indicado por bandas, el módulo MORT está indicado en gris y la región CED3/ICE está indicada en negro.

La Figura 9A-C describe los resultados que ilustran la interacción *in vitro* de MACH b1 y sus mutantes de delección con MORT-1. La Fig. 9A muestra la evaluación de la expresión de proteínas y sus tamaños moleculares mediante la inmunoprecipitación a partir de lisados celulares usando una anticuerpo anti-FLAG. La Fig. 9B muestra la afinidad de unión de las proteínas a GST-MORT-1, adsorbidas a esferas de glutation-agarosa (o, como un testigo, a GST o GST unido al dominio intracelulares de Fas-APO-1). La Fig. 9C muestra los resultados de las inmunoprecipitaciones de las diversas construcciones de fusión MORT-1 y MACH usando los diversos anticuerpos específicos.

la Figura 10 es una representación diagramática de las diversas isoformas MACH.

La Figura 11 es un alineamiento de secuencia de aminoácido colineal esquemático de las isoformas MACH, MACH a1 (SEQ ID N°: 7), MACH β 1 (SEQ ID N°: 5), y MACH β 3 (SEQ ID N°: 8) y los diversos miembros conocidos de la familia de proteasas CED3/ICE, CED-3 (SEQ ID N°: 9), Ich-11/Nedd2 (SEQ id n°: 10), ICE_{rel}III (SEQ ID N°: 11), Tx/Ich2/ICE_{rel} II (SEQ ID N°: 12), ICE (SEQ ID N°: 13), CPP-32 (SEQ ID N°: 30), Mcn2a (SEQ ID N°: 31). Los residuos aminoacídicos están enumerados tanto a la izquierda como a la derecha de cada secuencia. Las líneas de puntos; espacios en la secuencia para permitir el alineamiento óptimo. Los aminoácidos que son idénticos en al menos tres de los miembros de la familia de proteasas CED3/ICE mostradas están encuadrados. Los módulos MORT aguas arriba de la región de homología CED3/ICE están encuadrados. Los sitios de las delecciones C-terminales empleados en este estudio son mostrados por líneas intermitentes. Los bloques de cuatro aminoácidos aguas abajo de la región del módulo MORT, que varían entre las diversas isoformas MACH (bloques 1-4) son observados mediante líneas en la parte superior. en la región de homología CED3/ICE, los aminoácidos que se alinean con residuos en el ICE implicados en la actividad catalítica mediante análisis de cristales por rayos X como se muestra a continuación: los residuos putativamente implicados en la catálisis, correspondientes a His₂₃₇, Gly₂₃₈ y Cys₂₈₅ en ICE están marcados por círculos rellenos por debajo del alineamiento (●). Los residuos que constituyen el bolsillo de unión para la cadena lateral de carboxilato del P1 Asp, correspondiente a Arg₁₇₉, correspondiente a Arg₁₇₉, Gln₂₈₃, Arg₃₄₁ y Ser₃₄₇ en ICE, están marcados mediante círculos abiertos por debajo del alineamiento (○). Los residuos Ala aguas arriba de los residuos que corresponden a Cys₂₈₅ en ICE, y los residuos Arg y Gly aguas abajo a la Cys, que están conservados en todas las proteasas previamente descritas de la familia CED3/ICE. Los residuos próximos a los residuos P1-P4 del sustrato están marcados por triángulos por debajo del alineamiento (Δ). Conocidos y previamente supuestos sitios de corte Asp-X y sitios potenciales de corte encontrados en localizaciones similares en MACH están encuadrado. las flechas indican que los extremos N- y C-terminales de las subunidades p20 y p10 de ICE y de las subunidades p17 y p12 de CPP32. Los extremos C-terminales de las proteínas se indican por asteriscos (*).

Las Figuras 12A-F describen los resultados ilustrando la actividad proteasa de MACHa1 a 15 min (Fig. 12A), 30 min. (Fig. 12B), 60 min. (Fig. 12C), 90 min. (Fig. 12D), 180 min. (Fig. 12E). La Fig 12 F muestra la actividad proteolítica a lo largo del tiempo a una concentración específica de sustrato.

Las Figuras 13A y 13B muestran la actividad proteasa de la región de homología CED3/ICE en MACHa. A, cinética de corte del sustrato fluorogénico derivado de la secuencia PARP, Ac-DEVD-AMC (50 uM), por extractos de *E. coli* que expresan una proteína de fusión-GST de la región de homología CED3/ICE en MACHa1 (Ser₂₁₇ a través del extremo C-terminal de la proteína (■) comparado con la falta de corte mediante extractos de bacterias que expresan los productos de las proteínas de fusión-GST de MACHa1 (○) de longitud completa, o de la región de homología CED3/ICE en la que Cys₃₆₀ está remplazada por la Ser (▽), o por extractos de bacteria que expresan productos de fusión a GST de cualquier de los dos productos proteolíticos potenciales de la región de homología CED3/ICE (Ser₂₁₇ hasta Asp₃₇₃ (Δ) y Ser₃₇₅ hasta Asp₄₇₉, el extremo C terminal de la proteína (Δ)). B, dependencia de la concentración del sustrato del corte de Ac-DEVD-AMC. El sustrato fue incubado durante 180 min con extractos de bacteria que expresan el producto de fusión a GST de la región de homología CED3/ICE de MACHa1 (■). El corte de este sustrato mediante los extractos fue inhibido en presencia de ácido yodoacético (5 mM, □). Ac-YVAD-AMC, un sustrato fluorogénico que corresponde a un sitio de corte ICE en el precursor IL-1 β , no fue cortado (●).

Las Figuras 14A-D muestran la muerte celular mediada por MACHa1 y MACHa2.

La Figura 15 describe gráficamente la muerte celular mediada por MACHa1 y MACHa2.

Las Figuras 16A-D muestran la morfología de las células en las que la muerte celular fue inducida o bloqueada.

La Figura 17 muestra gráficamente que las moléculas MACH A que contienen una región CED3/ICE no funcional bloquean la inducción de muerte celular por p55-R.

La Figura 18 muestra que las moléculas MACHa que contienen una región CED3/ICE no funcional bloquean la inducción por muerte celular por FAS/APO1.

La Figura 19 muestra la muerte de las células HeLa que expresan de modo transitorio FAS/APO1.

Descripción detallada del invento

El presente invento se refiere, en un aspecto, a las isoformas de la proteína de unión a MORT-1 nueva, MACH, siendo dichas isoformas capaces de inhibir la muerte celular, que son capaces de unirse a o interactuar con MORT-1 y de ese modo unirse al dominio intracelular del receptor FAS-R, al cual se une MORT-1, o a la unión del dominio intracelular del p55 TNF-R, al cual se une la proteína TRADD (véase el Ejemplo 2 y como se indica anteriormente) y al cual se une la proteína MRT-1 de TRADD.

Más específicamente, además de la unión a o interacción con MORT-1 las proteínas o fragmentos del presente invento son capaces de inhibir la muerte celular. Por consiguiente, las proteínas de unión a MORT-1 del presente invento son consideradas como mediadores o moduladores de FAS-R, que tiene un papel, en por ejemplo, el proceso de señalización que es iniciado por la unión del ligando FAS a FAS-R, e igualmente que tienen un papel en el proceso de

señalización que es iniciado por la unión de TNF a p55-R. Las proteínas de unión a MORT-1 del presente invento son las nuevas isoformas MACH descubiertas que son capaces de inhibir la muerte celular, las secuencias de aminoácidos y de ADN de las cuales las nuevas secuencias no aparecen en las bases de datos de "GENBANK" o "PROTEIN BANK" de secuencias de ADN o aminoácidos.

Más particularmente, según la presente descripción diversos homólogos de mamíferos de la proteasa de nemátodo, CED3 han sido descritos. Estos han sido designados como isoformas MACH (isoformas MACH α y MACH β) que, aunque están estrechamente relacionadas, muestran sin embargo algunas diferencias de estructura y de especificidad de sustrato, y como tal pueden servir un poco para diferentes funciones en células de mamífero. Ciertamente, dos actividades diferentes de las proteasas son conocidas. El papel principal de ICE parece ser el procesamiento del precursor precursor de IL-1 β , mientras que el CED3 se ha demostrado claramente que sirve como un efector de la muerte celular programada. Este último papel parece ser el papel de al menos algunos de los homólogos de mamíferos (algunas isoformas MACH). La secuencia de aminoácidos de MACH α 1 muestra un cierto parecido con CPP32, el homólogo mamífero más próximo conocido de CED3. La especificidad de sustrato de MACH es también similar al de CPP32, excepto que MACH α 1 muestra tener una especificidad de sustrato mas restringida que el de CPP32. CPP32 corta preferencialmente el péptido sustrato correspondiente al sitio de corte en poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP), aunque también tiene cierta actividad proteolítica frente al péptido que corresponde al sitio de corte ICE en el precursor IL-1 β . MACH α 1 parece, sin embargo, ser sólo capaz de cortar la secuencia derivada de PARP. Estas relaciones de MACH α 1 a CPP32 y CED3, y sus disimilaridades a ICE, son consistentes con la idea que MACH α 1 sirve, de modo similar a CED3, como regulador de la muerte celular. MACH α 1 muestra, sin embargo, algunas características de secuencias que la distinguen de CED3 y de CPP32, así como de todos los otros miembros de la familia CED3/ICE. La parte C terminal de MACH α 1, aguas arriba de sus región de homología CED3/ICE, no muestra similitud en absoluto con la región aguas arriba de cualquier de los otros homólogos. Hay también algunas características de secuencias únicas a la región de homología CED3/ICE de la proteína. Estas diferencias sugieren que MACH α 1 pertenece a una rama evolucionaria de la familia y que su contribución a la muerte celular difieren en algo de la de los homólogos CED3/ICE previamente descritos.

Una diferencia importante puede referirse a la manera en la que la función de la proteasa es regulada. Estando ambas implicadas en los procesos de muerte celular relacionados con el desarrollo y en la inmunocitolisis inducida por el receptor, el corte de las proteínas por proteasas de la familia CED3/ICE debería ser susceptible a regulación tanto por las señales que se forman dentro de la célula como por señales que emanan de los receptores de superficie celular. En procesos de muerte celular durante el desarrollo, la activación de tales proteasas parece implicar mecanismos que afectan la expresión génica, dando como resultado síntesis potenciada de proteasas, así como en síntesis disminuida de proteínas tipo BCL-2, que antagonizan su efecto apoptótico. Esto claramente no es el caso sin embargo, para la citotoxicidad desencadenada por FAS-R o los receptores TNF. Las células pueden ser destruidas por TNF o por el ligando de FAS-R aún cuando su actividad de síntesis de proteínas está completamente bloqueada (son de hecho en ese caso destruidas más eficazmente) y permanecen dependientes de estímulo en esas condiciones. La activación de proteasas de la familia CED3/ICE por los receptores TNF y FAS-R puede así tener lugar mediante un mecanismo que es independiente de la síntesis de proteínas. Las propiedades de secuencia únicas de MACH α 1 pueden permitirle tomar parte en tal mecanismo.

Para el conocimiento de los solicitantes, ninguna otra proteasa ha sido hasta ahora descrita como que se asocie, bien directamente o a través de una proteína adaptadora, con el dominio intracelular de un receptor de superficie celular. Bien por inferencia del modo de acción de las proteínas asociadas al receptor que tienen otras actividades enzimáticas, parece plausible que la unión de MACH α 1 a MORT1 permite la estimulación de la actividad proteasa de MACH α 1 tras el desencadenamiento de FAS-R. También puede permitir la activación de la proteasa por el p55-R, a través de la unión de MORT1 a TRADD, que se une a p55-R.

Otros miembros de la familia CED3/ICE fueron encontrados que exhiben una actividad completa sólo tras el procesamiento proteolítico, que tiene lugar bien mediante auto corte o mediante los efectos de otras proteasas de esta familia (revisado en Kumar, 1995; Henkart, 1996). El efecto citotóxico que resulta de la coexpresión de los dos potenciales productos principales de autocorte de MACH α 1, al contrario de la falta de citotoxicidad en las células que expresan la región de homología CED3/ICE completa, es consistente con la posibilidad que también MACH α 1 gana una actividad completa sólo tras, su procesamiento. La actividad enzimática observada en lisados de bacteria que expresan la región de longitud completa refleja aparentemente el autoprosesamiento de la proteína producida en estas condiciones o procesadas por algunas proteasas de bacterias. De qué modo este procesamiento tiene lugar dentro de la célula de mamífero, y como puede provocarse mediante el desencadenamiento de FAS-R y p55-R no se conoce, ni está claro aún que contribución relativa tiene la actividad proteasa de MACH α 1 en la citotoxicidad inducida por FAS-R y TNF. La evaluación de esta contribución se complica por el hecho que también la expresión de MACH β 1, que carece de la región de homología CED3/ICE, da como resultado una marcada citotoxicidad. Presumiblemente, esta citotoxicidad refleja la capacidad de MACH β 1 para unirse a MACH α 1. Debido a esta capacidad, las moléculas de MACH transfectadas pueden imponer, tras agregación, un cambio conformacional en las moléculas de MACH α 1 que son endógenas de las células transfectadas. Tal mecanismo puede bien dar cuenta también de la citotoxicidad observada cuando las moléculas que actúan aguas arriba de MACH, (MORT1, TRADD o los dominios de muerte que tienen el p55-R o FAS-R) están sobreexpresadas en las células. En este momento, no se puede excluir que la citotoxicidad observada tras la expresión inducida de MACH o de las moléculas que actúan aguas arriba de ella, reflejen, además de la actividad proteolítica de la región de homología CED3/ICE en MACH, también la activación de algunos de los otros mecanismos que se creía tomaban parte en el efecto citotóxico de FAS-R y p55-R (por ejemplo, la

activación de la esfingomielinasa neutra o ácida). Tampoco se puede excluir que la actividad proteolítica de la región de homología CED3/ICE sirva para otras funciones aparte de la inducción de citotoxicidad. Una idea más clara de la función de MACHa1 debería ganarse mediante la identificación de las proteínas sustrato endógenas que son cortadas tras la activación de MACHa1. Encontrar modos de eliminar la actividad de MACHa1 según se desee, por ejemplo mediante la expresión de moléculas inhibitoras, contribuirá también a comprender la función de esta proteína, y sirve como un modo de regular su actividad cuando se desea. Bien puede existir en células que expresan MACHa1 inhibidores naturales de la proteasa comprendida en esta proteína. La existencia de isoformas de corte y empalme alternativos para algunos de los otros miembros de la familia CED3/ICE se ha demostrado que constituye un modo de restricción fisiológica de la función de estas proteasas. Algunas de las isoformas de estas otras proteasas fueron documentadas que actúan como inhibidores naturales de las isoformas de longitud completa, aparentemente formando heterodímeros inactivos, con ellos. Esto puede bien ser el caso también para algunas isoformas de MACH, por ejemplo, MACHa3, en el que el sitio de corte potencial del extremo N-terminal no existe y los mutantes MACHa1 cuya región de homología CED3/ICE es deficiente. La expresión de tales isoformas inhibitoras pueden constituir un mecanismo de autoprotección celular frente a la citotoxicidad de FAS-R y TNF. La amplia heterogeneidad de las isoformas MACH, que exceden ampliamente la heterogeneidad observada para cualquier de las otras proteasas de la familia CED3/ICE, puede permitir un ajuste particularmente refinado de la función de la forma activa de esta proteína. Parece posible que algunas de las isoformas MACH sirva otras funciones. La capacidad de MACHb1 para unirse tanto a MORT-1 como a MACHa1 sugieren la posibilidad de que algunas de estas isoformas, y tal vez también otras isoformas MACH, no tiene un efecto inhibitorio sino más bien un efecto potenciador de la función de las isoformas enzimáticamente activas. Parece posible que algunas isoformas no sirvan para un papel relacionado con la citotoxicidad, sino más bien actuar como sitios de anclaje para moléculas que están implicadas en otros efectos, no citotóxicos de FAS-R y TNF.

Debido a la capacidad única de FAS-R y los receptores de TNF de causar muerte celular, así como la capacidad de los receptores de TNF de desencadenar otras actividades de daño celular diversas, una aberración de la función de estos receptores puede ser particularmente dañina para el organismo. Ciertamente, se ha demostrado que tanto una función excesiva como deficiente de los receptores que contribuyen a las manifestaciones patológicas de diversas enfermedades. Identificar moléculas que toman parte en la actividad de señalización de estos receptores, y encontrar modos de modular la función de estas moléculas, constituye una indicación potencial para nuevas aproximaciones terapéuticas a estas enfermedades. En vista del papel central que se supone a MACH a1 en la toxicidad de FAS-R y TNF, parece particularmente importante diseñar fármacos que puedan bloquear la función proteolítica de esta molécula, como se ha hecho para algunos otros miembros de la familia CED3/ICE. Las características de secuencia únicas de estos homólogos CED3/ICE que comprenden las moléculas MACHa1 puede permitir diseñar fármacos que pueden afectar su protección frente a una citotoxicidad excesiva mediada por el sistema inmune sin interferir con los procesos de muerte celular fisiológica, en el que otros miembros de la familia CED3/ICE están implicados.

Así, la presente descripción también tiene que ver con la secuencia de ADN que codifica para una proteína de unión MORT-1 y las proteínas de unión MORT-1 codificadas por las secuencias de ADN.

Por otro lado, la presente descripción tiene que ver además con las secuencias de ADN que codifican los análogos biológicamente activos, fragmentos y derivados de la proteína de unión MORT-1, y los análogos, fragmentos y derivados codificados por los mismo. La preparación de tales análogos, fragmentos y derivados es mediante un procedimiento estándar (véase por ejemplo, Sambrook y otros, 1989) en el que las secuencias de ADN que codifican la proteína de unión MORT-1, uno o más codones pueden ser delecionados, añadidos o sustituidos por otra, para dar análogos que tiene al menos un cambio en un residuo de aminoácidos con respecto a la proteína nativa.

Un polipéptido o proteína que “corresponde sustancialmente” a la proteína de unión a MORT-1 incluye no sólo la proteína de unión a MORT-1 sino también polipéptidos o proteínas que son análogos a la unión a MORT-1.

Análogos que corresponden sustancialmente a la proteína de unión a MORT-1 son los polipéptidos en los que uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a MORT-1 han sido remplazados por otros aminoácidos, delecionado y/o insertado, siempre que las proteína resultante exhiba sustancialmente la misma o mayor actividad biológica que la proteína de unión a MORT-1 a la cual corresponde.

A modo de corresponder sustancialmente a la proteína de unión a MORT-1, los cambios en la secuencia de las proteínas de unión a MORT-1, tal como las isoformas MACH son generalmente relativamente menores. Aunque el número de cambios puede ser más de diez, preferiblemente no hay más de diez cambios, más preferiblemente no más de cinco, y más preferiblemente no más de tres cambios como tal. Mientras que cualquier técnica puede ser usada para encontrar potenciales proteínas biológicamente activas que corresponden sustancialmente a las proteínas de unión a MORT-1, una técnica tal es el uso de técnicas de mutagénesis convencional en el ADN que codifica la proteína, dando como resultado unas pocas modificaciones. Las proteínas expresadas por tales clones pueden ser entonces cribadas para la unión a MORT-1 y/o para la actividad mediada por FAS-R y p55-R.

Cambios “conservativos” son aquellos cambios que no serían esperados que cambien la actividad de la proteína y son normalmente los primeros en ser cribado ya que estos no se espera que cambien sustancialmente el tamaño, carga o configuración de la proteína y así no se esperaría que cambie las propiedades biológicas de las mismas.

Las sustituciones conservativas de las proteínas de unión a MORT-1 incluyen un análogo en el que al menos un residuo aminoácido en el polipéptido ha sido remplazado de modo conservador por un aminoácido diferente.

Tales sustituciones son preferiblemente hechas según la siguiente lista como se presente en la Tabla IA, sustituciones que pueden ser determinadas mediante la experimentación de rutina para proporcionar propiedades estructurales y funcionales modificadas de una molécula polipeptídica sintetizada al tiempo que se mantiene la actividad biológica característica de la proteína de unión a MORT-1.

TABLA IA

Residuo original	Sustituciones ejemplo
------------------	-----------------------

Ala	Gly;Ser
Arg	Lys
Asn	Gln;His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala;Pro
His	Asn;Gln
Ile	Leu;Val
Leu	Ile;Val
Lys	Arg;Gln;Glu
Met	Leu;Tyr;Ile
Phe	Met;Leu;Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp;Phe
Val	Ile;Leu

Alternativamente, otro grupo de sustituciones de la proteína de unión a MORT-1 son aquellas en las que al menos un residuo aminoacídico en el polipéptido ha sido eliminado y un residuo diferente insertado en su sitio según la Tabla IB siguiente. Los tipos de sustituciones que pueden ser hechas en el polipéptido pueden ser basados en análisis de las frecuencias de cambios de aminoácidos entre una proteína homóloga de diferente especie, tal como los presentados en la Tabla 1-2 de Schulz y otros, G.E., Principles of Protein Structure Springer-Verlag, Nueva York, NY, 1798, y las Figs 3-9 de Creighton, T.E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman y Co., San Francisco, CA 1983. Basado en tal análisis, las sustituciones conservativas alternativas son definidas aquí como intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

TABLA IB

- Residuos pequeños alifáticos, apolares o ligeramente polares:
Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
- Residuos polares negativamente cargados y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln;
- Residuos polares, positivamente cargados: His, Arg, Lys;
- Residuos largos alifáticos apolares: Met, Leu, Ile, Val (Cys); y
- Residuos largos aromáticos: Phe, Tyr, Trp.

Los tres residuos aminoacídicos en paréntesis arriba tiene funciones especiales en la arquitectura de las proteínas: Gly es el único residuo que carece de una cadena lateral y así imparte flexibilidad a la cadena. Esto tiende sin embargo,

a promover la formación de estructura secundaria distinta de la α -hélice. Pero, debido a su geometría inusual, restringe mucho la cadena y generalmente tiende a promover estructuras de tipo giro beta, aunque en algunos casos la Cys puede ser capaz de participar en la formación de puentes disulfuro que es importante en el plegamiento de la proteína. Obsérvese que Schulz y otros, *supra*, unirán los Grupos 1 y 2 anteriores. Obsérvese también que la Tyr, debido a su potencial de enlaces de hidrógeno, tiene un parentesco significativo con Ser, y Thr, etc.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos según el presente invento, por ejemplo, como se presenta anteriormente, son conocidos en la técnica y se esperaría que mantuviera las propiedades biológicas y estructurales del polipéptido tras una sustitución aminoacídica. La mayoría de las delecciones y sustituciones según el presente invento son aquellas que no producen cambios radicales en las características de la proteína o molécula polipeptídica. "Características" se define en una manera no inclusiva para definir cambios tanto en la estructura secundaria, por ejemplo, α -hélice o β -lámina, así como cambios en la actividad biológica, por ejemplo, la unión de MORT-1 o mediación del ligando de FAS-R o el efecto del TNF en las células.

Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden ser usadas para obtener análogos de proteínas de unión a MORT-1 para su uso en el presente invento incluyen cualquiera de las etapas de los métodos conocidos, tales como los presentados en la patente norteamericana RE 33.653, 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, a Mark y otros; 5.116.943 a Koths y otros 4.965.195 a Namen y otros; 4.879.111 a Chong y otros, y 5.017.691 a Lee y otros; y proteínas sustituidas por lisina presentadas en la patente norteamericana N°. 4.904,584 (Shaw y otros).

Aparte de las sustituciones conservativas tratadas anteriormente que no cambiarían significativamente la actividad de la proteína de unión a MORT-1, sustituciones bien conservativas o bien menos conservativas y cambios más aleatorios, que llevan a un aumento en la actividad biológica de los análogos de las proteínas de unión a MORT-1, se pretende que estén dentro del alcance de la descripción.

Cuando se ha de confirmar el efecto exacto de la sustitución o delección, una persona con experiencia en la técnica apreciará en el efecto de la(s) sustitución(es), delección(es), etc., será evaluado mediante la unión de rutina y los ensayos de muerte celular. El cribado que usa tal ensayo estándar no implica una experimentación excesiva.

Análogos aceptables son aquellos que conservan al menos la capacidad de unión a MORT-1, y de ese modo, como se observa anteriormente mediar la actividad (por ejemplo, mediante la actividad proteasa de al menos algunas de las isoformas MACH) de FAS-R y p55-R. De tal modo, se pueden producir análogos que tienen el así llamado efecto dominante negativo, a saber, un análogo que carece bien de la unión a MORT-1, o en una señalización subsiguiente o actividad proteasa que sigue a dicha unión. Tales análogos pueden ser usados, por ejemplo, para inhibir el efecto del ligando de FAS compitiendo con las proteínas de unión a MORT-1 naturales. Por ejemplo, parece probable que las isoformas MACH, MACHa2 y MACHa3 sean análogos "naturales" que sirven para inhibir la actividad MACHa compitiendo con la unión de las isoformas MACH (proteasa) activa a MORT-1 que parece ser esencial en la activación de estas isoformas MACH. Una vez que las isoformas MACH no pueden unirse a MORT-1, las rutas de señalización intracelular mediada por FAS-R y p55-R serán de ese modo también inhibidas. De igual modo, análogos así llamados dominante positivos pueden ser producidos que servirían para potencial el efecto del ligando FAS o de TNF. Estas tendrían las mismas o mejores propiedades de unión a MORT-1 y la misma o mejores propiedades de señalización de las proteínas de unión a MORT-1.

A nivel genético, estos análogos son preparados generalmente mediante mutagénesis dirigida de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína de unión a MORT-1, produciendo de ese modo un ADN que codifica el análogo, y a partir de ahí sintetizar el ADN y expresar el polipéptido en cultivo de células recombinantes. Los análogos exhiben típicamente la misma o aumentada actividad biológica cualitativa como la proteína presente de manera natural, Ausubel y otros, *current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publications y Wiley-Interscience, Nueva York, NY, 1987-1995; Sambrook y otros *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

La preparación de una proteína de unión a MORT-1 según se adjunta, o una secuencia nucleotídica alternativa que codifica el mismo polipéptido pero que difiere de la secuencia natural debido a los cambios permite mediante la degeneración conocida del código genético, puede ser lograda mediante mutagénesis específica de sitio del ADN que codifica un análogo preparado anteriormente o una versión nativa de una proteína de unión a MORT-1. La mutagénesis dirigida permite la producción de análogos a través del uso de secuencias oligonucleotídicas específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia cebadora del tamaño suficiente y complejidad de secuencia para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de delección que está siendo atravesada. Típicamente, un cebador de alrededor de 20 a 25 nucleótidos en longitud es preferida, con alrededor de 5 a 10 nucleótidos complementarios en cada lado de la secuencia que está siendo alterada. En general, la técnica de mutagénesis dirigida es bien conocida en la técnica, como se ejemplifica por las publicaciones tales como Adelman y otros, *DNA* 2:183 (1983).

Como se apreciará, la técnica de mutagénesis dirigida emplea típicamente un vector fago que, existe bien como hebra única o bien como doble hebra. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida incluye vectores tales como el fago M13, por ejemplo, como se describe por Messing y otros, *Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA*. Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981).

Estos fagos están fácilmente disponibles de modo comercial y su uso es generalmente bien conocido por aquellos con experiencia en la técnica. Alternativamente, los vectores plasmídicos que contienen un origen de replicación de fago de hebra única (Veira y otros, *Meth, Enzymol.* 153:3, 1987) pueden ser empleados para obtener ADN de hebra única.

En general, la mutagénesis dirigida según se adjunta es lograda obteniendo primero un vector de hebra única que incluye en su secuencia una secuencia de ADN que codifica el polipéptido relevante. Un cebador oligonucleotídico que lleva la secuencia mutada deseada es preparado sintéticamente mediante el ADN automatizado/síntesis de oligonucleótidos. Este cebador es entonces hibridado con el vector que contiene la secuencia proteica de hebra única, y sujeto a enzimas de polimerización de ADN tales como el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli*, para completar la síntesis de la hebra que lleva la mutación. Así, una secuencia mutada y la segunda hebra lleva la mutaciones deseadas. El vector heterodúplex es entonces usado para transformar las células apropiadas, tales como las células JM101 de *E. coli*, y los clones son seleccionados para incluir vectores recombinantes que llevan el reordenamiento de la secuencia mutada.

Después que tal clon es seleccionado, la proteína de unión a MORT-1 puede ser religada y colocada en un vector apropiado, generalmente un vector de transferencia o de expresión del tipo que puede ser empleado para la transfección de un hospedante apropiado.

Por consiguiente, el gen o ácido nucleico que codifica la proteína de unión a MORT-1 puede también ser detectado, obtenido y/o modificado, *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*, mediante el uso de técnicas de amplificación del ADN o ARN conocidas, tales como PCR y síntesis de oligonucleótidos químicos. PCR permite la amplificación (aumento en número) de secuencias de ADN específicas mediante reacciones de ADN polimerasas repetidas. Esta reacción puede ser usada como un remplazo del clonaje; todo lo que se requiere es un conocimiento de la secuencia de ácidos nucleicos. Para llevar a cabo una PCR, los cebadores son diseñados a modo de que sean complementarios a las secuencias de interés. Los cebadores son entonces generados mediante síntesis automatizada de ADN. Debido a que los cebadores pueden ser hibridados con cualquier parte del gen, se pueden crear las condiciones de tal modo que los desemparejamientos (mismatch) en el emparejamiento de base complementaria pueda ser tolerado. La amplificación de estas regiones de desemparejamientos puede llevar a la síntesis de un producto mutado que resulta en la generación de un péptido con nuevas propiedades (es decir, la mutagénesis dirigida). véase también, por ejemplo, Ausubel, *supra* Ch.16. También mediante el acoplamiento de la síntesis de ADN complementario (cADN), usando la transcriptasa inversa, con PCR, ARN puede ser usado como el material de partida para la síntesis del dominio extracelular de un receptor de prolactina sin clonar.

Además, los cebadores de PCR pueden ser diseñados para incorporar nuevos sitios de restricción u otras características tales como los codones de terminación en los extremos del segmento génico a ser amplificado. Esta colocación de los sitios de restricción en los extremos 5' y 3' de la secuencia génica amplificada permite a los segmentos génicos codificar la proteína de unión a MORT-1 o un fragmento de la misma a ser diseñado a la medida para la ligación de otras secuencias y/o sitios de clonaje en vectores.

PCR y otros métodos de amplificación de ARN y/o ADN son bien conocidos en la técnica y pueden ser usados según el presente invento sin una experimentación excesiva, basado en la enseñanza y guía presentada aquí. Métodos conocidos de amplificación de ADN o ARN incluyen, pero no se limitan a reacción polimerasa en cadena (PCR) y procesos de amplificación relacionados (véanse por ejemplo, las patentes norteamericanas N°s 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159, 4.965.188, a Mullis y otros; 4.795.699 y 4.921.794, a Tabor y otros; 5.142.033 a Innis; 5.122.464 a Wilson y otros; 5.091.310 a Innis; 5.066.584 a Gyllesten y otros; 4.689.818 a Gelfand y otros. 4.994.370 a Silver y otros; 4.766.067 a Biswas; 4.656.134 a Ringold; e Inns y otros, eds., PCR Protocols: A Guide to Method and Applications) y amplificación mediada por ARN que usa ARN antisentido para la secuencia diana como molde para la síntesis de ADN de doble hebra (el documento de patente norteamericana N°: 5.130.238 a Malek y otros, con la marca registrada NASBA); y la inmuno PCR que combina el uso de la amplificación de ADN con marcaje de anticuerpos (Ruzicka y otros, *Science* 260:487 (1993); Sano y otros, *Science* 258:120 (1992); Sano y otros *Biotechniques* 9: 1378 (1991)).

De manera análoga, los fragmentos biológicamente activos de las proteínas de unión a MORT-1 (por ejemplo, aquellas de cualquiera de las isoformas MACH) pueden ser preparadas como se observa anteriormente con respecto a los análogos de las proteínas de unión a MORT-1. Fragmentos adecuados de las proteínas de unión a MORT-1 son aquellas que conservan la capacidad de unión a MORT-1 y que pueden mediar la actividad biológica de FAS-R y p55-R como se indica anteriormente. Por consiguiente, se pueden preparar fragmentos de la proteína de unión a MORT-1 que tengan un efecto dominante negativo o dominante positivo como se observa a continuación con respecto a los análogos. Debería observarse que estos fragmentos representan una clase especial de los análogos del invento, a saber, son porciones definidas de las proteínas de unión a MORT-1 derivados de la secuencia completa de la proteína de unión a MORT-1 (por ejemplo, la de una cualquiera de las isoformas MACH), teniendo cada una de tales porciones o fragmentos alguna de las actividades deseadas anteriormente observadas. Tales fragmentos pueden ser por ejemplo, un péptido.

De igual modo, los derivados pueden ser preparados mediante modificaciones estándar de los grupos laterales de uno o más residuos aminoácidos de la proteína de unión a MORT-1, su análogo o fragmento, o en conjugación de la preteína de unión a MORT-1, sus análogos o fragmentos, a otras moléculas, por ejemplo, un anticuerpo, enzima, receptor, etc., como son bien conocidas en la técnica. Consecuentemente, el término "derivados" como se usan aquí

cubre derivados que pueden ser preparados a partir de los grupos funcionales que tienen lugar en las cadenas laterales en los residuos o los grupos N- o C- terminales, por medios conocidos en la técnica, y están incluidos en el invento. Los derivados pueden tener restos químicos tales como residuos carbohidrato o fosfato, siempre que tal fracción tenga la misma o mayor actividad biológica que las proteínas de unión a MORT-1.

Por ejemplo, los derivados pueden incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante la reacción con amonio o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acilo o grupos amino libre de los residuos aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanilo o carbocíclico aroilo) o derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo el de los residuos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

El término “derivado” se pretende que incluya sólo los derivados que no cambian un aminoácido a otro de los veinte aminoácidos normalmente presentes de manera natural.

Aunque la proteína de unión a MORT-1 es una proteína o polipéptido, es una secuencia de residuos de aminoácidos. Un polipéptido que consiste en una secuencia más larga que incluye la secuencia entera de una proteína de unión a MORT-1, según las definiciones aquí, se pretende que incluya en el alcance de tal polipéptido siempre que las adiciones no afecten a las características básicas y nuevas del invento, es decir, si ellas o bien conservan o bien aumentan la actividad biológica de la proteína de unión a MORT-1 o pueden ser cortadas para dejar una proteína o polipéptido que tiene la actividad biológica de la proteína de unión a MORT-1. Así, por ejemplo, la presente descripción se pretende que incluya las proteínas de fusión de la proteína de unión a MORT-1 con otros aminoácidos o péptidos.

También aquí descrito está el aspecto de que la nueva proteína de unión a MORT-1, sus análogos, fragmentos y derivados de los mismos, pueden tener un número de usos, por ejemplo:

(i) Proteína de unión a MORT-1, sus análogos, fragmentos y derivados de los mismos, pueden ser usadas para imitar o potencia la función de MORT-1 y por tanto del ligando de FAS-R o TNF, en situaciones en las que un efecto potenciado de FAS-R o TNF es deseado, tal como una aplicación antitumoral, antiinflamatoria, anti VIH, etc., en el que la citotoxicidad inducida por ligando de FAS-R o TNF es deseada. En este caso, la proteína de unión a MORT-1, su análogo, fragmentos o derivados de las mismas, que potencian el efecto del ligando de FAS-R o TNF, es decir, el efecto citotóxico, puede ser introducido en las células mediante procedimientos estándar conocidos *per se*. Por ejemplo, como la proteína de unión a MORT-1 son intracelulares y deberían ser introducidas sólo en las células en las que el efecto del ligando de FAS-R o TNF es deseado, un sistema para la introducción específica de estas proteínas en las células es necesario. Un modo de hacer esto es creando un virus animal recombinante, por ejemplo, uno derivado de Vaccinia, al ADN al que los siguientes dos genes serían introducidos: el gen que codifica un ligando que se une a las proteínas de superficie celular específicamente expresadas por las células, por ejemplo, tales como la proteína gp120 del virus del SIDA (VIH) que se une específicamente a algunas células (linfocitos CD4 y leucemias relacionadas), o cualquier otro ligando que se une específicamente a las células que llevan un FAS-R o p55-R, de tal modo que el vector del virus recombinante sería capaz de unirse a talas células que llevan FAS-R o p55-R; y el gen que codifica la proteína de unión a MORT-1. Así, la expresión de la proteína de unión a la superficie celular en la superficie del virus dirigirá el virus específicamente a la célula tumoral u otras células que lleven FAS-R o p55-R, tras lo cual la secuencia que codifica la proteína de unión a MORT-1 será introducida en las células vía el virus, y una vez expresada en las células, tendrá como resultado el potenciamiento del efecto del ligando de FAS-R o TNF que lleva a la muerte celular de las células tumorales u otras células que llevan FAS-R o p55-R que se deseen matar. La construcción de tal virus animal recombinante es mediante procedimientos estándar (véase por ejemplo, Sambrook y otros, 1989). Otra posibilidad es introducir las secuencias de la proteína de unión a MORT-1 (por ejemplo, una cualquiera de las isoformas MACH) en forma de los oligonucleótidos que pueden ser absorbidos por las células y expresados ahí.

(ii) En una realización de la presente descripción pueden ser usados para inhibir el efecto del ligando de FAS-R o TNF, por ejemplo, en casos tales como daño tisular en shock séptico, rechazo injerto frente a paciente, o hepatitis aguda, en el que se desea bloquear la señalización intracelular de FAS-R o p55-R inducida por el ligando de FAS-R o TNF. En esta situación, es posible, por ejemplo, introducir en las células, mediante procedimiento estándar, los oligonucleótidos que tiene la secuencia antisentido codificante para la proteína de unión a MORT-1, que bloquearía eficazmente la traducción de los mRNA que codifican bien la proteína MORT-1 o la proteína de unión a MORT-1 y de ese modo bloquean su expresión y llevan a la inhibición del efecto del ligando de FAS-R o TNF. Tales oligonucleótidos pueden ser introducidos en las células usando la aproximación del virus recombinante anterior, la segunda secuencia llevada por el virus son las secuencias oligonucleotídicas.

Otra posibilidad es usar anticuerpos específicos para la proteína de unión a MORT-1 para inhibir su actividad de señalización intracelular.

Otra manera más de inhibir el efecto del ligando de FAS-R o del TNF es mediante la aproximación de ribozimas recientemente desarrollada. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas que cortan específicamente los ARN. Las ribozimas pueden ser manipuladas mediante ingeniería a modo de cortar los ARN dianas de elección, por ejemplo, la proteína de unión a MORT-1 que codifican los mARNs del invento. Tales ribozimas tendrían una secuencia específica para el mRNA de la proteína de unión a MORT-1 y serían capaces de interaccionar con estas (unión complementarias) seguido del corte del mRNA, dando como resultado una disminución (o pérdida completa) en la expresión de la proteína de unión a MORT-1, siendo el nivel de la expresión disminuida dependiente del nivel de la expresión de ribozimas en la célula diana. Para introducir ribozimas en las células de elección (por ejemplo, las que llevan FAS-R o

p55-R), cualquier vector adecuado puede ser usado, por ejemplo, plásmido, vectores de virus animales (retrovirus), que son normalmente usados para este propósito (véase también (i) anteriormente, en el que el virus tiene, una segunda secuencia, un cADN que codifica la secuencia de ribozima de elección). (Para revisiones, métodos etc. que tienen que ver con ribozimas véase Chen y otros, 1992; Zhao y Pick, 1993; Shore y otros, 1993; Joseph y Burke, 1993; Shimayama y otros, 1993; Cantor y otros, 1993; Barinaga, 1993; Crisell y otros, 1993 y Koizumi y otros, 1993).

(iii) La proteína de unión a MORT-1, sus análogos, fragmentos o derivados pueden también ser usados para aislar, identificar y clonar otras proteínas de la misma clase, es decir, aquellas que se unen al dominio intracelular de FAS-R o a receptores funcionalmente relacionados, o aquellos que se unen a MORT-1 y de ese modo a receptores funcionalmente relacionados tales como FAS-R y p55-R, e implicados en el proceso de señalización intracelular. En esta solicitud el sistema de doble híbrido de levadura anteriormente mencionado puede ser usado, o puede usarse un sistema recientemente desarrollado que emplea una hibridación Southern no rigurosa tras el clonaje de PCR (Wilks y otros, 1989). En la publicación de Wilks y otros, se describe la identificación y clonaje de dos proteínas tirosina quinasas putativas mediante la aplicación de hibridación Southern no rigurosa seguida por el clonaje por PCR basado en la secuencia conocida del motivo quinasa, una secuencia quinasa concebida. Esta aproximación puede ser usada, según el presente invento usando la secuencia de la proteína de unión a MORT-1 (por ejemplo, cualquiera de las isoformas MACH) para identificar y clonar las de las relacionadas a las proteínas de unión a MORT-1.

(iv) Otra aproximación más para utilizar la proteína de unión a MORT-1, o sus análogos, fragmentos o derivados de los mismos, del invento es usarlas en métodos de cromatografía de afinidad para aislar e identificar otras proteínas o factores a lo que son capaces de unirse, por ejemplo, MORT-1, u otras proteínas o factores implicados en el proceso de señalización intracelular. En esta solicitud, la proteína de unión a MORT-1, su análogo, fragmentos o derivados de los mismos, del presente invento, puede ser unidos individualmente a las matrices de cromatografía de afinidad y después puestas en contacto con los extractos celulares o proteínas aisladas o factores que se sospecha que están implicados en el proceso de señalización intracelular. Tras el procedimiento de cromatografía de afinidad, las otras proteínas o factores que se unen a la proteína de unión a MORT-1, o sus análogos, fragmentos o derivados de las mismas del invento, pueden ser eluidas, aisladas y caracterizadas.

(v) Como se observa anteriormente, la proteína de unión a MORT-1, o sus análogos, fragmentos o derivados de los mismos, de la descripción pueden ser usados para los propósitos de purificación de la proteína de unión a MORT-1 (por ejemplo isoformas MACH) bien a partir de extractos celulares o bien a partir de líneas celulares transformadas produciendo proteínas de unión a MORT-1, o sus análogos o fragmentos. Además, estos anticuerpos pueden ser usados para propósitos de diagnóstico para identificar trastornos relacionados con el funcionamiento anormal del sistema de ligando de FAS-R o TNF, por ejemplo, efectores celulares inducidos por ligando de FAS-R o TNF hiperreactivos o hiporeactivos. Así, si tales trastornos estuvieran relacionados con un malfuncionamiento del sistema de señalización intra-celular que implican la proteína MORT-1, o la proteína de unión a MORT-1, tales anti-cuerpos servirían como una importante herramienta de diagnóstico.

Debería también mencionarse que el aislamiento, identificación y caracterización de la proteína de unión a MORT-1 (por ejemplo, las isoformas MACH) del invento pueden ser realizadas usando cualquiera de los procedimientos de cribado estándar bien conocidos. Por ejemplo, uno de estos procedimientos de cribado, el procedimiento de levadura de doble híbrido como está expuesto aquí (Ejemplo 1), fue usado para identificar la proteína MORT-1 y subsiguientemente las proteínas de unión a MORT-1 (Ejemplo 2-3) del invento. Similarmente como se observa anteriormente y a continuación, otros procedimientos pueden ser empleados tales como cromatografía de afinidad, los procedimientos de hibridación de ADN, etc. como se conocen bien en la técnica, para aislar, identificar y caracterizar la proteína de unión a MORT-1 del invento o para aislar, identificar y caracterizar proteínas, factores, receptores, etc. adicionales que son capaces de unirse a la proteína MORT-1 o a las proteínas de unión a MORT-1 del invento.

Como se expone aquí anteriormente, la proteína de unión a MORT-1 puede ser usada para generar anticuerpos específicos frente a las proteínas de unión a MORT-1, por ejemplo, isoformas MACH. Estos anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden ser usados como se exponen aquí a continuación en detalle, comprendiéndose que en estas aplicaciones los anticuerpos o fragmentos de los mismos son aquellos específicos para las proteínas de unión a MORT-1.

Basados en los hallazgos de los presentes inventores que al menos algunas de las isoformas MACH (véase anteriormente y en el Ejemplo 3 a continuación) son proteasas relacionadas con las proteasas de la familia de proteasas CED3/ICE, las siguientes aplicaciones médicas específicas son previstas para estas isoformas MACH; se ha encontrado que los inhibidores específicos de otras proteasas CED3/ICE, algunas de las cuales son permeables a las células, ya existen, que pueden bloquear eficazmente los procesos de muerte celular programada. Por lo tanto, es posible según el presente invento diseñar inhibidores que pueden impedir la muerte celular inducida por el ligando de FAS-R o TNF, rutas en las que las isoformas de las proteasas MACH están implicadas. Además, en vista de las características de secuencia únicas de estas nuevas proteasas MACH, parece posible diseñar inhibidores que serán altamente específicos para los efectos inducidos por TNF y el ligando de FAS-R. Estos hallazgos de los presentes inventores también proporcionan un modo de estudiar mecanismos en los que la "proteasa asesina" es activada en respuesta al ligando de FAS-R y TNF, permitiendo esto el desarrollo subsiguiente de fármacos que pueden controlar la extensión de esta activación. Hay muchas enfermedades en las que tales fármacos pueden ser de gran ayuda. Entre otras, hepatitis aguda en la que el daño agudo al hígado parece reflejar la muerte de las células hepáticas mediada por el ligando de FAS-R; la muerte celular inducida por autoinmunidad tal como la muerte de las células b-de Langerhans del páncreas, que

resultan en diabetes; la muerte de células en el rechazo del injerto (por ejemplo, riñón, corazón e hígado); la muerte de los oligodendrocitos en el cerebro en esclerosis múltiple, y el suicidio de las células T inhibido por el SIDA que causa la proliferación del virus del SIDA y por tanto la enfermedad del SIDA.

Como se menciona aquí anteriormente y a continuación, parece que dos de las isoformas MACH, MACHa2 y MACHa3 pueden servir como inhibidores "naturales" de las isoformas de la proteasa MACH, y éstas pueden así ser empleadas como los inhibidores específicos anteriormente mencionados de estas proteasas MACH. De igual modo, otras sustancias tales como los péptidos, compuestos orgánicos, anticuerpos, etc. pueden también ser cribados para obtener fármacos específicos que son capaces de inhibir las proteasas MACH.

Un ejemplo no limitante de cómo los inhibidores peptídicos de las proteasas MACH serían diseñadas y cribadas está basado en estudios previos de inhibidores peptídicos de proteasas ICE o tipo ICE, la especificidad de sustrato de ICE y estrategias para el análisis de epítomos usando la síntesis peptídica. El requerimiento mínimo para el corte eficaz del péptido por ICE se encontró que implica cuatro aminoácidos en el extremo izquierdo del sitio de corte con una preferencia fuerte por el ácido aspártico en la posición P1 y siendo la metilamina suficiente en la derecha de la posición P1 (Sleath y otros, 1990; Howard y otros, 1991; Thornberry y otros, 1992). Además, el péptido sustrato fluorogénico (un tetrapéptido), acetil-Asp-Glu-Val-Asp-a-(4-metil-cumaril-7-amida) abreviado Ac-DEVD-AMC, corresponde con una secuencia en la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) que se encontró que se corta en las células poco después de la estimulación con FAS-R, así como otros procesos apoptóticos (Kaufmann, 1989; Kaufmann y otros, 1993; Lazebnik y otros, 1994), y se corta de modo eficaz mediante CPP32 (un miembro de la familia de proteasas CED3/ICE) y proteasas MACH.

Como el Asp en la posición P, la posición del sustrato parece ser importante, teniendo los tetrapéptidos Asp como el cuarto residuo aminoácido y diversas combinaciones de aminoácidos en las tres primeras posiciones de los residuos pueden ser rápidamente cribados para la unión al sitio activo de las proteasas MACH usando, por ejemplo, el método desarrollado por Geysen (Geysen, 1985; Geysen y otros, 1987) en el que un gran número de péptidos en soportes sólidos fueron cribados para las interacciones específicas con anticuerpos. La unión de las proteasas MACH a péptidos específicos pueden ser detectados mediante una variedad de métodos de detección bien conocidos para aquellos con experiencia en la técnica, tal como radiomarcaje de la proteasa MACH, etc. Este método de Geysen demostró ser capaz de ensayar al menos 4000 péptido cada día laboral.

Puesto que puede ser ventajoso diseñar inhibidores peptídicos que inhiben selectivamente las proteasas MACH sin interferir con los procesos de muerte celular fisiológicos en los que otros miembros de la familia de proteasas CED3/ICE están implicados, el grupo de péptidos que se unen a las proteasas MACH en un ensayo tal como el descrito anteriormente puede ser sintetizados como un péptido sustrato fluorogénico para ensayar en lo que se refiere a corte selectivo de las proteasas MACH sin ser cortadas por otras proteasas CED3/ICE. Los péptidos que se determina que son selectivamente cortado por las proteasas MACH, pueden entonces ser modificados para potenciar la permeabilidad celular e inhibir la actividad por muerte celular de MACH bien de modo reversible o irreversible. Thornberry y otros (1994) documentaron que un tetrapéptido (aciloxi)metil cetona Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CH₂OC(O)-[2,6 (CF₃)₂]Ph fue un potente inactivador de ICE. De igual modo, Milligan y otros (1995) documentaron que los inhibidores tetrapeptídicos que tienen un grupo clorometilcetona (irreversiblemente) o aldehído (reversiblemente) inhibieron ICE. Además, un grupo benciloxycarboxil-Asp-CD₂OC(O)-2,6-diclorobenceno (DCB) se demostró que inhibe ICE (Máxima y otros, 1995). Por consiguiente, los tetrapéptidos que se unen selectivamente a las proteasas MACH pueden ser modificados con, por ejemplo, un grupo aldehído, clorometilcetona, (aciloxi) metil cetona o un grupo CH₂OC(O)-DCB para crear un inhibidor peptídico de la actividad proteasas MACH.

Mientras que algunos inhibidores específicos de otras proteasas CED3/ICE son permeables a las células, la permeabilidad celular de los inhibidores peptídicos puede necesitar ser potenciada. Por ejemplo, péptidos pueden ser modificados químicamente o derivados para potenciar su permeabilidad a través de la membrana celular y facilitar el transporte de tales péptidos a través de la membrana y en el citoplasma. Muranishi y otros (1991) documentaron derivar hormona liberadora de tirotropina con ácido láurico para formar un derivado lauroilo lipofílico con buenas características de penetración a través de las membranas celulares. Zacharia y otros (1991) también documentaron la oxidación de la metionina a sulfóxido y el remplazamiento del enlace peptídico con su isoéster cetometileno (COCH₂) para facilitar el transporte de péptidos a través de las membranas celulares. Estas son sólo algunas de las modificaciones conocidas y derivadas que son bien conocidas por aquellos profesionales con experiencia en la técnica.

Además, fármacos o inhibidores peptídicos, que son capaces de inhibir la actividad de muerte celular de MACHa1 y MACHa2, pueden ser conjugados o acomplexados con moléculas que facilitan la entrada en la célula.

El documento de patente norteamericana 5.149.782 describe la conjugación de una molécula que ha de ser transportada a través de la membrana celular con un agente de unión de membranas tales como polipéptidos fusogénicos, polipéptidos formadores de canales iónicos, otros polipéptidos de membrana, y ácidos grasos de cadena larga, por ejemplo, ácido mirístico, ácido palmítico. Estos agentes de unión de membranas insertan los conjugados moleculares en la bicapa lipídica de las membranas celulares y facilitan su entrada en el citoplasma.

Low y otros, documento de patente norteamericana 5.108.921, revisa métodos disponibles para el suministro transmembrana de moléculas tales como, pero no limitadas a, proteínas y ácidos nucleicos mediante el mecanismo de actividad endocítica mediada por receptor. Estos sistemas de receptores incluyen aquellos que reconocen galactosa,

manosa, manosa-6-fosfato, transferrina, asialoglicoproteína, transcobalamina (vitamina B₁₂), a-2 macroglobulinas, insulina y otros factores de crecimiento peptídico tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF). Low y otros, enseñan que los receptores de nutrientes, tales como receptores para biotina y folato, pueden ser usados ventajosamente para potenciar el transporte a través de la membrana celular debido a la localización y multiplicidad de la biotina y los receptores folato de las superficies de membrana de la mayoría de las células y los procesos de transporte transmembrana mediados por el receptor asociados. Así, un complejo formado entre un compuesto a ser introducido en el citoplasma y un ligando, tal como una biotina o folato, es puesto en contacto con una membrana celular que lleva biotina o receptores folato para iniciar el mecanismo de transporte transmembrana mediado por el receptor y permitir de ese modo la entrada del compuesto deseado en la célula.

ICE es conocido como que tiene la capacidad para tolerar las sustituciones liberales en la posición P₂ y esta tolerancia a las sustituciones liberales fue explotada para desarrollar un marcaje de afinidad potente y altamente selectivo que contiene un marcaje de biotina (Thornberry y otros, 1994). Por consiguiente, la posición P₂ así como posiblemente el extremo N-terminal del inhibidor tetrapeptídico puede ser modificado o derivado, tal como con la adición de una molécula de biotina, para potenciar la permeabilidad de estos inhibidores peptídicos a través de la membrana celular.

Además, se conoce en la técnica que fusionar una secuencia peptídica deseada con una secuencia de péptido líder/señal para crear "péptidos quimera" permitirá a tal péptido quimera ser transportado a través de la membrana celular en el citoplasma.

Como se apreciará por aquellos profesionales con experiencia en la técnica de péptidos, los inhibidores peptídicos de la actividad proteolítica de MACH, pretenden incluir fármacos o inhibidores peptidomiméticos, que pueden también ser rápidamente cribados para la unión a la proteasa MACH para diseñar tal vez inhibidores más estables.

También se apreciará que los medios para facilitar o potenciar el transporte de los inhibidores peptídicos a través de la membrana celular como se discute anteriormente son también aplicables a las isoformas MACH mismas así como a otros péptidos y proteínas que ejercen sus efectos intracelularmente.

Con respecto a los anticuerpo mencionados aquí a través de la solicitud, el término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos quimeras, anticuerpo anti-idiotipo (anti-Id) a anticuerpos que pueden ser marcados en forma soluble o unida, así como fragmentos de los mismos proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como, pero no limitado a corte enzimático, síntesis peptídica o técnicas recombinantes.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas a partir del suero de animales inmunizados con un antígeno. Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para antígenos, población que contiene sustancialmente sitios de unión de epitopos similares. Los mAbs pueden ser obtenidos mediante métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Véase por ejemplo Oler y Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975); documento de patente norteamericana N° 4.376.110; Ausubel y otros, eds., Harlow y Lane *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan y otros, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Intersciences N.Y., (1992-1996), el contenido de cuyas referencias está completamente incorporado aquí mediante referencia. Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de la misma. Un hibridoma que produce un mAb del presente invento puede ser cultivado *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. La producción de concentraciones elevadas de mAbs *in vivo* o *in situ* hace que éste sea el método actual de producción preferido.

Los anticuerpos quimera son moléculas de las cuales las diferentes porciones son derivadas a partir de diferentes especies animales, tales como las que tienen la región variable derivada de un mAb murino y una región constante de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quimera son principalmente usados para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y el aumento de rendimiento en la producción, por ejemplo en el que los mAbs murinos tiene rendimientos elevados a partir de hibridomas pero una mayor inmunogenicidad en humanos, tal que mAbs quimeras humanos/murinos son usados. Los anticuerpos quimeras y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Cabilly y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3273-3277 (1984); Morrison y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984); Boulianne y otros, *Nature* 312:643-646 (1984); Cabilly y otros, solicitud de patente europea 125023 (publicada el 14 de Noviembre de 1984); Neuberger y otros, *Nature* 314: 268-270 (1985); Taniguchi y otros, solicitud de patente europea 171496 (publicada el 19 de Febrero de 1985); Morrison y otros, Solicitud de Patente Europea 173494 (publicada el 5 de Marzo, 1986); Neuberger y otros, solicitud de patente PCT WO8601533 (publicada el 13 de Marzo de 1986); Kudo y otros, Solicitud de patente europea 184187 (publicada el 11 de Junio de 1986); Asgan y otros, *J. Immunol* 137: 1066-1074 (1986); Robinson y otros Solicitud de patente internacional N° WO8702671 (publicada el 7 de Mayo de 1987); Liu y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443 (1987); Sun y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218 (1987); Better y otros, *Science* 240: 1041-1043 (1988); y Harlow y Lane, *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, *supra*.

Un anticuerpo anti-idiotipo (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id puede ser preparado inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo cepa de ratón) como la fuente de los mAbs frente a los cuales un anticuerpo anti-Id es preparado. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del

anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo frente a estos determinantes idiotípicos (el anticuerpos anti-Id). Véase, por ejemplo, el documento de patente norteamericana N°: 4.699.880.

5 El anticuerpos anti-Id puede también ser usado como un “inmunógeno” para inducir una respuesta inmune en otro animal más, produciendo un así llamado anticuerpo anti-anti-Id. el anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original que indujo el anti-Id. Así, usando anticuerpos frente a los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica.

10 Por consiguiente, mAbs generados frente a las proteínas de unión a MORT-1, análogos, fragmentos o derivados de los mismos, del presente invento pueden ser usados para inducir anticuerpos anti-Id en animales adecuados, tales como ratones BALB/c. Las células de bazo de tales ratones inmunizados son usadas para producir híbridos anti-Id que secretan mAbs anti-Id. Además los mAbs anti-Id pueden ser acoplados a un vehículo tal como la hemocianina de lapa keyhole (KLH) y usada para inmunizar ratones BALB/c adicionales. El suero de estos ratones contendrá anticuerpos anti-anti-Id que tienen las propiedades de unión del mAb original específico para un epítipo de la proteína de unión a
15 MORT-1 anterior, o análogos, fragmentos y derivados de los mismos.

Los mAbs anti-Id tienen así sus propios epítopos idiotípicos, o “idiotopos” estructuralmente similares al epítipo a ser evaluado, tal como la proteína GRB-a.

20 El término “anticuerpo” también pretende incluir tanto moléculas intactas como fragmentos de las mismas, tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂, que son capaces de unirse al antígeno. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápido de la circulación, y pueden tener menos unión tisular inespecífica que un anticuerpo intacto (Wahl y otros, J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)).

25 Se apreciará que Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en el presente invento pueden ser usados para la detección y cuantificación de la proteína de unión a MORT-1 según los métodos descritos aquí para moléculas de anticuerpo intactas. Tales fragmentos son típicamente producidos por el corte proteolítico, usando enzimas tales como papaina (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

30 Se dice que un anticuerpo es “capaz de unirse” a una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para de ese modo unir la molécula al anticuerpo. El término “epítipo” pretende referirse a la porción de cualquier molécula capaz de estar unida por un anticuerpo al que puede también ser reconocido por ese anticuerpo. Los epítopos o “determinantes antigénicos” consisten normalmente en agrupaciones de moléculas en la superficie químicamente activa tal que los aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tiene características estructurales en
35 tres dimensiones específicas así como características de carga específicas.

Un “antígeno” es una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse por un anticuerpo que es además capaz de inducir a un animal a producir un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más que un epítipo. La reacción específica a la que se hace referencia anteriormente pretende indicar que
40 el antígeno reaccionará, en una manera altamente selectiva con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser evocados por otros antígenos.

Los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de anticuerpos, útiles en el presente invento pueden ser usados cuantitativamente o cualitativamente para detectar la proteína de unión a MORT-1 en una muestra o para detectar la presencia
45 de células que expresan la proteína de unión a MORT-1 del presente invento. Esto puede lograrse mediante técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo marcado fluorescentemente (véase a continuación) acoplado con detección por microscopía de luz visible, citometría de flujo o fluorométrica.

Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) útiles en el presente invento pueden ser empleados histológicamente,
50 como en inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica, para la detección *in situ* de la proteína de unión a MORT-1 del presente invento. La detección *in situ* puede ser lograda eliminando un espécimen histológico de un paciente, y proporcionando el anticuerpo marcado del presente invento a tal espécimen. El anticuerpo (o fragmento) es proporcionado preferiblemente aplicando o solapando el anticuerpo (o fragmento) marcado con una muestra biológica. A través del uso de tal procedimiento, es posible determinar no sólo la presencia de la proteína de unión MORT-1,
55 sino también su distribución en el tejido examinado. Usando el presente invento, aquellos con una experiencia general percibirán rápidamente que cualquiera de la amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) pueden ser modificados para lograr tal detección *in situ*.

Tales ensayos para la proteína de unión a MORT-1 del presente invento comprenden típicamente incubar una
60 muestra biológica, tal como un fluido biológico, un extracto tisular, células recién recogidas tales como linfocitos o leucocitos, o células que han sido incubadas en cultivo tisular, en presencia de un anticuerpo detectablemente marcado capaz de indentificar la proteína de unión a MORT-1, y detectar el anticuerpo por cualquiera del número de técnicas bien conocidas en la técnica.

65 La muestra biológica puede ser tratada con un soporte o vehículo en fase sólida tal como nitrocelulosa, u otro soporte o vehículo sólido que es capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte o vehículo puede ser entonces lavado con tampones adecuados seguido por tratamiento con un anticuerpo detectablemente marcado según el presente invento, como se observa anteriormente. El soporte o vehículo en fase sólida puede

ser entonces lavado con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcaje unido en dicho soporte o vehículo sólido puede ser entonces detectado mediante medios convencionales.

Por “soporte en fase sólida”, “vehículo en fase sólida”, “soporte sólido”, “vehículo sólido”, “soporte” o “vehículo” se entiende cualquier soporte o vehículo capaz de unir antígenos o anticuerpos. Soportes o vehículos bien conocidos, incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilón, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser bien soluble en cierta medida o insoluble para los propósitos del presente invento. El material soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Así, la configuración del soporte o vehículo puede ser esférica, como en una bola, cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de un bastoncillo. Alternativamente, la superficie puede ser plana como en las láminas, tiras de ensayo, etc. Soportes o vehículos preferidos incluyen bolas de poliestireno. Aquellos con experiencia en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpos o antígenos, o serán capaces de establecerlo usando experimentación rutinaria.

La actividad de unión de un lote de anticuerpos dado, del invento como se menciona anteriormente, puede ser determinada según métodos bien conocidos. Aquellos con experiencia en la técnica serán capaces de determinar condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

Otras etapas tales de lavado, agitación, filtrado y similares pueden ser añadidas a los ensayos como se acostumbre o sea necesario para una situación particular.

Uno de tales modos en los que un anticuerpo según el presente invento puede ser detectablemente marcado es uniendo los mismos a una enzima y usarlo en un inmuno ensayo enzimático (EIA). Esta enzima, a su vez, cuando luego es expuesta a un sustrato apropiado, reaccionará con el sustrato de tal manera que produzca un resto químico que puede ser detectado, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que pueden ser usadas para marcar detectablemente el anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococos, isómeros delta-5-esteriodeos, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerolfosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolin-esterasa. La detección puede ser lograda mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección puede también ser lograda mediante comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de un modo similar.

La detección puede ser lograda usando cualquiera de la variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, mediante marcaje radioactivo de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, es posible detectar R-PTPase a través del uso de un radioinmunoensayo (RIA). Una buena descripción de RIA puede ser encontrada en Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, por Works, T.S. y otros., North Holland Publishing Company, NY (1978) con referencia particular al capítulo titulado “An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques” por Chard, T., incorporadas mediante referencia aquí. El isótopo radioactivo puede ser detectado mediante tales medios como el uso de un contador g o un contador de centelleo o mediante autoradiografía.

Es posible también marcar un anticuerpo según el presente invento con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente es expuesto a la luz con la apropiada longitud de onda, su presencia puede ser entonces detectada debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcaje fluorescentes más comúnmente usados están el isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, picocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo puede también ser detectablemente marcado usando metales emisores de fluorescencia tales como ¹⁵²E, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden ser unidos al anticuerpo usando tales grupos quemadores de metales como el ácido dietilenetriamina pentaacético (ETPA).

El anticuerpo puede también ser detectablemente marcado acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado quimioluminiscentemente es entonces determinado detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster acridino teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.

De igual modo, un compuesto bioluminiscente puede ser usado para marcar el anticuerpo del presente invento. la bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en sistemas biológicos en los que la proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción de la reacción química. La presencia de una proteína bioluminiscente es determinada detectando la presencia de luminiscencia: Compuestos bioluminiscentes importantes para propósitos de marcado son luciferina, luciferasa y aequorina.

Una molécula de anticuerpo del presente invento puede ser adaptada para la utilización en un ensayo inmuno-métrico, también conocido como el ensayo de “dos sitios” o “sándwich”. En un ensayo inmunométrico típico, una cantidad de anticuerpos (o fragmento de anticuerpo) sin marcar es unido a un soporte o vehículo sólido y una cantidad del anticuerpo soluble detectablemente marcado es añadida para permitir la detección y/o cuantificación del complejo ternario formado entre el anticuerpo de fase sólida, antígeno, y anticuerpo marcado.

Ensayos inmunométricos típicos, y preferidos incluyen ensayos “directos” o “forward” en los que el anticuerpo unido a la fase sólida es puesto primero en contacto con la muestra a ser ensayada para extraer el antígeno de la muestra mediante la formación de un complejo binario anticuerpo en fase sólida-antígeno. Tras un período de incubación adecuada, el soporte o vehículo sólido es lavado para eliminar el residuo de la muestra fluida, incluyendo el antígeno sin reaccionar, si lo hay, y después puesto en contacto con la disolución que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo sin marcar (que funciona como una “molécula receptora”). Tras un segundo período de incubación para permitir que el anticuerpo marcado se acompleje con el antígeno unido al soporte o vehículo sólido a través del anticuerpo sin marcar, el soporte o vehículo sólido es lavado una segunda vez para eliminar el anticuerpo marcado sin reaccionar.

En otro tipo de ensayo “sándwich”, que puede también ser usado con los antígenos del presente invento, los ensayos así llamados “simultáneo” e “inverso” son usados. Un ensayo simultáneo implica una etapa de incubación única según el anticuerpo unido al soporte o vehículo sólido y el anticuerpo marcado son ambos añadidos a la muestra a ser ensayada al mismo tiempo. Después de que la incubación se completa, el soporte o vehículo sólido es lavado para eliminar el residuo de muestra fluida y un anticuerpo marcado no acomplejado. La presencia de anticuerpos marcados asociados con el soporte o vehículo sólido es entonces determinada como ser haría en un ensayo sándwich “directo” convencional.

En el ensayo “inverso”, la adición secuencial del anticuerpo marcado sobre la muestra fluida seguido por la adición de anticuerpo sin marcar unido a un soporte o vehículo sólido tras una período de incubación adecuado es utilizado. Tras una segunda incubación, la fase sólida es lavada en una manera convencional para liberarlo del residuo de la muestra a ser ensayada y la disolución del marcador marcado sin reaccionar. La determinación del anticuerpo marcado asociado con un soporte o vehículo sólido es entonces determinado como en los ensayos “simultáneo” y “directo”.

Las proteínas de unión a MORT-1 de la descripción pueden ser producidas por cualquier procedimiento de ADN recombinante estándar (véase por ejemplo, Sambrook y otros 1989 y Ansabel y otros, 1987-1995, *supra*) en los que las células hospedantes eucarióticas o procarióticas adecuadas bien conocidas en la técnica son transformadas por los vectores eucarióticos o procarióticos apropiados que contiene las secuencias que codifican las proteínas. Por consiguiente, la presente descripción también tiene que ver con los vectores de expresión y los hospedantes transformados para la producción de las proteínas de la descripción. Como se menciona anteriormente, estas proteínas también incluyen sus análogos biológicamente activos, fragmentos y derivados, y así los vectores que los codifican también incluyen vectores que codifican análogos y fragmentos de estas proteínas, y los hospedantes transformados incluyendo los que producen tales análogos y fragmentos. Los derivados de estas proteínas producidas por los hospedantes transformados, son los derivados producidos por la modificación estándar de las proteínas o sus análogos o fragmentos.

La presente descripción también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden los vectores virales animales recombinantes que codifican las proteínas de unión a MORT-1, vectores que también codifican una proteína de superficie viral capaz de unir proteínas de superficie específicas de las células diana (por ejemplo, células cancerígenas) para dirigir la inserción de las secuencias de las proteínas de unión a MORT-1 en las células. Otras composiciones farmacéuticas de la descripción comprenden como ingrediente activo (a) una secuencia oligonucleotídica que codifican una secuencia anti-sentido de la secuencia de la proteína de unión a MORT-1, o (b) fármacos que bloquean la actividad proteolítica de las isoformas MACH.

Las composiciones farmacéuticas según el presente invento incluyen una cantidad suficiente del ingrediente activo para lograr el propósito buscado. Además, las composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en las preparaciones que pueden ser usados farmacéuticamente y que pueden estabilizar tales preparaciones para la administración al sujeto que necesita la misma así como conocida por aquellos con experiencia en la técnica.

La proteína de unión a MORT-1 MACH, es expresada en diferentes tejidos en niveles marcadamente diferentes y aparentemente también con diferentes patrones de isotipos. Esas diferencias contribuyen probablemente a las características específicas de tejido de la respuesta al ligando Fas/APO-1 y TNF. Como es el caso de otros homólogos de CED3/ICE (Wang y otros, 1994; Alnemri y otros., 1995), las isoformas MACH que contienen las regiones CED3/ICE incompletas (por ejemplo, MACHa3) se encuentra que tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de las moléculas MACHa1 o MACHa2 coexpresadas; también se encuentran que bloquean la inducción de muerte por Fas/APO1 y p55-R. La expresión de tales isoformas inhibitoras en las células pueden constituir un mecanismo de autoprotección celular frente a la citotoxicidad mediada por Fas/APO1 y TNF. La amplia heterogeneidad de las isoformas MACH, que excede ampliamente la observada por cualquiera de las otras proteasas de la familia CED3/ICE, debería permitir un ajuste fino de la función de las isoformas MACH activas.

También es posible que algunas isoformas MACH sirvan para otras funciones. La capacidad de MACH β 1 para unirse tanto a MORT-1 como a MACHa1 sugiere que esta isoforma puede en realidad potenciar la actividad de las isoformas enzimáticamente activas. La ligera citotoxicidad observada en los cultivos 293-EBNA y MCF7 transfectados con esta isoforma y el efecto citotóxico bastante significativo que ejerce en células HeLa es probable que refleje la activación de las moléculas MACHa engógenamente expresadas tras la unión a las moléculas MACHb1 transfectadas. Es imaginable, que algunas de las isoformas MACH puedan también actuar como sitios de anclaje para moléculas que están implicadas en otros, efectos no citotóxicos de los receptores Fas/APO1 y TNF.

Debido a su capacidad única de los receptores de Fas/APO1 y TNF para causar la muerte celular, así como la capacidad de los receptores TNF para desencadenar otras actividad de daño tisular, aberraciones en la función de estos receptores podría ser particularmente nociva para el organismo. Efectivamente, tanto un funcionamiento excesivo como deficiente de estos receptores se ha demostrado que contribuye a las manifestaciones patológicas de diversas enfermedades (Vassalli, 1992; Nagata y Golstein, 1995). La identificación de las moléculas que participan en la actividad de señalización de los receptores y encontrar medios para modular la actividad de estas moléculas, podría dirigir nuevas aproximaciones terapéuticas. En vista del papel central que se sospecha de MACHa en Fas/APO1 y la toxicidad mediada por TNF, parece particularmente importante diseñar fármacos que puedan bloquear la actividad proteolítica de MACHa, como se hizo para otras proteínas de la familia CED3/ICE (Thornberry y otros, 1994; Millar y otros, 1995; Máxima y otros, 1995; Milligan y otros, 1995; Enari y otros, 1995, Los y otros, 1995). Las características de secuencias únicas del homólogo CED3/ICE dentro de las moléculas MACHa permitiría diseñar fármacos que afectarían especialmente su actividad. Tales fármacos podrían proporcionar protección a partir de la citotoxicidad mediada por el sistema inmune implicando MACHa sin interferir con los procesos de muerte celular fisiológica en los que otros miembros de la familia CED3/ICE están implicados.

Otros aspectos del invento serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos.

El invento será ahora descrito en más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes y los dibujos que acompañan.

Debería observarse también que los procedimientos de: i) cribado de doble híbrido y ensayo de expresión de β -galactosidasa de doble híbrido; (ii) expresión inducida, marcaje metabólico e inmunoprecipitación de proteínas; (iii) unión *in vitro*; (iv) evaluación de la citotoxicidad; y (v) análisis por Northern y de secuencia, como se expone en los Ejemplos 1 (véase también Boldin y otros, 1995b) y 2 a continuación, con respecto a MORT-1 y a la proteína de unión a MORT-1, son igualmente aplicables (con algunas modificaciones) para el aislamiento correspondiente, clonaje y caracterización de MACH y sus isoformas. Estos procedimientos deben así ser interpretados como la descripción completa de los mismos procedimientos usados para el aislamiento, clonaje y caracterización de MACH según el presente invento, como se detalla en el Ejemplo 3 a continuación.

Ejemplo 1

Clonaje y aislamiento de la proteína MORT-1 que se une al dominio intracelular de FAS-R

(i) Cribado de doble híbrido y ensayo de expresión de β -galactosidasa de doble híbrido

Para aislar proteínas que interaccionan con el dominio intracelular del FAS-R, el sistema de doble híbrido de levadura fue usado (Fields y Song, 1989). Brevemente, este sistema de doble híbrido es un ensayo genético basado en levaduras para detectar interacciones proteína-proteína específicos *in vivo* mediante el restablecimiento de un activador transcripcional eucariótico tal como GAL4 que tiene dos dominios separados, un dominio de unión a ADN y un dominio de activación, dominios que cuando están expresados y unidos juntos para formar una proteína GAL4 restablecida, son capaces de unirse a una secuencia activadora aguas arriba que a su vez activa un promotor que controla la expresión de un gen reportero, tal como lacZ o HIS3, la expresión de la cual es fácilmente observada en las células cultivadas. En este sistema, los genes para las proteínas de interacción candidatas son clonados en vectores de expresión separados. En un vector de expresión, la secuencia de una proteína candidata es clonada en la fase con la secuencia del dominio de unión a ADN de GAL4 para generar una proteína híbrida con el dominio de unión a ADN de GAL4, y en el otro vector la secuencia de una segunda proteína candidata es clonada en fase con la secuencia del dominio de activación GAL4 para generar una proteína híbrida con el dominio de activación GAL4. Los vectores de doble híbrido son entonces cotransformados en una cepa hospedante de levadura que tienen un gen reportero lacZ o HIS3 bajo el control de los sitios de unión GAL4 aguas arriba. Sólo aquellas células hospedantes transformadas (cotransformantes) en las que las proteínas de doble híbrido están expresadas y son capaces de interaccionar entre sí, serán capaces de expresar el gen reportero. En el caso del reportero lacZ, las células hospedantes que expresan este gen se volverán de color azul cuando se añade X-gal a los cultivos. De este modo, las colonias azules son indicadoras del hecho que las dos proteínas candidatas clonadas son capaces de interaccionar entre sí.

Usando este sistema de doble híbrido, el dominio intracelular, FAS-IC, fue clonado, separadamente, en el vector pGBT9 (que llevan la secuencia de unión de ADN GAL4, proporcionado por CLONTECH, USA, véase a continuación), para crear proteínas de fusión con el dominio de unión a ADN de GAL4. Para el clonaje de FAS-R en pGBT9, un clon que codifica para la secuencia de cADN completa de FAS-R (documento de patente WO9531544) fue usado a partir del cual el dominio intracelular (IC) fue cortado mediante procedimientos estándar usando diversas enzimas de restricción y aislado entonces mediante procedimientos estándar e insertado en el vector pGBT9, abierto en su región del sitio de clonaje múltiple (MCS), con las correspondientes enzimas de restricción adecuadas. Debería observarse que el FAS-IC se extiende desde los residuos aminoacídicos 175-319 del FAS-R intacto, conteniendo esta porción los residuos 175-319 estando el FAS-IC insertado en el vector pGBT9.

El vector híbrido (quimera) anterior fue entonces cotransfectado junto con una librería de cADN a partir de las células HeLa humanas clonadas en el vector pGAD GH, que llevan el dominio de activación GAL4, en la cepa hospedante de levadura HF7c (todos los vectores observados anteriormente, pGBT9 y pGAD GH que llevan la librería de cADN de células HeLa, y la cepa de levadura fueron comprados de Clontech Laboratories, Inc., USA, como parte del

sistema de doble híbrido MATCHMAKER, N° PT 1265-1). Las levaduras cotransfectadas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en medio carente de Histidina (medio His), el que crezcan colonias es indicativo de transformantes positivos. Los clones de levadura seleccionados fueron entonces ensayados en lo que respecta a su capacidad para expresar el gen lacZ, es decir, a su actividad LACZ, y esto se hace añadiendo X-gal al medio de cultivo, que es catabolizado para formar un producto coloreado azul por b-galactosidasa, la enzima codificada por el gen lacZ. Así, colonias azules son indicadoras de un gen lacZ activo. Para la actividad del gen lacZ, es necesario que el activador de la transcripción GAL4 esté presente en una forma activa en los clones transformados, a saber, que el dominio de unión a ADN GAL4 codificado por el vector híbrido anterior a ser combinados apropiadamente con el dominio de activación GAL4 codificado por el otro vector híbrido. Tal combinación es sólo posible si las dos proteínas fusionadas a cada uno de los dominio GAL4 son capaces de interaccionar (unirse) de manera estable entre sí. Así, las colonias His⁺ y azules (LACZ⁺) que fueron aisladas son colonias que han sido cotransfectadas con un vector que codifica el FAS-IC y un vector que codifica un producto proteico de origen de células HeLa humanas que es capaz de unirse de modo estable a FAS-IC.

El ADN plasmídico a partir de las colonias de levadura His⁺, LACZ⁺ fue aislado y electroporado en la cepa HB101 de *E. coli* mediante procedimientos estándar seguido por la selección de transformantes Leu⁺ resistentes a Ampicilina, siendo estos transformantes los que llevan el vector GH pGAD híbrido que tiene tanto las secuencias codificantes Amp^R y Leu2. Tales transformantes son por lo tanto clones que llevan estas secuencias que codifican nuevas proteínas identificadas capaces de unirse al FAS-IC. El ADN plasmídico fue entonces aislado a partir de estas *E. coli* transformadas y reensayado mediante:

(a) retransformación de éstas con el plásmido híbrido del dominio intracelular de FAS-R (híbrido pGTB9 que lleva el FAS-IC) en la cepa de levadura HF7 como se expone aquí anteriormente. Como testigos, los vectores que llevan secuencias que codifican proteínas irrelevantes, por ejemplo, pACT-lamin o pGBT9 solas fueron usadas para la cotransformación con el plásmido que codifica la proteína de unión a FAS-IC (es decir, MORT-1). Las levaduras cotransformadas cuando son ensayadas en lo que respecta a su crecimiento en medio His⁻ solo, o con niveles diferentes de 3-aminotriazol; y

(b) retransformación del ADN plasmídico y el plásmido FAS-IC híbrido original y los plásmidos testigo descritos en (a) en las células hospedantes de levaduras de la cepa SFY526 y determinación de la actividad LACZ⁺ (efectividad de la formación de b-gal, es decir, formación de color azul).

Los resultados de los ensayos anteriores revelaron que el patrón de crecimiento de las colonias en medio His⁻ fue idéntica al patrón de actividad LACZ, como se evalúa por el color de la colonia, es decir, las colonias His⁺ fueron también LACZ⁺. Además, la actividad LACZ en cultivo líquido (condiciones de cultivo preferidas) fue evaluado tras la transfección de los dominios híbridos de unión de ADN GAL4 y activación en los hospedantes de levadura SFY526 que tienen una mejor inducibilidad LACZ con el activador de transcripción GAL4 que el de las células hospedantes de levadura HF7.

Usando el procedimiento anterior, una proteína llamada previamente designada, y ahora referido como MORT-1 por "Mediador de la toxicidad inducida por el receptor" o "Mediator of Receptor-induced Toxicity", fue identificada, aislada y caracterizada.

Además, debería también mencionarse que en un número de los ensayos de expresión de la b-galactosidasa de doble híbrido anterior, la expresión de la b-galactosidasa fue también evaluada mediante un filtro preferido. En el cribado, cindo de alrededor de 3x10⁶ cADNs se encontró que contenían el inserto MORT-1. Los insertos de cADN clonados así aislados fueron entonces secuenciados usando procedimientos de secuenciación de ADN estándar. La secuencia de aminoácidos de MORT-1 (SEQ ID N°: 2) fue deducida a partir de la secuencia de ADN. La numeración de residuos en las proteínas codificadas por los insertos de cADN son como en la base de datos Swiss Prot. Los mutantes de delección fueron producidos por PCR, y los mutantes puntuales mediante oligonucleótidos por mutagénesis dirigida (Current Protocols in Molec. Biol., 1994).

(ii) Expresión inducida, marcaje metabólico e inmunoprecipitación de proteínas

MORT-1, unido por N- al octapéptido FLAG (FLAG-MORT-1; Eastman Kodak, New Haven, Ct., USA), Fas-IC, FAS-R, p55-R, una quimera comprendida del dominio extracelular de p55-R (aminoácidos 1-168) unida al dominio transmembrana e intracelular de FAS-R (aminoácidos 153-319), y el cADN de luciferasa que sirve como testigo, fueron expresadas en las células HeLa. La expresión fue llevada a cabo usando un vector de expresión controlada por tetraciclina, en un clon de células HeLa (Hita-1) que expresa un transactivador controlado por tetraciclina (Gossen y Bujard, 1992); véase también Boldin y otros., 1995). El marcaje metabólico con [³⁵S] metionina y [³⁵S] cisteína (DUPONT, Wilmington, DE, USA y Amersham, Buckinghamshire, England) fue realizada 18 horas tras la transfección, por una incubación de 4 h adicional a 37°C en medio Eagle modificado de Dulbecco que carece de metionina y cisteína, pero suplementado con 2% de suero de ternera fetal dializado. Las células fueron entonces lisadas en tampón RIPA (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% NP-40, 1% desoxicolato, 0,1% SDS y 1 mM de EDTA) y el lisado fue preacclarado mediante incubación con antisuero de conejo irrelevante (3 ml/ml) y bolas de Proteína G Sefarosa (Pharmacia, Uppsala, Suecia; 60 ml/ml). La inmunoprecipitación fue realizada mediante 1 h de incubación a 4°C de alícuotas de 0,3 ml de lisado con anticuerpos monoclonales de ratón (5 ml/alícuota) frente al octapéptido FLAG (M2;

Eastman Kodak), p55-R (Nº 18 y Nº 20; Engelmann y otros, 1990), o FAS-R (ZB4; Kamiya Southand Oaks, Ca., USA) o con los anticuerpos de ratón del isotipo relacionado como testigos, seguido por una incubación adicional de 1 h con bolas de proteína G Sefarosa (30 ml/alícuota).

(iii) Unión *in vitro*

Las fusiones de Glutathion-S-transferasa (GST) con el Fas-IC salvaje o mutado fueron producidas y adsorbidas a bolas de glutathion-agarosa; véase Boldin y otros, 1995; Current Protocols in Molecular Biology, 1994; Frangioni y Neel, 1993). La unión de proteínas de fusión FLAG-MORT-1 metabólicamente marcadas A GST-FAS-IC fue evaluada incubando las bolas durante 2 h a 4°C con extractos de células hela, metabólicamente marcadas con [³⁵S]metionina (60 mCi/ml), que expresan FLAG-MORT-1. Los extractos fueron preparados en un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, 0,1% NP-40, ditiotritol 1 mM, EDTA 1 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, Aprotinina 20 mg/ml, Leupeptina 20 mg/ml, fluoruro sódico 10 mM y vanadato sódico 0,1 mM (1 ml por 5x10⁵ células).

(iv) Evaluación de la citotoxicidad desencadenada por la expresión inducida por MORT-1

cADN de MORT-1, Fas-IC, p55-IC y luciferasa fueron insertado en un vector de expresión controlado por tetraciclina y tranfectado a las células HtTa-1 (Gossen y Bujard, 1992) junto con el cADN de fosfatasa alcalina de placenta secretada, colocado bajo el control del promotor SV40 (el vector pSBC-2, Dirks y otros, 1993). Muerte celular fue evaluada 40 horas tras la transfección, bien mediante el ensayo de ingesta de rojo neutro (Wallach, 1984) o, para evaluar la muerte específicamente en aquellas células que expresan los cADNs tranfectados, determinando las cantidades de fosfatasa alcalina de placenta (Berger y otros, 1988) secretada al medio de crecimiento en las últimas 5 horas de incubación.

En otro grupo de experimentos para analizar la región de la proteína MORT-1 implicada en la unión al FAS-IC, las siguientes proteínas fueron expresadas de modo transitorio en las células HeLa que contiene un transactivador controlado por tetraciclina (HtTa-1), usando un vector de expresión controlado por tetraciclina (pUHD10-3): FAS-R humano solo; FAS-R humano así como la parte N-terminal de MORT-1 (aminoácidos 1-117, la “cabeza de MORT-1”); FAS-R humano así como la parte c-terminal de MORT-1, que contiene su región de homología del “dominio de muerte” (aminoácidos 130-245, el “MORT-1 DD”); FLAG-55.11 (aminoácidos 309-900 de la proteína 55.11 fusionada al extremo N-terminal del octapéptido FLAG, siendo la proteína 55.11 una proteína de unión específica a p55-IC. Doce horas tras la transfección, las células fueron tripsinizadas y sembradas a una concentración de 30.000 células/pocillo. Tras 24 h siguientes a la incubación, las células fueron tratadas durante 6 horas con un anticuerpo monoclonal frente al dominio extracelular de FAS-R (anticuerpo monoclonal CH-11, Oncor, Gaithersburg, MD, USA) a diversas concentraciones (0,001-10 mg/ml anticuerpo monoclonal), en presencia de 10 mg/ml de cicloheximida. La viabilidad celular fue entonces determinada mediante el ensayo de ingesta de rojo neutro y los resultados fueron presentados en términos de % de células viables según se compara con las células que han sido incubadas con cicloheximida sola (en ausencia de anticuerpo monoclonal CH-11 anti-FAS-R).

(v) Análisis por Northern y de secuencia

ARN poly A⁺ fue aislado de ARN total de células HeLa (Oligotex-dT RNA kit. QIAGEN, Hilden, Alemania). Análisis Northern usando el cADN de MORT-1 como una sonda fue usado mediante métodos convencionales (véase Holding y otros, 1995). La secuencia nucleotídica de MORT-1 fue determinada en ambas direcciones mediante el método de terminación de cadena didesoxi.

El análisis de secuencia de cADN MORT-1 clonado mediante el procedimiento de doble híbrido indicó que codifica una proteína nueva. Aplicando adicionalmente el ensayo de doble híbrido para evaluar la especificidad de la unión de esta proteína (MORT-1 por “Mediador de la toxicidad inducida por receptor”) a Fas-IC, y para definir la región particular en Fas-IC a la cual se une, llevó a los siguientes hallazgos (Figura 1): (a) la proteína MORT-1 se une tanto al Fas-IC humano como de ratón, pero no a varias otras proteínas ensayadas, incluyendo tres receptores de la familia TNF/NGF (receptores TNF p55 y p75 y CD40); (b) mutaciones de remplazamiento en la posición 225 (Ile) en el “dominio de muerte” de FAS-R, mostraron que abolen la señalización tanto *in vitro* como *in vivo* (la mutación *lpr^{cg}* (Watanabe-Fukunaga y otros, 1992; Itoh y Nagata, 1993), también impide la unión de MORT-1 al FAS-IC; (c) el sitio de unión de MORT-1 en FAS-R se encuentra dentro del “dominio de muerte” de este receptor; y (d) MORT-1 se une a sí mismo. La autoasociación, y la unión de MORT-1 a FAS-R implica diferentes regiones de la proteína: un fragmento de MORT-1 que corresponde a los residuos 1-117 se une a MORT-1 entera, pero no se une a sí mismo ni al FAS-IC. Por el contrario, un fragmento que corresponde a los residuos 130-245 se une al FAS-R, pero no se une a MORT-1 (FIG 1). Además, es evidente a partir de los resultados de la Fig. 1 que la región del “dominio de muerte” de FAS-R es crítica para la autoasociación de FAS-IC, como lo es la región del “dominio de unión” de p55-R para la autoasociación de p55-IC. Las deleciones en ambos lados de estos “dominios de muerte” no afectan a la capacidad de autoasociación de la misma mientras que, sin embargo, una deleción en estos “dominios de muerte” afecta a la autoasociación. En el caso de MORT-1, la unión de MORT-1 a FAS-IC también depende del “dominio de muerte” completo (entero) de FAS-R, mientras que sin embargo, tampoco depende de las regiones fuera de la región del “dominio de muerte” de FAS-R para la unión a FAS-IC.

En la Fig.1, se describe la interacción de las proteínas codificadas por el dominio de unión de ADN Gal4 y las construcciones del dominio de activación (pGBT9 y pGAD-GH) en levaduras transfectadas SFY526 como se evaluó mediante el ensayo de filtros de expresión de b-galactosidasa. Las construcciones del dominio de unión a ADN incluyen cuatro construcciones del Fas-IC humano, cuatro construcciones del Fas-IC de ratón incluyendo dos construcciones completas que tienen mutaciones de remplazamiento de Ile a Leu o Ile a Ala en la posición 225 (I225N y I225A, respectivamente) y tres construcciones MORT-1, todas las cuales se muestran esquemáticamente a la izquierda de la Fig. 1. Las construcciones del dominio de activación incluyen tres construcciones MORT-1, la porción MORT-1 está como en la construcción del dominio de unión a ADN; y una construcción de Fas-IC humana completa, siendo la porción Fas-IC la misma en la construcción del dominio de unión a ADN anterior. los dominios intracelulares del receptor p55 TNF (P55-IC residuos 206-426), CD40 humano (CD40-IC, residuos 216-277) y receptor p75 TNF humano (p75-IC, residuos 287-461) así como los vectores lamin, ciclina D y Gal4 "vacío" (pGBT9) sirven como testigos negativos en la forma de construcciones de dominio de unión a ADN. SNF-1 y SNF4 sirven como testigos positivos en la forma de dominio de unión a ADN (SNF1) y construcciones de dominio de activación (SNF4). Vectores Gal4 "vacíos" (pGAD-GH) también sirven como testigos negativos en la forma de construcciones de dominios de activación. Los símbolos "++" y "+" indican el desarrollo de un color fuerte a los 30 y 90 min del ensayo, respectivamente; y "-" indica el no desarrollo de color a las 24 h. Combinaciones para las cuales no se da ningún valor es que no han sido ensayadas.

La expresión de moléculas MORT-1 unidas a su extremo N terminal con el octapéptido FLAG (FLAG-MORT-1) dieron proteínas en células HeLa de cuatro distintos tamaños-alrededor de 27, 28, 32 y 34 kD. La interacción de MORT-1 con Fas-IC *in vitro* fue observada realizando un inmunoprecipitado de proteínas de extractos de células HeLa transfectadas con la proteína de fusión FLAG-MORT-1 o con cADN de luciferasa como testigo, siendo la inmunoprecipitación realizada con un anticuerpo anti-FLAG (aFLAG). La interacción *in vitro* fue también demostrada entre MORT-1 y FAS-IC en la que MORT-1 está en la forma de proteína de fusión FLAG-MORT metabólicamente marcada con [³⁵S]metionina obtenidas de extractos de células HeLa transfectadas y FAS-IC está en la forma de proteínas de fusión GST-FAS-IC humanas y de ratón incluyendo una que tiene una mutación de remplazamiento en la posición 225 en Fas-IC, todas las cuales proteínas de fusión GST-FAS-IC fueron producidas en *E. coli*. Las proteínas de fusión GST fueron unidas a bolas de glutatión antes de la interacción con extractos que contiene la proteína de fusión MORT-1-FLAG tras esta interacción, se realizó SDS-PAGE (electroforesis). Así, la interacción *in vitro* fue evaluada mediante autoradiografía tras SDS-PAGE, la unión de MORT-1 metabólicamente marcada con [³⁵S], producida en células HeLa como una fusión con el octapéptido FLAG (FLAG-MORT-1), a GST, fusión GST con el Fas-IC de humano o de ratón (GST-huFas-IC, GST-mFas-IC) o a fusión GST con Fas-IC que contiene una mutación de remplazamiento de Ile a Ala en la posición 225. Se mostró que las cuatro proteínas FLAG-MORT1 mostraron su capacidad para unirse a Fas-IC tras incubación con una proteína de fusión Fas-IC. Como en el ensayo de doble híbrido (Fig 1), MORT-1 no se unió a la proteína de fusión GST-Fas-IC con un remplazamiento en el sitio de mutación lpr^{cg} (I225A).

Las proteínas codificadas por el cADN FLAG-MORT-1 mostraron también una capacidad para unirse al dominio intracelular de FAS-R, así como al dominio intracelular de la quimera FAS-R cuyo dominio intracelular fue remplazado con la de p55-R (p55-FAS), cuando se coexpresa con estos receptores en las células HeLa. En este caso, la interacción de MORT-1 con FAS-IC en las células HeLa transfectadas, es decir, *in vivo*, como se observa con los inmunoprecipitados de diversas células HeLa transfectadas demostraron la interacción *in vivo* y la especificidad de la interacción entre MORT-1 y FAS-IC en células cotransfectadas con construcciones que codifican estas proteínas. Así, la proteína de fusión FLAG-MORT-1 fue expresada y marcada metabólicamente con [³⁵S]cisteína (20 mCi/ml) y [³⁵S]metionina (40 mCi/ml) en células HeLa solo o junto con FAS-R humano, FAS-R quimera en la que el dominio extracelular de FAS-R fue remplazado con la correspondiente región en el p55-R humano (p55-FAS), o p55-R humano, como testigo negativo. Una inmunoprecipitación cruzada de MORT-1 con el receptor coexpresado fue realizado usando diversos anticuerpos específicos. Los resultados indican que, FLAG-MORT-1 es capaz de unirse al dominio intracelular de FAS-R, así como al dominio intracelular de una quimera FAS-R-p55-R que tiene el dominio extracelular de p55-R y el dominio intracelular de FAS-R, cuando es coexpresado con estos receptores en las células HeLa. Además, la inmunoprecipitación de FLAG-MORT1 a partir de extractos de las células transfectadas también da como resultado la precipitación del FAS-R coexpresado o la quimera p55-FAS coexpresada. Por el contrario, la inmunoprecipitación de estos receptores resulta en la coprecipitación de FLAG-MORT-1.

El análisis por Northern usando el cADN MORT-1 como sonda reveló un transcrito de hibridación único en células HeLa. En una transferencia Northern en el que el ARN poli A+ (0,3 mg) a partir de células transfectadas fue hibridado con cADN de MORT-1, el tamaño del transcrito de ARN (alrededor de 1,8 kb) se encontró que estaba próximo al tamaño del cADN MORT-1 (alrededor de 1702 nucleótidos).

En el análisis de secuencia, el cADN se encontró que contenía un marco de lectura abierta de alrededor de 250 aminoácidos. La Fig. 2 describe el nucleótido preliminar (SEQ ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID N°: 2) de MORT-1 en el que el motivo del "dominio de muerte" está subrayado, ya que es un posible residuo de inicio Met (posición 49; en negrita, subrayado M) y el codon stop de la traducción (el asterisco bajo el codon en la posición 769-771). Este motivo de "dominio de muerte" muestra homología con los motivos de "dominio de muerte" p55-R y FAS-R (p55DD y FAS-DD). Para determinar el extremo C-terminal preciso de MORT-1 y obtener evidencias que conciernen al extremo N-terminal (residuo Met inicial) preciso de MORT-1, experimentos adicionales fueron llevados a cabo como se indica a continuación:

Usando los métodos descritos anteriormente, un número de construcciones que codifican las moléculas MORT-1 fusionadas a su extremo N-terminal con el octapéptido FLAG (FLAG-MORT-1) fueron contruidas y expresadas en células HeLa con marcaje metabólico de las proteínas expresadas usando ³⁵S-cisteína y ³⁵S metionina. Las moléculas MORT-1-FLAG fueron codificadas por los siguiente cADN que contiene diferentes porciones de la secuencia codificante MORT-1:

i) El cADN del octapéptido FLAG unido al extremo 5' del cADN de MORT-1 a partir de cuyos nucleótidos 1-145 de la SEQ ID N°: 1 (véase la Fig. 2) han sido deletados:

ii) el cADN del octapéptido FLAG unido al extremo 5' del cADN MORT-1 completo;

iii) el cADN del octapéptido FLAG unido al extremo 5' del cADN MORT-1 del cual los nucleótidos 1-145 así como los nucleótidos 832-1701 de la SEQ ID N°:1 (Fig. 2) han sido deletados y el codon GCC en la posición 142-144 fue mutado para TCC para impedir el inicio de la traducción en este sitio.

Tras la expresión de los productos de fusión FLAG-MORT-1, la inmunoprecipitación fue llevada a cabo como se menciona anteriormente, usando bien los anticuerpos monoclonales anti-FLAG (M2) o como testigo, anticuerpos anti-p75 TNF-R (N° 9), seguido por SDS-PAGE (10% acrilamida) y autoradiografía. Los resultados de los análisis con los productos de fusión FLAG-MORT-1 anteriores confirmaron (validaron) el extremo C-terminal de MORT-1 y han proporcionado evidencias de que el extremo N-terminal de MORT-1 puede estar en una posición 49 de la secuencia en la Fig. 2.

Ciertamente, se ha demostrado mediante experimentos de expresión adicional de MORT-1 sin el octapéptido FLAG fusionado a su extremo 5', que Met sirve como un sitio eficaz de inicio de la traducción.

Una búsqueda llevada a cabo en las bases de datos "Gene Bank" y "Protein Bank" revelaron que no hay secuencia correspondiente a la de la secuencia MORT-1 aislada. Así, MORT-1 representa una nueva proteína de unión específica a FAS-IC.

La elevada expresión de p55-IC da como resultado el desencadenamiento de un efecto citocida (Boldin y otros, 1995). La expresión de Fas-IC en células HeLa también tiene tal efecto, aunque en menor extensión, que podría ser detectado sólo con el uso de un ensayo sensible. El desencadenamiento independiente de ligando de los efectos citocidas en las células transfectadas con MORT-1 así como p55-IC y FAS-IC humanos, fue así analizado. El efecto de la expresión transitoria de MORT-1- FAS-IC humano, p55-IC humano, o luciferasa que sirvió como testigo, en la viabilidad de las células HeLa fue evaluado usando un vector de expresión controlado por tetraciclina. La viabilidad celular fue evaluada 40 min tras transfectar estos cADN en presencia o ausencia de tetraciclina (1 mg/ml, para bloquear la expresión), junto con un cADN que codifica la fosfatasa alcalina placentaria secretada. La viabilidad celular fue determinada bien mediante el ensayo de ingesta de rojo neutro o, para determinar específicamente la viabilidad de las células en particular que expresan el ADN transfectado, midiendo las cantidades de fosfatasa alcalina de placenta secretada al medio de crecimiento.

El análisis anterior reveló que la expresión de MORT-1 en células HeLa dio como resultado una muerte celular significativa, mayor que la causada por la expresión de FAS-IC. Estos efectos citotóxicos de todos los p55-IC, FAS-IC y MORT-1 parecen estar relacionados con las región de dominios de muerte, presentes en todas estas proteínas, "dominios de muerte" que tiene una propensidad a autoasociarse, y de ese modo desencadenar posiblemente los efectos citotóxicos.

En vista de las características anteriormente mencionadas de MORT-1, a saber, la asociación específica de MORT-1 con la región particular en FAS-R que está implicada en la inducción de muerte celular, y el hecho que aún un pequeño cambio en estructura de esa región, que impide la señalización (la mutación *lpr^{ce}*) abola también la unión de MORT-1, indica que esta proteína juega un papel en la señalización o el desencadenamiento de la muerte celular. Esta noción es apoyada además por la capacidad observada de MORT-1 para desencadenar por sí misma un efecto citocida. Así, MORT-1 puede funcionar como (i) un modulador de la autoasociación de FAS-R por su propia capacidad para unirse a FAS-R así como a sí misma, o (ii) servir como un sitio de anclaje para proteínas adicionales que están implicadas en la señalización por FAS-R, es decir, MORT-1 puede ser una proteína de anclaje y puede por lo tanto unirse a otros receptores a parte de FAS-R, o (iii) constituir parte de un sistema de señalización distinto que interacciona con la señalización por FAS-R.

Para analizar además las regiones de MORT-1 implicadas en la unión a FAS-IC y la modulación de los efectos celulares mediados por FAS-R (citotoxicidad), los experimentos anteriormente mencionados fueron llevados a cabo, usando vectores que codifican porciones de MORT-1 (la "cabeza MORT-1", aminoácidos 1-117 y el "MORT-1 dd", aminoácidos 130-245)(separadamente), con un vector que codifica el FAS-R humano para cotransfecciones de células HeLa. En estos experimentos, las diversas proteínas y combinaciones de proteínas fueron expresadas de modo transitorio en las células HeLa que contienen un transactivador controlado por tetraciclina (HtTA-1) insertando las secuencias que codifican las proteínas en un vector pUHD 10-3. De expresión controlado por tetraciclina. Las transfecciones testigo emplean vectores que codifican sólo el FAS-R y vectores que codifican la proteína de fusión FLAG-55.11 (siendo la proteína 55.11 una proteína de unión específica para p55-IC de la cual una porción que contiene los aminoácidos 309-900 fue fusionada (en su extremo N-terminal) al octapéptido FLAG).

Tras la transfección y períodos de incubación, las células transfectadas fueron tratadas con diversas concentraciones de un anticuerpo monoclonal anti-FAS-R (CH-11) que se une específicamente al dominio extracelular de FAS-R expresado por las células. Esta unión de anticuerpo anti-FAS-R induce la agregación del FAS-R a la superficie celular (muy similar al ligando FAS-R) e induce la ruta de señalización intracelular mediada por FAS-ICE, resultando, en
 5 última instancia, en la muerte celular (citotoxicidad celular mediada por FAS-R). La concentración del anticuerpo monoclonal anti FAS-R (CH-11) usado fueron en el intervalo de 0,01-10 mg/ml, normalmente concentraciones tales como 0.005; 0,05 y 5 mg/ml. Las células fueron tratadas con el anticuerpo anti-FAS en presencia de 10 mg/ml de cicloheximida.

Los resultados de los análisis anteriores muestra que la expresión de FAS-R en las células transfectadas transmite una sensibilidad aumentada a los efectos citocidas de los anticuerpo anti-FAS-R (compárese “fas” con “55.11”). Además, la coexpresión de la región en MORT-1 que contiene la región de homología del “dominio de muerte” y FAS-R (“fas + MORT-1DD”) interfiere fuertemente con la muerte celular inducida por FAS (es decir, mediada por FAS-R) como se esperaría por la capacidad de la región del “dominio de muerte” (DD) de MORT-1 para unirse al “dominio de muerte” de FAS-R (FAS-DD). Por otro lado, la coexpresión de la parte N-terminal de MORT-1 y FAS-R (“fas + MORT1 he”) no interfiere con la muerte celular mediada por FAS-R y, en todo caso potencia algo la citotoxicidad (es decir, aumenta ligeramente la muerte celular).
 10 15

Así, los resultados anteriores indican claramente que la proteína MORT-1 tiene dos regiones distintas en lo que a la unión de FAS-IC y mediación de la actividad citotóxica celular de FAS-IC se refiere.
 20

Estos resultados por tanto también proporcionan una base para el uso de diferentes partes (es decir, fragmentos activos o análogos) de la proteína MORT-1 para diferentes aplicaciones farmacéuticas. Por ejemplo, los análogos o fragmentos o derivados de los mismos de la proteína MORT-1 que contienen esencialmente sólo la porción C-terminal de MORT-1 incluyendo su región de “dominios de muerte” puede ser usado para inhibir los efectos citotóxicos mediados por FAS-R en células o tejidos que contienen FAS-R y de ese modo proteger estas células o tejidos de los efectos nocivos del ligando de FAS-R en casos tales como, por ejemplo, hepatitis aguda. Alternativamente, los análogos o fragmentos o derivados de los mismos de la proteína MORT-1 que contiene esencialmente sólo la porción N-terminal de MORT-1 puede ser usada para potenciar los efectos citotóxicos mediados por FAS-R en células y tejidos que contienen FAS-R llevando de ese modo a la destrucción potenciada de esta células o tejidos cuando se desee en casos tales como, por ejemplo, células tumorales y células T y B autoreactivas. Como se detalla aquí anteriormente, los usos anteriores de las diferentes regiones de MORT-1 pueden ser llevadas a acabo usando los diversos virus recombinantes (por ejemplo, Vaccinia) para insertar la secuencia codificante de la región MORT-1 en células o tejidos específicos que se desea tratar.
 25 30 35

Además, es también posible preparar y usar varias otras moléculas tales como anticuerpos, péptidos y moléculas orgánicas que tienen secuencias o estructuras moleculares correspondientes a las regiones MORT-1 anteriormente mencionadas para lograr el mismo efecto deseado mediado por estas regiones MORT-1.

Por otro lado, MORT-1 puede ser utilizado para identificar de modo específico, aislar y caracterizar otras proteínas que son capaces de unirse a MORT-1 (es decir, proteínas de unión a MORT-1); véanse Ejemplos 2 y 3.

Ejemplo 2

Aislamiento de una proteína de unión a MORT-1

(i) Cribado de doble híbrido y ensayo de expresión de β -galactosidasa de doble híbrido

En una manera análoga al procedimiento descrito en el Ejemplo 1, usando el dominio intracelular de p55 TNF-R (p55 IC) y MORT-1 como cebos, y un cribado de una librería de células B humanas, dos clones de cADN fueron obtenidos, los cuales codifican una proteína capaz de unirse tanto a MORT-1 como a p55-ICE. Ambos clones tienen idénticas secuencias nucleotídicas en el extremo 5' como se muestra en la Fig. 3 (SEQ ID N°: 3).
 50

(ii) Propiedades de unión del ADN recién clonado, en cribados de doble híbrido

Usando el procedimiento de doble híbrido de levadura anteriormente mencionado, una construcción que contiene el nuevo cADN de la proteína de unión a MORT-1 fue usado como “presa” a la cual se añadieron las construcciones de un número de “cebos” en reacciones separadas, para determinar la especificidad de unión de la proteína de unión a MORT-1 codificada por este cADN. Estos “cebos” incluyen construcciones que codifican MORT-1, porciones de MORT-1 (“cabeza” de MORT, aa 1-117, “cola” de MORT, aa 130-245), el p55 IC (206-426 p55) o porción de la misma (el “dominio de unión”, 326-426 p55; y otros aguas arriba del “dominio de unión” es decir 206-326). Los resultados son mostrados en la Tabla 2.
 60

65

TABLA 2

Cebo	Datos de expresión de b-galactosidasa
MORT-1	+++
130-245 MORT-1	+
1-117 MORT-1	-
206-426 p55	+++
326-426 p55	+++
206-326 p55	-
206-308 p55	-
206-345 p55	-
P55 L35INI	-
FasIC	-
233-319 Fas	-
P75 IC	-
CD40 IC	-
pGBT10	-
SNF1	-
Ciclina D	-
Lámina	-

Los resultados anteriores del ensayo de expresión de β -galactosidasa de doble híbrido de la unión del clon a un largo panel de cebos confirmó que la proteína codificada por este clon se une específicamente a los dominios de muerte tanto de la p55 TNF-R como de MORT-1.

En general, la proteína de unión a MORT-1 puede ser utilizada directamente para modular o mediar los efectos asociados a MORT-1 en las células, o, indirectamente, para modular o mediar el efecto del ligando de FAS-R sobre las células cuando este efecto es modulado o mediado por MORT-1. Lo mismo es cierto con respecto a otras proteínas intracelulares o dominios intracelulares de proteínas transmembranas, como se demuestra específicamente para la p55-TNF-R aquí.

Las proteínas de unión a MORT-1 incluyen aquellas que se unen específicamente a la proteína MORT-1 entera o las que se unen a diferentes regiones de la proteína MORT-1, por ejemplo, las regiones indicadas anteriormente N y C terminal de MORT-1. Las proteínas de unión a MORT-1 que se unen específicamente a tales regiones pueden ser usadas para modular la actividad de estas regiones y de ese modo la actividad específica de MORT-1 como se determina por estas regiones.

Ejemplo 3

Aislamiento y caracterización de la proteína MACH. Otra proteína de unión a MORT-1

(i) Cribado de doble híbrido, ensayo de b-galactosidasa de doble híbrido, secuenciación y análisis de secuencia

Usando el procedimiento expuesto en los Ejemplos 1 y 2, una construcción de longitud completa que codifica la proteína MORT-1 humana fue empleada como "cebo" en el sistema de doble híbrido de levadura para aislar un clon de cADN que codifica una nueva proteína de unión a MORT-1. Esta nueva proteína fue originalmente designada MORT-2, y ahora redesignada y referida como MACH (por homóloga de CED3 asociada a MORT-1), en virtud de sus características como se detallan aquí a continuación.

Este clon fue secuenciado mediante procedimientos estándar como se expuso en los Ejemplos 1 y 2 anteriores. Los análisis de secuencia mediante procedimientos estándar y programas computerizados (véase los Ejemplos 1 y 2) revelaron que este cADN tiene una nueva secuencia y codifica una proteína nueva (ni el ADN ni las secuencias de aminoácidos fueron encontradas en las bases de datos de GENBANK o PROTEIN BANK). Además, el cADN que

5 codifica MACH reveló un marco de lectura abierta ORF-B que tiene una fuerte homología con la región anterior (5' aguas arriba) el motivo de "dominio de muerte" de la proteína MORT-1 (véase el Ejemplo 1). En las Figs. 4A-C, la estructura de esa parte del clon de cADN de MACH que contiene el ORF-B (235 residuos de aminoácidos; Fig. 4A); la secuencia aminoacídica deducida (SEQ ID N°:5) del ORF-B de MACH (Fig. 4B); y la secuencia nucleotídica (SEQ ID N° 4) de la molécula de cADN de MACH (Fig. 4C) como se muestra. En la Fig. 4A, la región rayada del ORF-B es

10 la región que comparte alta homología con la región de MORT-1 aguas arriba del motivo del "dominio de muerte" de MORT-1, y esta región de homología ORF-B de MACH consiste en los residuos aminoacídicos subrayados en la Fig. 4B.

El ensayo de doble híbrido de levadura fue aplicado adicionalmente para evaluar la especificidad de unión de

15 MACH a MORT-1, en particular, para definir la región en MORT-1 a la cual se une MACH, así como para determinar cual de las ORFs de MACH interactúa con MORT-1, siendo el procedimiento como se expone aquí anteriormente en los Ejemplos 1 y 2. Brevemente, diversas construcciones de MORT-1 y MACH fueron preparadas para ensayar la interacción de las proteínas codificadas por las construcciones del dominio de unión y activación al ADN Gal4 en las células de levadura SFY526 transfectadas como se evalúa mediante el ensayo del filtro de expresión de b-galactosidasa.

20 Las construcciones del dominio de unión a ADN fueron preparadas en los vectores pGBT9 y las construcciones del dominio de activación fueron preparadas en los vectores pGAD-GM. Para las construcciones del dominio de activación, el cADN de MACH de longitud completa (MACH) fue usado, al igual que lo fue una construcción que codifica sólo la región ORF-B (MACH B). Las construcciones del dominio de activación testigo fueron aquellas que contenían la secuencia que codifica para MORT-1 completa (MORT-1, testigo positivo) y aquellas que no tienen

25 insertos, es decir, vectores "vacíos" (pGAD -GM). Para las construcciones del dominio de unión al ADN, el cADN de MORT-1 de longitud completa fue usado (MORT-1), como lo fueron las construcciones que codifican sólo para la región aguas arriba de MORT-1 (MORT-1-IDD aa 130-245). Las construcciones del dominio de unión a ADN testigo, que fueron construidas para determinar también la especificidad de la unión a MACH, incluyendo las construcciones que codifican lámina (Lamin), los residuos 287-461 del dominio intracelular del p75 TNF-R humano (p75 IC humano),

30 ciclina D (cyc D), SNF1, residuos 206-426 del dominio intracelular del p55 TNF-R humano (p55 IC humano), la región del "dominio de muerte" del dominio intracelular del Fas-R humano (Fas DD humano), residuos 216-277 del dominio intracelular del CD40 humano (CD40 IC humano), vectores sin inserto o vectores pGBT9 "vacíos" (pGBT9, testigo negativo), y una construcción que codifica la región ORF-B de MACH (MACH B). En el ensayo, el desarrollo de color fue determinado, en el que cuanto mayor fue el desarrollo del color, mayor era la interacción entre las

35 construcciones codificadas por el dominio de unión a ADN y dominio de activación. El desarrollo del color fue descrito mediante símbolos, en los que "+++" y "+" indican el desarrollo de un color fuerte a los 30 y 90 min del ensayo respectivamente, y "--" indican la falta de desarrollo de color a las 24 h del ensayo. En los casos en los que las interacciones no fueron ensayadas, no se indican ningún símbolo. Los resultados de las diversas interacciones para el caso anterior están expuestas en la Tabla 3, mientras que los resultados de las diversas interacciones de las isoformas

40 MACH se describen en la Fig. 5.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 3

	DOMINIO HÍBRIDO			
Híbrido del dominio de unión a ADN	MACH	MACH B	MORT1	pGAD-GH
MORT-1	+++	+++	+++	---
<u>Región de unión en MORT-1</u>				
MORT1 (-117)				
MORT1DD (130-245)	---	---		
<u>Ensayos de especificidad</u>				
Lámina	---	---		
P75IC humano	---			
Ciclina D				
SNF1				
p55 IC humano				
FAS DD humano	---			
CD40 IC humano	---			
pGBT9	---			
MACH B		+	+	---

Así, como surge de las tablas mostradas en la Tabla 3 a continuación, está claro que:

- (a) MACH se une a MORT-1 en una manera muy fuerte y específica
- (b) El sitio de unión a MACH en MORT-1 tiene lugar antes (aguas arriba) del motivo del “dominio de muerte” en MORT-1, es decir, en la región de MORT-1 definida por aa 1-117 de MORT-1;
- (c) La región ORF-B de MACH es la región de la proteína MACH de interacción con MORT-1; y
- (d) La región ORF-B de MACH es capaz de autoasociación.

(ii) *Efectos citotóxicos celulares mediados por la capacidad de autoasociación de la proteína MACH*

La observación de que MACH se puede autoasociar, en particular, que la región ORF-B de MACH se autoasocia y la correlación previa entre la autoasociación y la citotoxicidad celular como se observa para los dominios intracelulares de p55TNF-R y FAS-R, y como se observa para MORT-1 (véase Ejemplo 1), sugiere que la autoasociación de MACH puede también estar implicada en la citotoxicidad celular.

Para ensayar esta posibilidad, construcciones que codifican MACH fueron preparadas con un vector de expresión controlado por tetraciclina (para detalles véase el Ejemplo 1). Estas construcciones fueron usadas para transfectar células HeLa en las que los vectores fueron expresados de modo transitorio. A parte de las construcciones MACH, otras construcciones testigo fueron usadas para evaluar el efecto de la expresión transitoria en la viabilidad de las células HeLa para las que el efecto de las construcciones MACH podría ser comparado. Estas otras construcciones incluyen MORT-1, FAS-IC humano y luciferasa (Luc). Además, la cotransfección de las células HeLa fue también ensayada usando MORT-1 y construcciones de MACH para determinar los efectos que la interacción entre estos productos podría causar. Tras la transfección de las células HeLa fueron incubadas y la viabilidad celular fue evaluada 48 h tras la transfección bien en presencia o en ausencia de tetraciclina (1 ug/ml) para bloquear la expresión. La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de ingesta de rojo neutro.

Los resultados son mostrados en la Fig. 6, que describe gráficamente el desencadenamiento independiente de ligando de los efectos citocidas en las células transfectadas con MACH en comparación con las células transfectadas con construcciones que codifican las otras proteínas así como las células cotransfectadas (MORT-1 + MACH). Los resultados son mostrados como la viabilidad celular en unidades de DO a 540 nm para cada construcción, en el que para cada construcción, una barra rayada indica incubación de células tras la transfección en ausencia de tetraciclina, y una barra rellena indica incubación de las células transfectadas en presencia de tetraciclina.

A partir de los resultados mostrados en la Fig. 6, es aparente que MACH induce un efecto citotóxico dramático en células HeLa, es decir, la sobreexpresión inducida de cADN de MACH en células HeLa, da como resultado un efecto citotóxico dramático. Este efecto citotóxico es probable que esté relacionado con la capacidad de autoasociación de MACH.

(iii) *Análisis Northern*

Usando procedimientos bien conocidos (véase el Ejemplo 1), los análisis Northern de diversas líneas celulares fueron llevados a cabo usando un cADN MACH como sonda. Los resultados de este análisis muestran que en un gran número de líneas celulares, en particular, las líneas celulares CEM, Raji, Daudi, HeLa, Alexander, Jurkat y A673, existen dos transcritos hibridadores de aproximadamente 3,2 kb en tamaño.

En vista a lo anterior, la proteína MACH, particularmente la proteína MACHb1 (ORF-B de MACH) puede ser utilizada directamente para modular o mediar los efectos asociados con MORT-1 en las células, o indirectamente, para modular o mediar el efecto del ligando de FAS-R en las células cuando este efecto es modulado o mediado por MORT-1. El hecho que MACH se une específicamente a la región aguas arriba de MORT-1 y comparte homología con MORT-1 proporciona una manera específica en la que MACH o ORF-B de MACH puede ser usado para modular esta región específica de MORT-1 y por tanto la actividad específica de MORT-1 determinada por esta región aguas arriba. Además, MACH u ORF-B de MACH puede ser usada como un modulador o mediador de los efectos intracelulares en un modo análogo a la propia MORT-1 (véase anteriormente) en virtud de la capacidad de MACH de autoasociarse e inducir la citotoxicidad celular por su cuenta.

Análisis adicionales de la proteína MACH y las secuencias de ADN que la codifican han sido realizados como se expone aquí a continuación. Además, se reveló que el ORF-B de MACH no representa más que una de las isoformas de MACH. Por tanto, la proteína MACH y las secuencias de ADN que lo codifican han sido ahora renombrada, como será evidente a partir de lo siguiente.

(a) *Cribado de doble híbrido para proteínas que se unen a MORT-1 revela una proteína nueva que comparte un motivo de secuencia con MORT-1*

Como se mencionó anteriormente, para identificar proteínas que participan en la inducción de la muerte celular por MORT-1, la técnica de doble híbrido fue usada para cribar librerías de cADN para proteínas que se unen a MORT-1. Un cribado de doble híbrido de una librería de células B humanas (Durfee y otros, 1993) usando cADN de MORT-1 como cebo dio clones de cADN de MORT-1 misma, reflejando la capacidad de esta proteína para autoasociarse así como clones de TRADD, a los cuales MORT-1 se une eficazmente (véase el Ejemplo 2). El cribado también dio clones de cADN de una secuencia nueva cuyo producto se unió específicamente a MORT-1. La proteína que inicialmente fue llamada MACH, y luego, tras encontrarse que está presente en múltiples isoformas (véase a continuación) fue renombrada MACH b1, mostró también una capacidad para unirse en un ensayo de doble híbrido a sí misma, pero fue incapaz de unirse a FAS-R.

En la Fig 5, se muestran los resultados de la interacción de MORT-1 y MACH en las células de levaduras transfectadas. Brevemente, MORT-1 y MACH b1 y sus construcciones de delección, así como MACHa1, un mutante de MACH a1 en el que la cisteína catalítica Cys₃₆₀ es remplazada por Ser (MACHa1 (C360S)) y el dominio intracelular del FAS-R (Fas-IC) humano; fueron expresados en la levadura SFY526 en construcciones del dominio de unión a ADN Gal4 y el dominio de activación (pGBT9 y pGAD-GH). Su interacción fue evaluada por un ensayo de filtro de expresión de β -galactosidasa como se describe en Boldin y otros (1995n). Los resultados están presente en términos del tiempo requerido para el desarrollo de un color fuerte. ND indica que el ensayo no fue hecho. Ninguno de los insertos examinados interaccionó con un número de testigos negativos ensayados, incluyendo los dominios intracelulares del receptor p55 TNF humano, receptor p75 TNF y CD40, y lámina, ciclina D y los vectores gal4 "vacíos". MACH β 1 fue clonada mediante el cribado de doble híbrido de una librería de células B humanas marcadas con gal4-AD (Durfee y otros, 1993) para las proteínas que se unen a MORT-1, usando la cepa reportera de levadura HF7c. Excepto donde se indica lo contrario, todos los procedimientos experimentales para los hallazgos presentados son como se describieron anteriormente (véase también Holding y otros, 1995). Los análisis de delección mostraron que MACH β 1 se une a la parte N-terminal de MORT-1, que está implicada en la inducción de la muerte celular (Chinnaiyan y otros, 1995). MACH β 1 también se autoasocia en la levadura transfectada. Sin embargo, no se unió a varias proteínas testigo y a diferencia de MORT-1 no fue capaz de unirse a FAS-R (Fig. 5). La expresión de las moléculas de MACH β 1 en células de mamífero dieron una proteína de 34 kDa que se unió a las moléculas MORT-1 coexpresadas con ellas. También fue capaz de unirse a la proteína de fusión GST-MORT-1 *in vitro*.

La comparación de las secuencias de aminoácidos en MACH β 1 y MORT-1 revelaron un motivo de secuencia compartido (designado "Módulo Mort") en estas dos proteínas, distintas del motivo de muerte a través del cual

MORT-1 se une a FAS-R. Este motivo está presente una vez en MORT-1 y dos veces en MACH β 1. El mismo motivo se encuentra también en PEA-15, una fosfoproteína de astrocitos de función desconocida. Datos preliminares sugieren que el motivo MORT está implicado en la unión de MACH β 1 (y de otras isoformas MACH) a MORT-1.

La Fig. 7A describe la secuencia de aminoácidos deducidas (SEQ ID N°:5) de MACH β 1. Los dos módulos MORT están recuadrados y los extremos C terminales de los dos mutantes de delección MACH β 1 empleados (Fig. 7) están indicados mediante asteriscos. La Fig. 7B muestra la homología de secuencia de los módulos en MACH β 1 (designado MACH en la Fig 7 B), MORT-1 y el gen PEA-15 (número de acceso X86809). Residuos idénticos y similares están indicados mediante áreas recuadradas y sombreadas, respectivamente.

La Fig. 8 muestra una representación diagramático del dominio de muerte y los módulos MORT y de la región de homología CED3/ICE en Fas/APO1, MACH β 1 y MACH α 1.

La región en MORT-1 que contiene este “módulo” MORT ha demostrado tomar parte en la inducción de muerte celular por esta proteína (véase el Ejemplo 1 a continuación). Se ha demostrado también que contribuye a, aunque no es suficiente en, la autoasociación de MORT-1 (véase Ejemplo 1). Como se muestra en la Fig. 5, el análisis de las propiedades de unión de las construcciones de delección de MACH β 1 en levaduras transfectadas reveló una implicación similar de los módulos MORT en autoasociación de MACH β 1, así como en su unión a MORT-1: las construcciones de delección en la que la región debajo (aguas abajo del módulo MORT) se ha perdido, fueron incapaces de unirse entre sí, aunque mantuvieron la capacidad para unirse a la MORT-1 de longitud completa y a la MACH β 1 de longitud completa. Una truncación adicional en la que parte de la secuencia del módulo MORT fue también delecionada, dando como resultado la pérdida de la capacidad de unión de las proteínas. Para evaluar adicionalmente la implicación de los módulos MORT en estas interacciones, los mutantes de delección de MACH β 1, unidos con el octapéptido FLAG (FLAG-MACH β 1), fueron expresadas en las células HeLa y evaluadas en lo que respecta a su unión *in vitro* a la proteína de fusión glutatión-S-transferasa-MORT-1 (GST-MORT-1) producida en bacterias. Como se muestra en las figuras 9A-C, de igual modo a la unión observada en el ensayo de doble híbrido de levadura, esta unión *in vitro* se encontró que depende de la interacción de la región en los módulos MACH β 1. Las Figs. 9 A y 9 B mostraron los resultados (autoradiogramas) de la interacción *in vitro* de MACH β 1 y sus mutantes de delección con MORT-1. Brevemente, MACH β 1 metabólicamente marcada con ^{35} [S], MACH β 1 fusionada en su extremo N-terminal al octapéptido FLAG (FLAG-MACH β 1), los mutantes de truncación en el C-terminal de FLAG-MACH β 1, y, como testigo luciferasa, fueron producidos en células HeLa transfectadas. La expresión fue hecha usando un vector de expresión controlado por tetraciclina, en un clon de células HeLa (HtTA-1) que expresan un transactivador controlado por tetraciclina.

La Figura 9A muestra la evaluación de la expresión de las proteínas y sus tamaños moleculares mediante inmunoprecipitación a partir de lisados celulares, usando un anticuerpo anti-FLAG. Los anticuerpos usados son como se indica a continuación: antiseros de conejo anti MACH β 1 y anti-MORT-1 fueron generados frente a las proteínas de fusión GST-MACH β 1 Y GST-MORT1. Los anticuerpos monoclonales de ratón frente al octapéptido FLAG (M2) y frente a FAS/APO1 (CH 11, Yonehara y otros, 1989) fueron adquiridos de Eastman Kodak y Oncor (Gaithersburg, MD) respectivamente. El anticuerpo monoclonal de ratón anti epítipo -HA (12CA5, Field y otros, 1988) y el anticuerpo anti-TNF fueron producidos en el laboratorio de los solicitantes según los métodos normales bien conocidos en la técnica. La Fig. 9B muestra una unión por afinidad de las proteínas a GST-MORT-1, adsorbidas a bolas de glutatión-agarosa (o, como un testigo, a GST o GST-unidas al dominio intracelular de Fas-APO1). La Fig. 9C muestra los resultados de las inmunoprecipitaciones de las diversas construcciones de fusión MORT-1 y MACH usando los diversos anticuerpos específicos.

(b) MACH está presente en múltiples isoformas

Análisis Northern usando cADN de MACH β 1 como una sonda reveló transcrito(s) de aproximadamente 3 kb en tamaño en varias líneas celulares diferentes. Brevemente, los análisis de transferencia Northern de ARN total (14 mg/carril) o ARN poli A $^{+}$ (2 mg) de varias líneas celulares, usando cADN MACH β 1 como sonda fueron realizados. Las líneas celulares examinadas, T47D, CEM, Raji, Daudi, HeLa, Alexander, Jurkat y A673, son todas de origen humano y fueron derivadas a partir de carcinoma ductal de mama, de leucemia de células T linfoblástica aguda, un linfoma de Burkitt, un linfoma de Burkitt, un carcinoma epiteloidal, un hematoma humano, una leucemia aguda de células T y un rhabdoidosarcoma, respectivamente. La forma más bien difusa de la banda que hibrida en las transferencias Northern sugirió que estos transcritos son de tamaños homogéneos que oscilan entre 2,85 y 3,5 Kb. Tanto las cantidades como los tamaños de los transcritos varió entre diferentes tejidos humanos y no estuvieron correlacionados con la expresión de MORT-1 (Chinnaiyan y otros, 1995) o de FAS/APO1 (Watanabe y otros, 1992). Sondas de cADN fueron radiomarcadas con el kit de cebadores aleatorios (random-prime) (Boehringer Mannheim) y aplicado para su análisis de transferencias de múltiples tejidos humanos (Clontech) según las instrucciones del fabricante. En testículo y músculo esquelético, por ejemplo, los transcritos fueron apenas detectados, aún cuando estos tejidos expresan cantidades significativas de MORT-1. Por el contrario, leucocitos mononucleares de sangre periférica, en el que la expresión de MORT1 es muy baja, fueron encontrados que expresan MACH a niveles elevados. La activación de lectina de los leucocitos resulta en un cambio notable en el patrón de tamaños de los transcritos MACH, junto con una inducción de MORT-1.

Explorar la naturaleza de esta heterogeneidad de tamaños, librerías de cADN fueron cribadas en busca de transcritos que hibriden con la sonda de cADN MACH β 1. MACH β 1 y MACH β 2 fueron clonadas de una librería de cADN de Charon BS derivada a partir del mRNA del timo humano. La librería fue cribada en condiciones rigurosas con una

sonda de cADN MACHb1, marcada usando un kit de cebadores al azar (Boehringer Mannheim). Las otras isoformas MACH fueron clonadas por RT-PCR, a partir de ARN total de células linfoblastoides humanas Raji (MACH α 1, α 2, α 3, β 3, β 4 y β 5) y Daudi (MACH α 2, β 2, β 3, β 4, y β 5). La reacción por transcriptasa inversa fue realizada con un cebador oligo-dT adaptador (5'-GACTCGAGTCTAGAGTCGAC(T)17-3'; SEQ ID N°: 26) y la transcriptasa inversa SuperScript II (GIBCO-BRL), usada según las instrucciones del fabricante. La primera ronda de PCR fue realizada con Expand Long Template PCR System (Boehringer Mannheim) usando los siguientes cebadores homosen-
 5 5' y antisentido: 5'-AAGTGAGCAGATCAGAATTGAG-3', correspondiendo a los nucleótidos 530-551 del cADN de MACH β 1 (SEQ ID N°: 4), y 5'-GACTCGAGTCTAGAGTCGAC-3' (SEQ ID N°: 27), respectivamente. La segunda
 10 ronda fue realizada con polimerasa Vent (NEB) usando los siguientes cebadores anidados homosen-5' y antisentido: 5' GAGGATCCCCAAATGCAAACCTGGATGATGAC-3' (SEQ ID N°: 28) y 5'-GCCACCAGCTAAAAACATTCT-CAA-3'; (correspondiendo a los nucleótidos 962-939 de la SEQ ID N°: 4) de cADN de MACH β 1, respectivamente. Para confirmar que MACH β 3 y MACH β 4 tienen codones de iniciación, una secuencia 5' más de estas isoformas del
 15 ARN de las células Raji fue clonado. La reacción de PCR, realizada usando el cebador oligo-dT adaptador como se describe anteriormente, fue seguido por dos rondas de PCR (con polimerasa Vent (NEB)) usando los siguientes oligonucleótidos homosen-5' y antisentido: 5'-TTGGATCCAGATGGACTTCAGCAGAAATCTT-3' (SEQ ID N°: 29) y 5'-ATTCTCAAACCCTGCATCCAAGTG-3' (correspondiendo a los nucleótidos 946-923 de la SEQ ID N°: 4) en
 20 MACH β 1. El último oligonucleótido es específico para las isoformas β . Entre los clones obtenidos de esta manera, aquellos que se encontró que contenían los nucleótidos que codifican para los aminoácidos del "bloque 2" (cuya presencia distingue MACH β 3 y MACH β 4 de MACH β 1 y MACH β 2 como se trata a continuación) fueron completamente
 25 secuenciados. Las secuencias de nucleótidos en todas las isoformas clonadas fueron determinadas en ambas direcciones mediante el método de terminación de cadena dideoxi. Sólo clones de cADN parciales de MACH α 3 y MACH β 2 fueron obtenidos. Este cribado reveló la existencia de múltiples isoformas de MACH. Las secuencia aminoacídicas de ocho de estas isoformas fueron estudiadas en detalle. Los resultados son ilustrados diagramáticamente en la Fig. 12 y ejemplificados en la Fig. 13 en las que las secuencias aminoacídicas de tres de las isoformas son comparadas con
 30 homólogos conocidos.

La Fig. 10 muestra una representación diagramática de las diversas isoformas MACH. Las regiones codificantes están representadas mediante áreas recuadradas. Los diversos dominios en las regiones codificantes son indicados mediante diferentes sombreados como se indica a continuación: los módulos MORT-1;

30



los tres bloques de secuencias de aminoácidos que están presentes en diferentes combinaciones en las isoformas. Las
 35 posiciones de los residuos en la región de homología CED3/ICE implicada en la actividad catalítica de ICE basada en su estructura cristalina por rayos X como se muestra. El residuo de cisteína catalítica está también indicado por una estrella (*). Estas partes de la secuencia de nucleótidos MACH α 1 que faltan en las secuencias de otras isoformas están indicadas en los diagramas de las últimas isoformas mediante líneas conectoras en forma de V. Las longitudes de estas
 40 regiones de cADN, que probablemente corresponden a distintos exones, están indicadas por debajo del diagrama de MACH α 1. La falta de 65 nucleótidos que en MACH α 1 codifican el "bloque 2" causan la alteración en MACH β 1 y MACH β 2 del marco de lectura de los nucleótidos que codifican el "bloque 3". En estas isoformas, por lo tanto, estos
 45 nucleótidos codifican otros aminoácidos que juntos constituyen su región C-terminal única. Por otro lado, en MACH β 3 y MACH β 4 el marco de lectura del bloque 3 es mantenido, pero su ausencia de los nucleótidos que codifican la región CED3/ICE y partir de la región 3' no codificante resulta en la alteración del marco de lectura de los nucleótidos
 50 aguas mas abajo. Debido a esta alteración, la parte más 5' de esta región aguas abajo no codificante no codifica 10 aminoácidos, que constituyen la región C terminal única de estas dos isoformas (Aes rayadas indicadas en la figura, solo clones de cADN parciales de MACH α 3 y MACH β 2 fueron obtenidos.

Las isoformas fueron clonadas a partir de una librería de cADN de células B humanas (MACH β 1), a partir de
 50 librerías de cADN de timo humanas (MACH α 1 y α 2) y a partir del mRNA de las células linfoblastoides humanas Raji (MACH α 1, α 2, α 3, β 3, β 4, y β 5) y Daudi (MACH α 2, β 2, β 3, β 4, y β 5). El clonaje del mRNA de las células Raji y Daudi fue hecho mediante RT-PCR, usando oligonucleótidos correspondientes a una región 3' no codificante y a una
 55 secuencia dentro del segundo módulo MORT en MACH β 1. El codon de iniciación de clones aislados de ese modo es por tanto localizado dentro del segundo módulo MORT. La secuencia de cADN y la secuencia aminoacídica de las isoformas MACH son presentadas en el listado de secuencias e identificadas como sigue en la Tabla 4.

60

65

TABLA 4

	Isoforma MACH	Secuencia cADN	de Secuencia aminoacídica
5	MACH α 1	SEQ ID N°:14	SEQ ID N°:7
10	MACH α 2	SEQ ID N°:17	SEQ ID N°:18
	MACH α 3	SEQ ID N°:19	SEQ ID N°:20
	MACH β 1	SEQ ID N°:4	SEQ ID N°:5
15	MACH β 2	SEQ ID N°:21	SEQ ID N°:22
	MACH β 3	SEQ ID N°:23	SEQ ID N°:8
	MACH β 4	SEQ ID N°:24	SEQ ID N°:25
20	MACH β 5	SEQ ID N°:33	SEQ ID N°:34

25 Las secuencias en las diferentes isoformas se relacionan entre sí como sigue: (a) todas las isoformas MACH comparten una región N-terminal común de 182-aminoácidos que comprenden los módulos MORT, aunque varía en los extremos carboxilo terminales (3' aguas abajo) de estos módulos, así como en las regiones no codificantes. (b) en base a sus secuencias C terminales, las isoformas caen en dos subgrupos: cuatro isoformas definidas como subgrupo b, tienen diferentes extremos C terminales debido a la alteración en el marco de lectura. Dos (MACHb1 y b2) comparten el extremo C-terminal encontrado en la isoforma inicialmente clonada en el cribado de doble híbrido y dos (MACHb3 y b4) comparten un extremo C-terminal diferente; tres isoformas, definidas como subgrupo a, tienen una región C-terminal mucho más larga que se asemeja mucho a las proteasas de la familia CED3/ICE (véase a continuación); (c) las regiones que se extienden entre la región del módulo MORT y la región C terminal que define los subgrupos varió de una isoformas a otra. Sin embargo, un examen cuidadoso mostró que estas regiones intermedias consisten en diferentes combinaciones de los tres bloques de secuencias aminoacídicas (bloques 1, 2 y 3). Las variaciones de secuencias de aminoácidos entre los diferentes clones reflejan dos tipos de variaciones en la secuencia de nucleótidos que muy probablemente están presentes mediante corte y empalme alternativo: (a) inserción o ausencia de cualquier de las dos secuencia nucleotídicas, una de 45 nucleótidos (nts) y la otra de 65 nts, o de ambas por debajo de los nucleótidos que codifican Lys 184; (b) presencia de un inserto adicional dentro de la región que en MACHb1 constituye la parte 3' no codificante. Esta variaciones afectan tanto al marco de lectura abierto como a la longitud de la proteína.

Parte de las isoformas MACH abarcan un homólogo CED3/ICE. Una búsqueda en bases de datos reveló que la región C terminal de las isoformas MACH incluye el bloque 3 y la secuencia que se extiende aguas abajo de ella, se asemeja mucho a proteasas de la familia de CED3/ICE. La Fig. 11 presenta la comparación de secuencias de esta región en MACH y los diversos miembros humanos conocidos de esta familia así como la proteína ced3 de *Caenorhabditis elegans*. CED3 (Ellis y Horvitz, 1986; Yuan y otros 1993) y las proteasas humanas conocidas de la familia de proteasas CED3/ICE; CPP32 (Fernandez-Alnemri y otros, 1994), también llamada apopainina (Nicholson y otros, 1995) y Yama (Tewari y otros, 1995n), Mch2a (Fernández-Alnemri y otros, 1995), Ich-1 (Wang y otros, 1994; el homólogo humano de la proteína Nedd2, Kumar y otros, 1994), ICE_{rel}, II (Munday y otros, 1995), ICE_{rel}, II (Munday y otros 1995), también llamada TX e Ich-2 (Faucheu y otros, 1995; Kamens y otros, 1995), e ICE (Thornberry y otros, 1992; Cerretti y otros, 1992). La Fig. 11 describe esquemáticamente el alineamiento de secuencias aminoacídicas colineal de las isoformas MACH y los diversos miembros de la familia de proteasas CED/ICE. Se muestran las secuencias de aminoácidos de MACH α 1, MACHb1, MACHb3 así como la de la proteasa de *Caenorhabditis elegans* CED3, y de la conocida proteasa humana de la familia de proteasas CED3/ICE.

55 La región C-terminal arriba indicada de MACH se asemeja mucho a CPP32 (con un 41% de identidad y 62% de homología) y CED3 (con un 34% de identidad y 56% de homología). Muestra una similitud significativamente menor a ICE (con un 28% de identidad y 50% de homología) y a sus homólogos ICE_{rel}II próximamente relacionados (también llamados TX e Ich2) e ICE_{rel}III. La similitud fue observada a través de casi toda la región comenzando desde la Tyr226 en el bloque 3, hasta el extremo C-terminal de las isoformas MACH α .

Dos puntos de similitud son particularmente notables:

65 (a) todas las proteasas conocidas de la familia CED3/ICE de proteínas de corte en los sitios definidos por la presencia de un Asp en la posición P1 y un residuos aminoacídico hidrofóbico pequeño en la posición P1. Su especificidad difiere, sin embargo, en lo que respecta a otras características estructurales del sustrato, incluyendo la naturaleza de los residuos en las posiciones P2-P4. Consecuentemente, los residuos del sitio activo implicados en catálisis (correspondiente a His237, Gly238 y Cys285 en ICE) y en el bolsillo de unión para la cadena lateral carboxilato del Asp P1

(Arg179, Gln283, Arg 341 y probablemente también Ser347) están conservados entre estas proteasas. Como se muestra en la Fig. 11, estos residuos (marcados por el sombreado de los residuos y por círculos rellenos o vacíos debajo de las secuencias) están también conservados en MACH α 1. Hay una excepción, aunque, un cambio conservativo de Ser a Thr en el sitio correspondiente a Ser347 de ICE. Otra ligera, pero potencialmente importante, diferencia de secuencia entre las isoformas MACH α y otros miembros de la familia de proteasas es un remplazamiento Arg por Gln del residuo correspondiente a Arg286 de ICE. Este residuo, que es adyacente al residuo de cisteína catalítico putativo, está completamente conservado en todos los otros miembros de la familia CED3/ICE. También parte de los residuos en los sitios situados cerca de los residuos P2-P4 del sustrato (marcados por triángulos por debajo de las secuencias en la Fig. 11) difieren en las isoformas MACH α a partir de estos encontrados en otros miembros de la familia CED3/ICE.

(b) Proteasas de la familia CED3/ICE contienen sitios de autocorte. Se conoce ciertamente que varias de las proteasas son autoprocesadas, y dependen de este procesamiento para mostrar la actividad catalítica máxima. Su forma completamente bioactiva está compuesta de dos productos de corte asociados de modo no covalente, que difieren en tamaño (p20 y p17 en ICE; p17 y p12 en CPP32, como se indica mediante flechas en la Fig. 11) la presencia de sitios potenciales de autocorte en otros miembros de la familia sugiere que están sujetos a un procesamiento similar, y, de igual modo, dependen en este procesamiento para exhibir la actividad máxima. Tales sitios potenciales de autocorte están presentes en MACH α 1 casi en las mismas posiciones como en CPP32 (véase los recuadros sombreados en la Fig. 11). El sitio correspondiente al extremo de la subunidad p17 de CPP32 está situado en el segundo bloque de aminoácidos conservado, justo unos pocos aminoácidos aguas arriba del extremo N terminal de la región de homología CED3/ICE (por debajo de Asp 216). El sitio correspondiente al punto de corte entre las dos subunidades de CPP32 está situado, como en los otros miembros de la familia CED3/ICE que se conoce que están cortados, unos pocos aminoácidos aguas abajo del residuo de cisteína catalítica (debajo de Asp 374). Esta conservación sugiere que la región de homología CED3/ICE en MACH1 está sometida al procesamiento proteolítico. Los tamaños de los dos productos esperados de este corte están muy próximos a los de las dos subunidades de la molécula CPP32 procesada.

(c) La región de homología CED3/ICE en MACH tiene actividad proteolítica

Para descubrir si la región de homología CED3/ICE en MACH α posee actividad proteolítica, los solicitantes expresaron la región que se extiende desde el sitio de corte potencial aguas arriba de esta región, entre Asp 216 y Ser 217, hasta el extremo C terminal de la proteína en bacterias, como una proteína de fusión. Los lisados bacterianos fueron examinados en lo que respecta a su capacidad para cortar los sustratos peptídicos fluorogénicos, mostrados antes del corte por otros homólogos CED3/ICE. Dos sustratos peptídicos fueron usados: el primero, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-a-(4-Metil-Cumaril-7-amida)(Ac-DEVD-AMC), corresponde a una secuencia de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), una proteína nuclear encontrada que se corta en las células poco después de la estimulación con FAS-R (Tewari y otros, 1995b), así como en otros procesos apoptóticos (Kaufmann, 1989; Kaufmann y otros, 1993; Lazebnik y otros, 1994). Este sustrato fluorogénico está cortado de modo eficaz por CPP32. El segundo sustrato fluorogénico, Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-AMC (Ac-YVAD-AMC), corresponde a un sitio de sustrato para ICE en el precursor de IL-1b. Este sustrato fluorogénico es cortado por ICE. Como se muestra en las Figs. 12A-F y 13A-B, lisados de bacteria que expresan la región de homología CED3/ICE en MACH α 1 cortó de modo eficaz el sustrato fluorogénico derivado de la secuencia PARP. No tuvieron ninguna actividad proteolítica medible, sin embargo, frente al sustrato fluorogénico derivado de la secuencia precursora IL-1B (testigos), Ac-YVAD-AMC, que es un sitio de corte ICE en el precursor IL-1b (Thornberry y otros, 1992). La actividad proteolítica fue bloqueada mediante ácido yodoacético (5 mM), confirmando que está mediada por una tiol proteasa. No se observó ningún corte con lisados que contenían la región de homología CED3/ICE de MACH unida a GST en el que el residuo Cys360 de la cisteína catalítica fue remplazado por Ser. También, los lisados de las bacterias que expresaron la proteína MACH α 1 completa como una proteína de fusión GST no cortaron Ac-DEVD-AMC, probablemente debido a la ausencia de enzimas bacterianas capaces de procesar la molécula completa. Ni tuvo lugar un corte con los lisados que contenían cualquiera de los dos productos de corte potenciales de la región de homología CED3/ICE.

Las Figs. 12A-F y 13A muestran las cinéticas de corte del sustrato fluorogénico derivado de la secuencia PARP, Ac-DEVD-AMC (50 μ M), por extractos de *E. coli* que expresan una proteína de fusión GST de la región de homología CED3/ICE en MACH α 1 (Ser 217 a través del extremo C terminal de la proteína) comparado con la falta de corte mediante extractos de bacterias que expresan las proteínas de fusión a GST de la molécula de MACH α 1 completa o de cualquier de los dos productos proteolíticos potenciales de la región de homología CED3/ICE (Ser 217 hasta Asp 374 y desde Asp 374 hasta el extremo C-terminal de la proteína).

También muestra la dependencia de la concentración de sustrato del corte de Ac-DEVD-AMC, incubada durante 180 min. Con extractos de bacterias expresando la región de homología CED3/ICE MACH α 1 en fusión con GST (véase la Fig. 13 B). No se observó ningún corte en presencia de ácido yodoacético (5 mM). Los extractos no tuvieron actividad en Ac-YVAD-AMC, un sustrato fluorogénico correspondiente al sitio de sustrato para ICE en el precursor IL-1b.

Brevemente, las proteínas de fusión GST fueron producidas en bacterias XL1-blue usando el vector de expresión pGEX3. Las bacterias fueron lisadas mediante sonicación en un tampón que contenía 25 mM HEPES (pH 7,5), 0,1% 3-[3-colamido propil]dimetil-amino]-1-propanosulfonato, 5 mM EDTA y 2 mM DDT, seguido por centrifugación a 16.000X g durante 10 min. El análisis por SDS-PAGE confirmó la presencia de niveles similares de las diversas proteínas de fusión en los lisados (no mostrado). Alícuotas de 50 μ l de los extractos (4 mg/ml de proteína total) fueron

incubados a temperatura ambiente durante los períodos indicados en un volumen de reacción total de 500 μ l con los sustratos fluorogénicos, a las concentraciones indicadas. La liberación de AMD fue medida mediante espectrofluorimetría a una longitud de onda de excitación de 380 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. La concentración de AMC fue determinada a partir de una curva de patrones. Ambos péptidos sustratos fluorogénicos fueron obtenidos de Peptide Institute Inc. (Osaka, Japón). Otras proteasas CED3/ICE demostraron que exhibían una actividad completa sólo tras el procesamiento proteolítico, que tiene lugar bien por auto corte, o vía su corte por otras proteasas (revisado en Kumar, 1995; Henkart, 1996). La observación de los lisados de bacterias que expresan moléculas GST-MACH α 1 no poseen actividad enzimática, a diferencia de la actividad observada en lisados de bacterias que expresan la región de homología CED3/ICE, sugiriendo que el procesamiento es también requerido para la actividad MACH α . La manera en que el procesamiento de MACH tiene lugar dentro de las células de mamíferos, y como este procesamiento es provocado por el desencadenamiento de FAS-R o p55-R, no se conoce. MORT-1 se ha demostrado que se une en las células a FAS-R activado junto con algunas otras proteínas (Kischkel y otros, 1995). Estas proteínas es probable que incluyan MACH α 1 y otras isoformas MACH. Parece posible que la unión de MORT-1 en asociación con MACH α a FAS-R una varias moléculas MACH juntas, o incluya cambios conformacionales en ellas, y que estos cambios desencadenen bien el procesamiento proteolítico de MACH α o hagan MACH α susceptible de corte por otras proteasas. La estimulación de p55-R puede desencadenar el autoprocésamiento de MACH α en una manera similar, aunque menos directa, juntando varias moléculas TRADD, o induciendo un cambio conformacional en ellas, que a su vez inducen un cambio en la formación o estado de agregación de MORT-1 y su molécula MACH asociada.

La especificidad de sustrato de MACH α parece estar más bien “orientada a la muerte”. Aunque podría cortar un péptido sustrato correspondiente a un sitio de corte en el sustrato de muerte PARP (Ac-DEVD-AMC), MACH α no mostró ninguna actividad proteolítica hacia un péptido correspondiente al sitio de procesamiento del precursor IL-1 β por ICE (Ac-YVAD-AMC). La identificación de las proteínas celulares que sirven como sustrato para el corte por MACH α elucidarán los eventos aguas más abajo en la inducción de muerte por esta proteasa. Sustratos probables para el corte de MACH α son otros miembros de la familia CED3/ICE, como CPP32 e ICE. Algunas de estas proteasas son ciertamente procesadas tras el desencadenamiento del receptor FAS-R o TNF (Miura y otros, 1995; Schlegel y otros, 1996; Chinnaiyan y otros, 1996). Tal vez proteasas que no pertenecen a la familia CED3/ICE puedan también activarse por MACH α , bien directamente o a través de la acción de otras proteasas CED3/ICE. La implicación de múltiples proteasas en el proceso de muerte celular es consistente con la capacidad documentada de los inhibidores de diversas proteasas, incluyendo inhibidores de las serín proteasas y un inhibidor del corte por ICE así como el cADN antisentido de ICE, para proteger las células de la toxicidad inducida por el receptor FAS-R y TNF (Weitzen y Granger, 1980; Ruggiero y otros, 1987; Enari y otros, 1995; Los y otros, 1995).

Una variedad de otras enzimas, incluyendo fosfolipasas, esfingomielinasas y proteína quinasas, pueden participar en la inducción de muerte celular por los receptores de TNF y FAS-R (véase Eischen y otros, 1994; Vandenabeele y otros, 1995; Cifone y otros, 1995 y referencias quí). Algunas de estas enzimas pueden activarse por el corte proteolítico iniciado por MACH α . También parece posible, si embargo, que al menos parte de estas otras actividades relacionadas con la muerte celular están estimuladas por distintas rutas de señalización, independientemente de la estimulación de MACH α . La implicación de más de una cascada de señalización en la inducción de la muerte celular, algunas comunes a p55-R y Fas/APO1 y algunas inducidas sólo por una de ellas, sería consistente con los documentos sobre las características tanto compartidas como únicas de los procesos de muerte celular inducida por los dos receptores (Grell y otros, 1994; Schulze-Osthoff y otros, 1994; Wong y Goeddel, 1994; Clement y Stamenkovic, 1994).

(d) *MACH α 1 se une a MORT1 así como a MACH β 1*

Para descubrir si MACH α 1 se puede unir a MORT1, como lo hace MACH β 1, la interacción de las proteínas con las levaduras transfectadas fue examinada por primera vez. MACH α 1 pareció tener un efecto citotóxico significativo en las levaduras. Este efecto que se manifestó en una disminución marcada en el número de colonias en levaduras que expresaron la proteína en el vector del dominio de activación (AD) (cuyo nivel de expresión es mayor que el del vector del dominio de unión a ADN (DBD)). Por otro lado, MACH β 1 en el que el residuo de cisteína catalítica, Cys360, remplazado con Ser (MACH α 1 (C360S)) no fue citotóxico para ninguna célula de mamífero (véase a continuación), o levadura. Al igual que MACH β 1, MACH α 1 (C360S) unida en levaduras transfectadas a MORT1 y también a sí mismo. También se unió a MACH β 1. También, las levaduras que expresan el MACH α 1 salvaje junto con MORT-1 o MACH β 1 exhibieron interacción de las proteínas transfectadas. La intensidad del color del producto lacZ varió, sin embargo, entre las colonias de levaduras; en levaduras transfectadas con MACH α 1 tanto en los vectores AD como BD no se observó ningún producto coloreado, probablemente debido al efecto citotóxico del MACH α 1 salvaje. Aún así, pese a esta variación, las levaduras que expresan MACH α 1 bien con combinación con MORT1 o en combinación con MACH β 1 fueron claramente positivas para la interacción de las proteínas transfectadas. A diferencia de MACH β 1, MACH α 1 no exhibió una autointeracción en el ensayo de doble híbrido (Fig. 5).

Tanto MACH α 1 (C360S) como MACH β 1 coinmunoprecipitaron con MORT-1 a partir de lisados de células embrionarias humanas 293-EBNA, indicando que se unen a MORT1 también en células de mamífero. Para ensayar adicionalmente si MACH α 1 puede unirse a MORT1 también dentro de células de mamíferos, MACH α 1 o MACH β 2, unidas con el octapéptido FLAG fueron expresadas junto con las moléculas MORT1 marcadas con el epítopo HA. MACH α 1 y MACH β 1 metabólicamente ^{35} [S] unidas a sus extremos N-terminales al octapéptido FLAG (FLAG-MACH α 1 y β 1), y MORT1 unido por su extremo N terminal al epítopo HA (Field y otros, 1988) fueron expresadas en células HeLa.

La inmunoprecipitación de las proteínas a partir de los lisados de las células fue realizada usando anticuerpos monoclonales frente al octapéptido FLAG (M2; Eastman Kodak), epítipo HA (12CA5, Field y otros, 1988) o el receptor p75 TNF (N° 9, Bigda y otros, 1994) como testigo. Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12% acrilamida) seguido por autoradiografía. Tanto MACH α 1 como MACH β 2 coimmunoprecipitaron con MORT1 a partir de lisados de las células, indicando que se unen a MORT1. La eficacia de interacción de MACH α 1 con MORT1 pareció ser menor que la de MACH β 1.

(e) *Moléculas MACH que contienen la región de homología CED3/ICE pueden mediar la muerte celular*

Para explorar la implicación de MACH en la inducción de muerte celular, el efecto de la sobreexpresión de diversas isoformas MACH en la viabilidad celular fue examinada. El ensayo fue realizado transfectando vectores de expresión de MACH junto con el vector de expresión de β -galactosidasa como un marcador de transfección en células de riñón embrionarias humanas 293-EBNA y células de carcinoma de mama MCF7.

Brevemente, células 293-EBNA, células de carcinoma de mama humanas MCF7 y células HeLa HtTA-1 fueron hechas crecer en medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 10% de suero de ternera fetal, aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml estreptomycin. Placas de cultivo de tejido celular (5×10^5 de células 293-EBNA, 3×10^5 de células MCF7 o 3×10^5 células HeLa en placas de 6 cm) fueron transfectadas de modo transitorio, usando el método de precipitación por fosfato cálcico, con los cADNs de las proteínas indicadas junto con el vector de expresión de β -galactosidasa. En los experimentos presentado en las Figs. 14a-d y 15, cada placa fue transfectada con 3,5 mg de la construcción de MACH indicada y 1,5 μ g de pSV- β -gal. En los experimentos presentado en las Figuras 16A-D y 17-19, cada placa fue transfectada con 2,5 μ g de la construcción MACH o MORT1 indicadas (o como testigo, vector vacío) y 1,5 ug de pSV- β -gal. Las células fueron lavadas de 6 a 10 h tras la transfección. Las células 293-EBNA y MCF7 fueron incubadas durante unas 18 h adicionales sin tratamiento adicional. Las células HeLa fueron incubadas durante 26 h tras la transfección y luego durante 5 h en presencia de bien un anticuerpo anti-Fas APO1 (CH11, 9,5 ug/ml) o bien TNF (100 ng/ml), junto con cicloheximida (10 ug/ml). La extensión de la muerte celular al final de los períodos de incubación fue evaluada mediante la determinación de la expresión de β -galactosidasa, como se describe por Kumar y otros, 1994.

Cultivos transfectados con un vector de expresión de bien MACH α 1 o MACH α 2 exhibieron una muerte celular masiva, manifestada por redondeamiento celular, vesiculación, contracción, y finalmente separación de las células de la placa (Fig. 14B). A las 20 h tras la transfección, la mayoría de las células transfectadas, identificadas por la tinción de β -galactosidasa (X-Gal), mostraron una morfología condensada típica de apoptosis (Figura 14B). Por el contrario, las células que expresan el vector vacío permanecieron viables.

En particular, las Figs. 14A-D muestran la morfología de las células de riñón embrionarias humanas 293-EBNA que expresan de modo transitorio las isoformas MACH indicadas. Las flechas (Fig 14B) indican las células apoptóticas. Las fotografías fueron tomadas 26 h tras la transfección. La Fig. 15 muestra la cuantificación de muerte inducida por MACH de las células 293-EBNA (recuadros de bandas) y MCF7 (recuadros negros) mediante la determinación de la porción de las células que expresan β -galactosidasas que exhiben morfología apoptótica 20 h tras la transfección de las construcciones indicadas. Los datos son a partir de tres experimentos independientes con las células 293-EBNA y dos experimentos independientes con las células MCF7. se expresan como el porcentaje medio de las células azules que exhiben signos de apoptosis como una fracción del número total de células azules contadas (alrededor de 500 células por muestra).

Para examinar la implicación de la región de homología CED3/ICE dentro de las isoformas MACH α en sus efectos apoptóticos, las células fueron transfectadas con el vector de expresión para la isoforma MACH β 1, que carece de la región de homología CED3/ICE, así como con los vectores de expresión para MACH α 3, que carece de una parte N-terminal de la región, y con vectores de expresión para MACH α 1 (C360S) y para el mutante truncado en el extremo C terminal de MACH α 1 (MACH α 1 (1-415)), que carece de uno de los residuos que se cree que son críticos para la función de la proteasa CED3/ICE (correspondiente a Ser 347 en ICE). No tuvo lugar ninguna muerte (más allá de la ligera cantidad observada en las células transfectadas con un vector de expresión vacío) presente en las células 293-EBNA o MCF7 transfectadas con los vectores de expresión para MACH α 3, MACH α 1 (1-415) o MACH α 1 (C360S). Por otro lado, las células transfectadas con MACH α 1 junto con estos vectores también exhibieron muy poca muerte celular, indicando que las moléculas MACH que contienen una región CED3/ICE incompleta tiene un efecto dominante negativo en la actividad de las moléculas salvajes. Los cultivos que expresan MACH β 1, que no contiene la región CED3/ICE en absoluto, exhibieron alguna ligera muerte celular (Figura 15). Este efecto de MACH β 1, que más probablemente resulta de la activación de las moléculas MACH α 1 endógenas, fue por alguna razón más pronunciado en las células HeLa. Por otro lado, en las células HeLa MACH α 3, MACH α 1 (1-415) y MACH α 1 (C360S) fue también algo citotóxico (Figura 19).

La Figura 8 presenta diagramáticamente la interacción del receptor y la proteína diana que participan en la inducción de muerte celular por FAS/APO1 (FAS-R) y p55-R. La actividad parece constituir la etapa enzimática más aguas arriba en la cascada de señalización para los efectos citocidas de FAS/APO1 y p55-R. La capacidad de MACH β 1 para unirse tanto a MORT-1 como a MACH α 1 sugieren que esta isoforma potencia la actividad de las isoformas enzimáticamente activas.

Es posible que algunas de las isoformas tengan funciones adicionales. La capacidad de MACH β 2 para unirse tanto a MORT-1 como a MACH α 1 sugieren que esta isoforma puede potenciar la actividad de las isoforma enzimática-mente activas. La citotoxicidad moderada observada en cultivos de 293-EBNA y MCF7 transfectados con esta isoforma y el efecto citotóxico bastante significativo que ejerce en células HeLa probablemente refleja la activación de las moléculas MACH α expresadas tras la unión a las moléculas MACH β 1 transfectadas. Posiblemente, algunas de las isoformas MACH podrían también actuar como sitios de anclaje para moléculas que están implicadas en otros efectos no citotóxicos de receptores Fas/APO1 y TNF.

(f) *El bloqueo de la función MACH α interfiere con la inducción de muerte celular por Fas/APO1 y p55-R*

Para evaluar la contribución de MACH α a la citotoxicidad de Fas/APO1 (FAS-R) y p55-R, MACH α 3, así como los mutantes MACH α 1 no funcionales, MACH α 1 (1-415) y MACH α (C360S), fueron expresadas en células que fueron inducidas para exhibir esta citotoxicidad. La citotoxicidad inducida por p55-R fue disparada en las células 293-EBNA mediante la sobreexpresión transitoria de este receptor (Boldin y otros, 1995a), y la citotoxicidad de Fas/APO por sobreexpresión de las moléculas quiméricas compuestas del dominio extracelular del p55-R y los dominios transmembrana e intracelulares de Fas/APO1. Por alguna razón, esta quimera tiene un efecto citotóxico mucho mayor que el del Fas/APO1 normal. Las actividades citotóxicas en las células HeLa fue también inducida tratándolas con anticuerpos anti TNF o anti Fas/APO1 en presencia del bloqueante de la síntesis proteica cicloheximida. Las células HeLa fueron hechas sensibles a Fas/APO1 mediante la expresión transitoria de este receptor. En todos los sistemas examinados, MACH α 3 y los mutantes MACH α 1 no funcionales demostraron una protección eficaz frente a la citotoxicidad inducida por el desencadenamiento de Fas/APO1 o p55-R (Figuras 16-19). Tal protección fue también observada, como se describió previamente (Hsu y otros, 1996; Chinnaiyan y otros, 1996), en células transfectadas con un mutante de delección N-terminal de MORT1 que carece de la región de unión a MACH (MORT1 (92-208)). Estos efectos protectores indican que MACH α es un componente necesario de las cascadas de señalización para muerte celular inducidas tanto por Fas/APO1 como por p55-R.

En particular, las Figs. 16A-D muestran la morfología de células 293-EBNA en las que la muerte celular fue inducida mediante la expresión transitoria de una quimera que comprende el dominio extracelular de p55-R (aminoácidos 1-168) unida a los dominios transmembrana e intracelulares de Fas/APO1 (aminoácidos 153-319) (quimera p55-Fas) (Figs. 16A y 16B), o mediante la expresión del p55-R (Figs. 16C y 16D), y de las células que fueron protegidas de estos efectos citotóxicos mediante su transfección simultánea con MACH α 1 (C360S) (Figs. 16B y 16D). Las fotografías fueron tomadas 26 h tras la transfección. La Fig. 17 ilustra la cuantificación de la muerte inducida en células 293-EBNA mediante su transfección con la quimera p55-Fas o con p55-R, junto con un vector vacío, un mutante de delección MORT1 que carece de la región de unión a MACH (MORT1 (92-208)), o moléculas MACH α que contienen una región CED3/ICE no funcional. La Fig. 18 muestra la muerte de las células HeLa que expresan de modo transitorio Fas/APO1, inducidas mediante el tratamiento con anticuerpo anti-Fas/APO (aFas) y cicloheximida (CHI), y su prevención mediante la cotransfección por MORT1DD (92-208), MACH α (C360S) o MACH α 3. La Fig. 19 muestra la muerte de las células HeLa inducida mediante aplicación de TNF y cicloheximida (CHI), y su prevención como en la Fig. 18. Los datos son de al menos dos experimentos independientes y están expresados como en las Figuras 14A-F y 15.

MACH está expresado en diferentes tejidos a niveles marcadamente diferentes y aparentemente también con diferentes patrones de isotipo. Estas diferencias contribuyen probablemente a las características específicas de tejido de la respuesta al ligando Fas/APO1 y TNF. Como en el caso de otros homólogos CED3/ICE (Wang y otros, 1994; Alnemri y otros, 1995), isoformas MACH que contiene regiones CED3/ICE incompletas (por ejemplo MACH α 3) se encuentra que inhibir las actividades de moléculas MACH α 1 o MACH α 2 coexpresadas. También se ha encontrado que bloquean la inducción de muerte por Fas/APO1 y p55-R. La expresión de tales isoformas inhibitoras en células puede constituir un mecanismo de autoprotección celular frente a la citotoxicidad mediada por Fas/APO1 y TNF. La amplia heterogeneidad de las isoformas MACH, que excede ampliamente la observada para cualquiera de las otras proteasas de la familia CED3/ICE, debería permitir un ajuste particularmente fino de la función de las isoformas MACH activas.

La referencia a etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no es de ningún modo una admisión de que algún aspecto, descripción o realización del presente invento sea descrita, enseñada o sugerida en la técnica relevante.

La descripción precedente de las realizaciones específicas revelará de modo completo la naturaleza general del invento que otros pueden, aplicando conocimientos comunes a la técnica (incluyendo los contenidos en las referencias aquí citadas), modificar fácilmente y/o adaptar para diversas aplicaciones tales como realizaciones específicas, sin una experimentación excesiva, sin alejarse del concepto general del presente invento. Por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones pretenden estar dentro del significado y rango de equivalentes a las realizaciones descritas, basadas en la enseñanza y guía presentada aquí. Debe entenderse que la fraseología o terminología aquí es para los propósitos de descripción y no de limitación, tal que la terminología y fraseología de la presente especificación ha de ser interpretada por el experto en la técnica a la luz de las enseñanzas y guías presentadas aquí, en combinación con el conocimiento de alguien con experiencia en la técnica.

Referencias

- Alnemri, E.S. et al.** (1995) *J. Biol. Chem.* 270:4312-4317.
- 5 **Barinaga, M.** (1993) *Science* 262:1512-1514.
- Beidler, J. et al.,** (1995) *J. Biol. Chem.* 270:16526-16528.
- Berger, J. et al.,** (1988) *Gene* 66:1-10.
- 10 **Beutler, B. and Cerami, C.** (1987) *NEJM*: 316:379-385.
- Bigda, J. et al.** (1994) *J. Exp. Med.* 180:445-460.
- 15 **Boldin, M.P. et al.** (1995a) *J. Biol. Chem.* 270:337-341.
- Boldin, M.P. et al.** (1995b) *J. Biol. Chem.* 270:7795-7798.
- Brakebusch, C. et al.** (1992) *EMBO J.*, 11:943-850.
- 20 **Brockhaus, M. et al.** (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3127-3131.
- Cantor, G.H. et al.** (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10932-6.
- 25 **Cerreti, D.P. et al.** (1992) *Science* 256:97-100.
- Chen, C.J. et al.** (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:271-3.
- Chinnaiyan et al.** (1995) *Cell* 81:505-512.
- 30 **Chinnaiyan et al.** (1996) *J. Biol. Chem.* 271:4961-4965.
- Cifone, M.G. et al.** (1995) *EMBO J.* 14:5859-5868.
- 35 **Clement, M.V. et al.** (1994) *J. Exp. Med.* 180:557-567.
- Crisell, P. et al.,** (1993) *Nucleic Acids Res.* (England) 21 (22):5251-5.
- 40 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M. & Varki, A., eds.), (1994) pp.8.1.1-8.1.6 y 16.7-16.7.8, *Greene Publishing Associates, Inc. and Wiley & Sons, Inc.*, New York.
- Dirks, W., et al.,** (1993) *Gene* 128:247-249.
- 45 **Durfee, T. et al.** (1993) *Genes Dev.* 7:555-569.
- Eischen, C.M. et al.** (1994) *J. Immunol.* 153:1947-1954.
- Ellis, H.M. et al.** (1986) *Cell* 44:817-829.
- 50 **Enari, M. et al.** (1995) *Nature* 375:78-81.
- Engelman, H. et al.** (1990) *J. Biol. Chem.*, 265:1531-1536.
- 55 **Faucheu, C. et al.** (1995) *EMBO J.* 14:1914-1922.
- Fernandes-Alnemri, T. et al.** (1994) *J. Biol. Chem.* 269:30761-30764.
- Fernandes-Alnemri, T. et al.** (1995) *Cancer Res.* 55:2737-2742.
- 60 **Field, J. et al.** (1988) *Mol. Cell Biol.* 8:2159-2165.
- Fields, S. and Song, O.** (1989) *Nature*, 340:245-246.
- 65 **Frangioni, J.V. and Neel, R.G.** (1993) *Anal. Biochem.* 210:179-187.
- Geysen, H.M.** (1985) *Immunol. Today* 6:364-369.

- Geysen, H.M. et al.** (1987) *J. Immunol. Meth.* 102:259-274.
- Gossen, M. and Boujard, H.** (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551.
- 5 **Grell, M. et al.** (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:2563-2566.
- Heller, R.A. et al.** (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6151-6155.
- Henkart, P.A.** (1996) *Immunity* 4:195-201.
- 10 **Hohmann, H.-P. et al.** (1989) *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934.
- Howard, A.D. et al.** (1991) *J. Immunol.* 147:2964-2959.
- 15 **Hsu, H. et al.** (1995) *Cell* 81:495-504.
- Hsu, H. et al.** (1996) *Cell* 84:299-308.
- Itoh, N. et al.** (1991) *Cell* 66:233.
- 20 **Itoh, N. and Nagata, S.** (1993) *J. Biol. Chem.* 268:10932-7.
- Joseph, S. and Burke, J.M.** (1993) *J. Biol. Chem.* 268:24515-8.
- 25 **Kamens, J. et al.** (1995) *J. Biol. Chem.* 270:15250-15256.
- Kaufmann, S.H.** (1989) *Cancer Res.* 49:5870-5878.
- Kaufmann, S.H.** (1993) *Cancer Res.* 53:3976-3985.
- 30 **Kischkel, F.C. et al.** (1995) *EMBO J.* 14:5579-5588.
- Koizumi, M. et al.** (1993) *Biol. Pharm. Bull* (Japan) 16 (9):879-83.
- 35 **Kumar, S. et al.** (1994) *Genes Dev.* 8:1613-1626.
- Kumar, S.** (1995) *Trends Biochem Sci.* 20:198-202.
- Lazebnik, Y.A. et al.** (1994) *Nature* 371:346-347.
- 40 **Leithauser, F. et al.** (1993) *Lab. Invest.* 69:415-429.
- Loetscher, H. et al.** (1990) *Cell*, 61:351-359.
- 45 **Los, M. et al.** (1995) *Nature* 375:81-63.
- Martin, S.J. et al.** (1995) *J. Biol. Chem.* 270:6425-6428.
- Mashima, T. et al.** (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209: 907-915.
- 50 **Miller, B.E. et al.** (1995) *J. Immunol.* 154:1331-1338.
- Milligan, C.E. et al.** (1995) *Neuron* 15:385-393.
- 55 **Miura, M. et al.** (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92:98318-8322.
- Munday, N.A. et al** (1995) *J. Biol. Chem.* 270:15870-15876.
- Muranishi, S. et al.** (1991) *Pharm. Research* 8:649.
- 60 **Nagata, S. and Golstein, P.** (1995) *Science* 267, 1449-1456.
- Nicholson, O.W. et al,** (1995) *Nature* 376:3743.
- 65 **Nophar, Y. et al.** (1990) *EMBO J.*, 9:3269-3278.
- Piquet, P.F. et al.** (1987) *J. Exp. Med.*, 186:1280-89.

Ray et al. (1992) *Cell* 69:597-604.

Ruggiero, V, et al. (1987) *Cell Immunol.* 107:317-25.

Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schall, T.J. et al. (1990) *Cell*, 61:381-370.

Schlegel et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:1841-1844.

Schulze-Osthott, K. et al. (1994) *EMBO J.* 13:4587-4596.

Shimayama, T. et al., (1993) *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 29:177-8.

Shore, S.K. et al. (1993) *Oncogene* 8:3183-8.

Sleath, P.R. et al. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265:14526-14528.

Smith, CA. et al. (1990) *Science*, 248:1019-1023.

Song, H.Y. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:22492-22495.

Stanger, B.Z. et al. (1995) *Cell* 81:513-523.

Tartaglia, L. A. et al. (1993) *Cell*, 74:845-853.

Tewari, M. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:3255-3260.

Tewari, M, et al. (1995a) *J. Biol. Chem.* 279:18738-18741.

Tewari, M. et al. (1995b) *Cell* 81:1-20.

Thornberry, N.A. et al. (1992) *Nature* 356:768-774.

Thornberry, N.A. et al. (1994) *Biochemistry* 33:3934-3940.

Tracey, J.T. et al. (1987) *Nature*, 330:662-664.

Vandenabeele, P. et al, (1995) *Trends Cell Biol.* 5:392-400.

Vassalli, P. (1992) *Ann. Rev. Immunol.* 10:411-452.

Wallach, D. (1984) *J. Immunol.* 132:2464-9.

Wallach, D. (1986) In: *Interferon 7* (Ion Gresser, ed.), pp. 83-122, Academic Press, London.

Wallach, D. et al (1994) *Cytokine* 6:556.

Wang, L. et al. (1994) *Cell* 78:739-750.

Watanabe-Fukunaga, R. et al. (1992) *Nature*, 356:314-317.

Watanabe, F.R. et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1274-1279.

Weitzen, M. et al. (1980) *J. Immunol.* 125:719-24.

Wilks, A.F. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1603-1607.

Wong, et al. (1994) *J. Immunol.* 152:1751-1755.

Xue, D. et al (1995) *Nature* 377:248-251.

Yonehara, S. et al, (1989) *J. Exp. Med.* 169:1747-1756.

Yuan, J. et al. (1993) *Cell* 75:641-652.

Zaccharia, S. et al. (1991) *Eur. J. Pharmacol.* 203:353-357.

Zhao, J.J. and Pick, L. (1993) *Nature* (England) 365:448-51.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ADN seleccionada a partir del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de ADN de las SEQ ID N°: 4, 19, 21, 23, 24 ó 33;

(b) una secuencia de cADN que codifica una proteína MACH que es capaz de inhibir la muerte celular que comprende la SEQ ID N°: 5, 8, 20, 22, 25 ó 34;

(c) una secuencia de ADN capaz de hibridar en condiciones moderadamente rigurosas a las secuencias de (a) o (b), en las que la secuencia de ADN codifica una proteína MACH, que es capaz de inhibir la muerte celular;

(d) una secuencia de ADN que es degenerada como resultado del código genético a las secuencias de ADN definidas en (a) o (b) y que codifican una proteína MACH que es capaz de inhibir la muerte celular; y

(e) un fragmento del ADN de una cualquiera de (a) a (d) que codifica una proteína que es capaz de inhibir la muerte celular.

2. Un vector que comprende una secuencia de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia de ADN codifica una proteína MACH que es capaz de inhibir la muerte celular.

3. El vector de la reivindicación 2 capaz de ser expresada en una célula hospedante procariota o eucariota.

4. Las células hospedantes procariotas o eucariotas transformadas que contienen un vector de la reivindicación 2.

5. Una proteína MACH codificada por el ADN de la reivindicación 1.

6. Un método que produce una proteína MACH codificada por la secuencia de ADN de la reivindicación 1 que comprende crecer las células hospedantes transformadas de la reivindicación 4 en condiciones adecuadas para la expresión de dichas proteínas afectando las modificaciones postraduccionales para obtener dicha proteína y aislar dicha proteína expresada.

7. Anticuerpos específicos para la proteína MACH de la reivindicación 5 o fragmentos Fab o F(ab')₂ de dichos anticuerpos.

8. Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo una proteína MACH de la reivindicación 5 o una proteína aislada según el método de la reivindicación 6 o mezclas de las mismas.

9. Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, un vector de virus animal recombinante que codifica una proteína MACH de la reivindicación 5.

10. Una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo una secuencia oligonucleotídica que difiere de una secuencia antisentido de la secuencia MACH de la reivindicación 1.

11. El uso de la proteína MACH de la reivindicación 5 o secuencias que codifican dicha proteína para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el tejido dañado en un shock séptico, rechazo del injerto contra paciente o hepatitis aguda.

12. Un inhibidor de proteasas MACH seleccionado a partir del grupo que consiste en: una proteína que tiene la secuencia aminoácida SEQ ID N°: 7 excepto que tiene un residuo de cisteína en lugar de un residuo de serina en la posición 360 (C360S) y una proteína que tiene aminoácidos 1 a 415 de la SEQ ID N°: 7.

13. Una composición farmacéutica para usar para el tratamiento de tejido dañado en shock séptico, rechazo del injerto contra paciente o hepatitis aguda, que comprende una proteína MACH de la reivindicación 5 o secuencias que codifican dicha proteína.

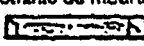
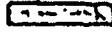
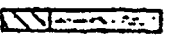
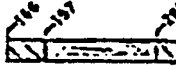
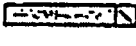
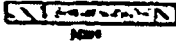
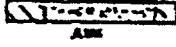
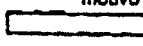
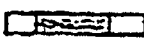
DOMINIO HÍBRIDO DE UNIÓN A ADN		DOMINIO HÍBRIDO DE ACTIVACIÓN					
		MORT1					
		Completa	1-117	130-245	Fas-IC humano	SNF1	PC40-GII
<u>Fas-IC humana</u>							
	Completa	++	-	+	++	-	-
	200-319	++			++	-	-
	233-319	-			-	-	-
	175-306	++	-	+	++	-	-
<u>Fas-IC de ratón</u>							
	Completa	++	-	++	++	-	-
	197-306	++	-	+	++	-	-
	1225N	-	-	-	++	-	-
	1225A	-			++	-	-
<u>MORT1</u>							
	Completa	++	++	-	++	-	-
	1-117	+	-		-	-	-
	130-245	-		-	++	-	-
<u>ENSAYOS DE ESPECIFICIDAD</u>							
p55-IC humano		-			-	-	-
p75-IC humano		-			-	-	-
CD40-IC humano		-			-	-	-
ciclina D		-			-	-	-
Lamina		-			-	-	-
SNF1		-			-	+	-
pGBT9		-			-	-	-

FIG. 1

1/1
 CTG AAT CAG GCA CCC GAG TCC AGG TTC GCG GGT GGA ATC CTT GCG CCC CTC GGT AAG CGG
 V H Q A P E C R F G E G I L G P L G K R
 61/21
 CGA GAG CTG GGT AGC GCG ACC GAG CCG AGG ACA GAG GGT GCG CGG AGC CTC GCG CGG CAG
 R D L A R A S E P R T E G A R R A C P Q
 121/41
 CCC CGC CGC CTT GCA GAG CCC GCG ATG CAG CCG TTC CTC GTG CTC CTC CAG TCC CTC TCC
 P R P L A D P A H D P F L V L L K S V S
 181/61
 TCC AGC CTG TCC AGC AGC GAG CTC ACC GAG CTC AAG TTC CTA TCC CTC GCG CGG CTC CTC
 S S L S S S E L T E L K F L C L G R V V
 241/81
 AAG CGC AAG CTG GAG CGC CTG CAG ACC GCG CTA GAG CTC TTC TCC ATG CTC CTC CAG CAG
 K R K L E R V Q S G L D L F S M L L E Q
 301/101
 AAG GAG CTG GAG CGC GCG CAG ACC GAG CTC CTG CGC GAG CTC CTC GCG TCC CTC CGG CGG
 H D L E P G X T E L L R E L L A S L R R
 361/121
 CAG GAG CTC CTC CGC GCG CTC GAG CAG TTC GAG CGG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG CTT
 M D L L R R V D D F E A G A A A G A A P
 421/141
 CGG GAA GAA GAG CTC TCT GCA GCA TTT AAG CTC ATA TCT GAG AAT CTC GCG AAA GAT TCG
 G E E D L C A A F H V I C D N V G K D W
 481/161
 ACA AGG CTG GGT GGT CAG CTC AAA CTC TCA GAG ACC AAG ATC CAG AGC ATC CAG GAG ACA
 R R L A R Q L X V S D T K I D S I E D R
 541/181
 TAC CCC CGC AAG CTC ACA GAG CGT CTC CGC CAG TCA CTC AAG ATC TCC AAG AAG ACA GAG
 Y P H H L T E R V R E S L R Y W K H T E
 601/201
 AAG CAG AAG GCA ACA GTG GCG CAG CTC GTC GCG GGT CTC AAG TCC TCC CAG ATG AAC CTC
 K E N A T V A H L V G A L R S C Q M N L
 661/221
 CTG GGT GAG CTC GTA CAA GAG GTT CAG CAG GCG GGT GAG CTC CAG AAG AGC ACT GCG GCG
 V A D L V Q E V Q Q A H D L Q Y R S G A
 721/241
 ATG TCC CGC ATG TCA TCG AAC TCA CAG GCA TCT ACC TCC GAG CGC TCC TCA TCG GCG GGT
 H S P H S W H S D A S T S E A S
 781/261
 GGT TTC GGT TCC TCG ACC ACA GCG ATC TAC ACA GCG TCC ACT TCG GTT CTC TCC AGG AAG
 841/281
 GTA CGC CAG CAG TCT GAA CAG CGA CGA CGA AGC CAG GGT CAG TCA GCG ACA CAG CAG CTC
 901/301
 CTT CTC AAG TCA AGC TCC GTT TAT TAA TCC CTC TCC GCG ACT AGC CGC GCG TCC GCG GGT
 961/321
 CCA CAG ATA TTT CCA TTT CTT CCT CAG TAT CAG ACT GAG CAA GAT CTT CTC TCC ACT AAA
 1021/341
 TCA CTT CTT GCG GCA GTA GTT GCA AAG TTC GAA CGG TCT CCA CCA CAG AAG GAA TCT GTC
 1081/361
 CAG ATG ACC AGT CAG ACT GTT ACT CCA CAG CGG AGG AGA CCA GGT CAG AGG CGC AGG AAT
 1141/381
 CGC AGC GAA GCA GAG AGC TCC AGA ACT GCG ATT TCA ACC GCG GCG ATC CTT CAG CAG AGC
 1201/401
 CCA TCC TCA AGC ACT CTC GCG TTC TCC TCC CCG TCC ACT TCC CAG AAA GCA TCT TTC TCT
 1261/421
 CCC ATT TCC TTC CAG GCG ACC GCG ACA CAG CTC CAG ACT AGC GTC AGC CGG GGT GGT CTC
 1321/441
 GTC CGG AGA GCG ATG GGT GCG GTC GCG GTC GCG ACA CCG GGT TCG CGG TCC TCC AGC TCT
 1381/461
 TCC CGC CTC TGT GAG TTE ACT CTC CTC TCT CAG ACT GGT AAG TAG CGG CAG TCA TCC TTC
 1441/481
 CCA GCA CGA ATT GAG ATA ATA TCT GTC AGC TCC TCA TCA GTC ATT CAG ACA CAG CAG TCT
 1501/501
 CTA AAT CTT CTT TCT CAG GAT TAT GCG TCC TCC AAT TCT ACA GTT TCT TAC TCT TTT CTA
 1561/521
 TCA AAA TCA CTA TCT TTC TCA TAA CAG AAT TCC CAA GCG ACC GCG ATC TCC TAT CTT TAA
 1621/541
 AAA GCA GTC CTC TTA TTC CTA AGG TAA TCC TAT TAA AAC ACA GGT TTA CAA CTT CCA TAT
 1681/561
 TAC AAA AAA AAA AAA AAA AAA

FIG. 2

ccgccgccgccgccgccacctgcccagacttttctgttccagggtcagcctgtagtgaatcggcc
gctgagcctgaaggaccaacagacgttcgcgcgctctgtgggtctcaaatggcgcaagggtg
ggcgctcactgcagcgaggctgccgggcgctgcgggacccggcgctggactcgctggccta
cgagtacgagcg....

FIG.3

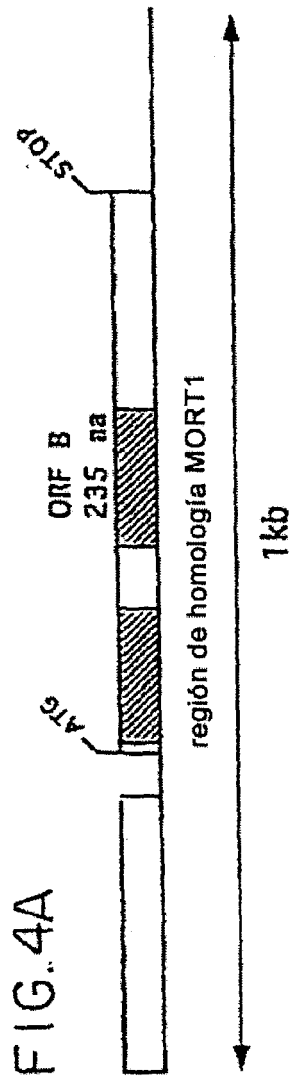
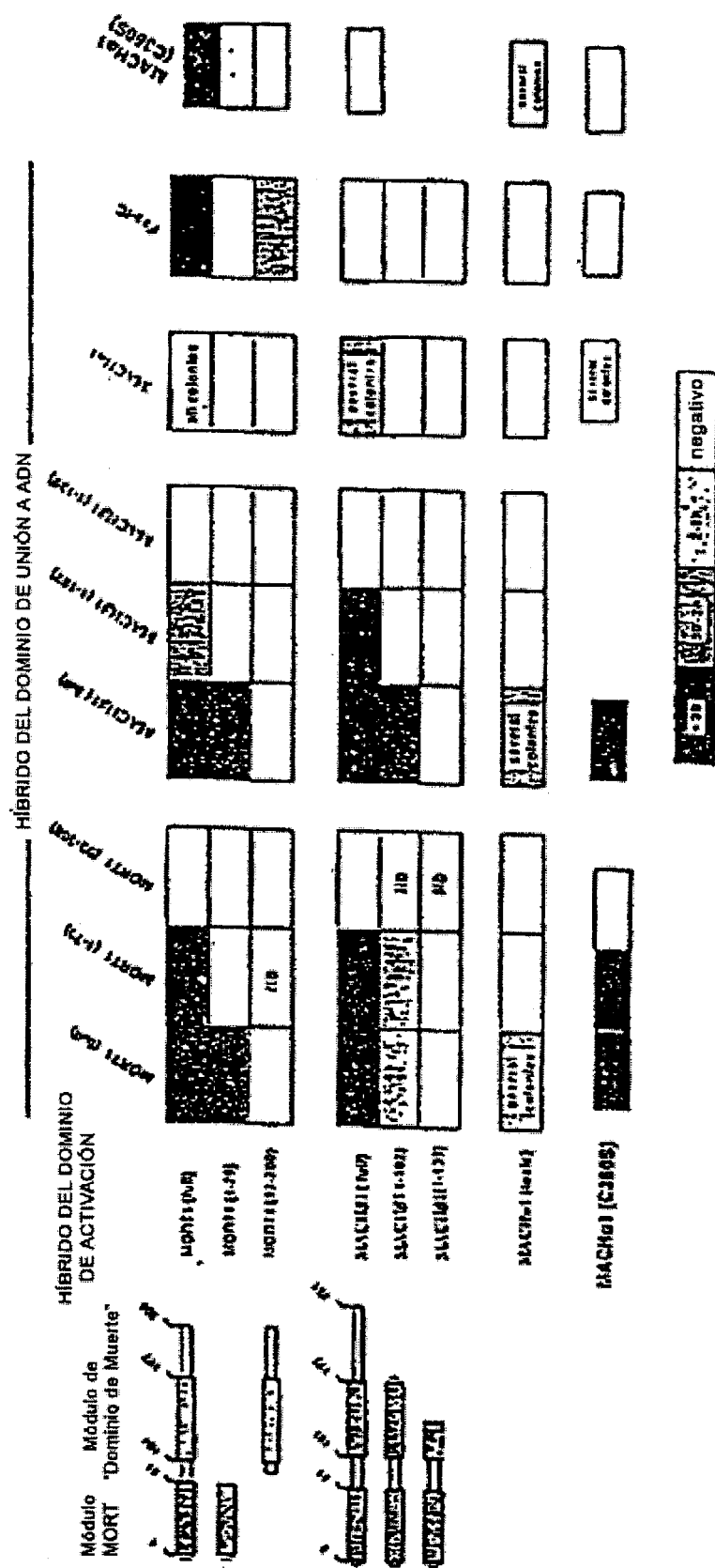


FIG. 4B

1	MDFSRNLYDA	10	GEOLDEEDLA	20	ELKELSDYI	30	PORKOERIAD	40	ALMLEQRLOE	50	KRMLESNLS	60	ELKELLERIN	70	RDLLLITYLN	80
81	TRKEEMEREL	90	QTPGRNQISA	100	YHVMXXOISE	110	EVRSSELRSE	120	KELLOEELSK	130	CKLDDDDNLL	140	DIETEMEKRY	150	ILGEGKLDLL	160
161	KRVCNOINKS	170	LLKIINDYEE	180	FSKRSRSSLE	190	GSPDEFSDNF	200	GQSLPNEKQT	210	SGILSDHQQS	220	QFCKSTGESA	230	QTSQH	235

FIG. 4C

1	CGAGGCCACG	10	LAGGCCGGCT	20	GCCTGAGGAA	30	TACCAAGTGGG	40	CNAGAGNATT	50	AGCNTTCTTG	60	GAGCATCTGC	70	TGCTTGAGCA	80
81	GCCCTGGGT	90	GCGTCCACTT	100	TCTGGGCACG	110	TGAGGTGGG	120	CCTTGCCCGC	130	CTGAGCCCTT	140	GAGTTGGTCA	150	CTTGAACCTT	160
161	GGGAATATTG	170	AGATTATATT	180	CTCTGCTCTT	190	TTANNAAGAT	200	GGACTTCAGC	210	AGNANTCTTT	220	ATGATATTGG	230	GGACACACTG	240
241	GACAGTGAAG	250	ATCTGGCCTC	260	CCTCAGATTC	270	CTGAGCCTGG	280	ACTACATTCC	290	GCAAGGGANG	300	CAAGAACCCCA	310	TCAAGGATGC	320
321	CTTGATGTTA	330	TTCCAGAGAC	340	TCCAGGAANA	350	GAGANTGTTG	360	GAGGAAAGCA	370	ATCTGTCTCT	380	CCTGANGGAG	390	CTGCTCTTCC	400
401	GAATTAATAG	410	ACTGGATTGG	420	CTGATTACCT	430	ACCTNANCAC	440	TAGAAAGGAG	450	GAGATGGNAA	460	GGGAACCTCA	470	GACACCCAGC	480
481	AGGGCTCAA	490	TTTCTGCCCTA	500	CAGGGTCATG	510	CTCTATCAGA	520	TTTCAGAGAG	530	AGTGAGCAGA	540	TCAGNATTGA	550	GGTCTTTTAA	560
561	GTTCCTTTTG	570	CNAGAGGNA	580	TCTCCANATG	590	CANACTGGAT	600	GATGACATGA	610	ACCTGCTGGA	620	TATTTTCATA	630	GAGNTGGAGA	640
641	AGAGGGTCAT	650	CCTGGGAGAA	660	GGAAAGTTGG	670	ACATCCTGAA	680	AGAGTCTGT	690	GCECNAATCA	700	ACNAGAGCCT	710	GCTGMAGATA	720
721	ATCAGGACT	730	ATGAGNATT	740	CAGCAAGAG	750	AGNAGCAGCA	760	GCCTTGAGG	770	ANGTCTGTAT	780	GNATTTTCA	790	ATGACTTTGG	800
801	ACAAAGTTTA	810	CCNANTGAA	820	AGCANACCTC	830	GGGGTACTG	840	TCTGATCATC	850	AMCANATCA	860	ATTTTGCAAA	870	AGCACGGGAG	880
881	AAAGTGGCCA	890	AACTTCACAG	900	CATTAGGGAC	910	AGNANTGAA	920	CACACTTGG	930	TGCAGGGTTT	940	GAGNATGTTT	950	TTAGCTGGTG	960
961	GCNATAANTA	970	TTAGNAGCCT	980	GCAGNATCCA	990	GCTACGAATA	1000	TAGAGGGTTT	1010	TGCTCTTGGG	1020	CCTTCGTGGC	1030	CTCGAG	1036



மேல்

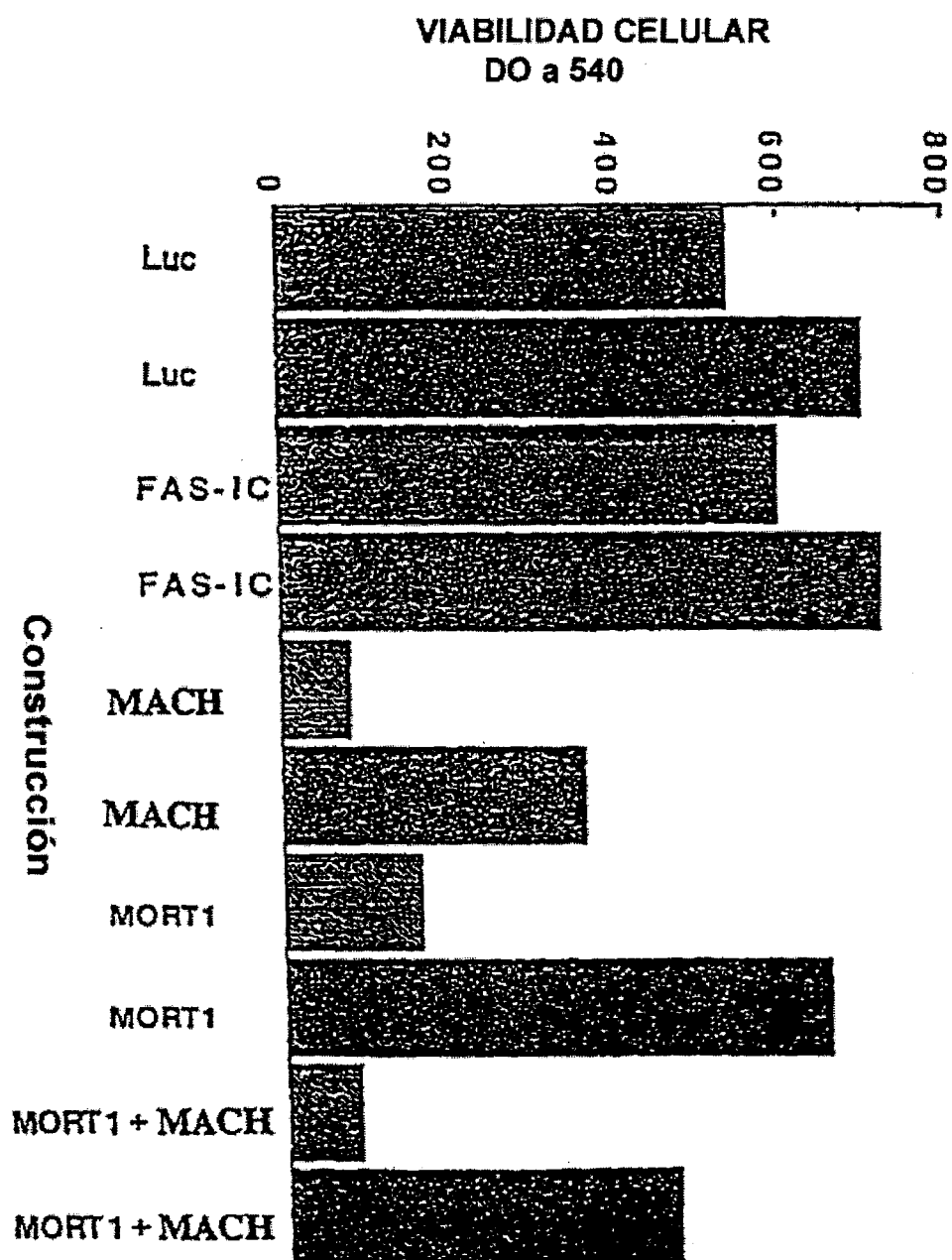


FIG.6

MDFSRNLYDIGEQDSEDLASLKFLSLDYIPQRKQEPKDALMLFQRLQE	50
KRMLEESNLSFLKELLFRINRLDLLITYLNTRKEEMERELQTPGRAQISA	100
YRVMLYQISEEVSRSELRSFKFLQEEISKCKLDDDMNLLDIFIEMEKRIV	150
ILGEGKLDILKRVCAQINKSLLKIINDYEEFSKERSSSLEGSPDEFSNDF	200
GQSLPNEKQTSGILSDHQSQSQFCKSTGESAQTSQH	235

FIG.7A

MONTI	4	FLVL	DISVSSSLSSSE	TE	CKFL	CLQNVGKRR	LE	NYQSO	42									
MACH	3	FSRN	YOIGEOLOSED	LA	SKFL	LDY	POR	KQEP	IKDA	41								
PEA-15	101	YVVM	YQISEEVSRSEL	RS	FKFL	QEE	SKCK	LODDMIL	139									
	4	VGTL	FOOLTNNITLED	EO	CKS	ACKED	P	SEK	SE	ITTA	42							
MONTI	43	COL	FSML	LEQND	EP	GHTE	NE	LLA	S	LRR	MDL	NRV	DD	81				
MACH	42	UNL	FQNL	DEKRM	LEES	NC	FL	CKEL	FR	JN	RLD	LL	ITYLN	80				
PEA-15	140	QD	IFIE	MEKRV	IL	GEOK	LD	IL	KRY	CA	Q	INK	BL	CK	177			
	43	SAWE	S	LE	SHNK	LOKDN	LS	ITE	HI	FE	IS	ND	P	D	LL	TMV	VU	81

FIG.7B

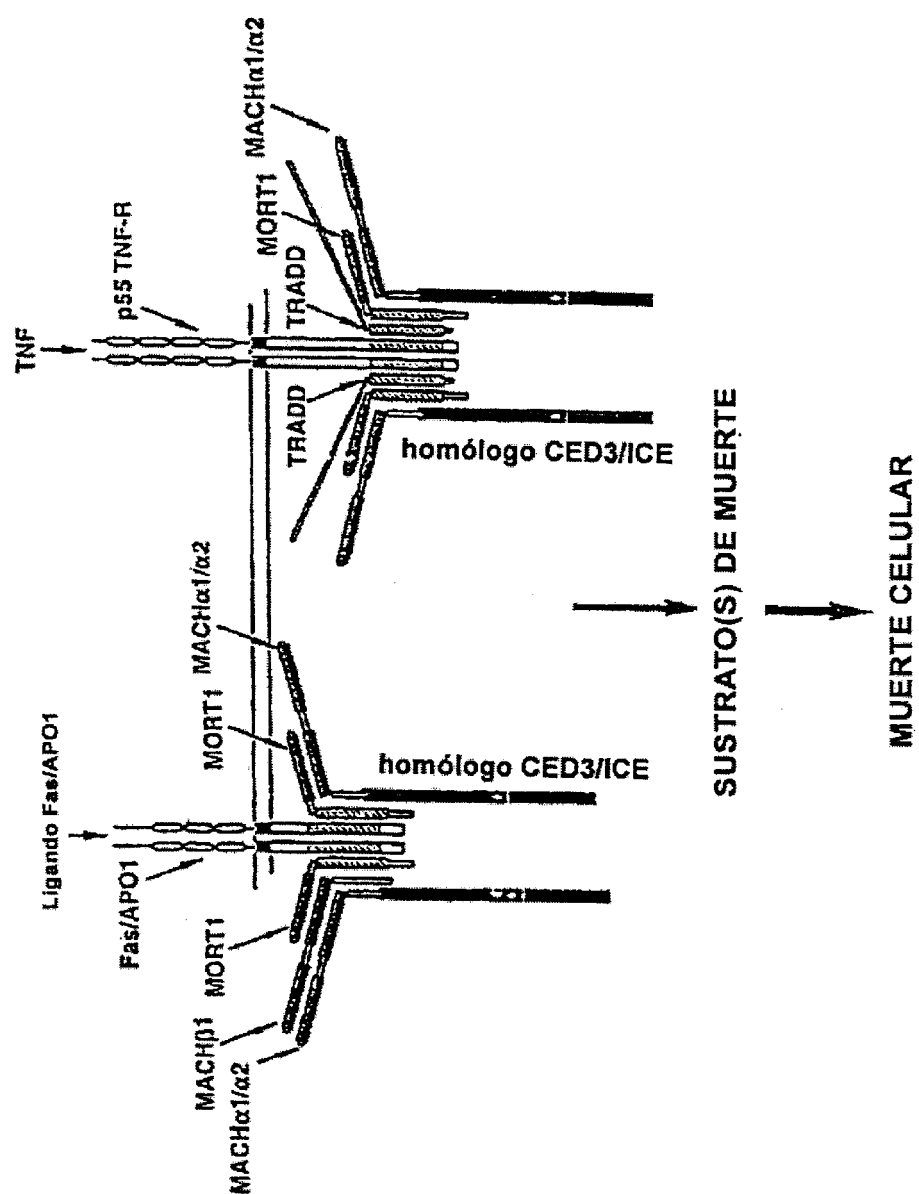


FIG. 8

FIG. 9A

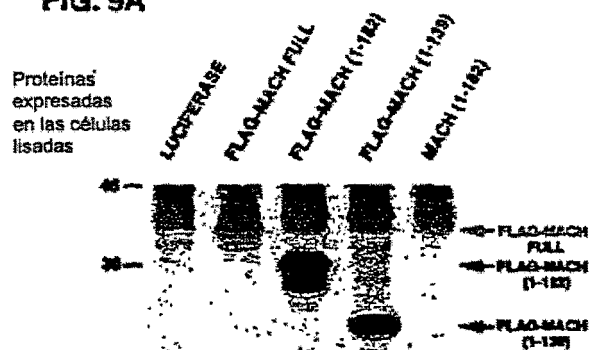


FIG. 9B

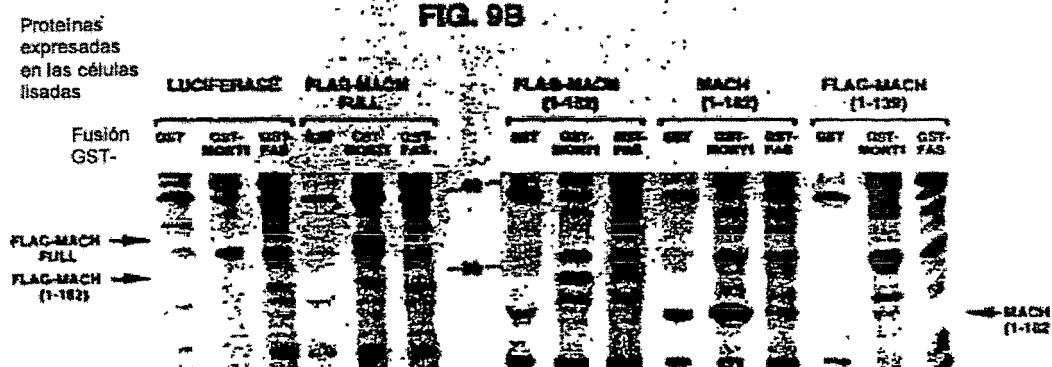
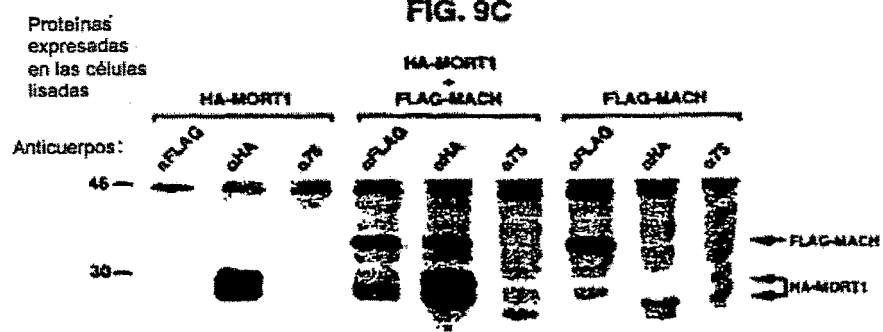


FIG. 9C



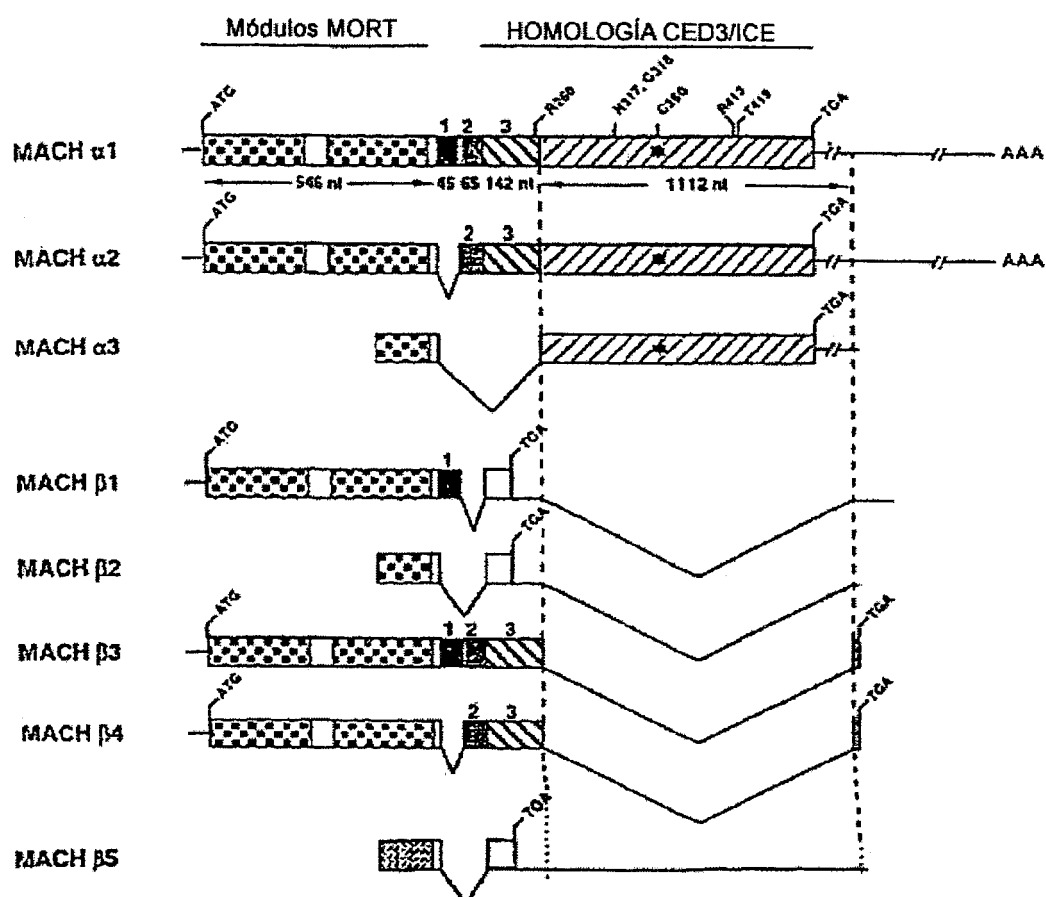


FIG.10

FIG. 11A

Primer Módulo MORT

MACH α 1	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	63
MACH α 1	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	63
MACH α 3	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	63
CED-3	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	76
Ich-11/Nedd2	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	89
ICE _{rel} III	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	112
TX/Ich2/ICE _{rel} II	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	71
ICE	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	75
MACH α 1	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	143
MACH α 1	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	143
MACH α 3	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	143
CED-3	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	155
Ich-11/Nedd2	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	144
ICE _{rel} III	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	135
TX/Ich2/ICE _{rel} II	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	94
ICE	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	121
CED-3	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	172
Ich-11/Nedd2	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	166
ICE _{rel} III	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	125
TX/Ich2/ICE _{rel} II	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	152
ICE	MDFSRNLYDIGEQDSEDASLKFLSLDYIPQRKQEPKIDALMLFQRLQEKRMLEESNLSFLK	152

FIG. 12A

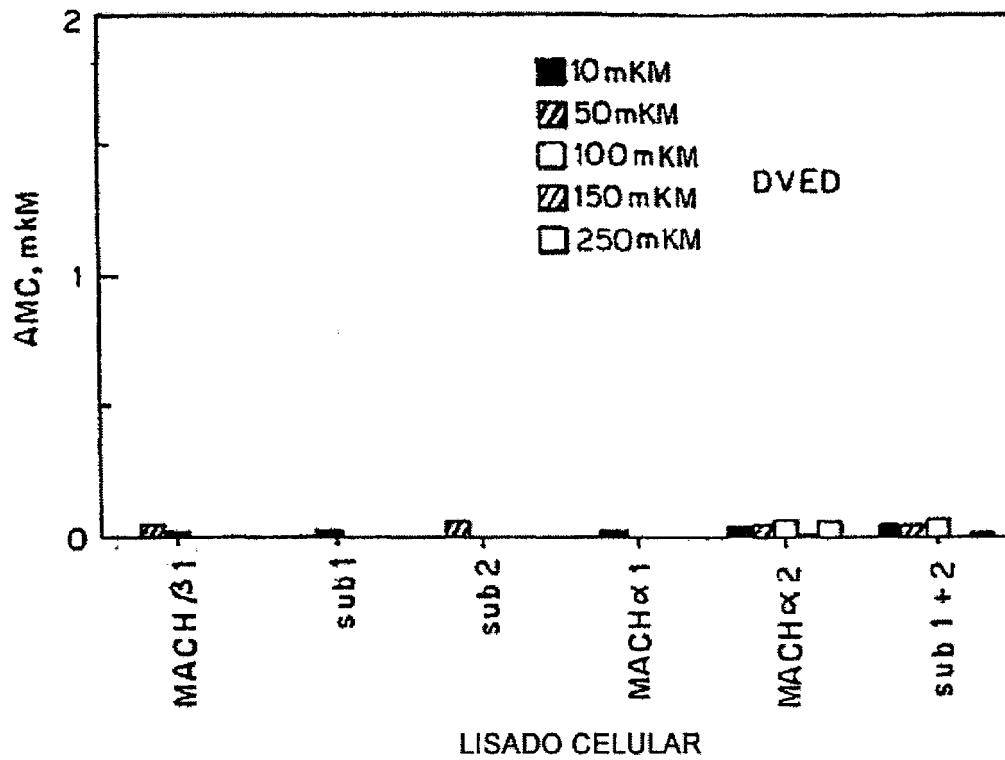


FIG. 12B

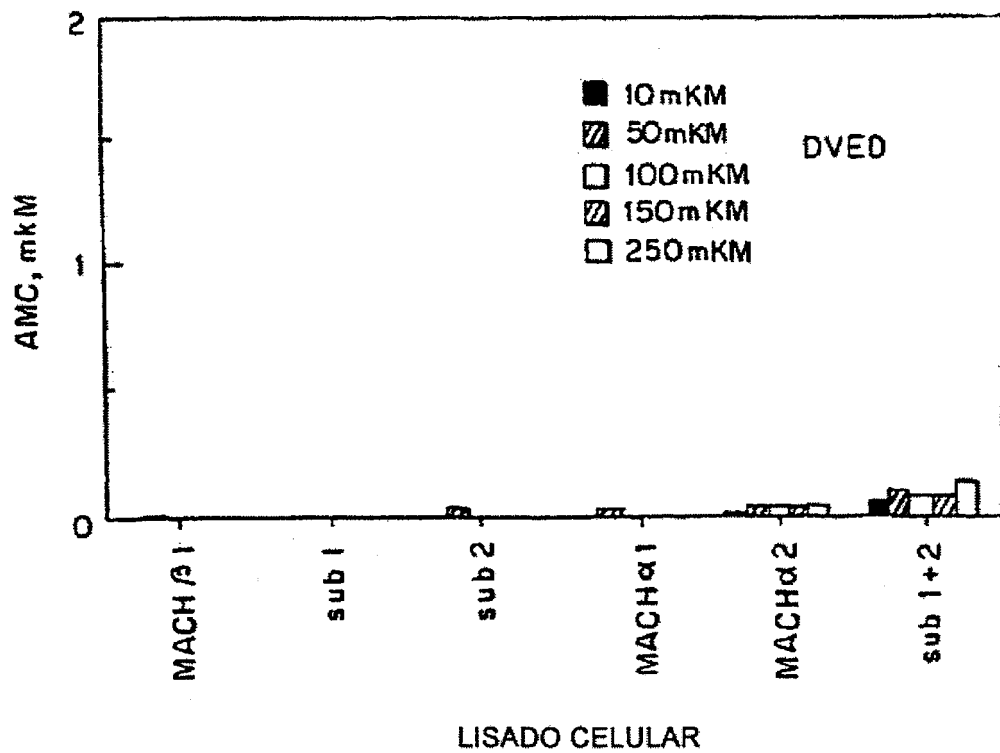


FIG. 12C

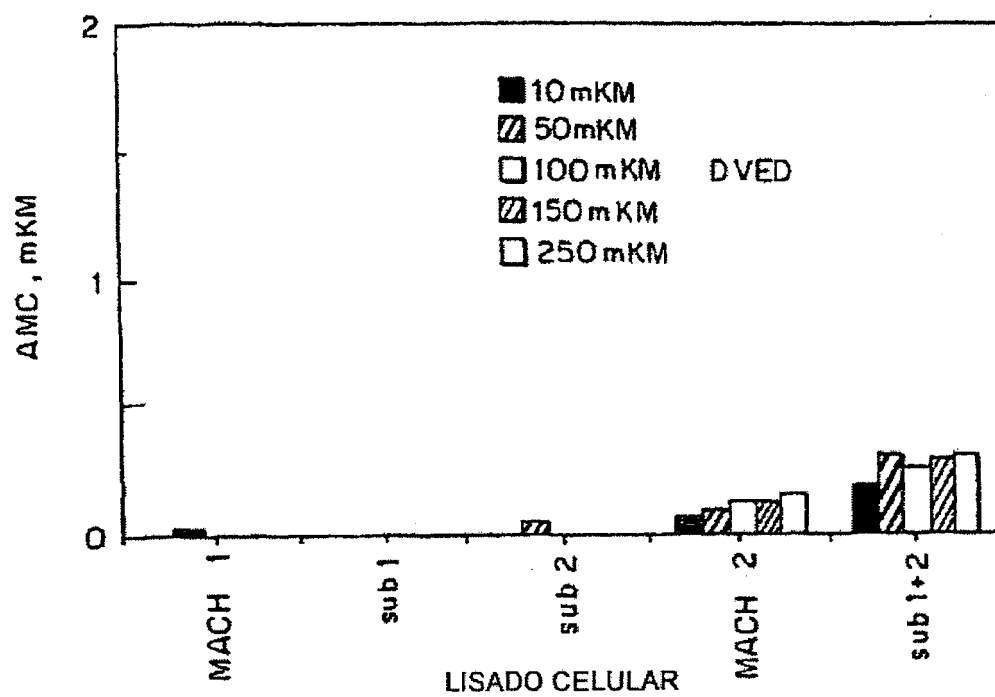


FIG. 12D

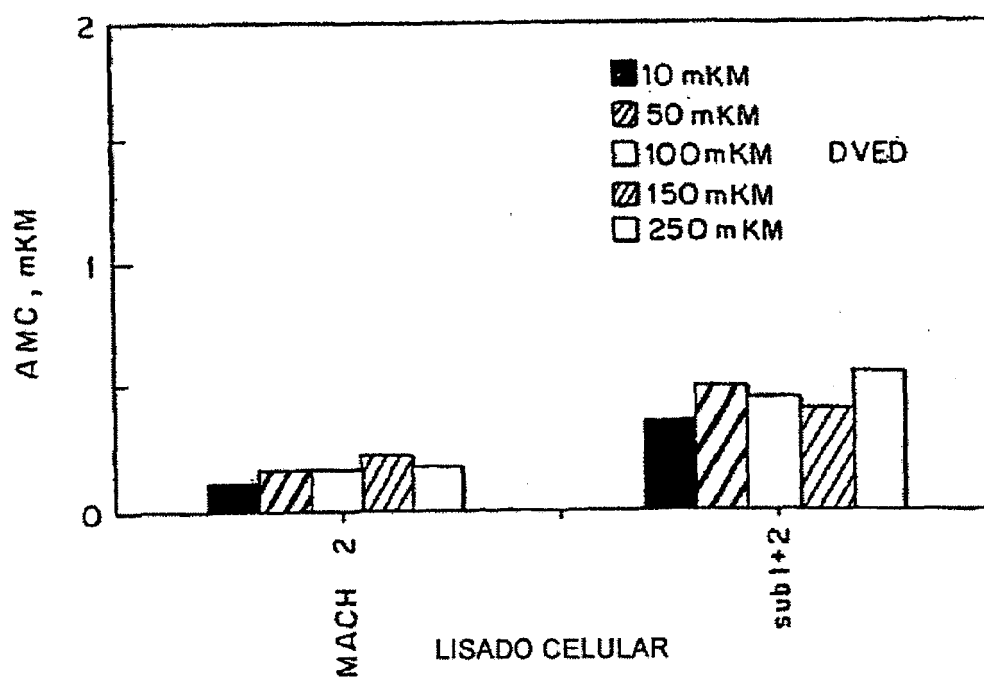


FIG. 12E

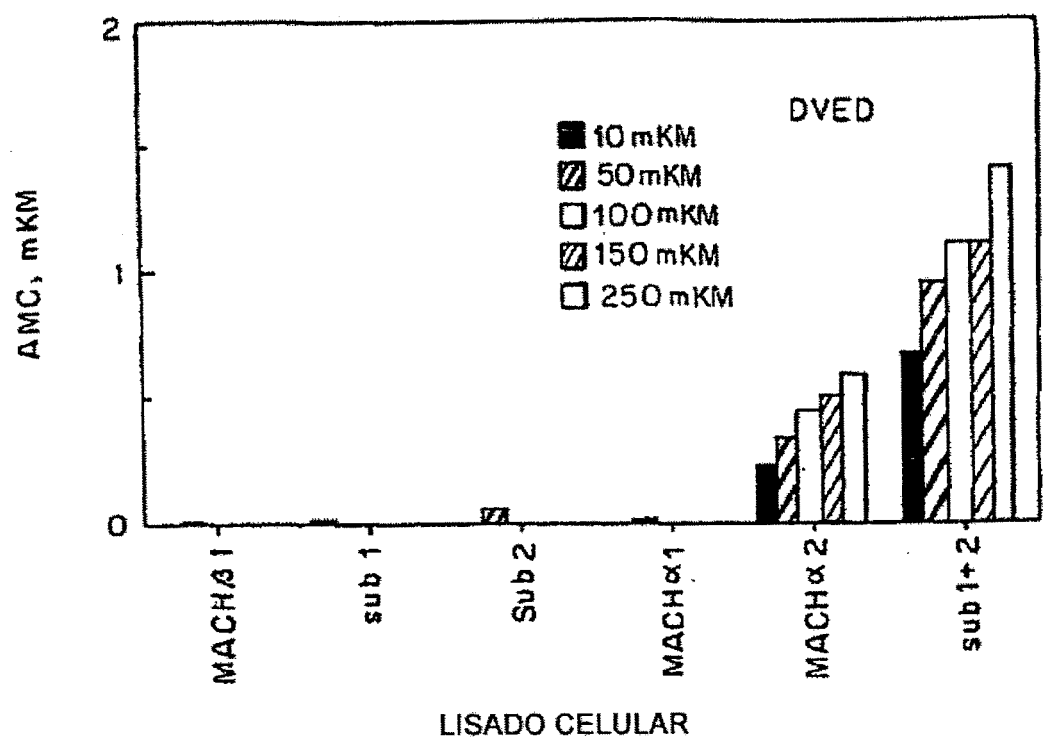
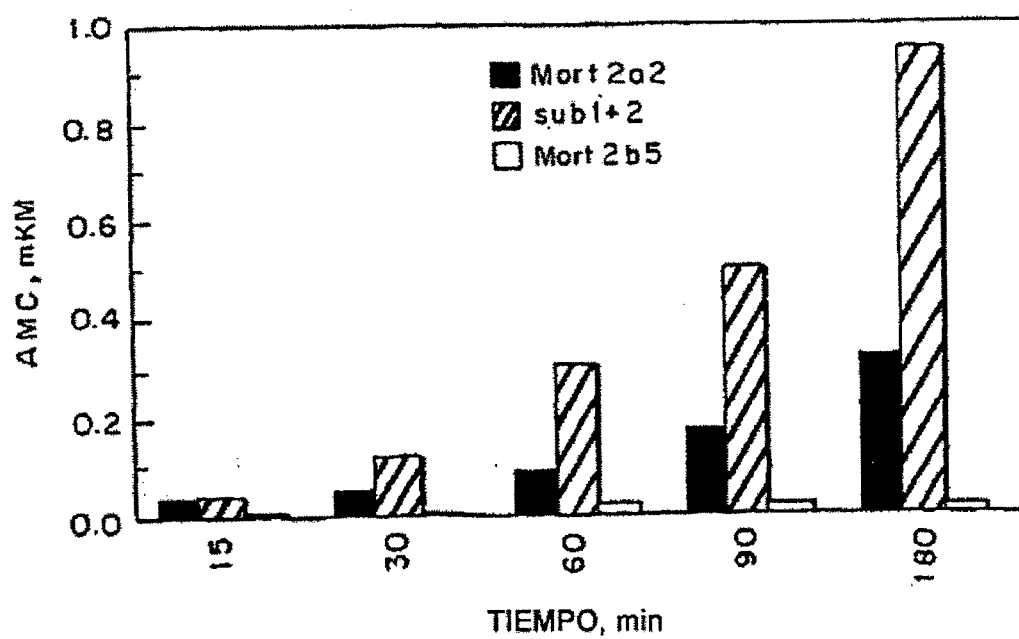


FIG. 12F



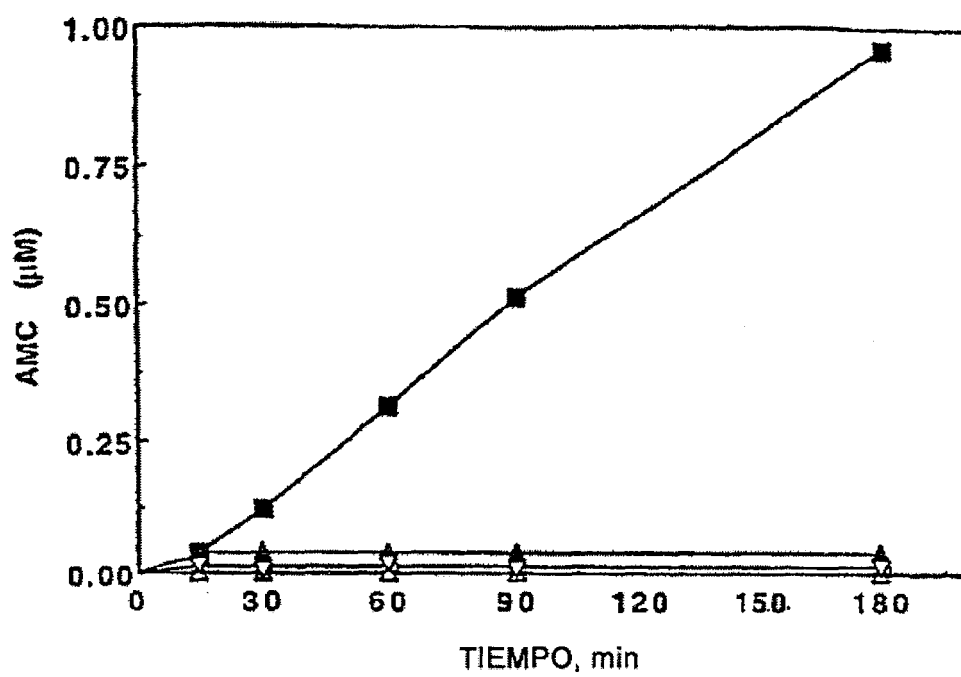


FIG.13A

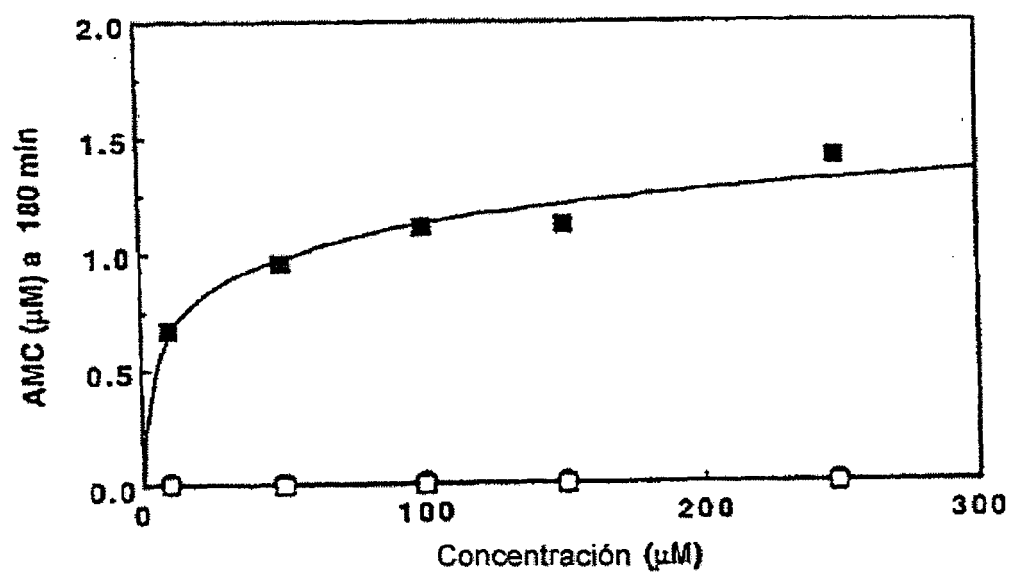


FIG.13B

Vector

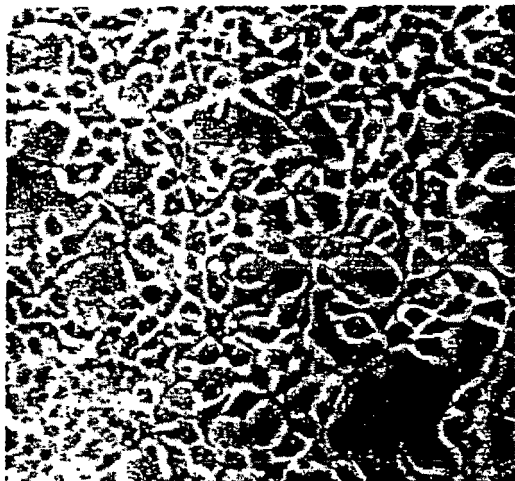


FIG. 14A

MACH α 2

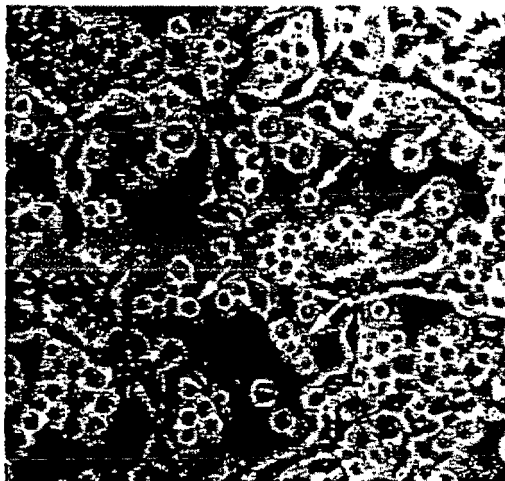
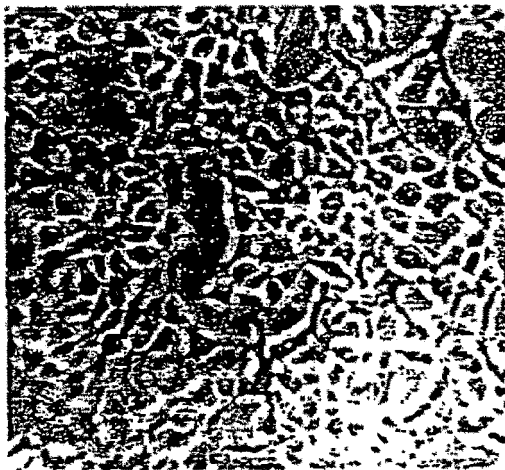


FIG. 14B



MACH α 3
FIG. 14C



MACH α 1(1-415)
FIG. 14D

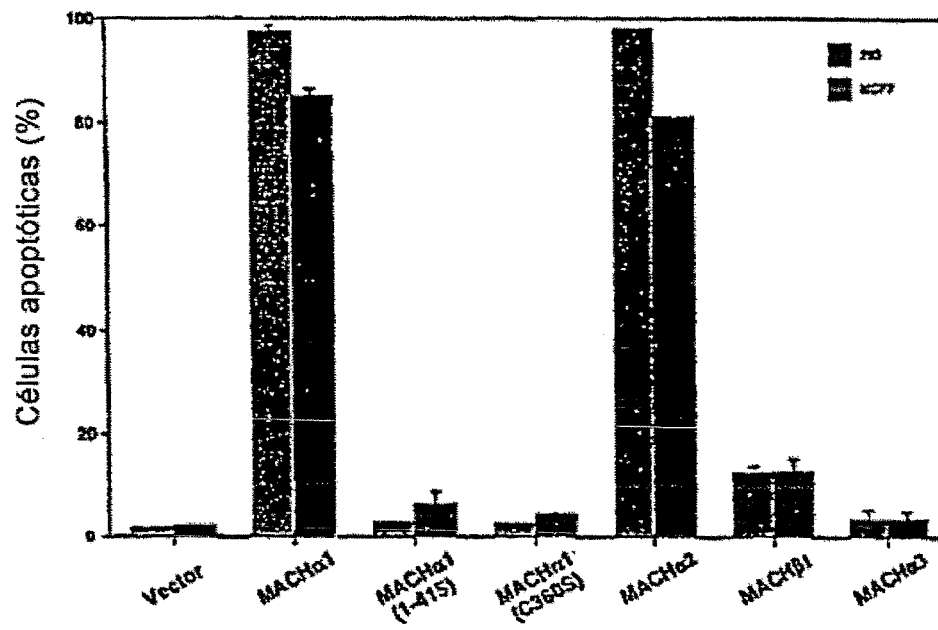


FIG.15

FIG. 16A

Quimera (p55-Fas) + vector

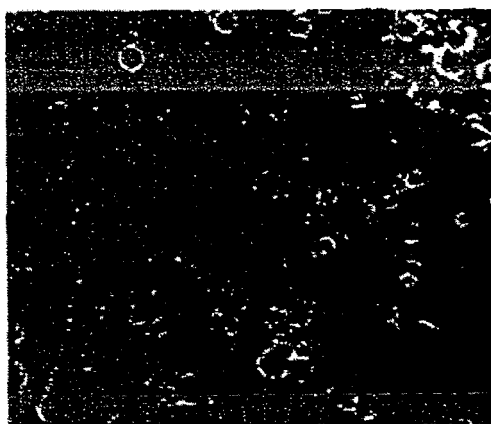


FIG. 16B

Quimera (p55-Fas) + MACH α 1 (C360S)

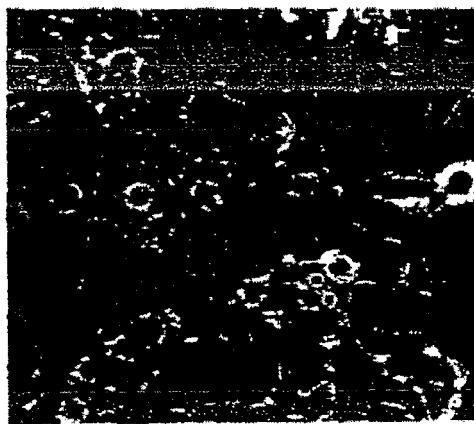


FIG. 16C

p55-TNFR + vector

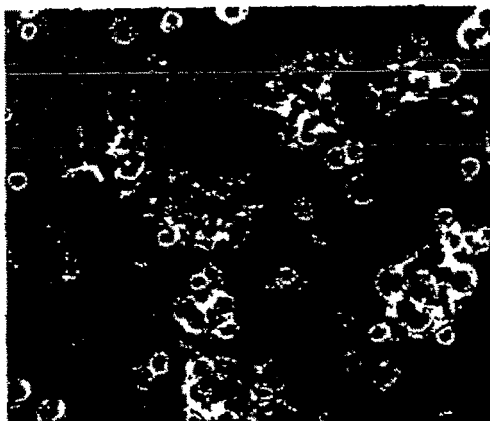
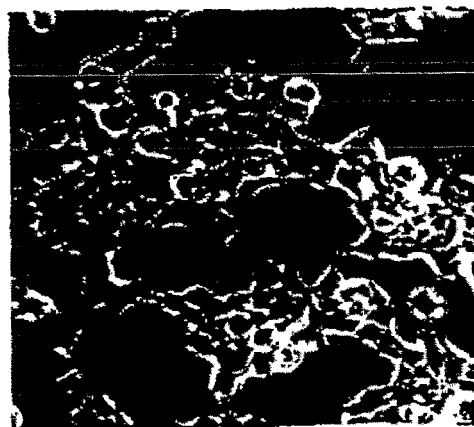


FIG. 16D

p55-TNFR + MACH α 1(C360S)



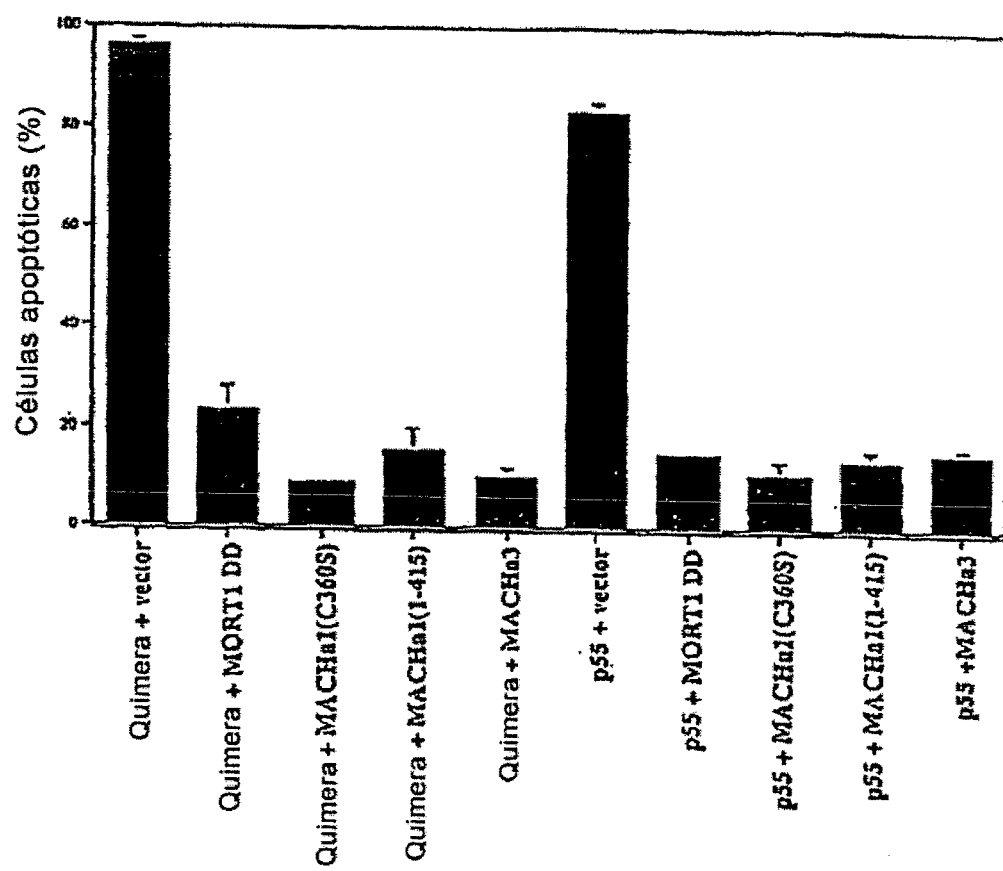


FIG.17

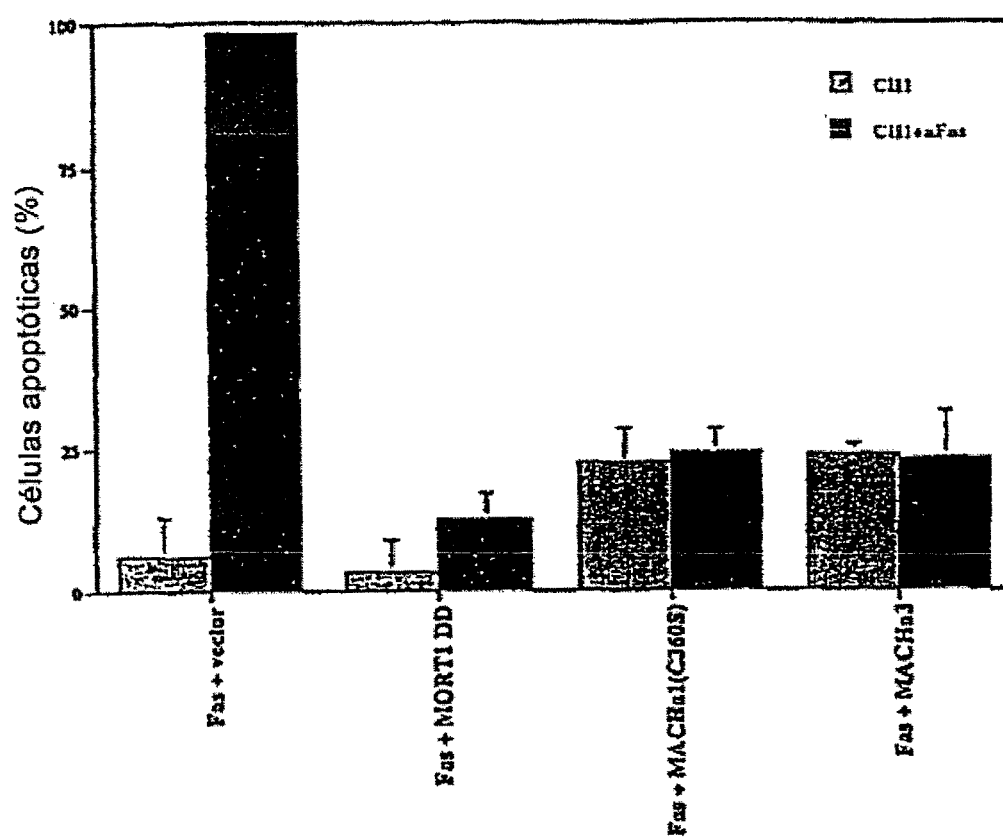


FIG. 18

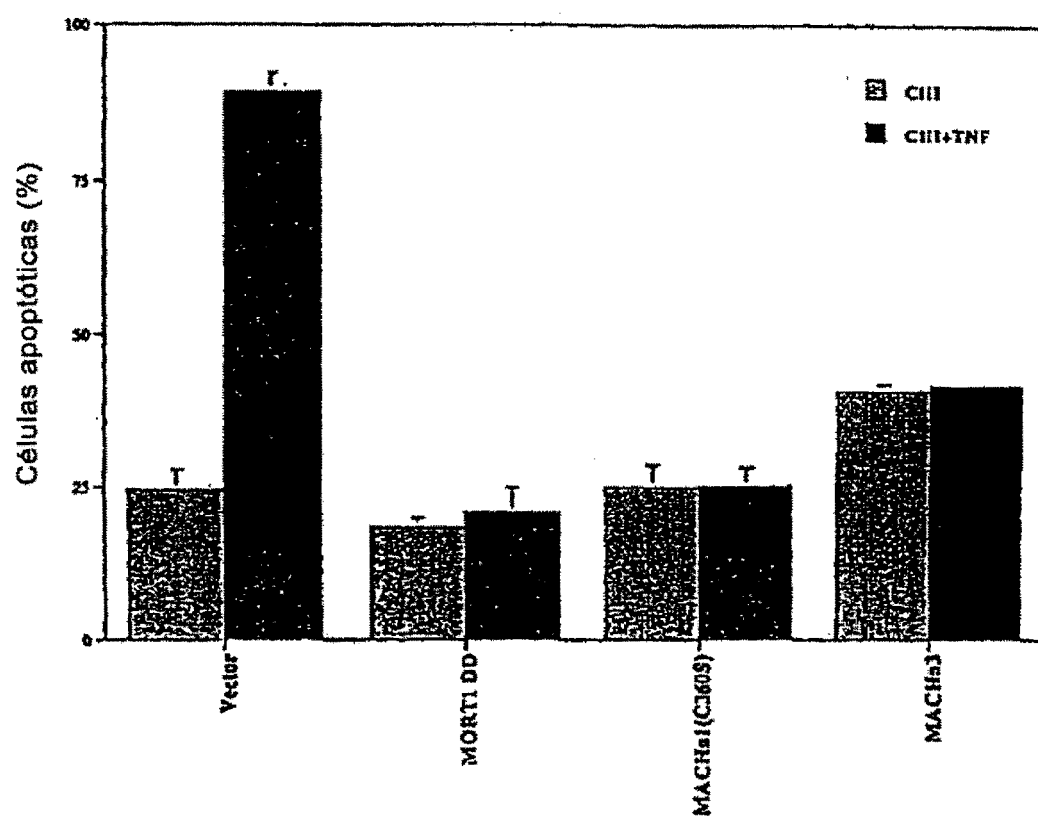


FIG.19

ES 2 326 704 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

5 (i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD. at the Weizmann Institute of Science

(B) CALLE: P.O. Box 95

10 (C) CIUDAD: Rehovot

(E) PAÍS: Israel

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 76100

15 (G) TELÉFONO: 011-972-847-0617

(H) TELEFAX: 011-972-847-0733

(A) NOMBRE: David WALLACH

20 (B) CALLE: 24 Borochoy Street

(C) CIUDAD: Rehovot

(E) PAÍS: Israel

25 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 76406

(G) TELÉFONO: 011-972-8946-3302

(A) NOMBRE: Mark P. BOLDIN

30 (B) CALLE: Weizmann Institute of Science, Beit Clore 303

(C) CIUDAD: Rehovot

(D) ESTADO:

35 (E) PAÍS: Israel

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 76000

(A) NOMBRE: Tanya M. GONCHAROV

40 (B) CALLE: Derekh Yavne 17-15

(C) CIUDAD: Rehovot

(D) ESTADO:

45 (E) PAÍS: Israel

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 76000

(A) NOMBRE: Yury V. GOLTSEV

50 (B) CALLE: Weizmann Institute of Science, Beit Clore 402

(C) CIUDAD: Rehovot

(D) ESTADO:

55 (E) PAÍS: Israel

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 76000

(A) NOMBRE: Henry WEINWURZEL

60 (B) CALLE: Herzl Street 43

(C) CIUDAD: Raanana

(E) PAÍS: Israel

65 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 43353

ES 2 326 704 T3

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: MODULADORES DE LA FUNCIÓN DE RECEPTORES DE fAS Y OTRAS PROTEÍNAS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 34

(iv) FORMA DE LECTURA DE ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Floppy disk

(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM

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

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, VersiÓn #1.30 (EPO)

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD PRIORITARIA:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: IL 114,615

(B) FECHA DE SOLICITUD: 16-JUL-1995

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD PRIORITARIA:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: IL 114,986

(B) FECHA DE SOLICITUD: 17-AGO-1995

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD PRIORITARIA:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: IL 115,319

(B) FECHA DE SOLICITUD: 14-SEP-1995

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD PRIORITARIA:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: IL 116,588

(B) FECHA DE SOLICITUD: 27-DIC-1995

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD PRIORITARIA:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: IL 117,932

(B) FECHA DE SOLICITUD: 16-ABR-1996

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1701 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..768

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

ES 2 326 704 T3

	GTG AAT CAG GCA CCG GAG TGC AGG TTC GGG GGT GGA ATC CTT GGG CCG	48
	Val Asn Gln Ala Pro Glu Cys Arg Phe Gly Gly Ile Leu Gly Pro	
	1 5 10 15	
5	CTG GGC AAG CGG CGA GAC CTG GCC AGG GCC AGC GAG CCG AGG ACA GAG	96
	Leu Gly Lys Arg Arg Asp Leu Ala Arg Ala Ser Glu Pro Arg Thr Glu	
	20 25 30	
10	GGC GCG CGG AGG GCC GGG CCG CAG CCC CGG CCG CTT GCA GAC CCC GCC	144
	Gly Ala Arg Arg Ala Gly Pro Gln Pro Arg Pro Leu Ala Asp Pro Ala	
	35 40 45	
15	ATG GAC CCG TTC CTG GTG CTG CTG CAC TCG GTG TCG TCC AGC CTG TCG	192
	Met Asp Pro Phe Leu Val Leu Leu His Ser Val Ser Ser Ser Leu Ser	
	50 55 60	
20	AGC AGC GAG CTG ACC GAG CTC AAG TTC CTA TGC CTC GGG CGC GTG GTC	240
	Ser Ser Glu Leu Thr Glu Leu Lys Phe Leu Cys Leu Gly Arg Val Val	
	65 70 75 80	
25	AAG CGC AAG CTG GAG CGC GTG CAG AGC GGC CTA GAC CTC TTC TCC ATG	288
	Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp Leu Phe Ser Met	
	85 90 95	
30	CTG CTG GAG CAG AAC GAC CTG GAG CCC GGG CAC ACC GAG CTC CTG CGC	336
	Leu Leu Glu Gln Asn Asp Leu Glu Pro Gly His Thr Glu Leu Leu Arg	
	100 105 110	
35	GAG CTG CTC GCC TCC CTG CGG CGC CAC GAC CTG CTG CGG CGC GTC GAC	384
	Glu Leu Leu Ala Ser Leu Arg Arg His Asp Leu Leu Arg Arg Val Asp	
	115 120 125	
40	GAC TTC GAG GCG GGG GCG GCG GCC GGG GCC GCG CCT GGG GAA GAA GAC	432
	Asp Phe Glu Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ala Pro Gly Glu Glu Asp	
	130 135 140	
45	CTG TGT GCA GCA TTT AAC GTC ATA TGT GAT AAT GTG GGG AAA GAT TGG	480
	Leu Cys Ala Ala Phe Asn Val Ile Cys Asp Asn Val Gly Lys Asp Trp	
	145 150 155 160	
50	AGA AGG CTG GCT CGT CAG CTC AAA GTC TCA GAC ACC AAG ATC GAC AGC	528
	Arg Arg Leu Ala Arg Gln Leu Lys Val Ser Asp Thr Lys Ile Asp Ser	
	165 170 175	
55		
60		
65		

ES 2 326 704 T3

	ATC GAG GAC AGA TAC CCC CGC AAC CTG ACA GAG CGT GTG CGG GAG TCA	576
	Ile Glu Asp Arg Tyr Pro Arg Asn Leu Thr Glu Arg Val Arg Glu Ser	
	180 185 190	
5	CTG AGA ATC TGG AAG AAC ACA GAG AAG GAG AAC GCA ACA GTG GCC CAC	624
	Leu Arg Ile Trp Lys Asn Thr Glu Lys Glu Asn Ala Thr Val Ala His	
	195 200 205	
10	CTG GTG GGG GCT CTC AGG TCC TGC CAG ATG AAC CTG GTG GCT GAC CTG	672
	Leu Val Gly Ala Leu Arg Ser Cys Gln Met Asn Leu Val Ala Asp Leu	
	210 215 220	
	GTA CAA GAG GTT CAG CAG GCC CGT GAC CTC CAG AAC AGG AGT GGG GCC	720
	Val Gln Glu Val Gln Gln Ala Arg Asp Leu Gln Asn Arg Ser Gly Ala	
	225 230 235 240	
15	ATG TCC CCG ATG TCA TGG AAC TCA GAC GCA TCT ACC TCC GAA GCG TCC	768
	Met Ser Pro Met Ser Trp Asn Ser Asp Ala Ser Thr Ser Glu Ala Ser	
	245 250 255	
	TGATGGGCGG CTGCTTTGCG CTGGTGGACC ACAGGCATCT ACACAGCCTG GACTTTGGTT	828
20	CTCTCCAGGA AGGTAGCCCA GCACTGTGAA GACCCAGCAG GAAGCCAGGC TGAGTGAGCC	888
	ACAGACCACC TGCTTCTGAA CTCAAGCTGC GTTTATTAAT GCCTCTCCCG CACCAGGCCG	948
	GGCTTGGGCC CTGCACAGAT ATTTCATTT CTTCCTCACT ATGACACTGA GCAAGATCTT	1008
25	GTCTCCACTA AATGAGCTCC TGGGGGAGTA GTTGAAAGT TGGAAACCGTG TCCAGCACAG	1068
	AAGGAATCTG TGCAGATGAG CAGTCACACT GTTACTCCAC AGCGGAGGAG ACCAGCTCAG	1128
	AGGCCCAGGA ATCGGAGCGA AGCAGAGAGG TGGAGAAGTGG GATTGTGAAC CCCCGCCATC	1188
30	CTTCACCAGA GCCCATGCTC AACCACTGTG GCGTTCTGCT GCCCCTGCAG TTGGCAGAAA	1248
	GGATGTTTTT GTCCCATTTT CTTGGAGGCC ACCGGGACAG ACCTGGACAC TAGGGTCAGG	1308
	CGGGGTGCTG TGGTGGGGAG AGGCATGGCT GGGGTGGGGG TGGGGAGACC TGGTTGGCCG	1368
35	TGGTCCAGCT CTTGCCCCCT GTGTGAGTTG AGTCTCCTCT CTGAGACTGC TAAGTAGGGG	1428
	CAGTGATGGT TGCCAGGACG AATTGAGATA ATATCTGTGA GGTGCTGATG AGTGATTGAC	1488
	ACACAGCACT CTCTAAATCT TCCTTGTGAG GATTATGGGT CCTGCAATTC TACAGTTTCT	1548
40	TACTGTTTTG TATCAAAATC ACTATCTTTC TGATAACAGA ATTGCCAAGG CAGCGGGATC	1608
	TCGTATCTTT AAAAAGCAGT CCTCTTATTC CTAAGGTAAT CCTATTAAAA CACAGCTTTA	1668
	CAACTTCCAT ATTACAAAAA AAAAAAAAAA AAA	1701

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 256 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

	Val Asn Gln Ala Pro Glu Cys Arg Phe Gly Gly Gly Ile Leu Gly Pro	
	1 5 10 15	
60	Leu Gly Lys Arg Arg Asp Leu Ala Arg Ala Ser Glu Pro Arg Thr Glu	
	20 25 30	

65

ES 2 326 704 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 200 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

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

	CCGCCGCCGC	CGCCGCCACC	TGCCAGACT	TTCTGTTCC	AGGGTCAGCC	TGTAAGTAAT	60
	CGGCCGCTGA	GCCTGAAGGA	CCAACAGACG	TTCGCGCGCT	CTGTGGGTCT	CAATGGCGC	120
55	AAGGTGGGGC	GCTCACTGCA	GCGAGGCTGC	CGGGCGCTGC	GGGACCCGGC	GCTGGACTCG	180
	CTGGCCTACG	AGTACGAGCG					200

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1036 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 326 704 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

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

5	CGAGGCCACG AAGGCCGGCT GCCTGAGGAA TACCAGTGGG CAAGAGAATT AGCATTTCTG	60
	GAGCATCTGC TGTCTGAGCA GCCCCTGGGT GCGTCCACTT TCTGGGCACG TGAGGTTGGG	120
	CCTTGCCCGC CTGAGCCCTT GAGTTGGTCA CTTGAACCTT GGAATATTG AGATTATATT	180
10	CTCCTGCCTT TAAAAAGAT GGACTTCAGC AGAAATCTTT ATGATATTGG GGAACAACTG	240
	GACAGTGAAG ATCTGGCCTC CCTCAAGTTC CTGAGCCTGG ACTACATTCC GCAAAGGAAG	300
	CAAGAACCCA TCAAGGATGC CTTGATGTTA TTCCAGAGAC TCCAGGAAAA GAGAATGTTG	360
15	GAGGAAAGCA ATCTGTCCTT CCTGAAGGAG CTGCTCTTCC GAATTAATAG ACTGGATTG	420
	CTGATTACCT ACCTAAACAC TAGAAAGGAG GAGATGGAAA GGGAACTTCA GACACCAGGC	480
	AGGGCTCAAA TTTCTGCCTA CAGGGTCATG CTCTATCAGA TTTCAGAAGA AGTGAGCAGA	540
20	TCAGAATTGA GGTCTTTTAA GTTCTTTTGG CAAGAGGAAA TCTCCAAATG CAAACTGGAT	600
	GATGACATGA ACCTGCTGGA TATTTTCATA GAGATGGAGA AGAGGGTCAT CCTGGGAGAA	660
	GGAAAGTTGG ACATCCTGAA AAGAGTCTGT GCCCAAATCA ACAAGAGCCT GCTGAAGATA	720
	ATCAACGACT ATGAAGAATT CAGCAAAGAG AGAAGCAGCA GCCTTGAAGG AAGTCCTGAT	780
25	GAATTTTCAA ATGACTTTGG ACAAAGTTTA CCAAATGAAA AGCAAACCTC GGGGATACTG	840
	TCTGATCATC AACAATCACA ATTTTGCAAA AGCACGGGAG AAAGTGCCCA AACTTCACAG	900
	CATTAGGGAC AGGAATGGAA CACACTTGA TGCAGGGTTT GAGAATGTTT TTAGCTGGTG	960
30	GCAATAAATA TTAGAAGCCT GCAGAATCCA GCTACGAATA TAGAGGGTTT TGCTCTTGGG	1020
	CCTTCGTGGC CTCGAG	1036

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 235 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

40

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

45

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

50

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

65

ES 2 326 704 T3

```

Gln Ile Ser Ala Tyr Arg Val Met Leu Tyr Gln Ile Ser Glu Glu Val
      100              105              110
Ser Arg Ser Glu Leu Arg Ser Phe Lys Phe Leu Leu Gln Glu Glu Ile
      115              120              125
Ser Lys Cys Lys Leu Asp Asp Asp Met Asn Leu Leu Asp Ile Phe Ile
      130              135              140
Glu Met Glu Lys Arg Val Ile Leu Gly Glu Gly Lys Leu Asp Ile Leu
      145              150              155              160
Lys Arg Val Cys Ala Gln Ile Asn Lys Ser Leu Leu Lys Ile Ile Asn
      165              170              175
Asp Tyr Glu Glu Phe Ser Lys Glu Arg Ser Ser Ser Leu Glu Gly Ser
      180              185              190
Pro Asp Glu Phe Ser Asn Asp Phe Gly Gln Ser Leu Pro Asn Glu Lys
      195              200              205
Gln Thr Ser Gly Ile Leu Ser Asp His Gln Gln Ser Gln Phe Cys Lys
      210              215              220
Ser Thr Gly Glu Ser Ala Gln Thr Ser Gln His
      225              230              235

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

```

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

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 479 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

```

Met Asp Phe Ser Arg Asn Leu Tyr Asp Ile Gly Glu Gln Leu Asp Ser
  1      5      10      15

```

ES 2 326 704 T3

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

ES 2 326 704 T3

5 Leu Ser Ser Pro Gln Thr Arg Tyr Ile Pro Asp Glu Ala Asp Phe Leu
 385 390 395 400
 Leu Gly Met Ala Thr Val Asn Asn Cys Val Ser Tyr Arg Asn Pro Ala
 405 410 415
 Glu Gly Thr Trp Tyr Ile Gln Ser Leu Cys Gln Ser Leu Arg Glu Arg
 420 425 430
 10 Cys Pro Arg Gly Asp Asp Ile Leu Thr Ile Leu Thr Glu Val Asn Tyr
 435 440 445
 Glu Val Ser Asn Lys Asp Asp Lys Lys Asn Met Gly Lys Gln Met Pro
 450 455 460
 15 Gln Pro Thr Phe Thr Leu Arg Lys Lys Leu Val Phe Pro Ser Asp
 465 470 475

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 277 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

ES 2 326 704 T3

Ser Asp Ser Pro Arg Glu Gln Asp Ser Glu Ser Gln Thr Leu Asp Lys
 210 215 220
 Val Tyr Gln Met Lys Ser Lys Pro Arg Gly Tyr Cys Leu Ile Ile Asn
 225 230 235 240
 Asn His Asn Phe Ala Lys Ala Arg Glu Lys Val Pro Lys Leu His Ser
 245 250 255
 Ile Arg Asp Arg Asn Gly Thr His Leu Asp Ala Gly Phe Gly Asn Val
 260 265 270
 Phe Ser Trp Trp Gln
 275

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 489 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

ES 2 326 704 T3

Ser Ser Pro Arg Gly Met Cys Leu Ile Ile Asn Asn Glu His Phe Glu
 225 230 235 240
 Gln Met Pro Thr Arg Asn Gly Thr Lys Ala Asp Lys Asp Asn Leu Thr
 245 250 255
 Asn Leu Phe Arg Cys Met Gly Tyr Thr Val Ile Cys Lys Asp Asn Leu
 260 265 270
 Thr Gly Arg Gly Met Leu Leu Thr Ile Arg Asp Phe Ala Lys His Glu
 275 280 285
 Ser His Gly Asp Ser Ala Ile Leu Val Ile Leu Ser His Gly Glu Glu
 290 295 300
 Asn Val Ile Ile Gly Val Asp Asp Ile Pro Ile Ser Thr His Glu Ile
 305 310 315 320
 Tyr Asp Leu Leu Asn Ala Ala Asn Ala Pro Arg Leu Ala Asn Lys Pro
 325 330 335
 Lys Ile Val Phe Val Gln Ala Cys Arg Gly Glu Arg Arg Asp Asn Gly
 340 345 350
 Phe Pro Val Leu Asp Ser Val Asp Gly Val Pro Ala Phe Leu Arg Arg
 355 360 365
 Gly Trp Asp Asn Arg Asp Gly Pro Leu Phe Asn Phe Leu Gly Cys Val
 370 375 380
 Arg Pro Gln Val Gln Gln Val Trp Arg Lys Lys Pro Ser Gln Ala Asp
 385 390 395 400
 Ile Leu Ile Arg Tyr Ala Thr Thr Ala Gln Tyr Val Ser Trp Arg Asn
 405 410 415
 Ser Ala Arg Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ala Val Cys Glu Val Phe Ser
 420 425 430
 Thr His Ala Lys Asp Met Asp Val Val Glu Leu Leu Thr Glu Val Asn
 435 440 445
 Lys Lys Val Ala Cys Gly Phe Gln Thr Ser Gln Gly Ser Asn Ile Leu
 450 455 460
 Lys Gln Met Pro Glu Met Thr Ser Arg Leu Leu Lys Lys Phe Tyr Phe
 465 470 475 480
 Trp Pro Glu Ala Arg Asn Ser Ala Val
 485

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 421 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Met His Pro His His Gln Glu Thr Leu Lys Lys Asn Arg Val Val Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Gln Leu Leu Ser Glu Leu Glu His Leu Leu Glu Lys
 20 25 30

ES 2 326 704 T3

	Asp	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Met	Arg	Glu	Leu	Ile	Gln	Ala	Lys	Val	Gly
		35						40					45			
5	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Val	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Leu	Pro	Lys	Arg	Gly
		50					55					60				
	Pro	Gln	Ala	Phe	Asp	Ala	Phe	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Glu	Thr	Lys	Gln
	65					70					75				80	
10	Gly	His	Leu	Glu	Asp	Met	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Ser	Gly	Leu	Gln	His
					85					90					95	
	Val	Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Cys	Asp	Tyr	Asp	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Pro
				100					105					110		
15	Val	Cys	Glu	Ser	Cys	Pro	Leu	Tyr	Lys	Lys	Leu	Arg	Leu	Ser	Thr	Asp
			115					120					125			
	Thr	Val	Glu	His	Ser	Leu	Asp	Asn	Lys	Asp	Gly	Pro	Val	Cys	Leu	Gln
	130						135					140				
20	Val	Lys	Pro	Cys	Thr	Pro	Glu	Phe	Tyr	Gln	Thr	His	Phe	Gln	Leu	Ala
	145					150					155				160	
	Tyr	Arg	Leu	Gln	Ser	Arg	Pro	Arg	Gly	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Ser	Asn
				165						170					175	
25	Val	His	Phe	Thr	Gly	Glu	Lys	Glu	Leu	Glu	Phe	Arg	Ser	Gly	Gly	Asp
				180					185					190		
	Val	Asp	His	Ser	Thr	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Asp
			195					200					205			
30	Val	His	Val	Leu	Cys	Asp	Gln	Thr	Ala	Gln	Glu	Met	Gln	Glu	Lys	Leu
	210						215					220				
	Gln	Asn	Phe	Ala	Gln	Leu	Pro	Ala	His	Arg	Val	Thr	Asp	Ser	Cys	Ile
	225					230					235				240	
35	Val	Ala	Leu	Leu	Ser	His	Gly	Val	Glu	Gly	Ala	Ile	Tyr	Gly	Val	Asp
				245						250					255	
	Gly	Lys	Leu	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Val	Phe	Gln	Leu	Phe	Asp	Asn	Ala
			260					265					270			
40	Asn	Cys	Pro	Ser	Leu	Gln	Asn	Lys	Pro	Lys	Met	Phe	Phe	Ile	Gln	Ala
			275					280					285			
	Cys	Arg	Gly	Asp	Glu	Thr	Asp	Arg	Gly	Val	Asp	Gln	Gln	Asp	Gly	Lys
	290						295					300				
45	Asn	His	Ala	Gly	Ser	Pro	Gly	Cys	Glu	Glu	Ser	Asp	Ala	Gly	Lys	Glu
	305					310					315				320	
	Lys	Leu	Pro	Lys	Met	Arg	Leu	Pro	Thr	Arg	Ser	Asp	Met	Ile	Cys	Gly
				325						330					335	
50	Tyr	Ala	Cys	Leu	Lys	Gly	Thr	Ala	Ala	Met	Arg	Asn	Thr	Lys	Arg	Gly
			340						345					350		
	Ser	Trp	Tyr	Ile	Glu	Ala	Leu	Ala	Gln	Val	Phe	Ser	Glu	Arg	Ala	Cys
			355					360					365			
55	Asp	Met	His	Val	Ala	Asp	Met	Leu	Val	Lys	Val	Asn	Ala	Leu	Ile	Lys
	370						375					380				
	Asp	Arg	Glu	Gly	Tyr	Ala	Pro	Gly	Thr	Glu	Phe	His	Arg	Cys	Lys	Glu
	385					390				395					400	
60																
	Met	Ser	Glu	Tyr	Cys	Ser	Thr	Leu	Cys	Arg	His	Leu	Tyr	Leu	Phe	Pro
					405					410					415	
	Gly	His	Pro	Pro	Thr											
				420												
65																

ES 2 326 704 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 376 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

```

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

```

ES 2 326 704 T3

Ser Leu Ala Val Ile Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu Ala Asp
275 280 285
Ser Val Cys Lys Ile His Glu Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys Ser
290 295 300
Ser Thr Pro His Asn Val Ser Trp Arg Asp Arg Thr Arg Gly Ser Ile
305 310 315 320
Phe Ile Thr Glu Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Cys Cys Cys
325 330 335
His Leu Met Glu Ile Phe Arg Lys Val Gln Lys Ser Phe Glu Val Pro
340 345 350
Gln Ala Lys Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Ala Thr Leu Thr Arg
355 360 365
Asp Phe Tyr Leu Phe Pro Gly Asn
370 375

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 377 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

ES 2 326 704 T3

Thr Arg Pro Glu His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met
 195 200 205
 Ser His Gly Ile Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Val His Asp Glu Lys
 210 215 220
 Lys Pro Asp Val Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn
 225 230 235 240
 Arg Asn Cys Leu Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val Gln
 245 250 255
 Ala Cys Arg Gly Ala Asn Arg Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser Pro
 260 265 270
 Ala Ser Leu Glu Val Ala Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu Glu
 275 280 285
 Asp Ala Val Tyr Lys Thr His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys
 290 295 300
 Ser Ser Thr Pro His Asn Val Ser Trp Arg Asp Ser Thr Met Gly Ser
 305 310 315 320
 Ile Phe Ile Thr Gln Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Trp Cys
 325 330 335
 Cys His Leu Glu Glu Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu Thr
 340 345 350
 Pro Arg Ala Lys Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Leu Ser Met Thr
 355 360 365
 Arg Tyr Phe Tyr Leu Phe Pro Gly Asn
 370 375

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 404 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

ES 2 326 704 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2887 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

ES 2 326 704 T3

	GATTCTGCCT TTCTGCTGGA GGAAGTGTT TTCACAGGTT CTCCTCCTTT TATCTTTTGT	60
	GTTTTTTTTT AAGCCCTGCT GAATTTGCTA GTCAACTCAA CAGGAAGTGA GGCCATGGAG	120
5	GGAGGCAGAA GAGCCAGGTT GGTATTGAA AGTAGAAGAA ACTTCTTCCT GGGAGCCTTT	180
	CCCCCCCCCT TCCCTGCTGA GCACGTGGAG TTAGGCAGGT TAGGGGACTC GGAGACTGCG	240
	ATGGTGCCAG GAAAGGGTGG AGCGGATTAT ATTCTCCTGC CTTTTAAAAA GATGGACTTC	300
10	AGCAGAAATC TTTATGATAT TGGGGAACAA CTGGACAGTG AAGATCTGGC CTCCCTCAAG	360
	TTCTGAGCC TGGACTACAT TCCGCAAAGG AAGCAAGAAC CCATCAAGGA TGCCTTGATG	420
	TTATTCCAGA GACTCCAGGA AAAGAGAATG TTGGAGGAAA GCAATCTGTC CTTCTGAAG	480
15	GAGCTGCTCT TCCGAATTAA TAGACTGGAT TTGCTGATTA CCTACCTAAA CACTAGAAAG	540
	GAGGAGATGG AAAGGGAACT TCAGACACCA GGCAGGGCTC AAATTTCTGC CTACAGGGTC	600
	ATGCTCTATC AGATTTTCTA AGAAGTGAGC AGATCAGAAT TGAGGTCTTT TAAGTTTCTT	660
	TTGCAAGAGG AAATCTCCAA ATGCAAACTG GATGATGACA TGAACCTGCT GGATATTTTC	720
20	ATAGAGATGG AGAAGAGGGT CATCCTGGGA GAAGGAAAGT TGGACATCCT GAAAAGAGTC	780
	TGTGCCCCAA TCAACAAGAG CCTGCTGAAG ATAATCAACG ACTATGAAGA ATTCAGCAA	840
	GAGAGAAGCA GCAGCCTTGA AGGAAGTCTT GATGAATTTT CAAATGGGGA GGAGTTGTGT	900
25	GGGGTAATGA CAATCTCGGA CTCTCCAAGA GAACAGGATA GTGAATCACA GACTTTGGAC	960
	AAAGTTTACC AAATGAAAAG CAAACCTCGG GGATACTGTC TGATCATCAA CAATCACAAT	1020
	TTTGCAAAAG CACGGGAGAA AGTGCCCCAA CTTACAGCA TTAGGGACAG GAATGGAACA	1080
30	CACTTGGATG CAGGGGCTTT GACCACGACC TTGAAGAGC TTCATTTTGA GATCAAGCCC	1140
	CACGATGACT GCACAGTAGA GCAAATCTAT GAGATTTTGA AAATCTACCA ACTCATGGAC	1200
	CACAGTAACA TGGACTGCTT CATCTGCTGT ATCCTCTCCC ATGGAGACAA AGGCATCATC	1260
	TATGGCACTG ATGGACAGGA GGGCCCCATC TATGAGCTGA CATCTCAGTT CACTGGTTTG	1320
35	AAGTGCCCTT CCCTTGCTGG AAAACCCAAA GTGTTTTTTT TTCAGGCTTG TCAGGGGGAT	1380
	AACTACCAGA AAGGTATACC TGTGAGACT GATTACAGAG AGCAACCCCTA TTTAGAAATG	1440
	GATTTATCAT CACCTCAAAC GAGATATATC CCGGATGAGG CTGACTTTCT GCTGGGGATG	1500
40	GCCACTGTGA ATAACTGTGT TTCCTACCGA AACCTGCAG AGGGAACCTG GTACATCCAG	1560
	TCACTTTGCC AGAGCCTGAG AGAGCGATGT CCTCGAGGCG ATGATATTCT CACCATCCTG	1620
	ACTGAAGTGA ACTATGAAGT AAGCAACAAG GATGACAAGA AAAACATGGG GAAACAGATG	1680
45	CCTCAGCCTA CTTTCACACT AAGAAAAAAA CTTGTCTTCC CTTCTGATTG ATGGTGCTAT	1740
	TTTGTTTGTT TTGTTTTGTT TTGTTTTTTT GAGACAGAAT CTCGCTCTGT CGCCCAGGCT	1800
	GGAGTGCACT GCGGTGATCT CGGCTCACCG CAAGCTCCGC CTCCCGGGTT CACGCCATTC	1860
50	TCCTGCCTCA GCCTCCCCGAG TAGCTGGGAC TACAGGGGCC CGCCACCACA CCTGGCTAAT	1920
	TTTTTAAAAA TATTTTATAG AGAGACAGGG TTCACTGTG TTAGCCAGGG TGGTCTTGAT	1980
	CTCTGACCT CGTGATCCAC CCACCTCGGC CTCCCAAAGT GCTGGGATTA CAGGCGTGAG	2040
55	CCACCGCGCC TGGCCGATGG TACTATTTAG ATATAACACT ATGTTTTATT ACTAATTTTC	2100

ES 2 326 704 T3

TAGATTTTCT ACTTTATTAA TTGTTTGTCA CTTTTTTATA AGAGCTAAAG TTAAATAGGA 2160
 TATTAACAAC AATAACACTG TCTCCTTTCT CTTACGCTTA AGGCTTTGGG AATGTTTTTA 2220
 5 GCTGGTGGCA ATAAATACCA GACACGTACA AAATCCAGCT ATGAATATAG AGGGCTTATG 2280
 ATTCAGATTG TTATCTATCA ACTATAAGCC CACTGTTAAT ATTCTATTAA CTTTAATTCT 2340
 CTTTCAAAGC TAAATTCCAC ACTACCACAT TAAAAAAATT AGAAAGTAGC CACGTATGGT 2400
 10 GGCTCATGTC TATAATCCCA GCACTTTGGG AGGTTGAGGT GGGAGGATTT GCTTGAACCC 2460
 AAGAGGTCCA AGGCTGCAGT GAGCCATGTT CACACCGCTG CACTCAAGCT TGGGTGACAG 2520
 AGCAAGACCC CGTCCCCAAA AAAATTTTTT TTTTAATAAA CCCAAATTG TTTGAAAAC 2580
 15 TTAAAAAATT CAAATGATTT TTACAAGTTT TAAATAAGCT CTCCCCAAAC TTGCTTTATG 2640
 CCTTCTTATT GCTTTTATGA TATATATATG CTTGGCTAAC TATATTGCT TTTTGCTAAC 2700
 AATGCTCTGG GGTCTTTTTA TGCATTGCA TTTGCTCTT CATCTCTGCT TGGATTATTT 2760
 20 TAAATCATTG GGAATTAAGT TATCTTTAAA ATTTAAGTAT CTTTTTTCCA AAACATTTTT 2820
 TAATAGAATA AATATATATT TGATCTTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2880
 AAAAAA 2887

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1323 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

40 AAATGCAAAC TGGATGATGA CATGAACCTG CTGGATATTT TCATAGAGAT CGAGAAGAGG 60
 GTCATCCTGG GAGAAGGAAA GTTGGACATC CTGAAAAGAG TCTGTGCCCA AATCAACAAG 120
 AGCCTGCTGA AGATAATCAA CGACTATGAA GAATTCAGCA AAGGGGAGGA GTTGTGTGGG 180
 45 GTAATGACAA TCTCGGACTC TCCAAGAGAA CAGGATAGTG AATCACAGAC TTTGGACAAA 240
 GTTTACCAA TGAAAAGCAA ACCTCGGGGA TACTGTCTGA TCATCAACAA TCACAATTTT 300
 GCAAAAGCAC GGGAGAAAGT GCCCAAACCT CACAGCATTG GGGACAGGAA TGGAACACAC 360
 50 TTGGATGCAG GGGCTTTGAC CACGACCTTT GAAGAGCTTC ATTTTGAGAT CAAGCCCCAC 420
 GATGACTGCA CAGTAGAGCA AATCTATGAG ATTTTGAAAA TCTACCAACT CATGGACCAC 480
 AGTAACATGG ACTGCTTCAT CTGCTGTATC CTCTCCCATG GAGACAAAGG CATCATCTAT 540
 55 GGCATGATG GACAGGAGGC CCCCATCTAT GAGCTGACAT CTCAGTTCAC TGGTTTGAAG 600
 TGCCCTTCCC TTGCTGAAA ACCCAAAGTG TTTTITAITC TTATCATCAC CTCAAACGAG 660
 ATATATCCCG GATGAGGCTG ACTTTCTGCT GGGGATGGCC ACTGTGAATA ACTGTGTTTC 720
 60 CTACCGAAAC CCTGCAGAGG GAACCTGGTA CATCCAGTCA CTTTGCCAGA GCCTGAGAGA 780
 GCGATGTCCT CGAGGCGATG ATATTCTCAC CATCCTGACT GAAGTGAAC ATGAAGTAAG 840
 CAACAAGGAT GACAAGAAAA ACATGGGGAA ACAGATGCCT CAGCCTACTT TCACACTAAG 900

65

ES 2 326 704 T3

```

5  AAAAAAAGTT GTCTTCCCTT CTGATTGATG GTGCTATTTT GTTTGTTTTG TTTTGTTTTG 960
   TTTTTTTGAG ACAGAAATCTC GCTCTGTGCG CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC GTGATCTCGG 1020
   CTCACCGCAA GCTCCGCCTC CCGGGTTCAC GCCATTCTCC TGCCTCAGCC TCCCGAGTAG 1080
   CTGGGACTAC AGGGGCCCCG CACCACACCT GGCTAATTTT TTAATAATAT TTTTAGTAGA 1140
   GACAGGGTTT CACTGTGTTA GCCAGGGTGG TCTTGATCTC CTGACCTCGT GATCCACCCA 1200
   CCTCGGCCTC CCAAAGTGCT GGGATTACAG GCGTGAGCCA CCGCGCCTGG CCGATGGTAC 1260
10 TATTTAGATA TAACACTATG TTTATTACT AATTTTCTAG ATTTTCTACT TTATTAATTG 1320
   TTT 1323

```

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 335 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

```

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

```

ES 2 326 704 T3

Ile Pro Val Glu Thr Asp Ser Glu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu Met Asp
 225 230 235 240
 Leu Ser Ser Pro Gln Thr Arg Tyr Ile Pro Asp Glu Ala Asp Phe Leu
 245 250 255
 Leu Gly Met Ala Thr Val Asn Asn Cys Val Ser Tyr Arg Asn Pro Ala
 260 265 270
 Glu Gly Thr Trp Tyr Ile Gln Ser Leu Cys Gln Ser Leu Arg Glu Arg
 275 280 285
 Cys Pro Arg Gly Asp Asp Ile Leu Thr Ile Leu Thr Glu Val Asn Tyr
 290 295 300
 Glu Val Ser Asn Lys Asp Asp Lys Lys Asn Met Gly Lys Gln Met Pro
 305 310 315 320
 Gln Pro Thr Phe Thr Leu Arg Lys Lys Leu Val Phe Pro Ser Asp
 325 330 335

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2619 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

GTAGTGGATA GGCCTGTGAC GAAGGTGCTA CCATCGTGAG AGTAAGATT AATTCTCCTG 60
 CCTTTTAAAA AGATGGACTT CAGCAGAAAT CTTTATGATA TTGGGGAACA ACTGGACAGT 120
 GAAGATCTGG CCTCCCTCAA GTTCCTGAGC CTGGACTACA TTCCGCAAAG GAAGCAAGAA 180
 CCCATCAAGG ATGCCTTGAT GTTATTCCAG AGACTCCAGG AAAAGAGAAT GTTGGAGGAA 240
 AGCAATCTGT CTTTCCTGAA GGAGCTGCTC TTCCGAATTA ATAGACTGGA TTTGCTGATT 300
 ACCTACCTAA AACTAGAAA GGAGGAGATG GAAAGGGAAC TTCAGACACC AGGCAGGGCT 360
 CAAATTTCTG CCTACAGGGT CATGCTCTAT CAGATTTTCA AAGAAGTGAG CAGATCAGAA 420
 TTGAGGTCTT TTAAGTTTCT TTTGCAAGAG GAAATCTCCA AATGCAAACCT GGATGATGAC 480
 ATGAACCTGC TGGATATTTT CATAGAGATG GAGAAGAGGG TCATCCTGGG AGAAGGAAAG 540
 TTGGACATCC TGAAAAGAGT CTGTGCCCAA ATCAACAAGA GCCTGCTGAA GATAATCAAC 600
 GACTATGAAG AATTCAGCAA AGGGGAGGAG TTGTGTGGGG TAATGACAAT CTCGGACTCT 660
 CCAAGAGAAC AGGATAGTGA ATCAGAGACT TTGGACAAAG TTTACCAAAT GAAAAGCAAA 720
 CCTCGGGGAT ACTGTCTGAT CATCAACAAT CACAATTTTG CAAAAGCACG GGAGAAAGTG 780
 CCCAACTTC ACAGCATTAG GGACAGGAAT GGAACACACT TGGATGCAGG GGCTTTTGACC 840
 ACGACCTTTG AAGAGCTTCA TTTTGAGATC AAGCCCCACG ATGACTGCAC AGTAGAGCAA 900
 ATCTATGAGA TTTTGAAAAT CTACCAACTC ATGGACCACA GTAACATGGA CTGCTTCATC 960
 TGCTGTATCC TCTCCCATGG AGACAAAGGC ATCATCTATG GCACTGATGG ACAGGAGGCC 1020
 CCCATCTATG AGCTGACATC TCAGTTCACT GGTTTGAAGT GCCCTTCCCT TGCTGGAAAA 1080

ES 2 326 704 T3

CCAAAGTGT TTTTATTCA GGCTTGTGAG GGGGATAACT ACCAGAAAGG TATACCTGTT 1140
 GAGACTGATT CAGAGGAGCA ACCCTATTTA GAAATGGATT TATCATCACC TCAAACGAGA 1200
 5 TATATCCCGG ATGAGGCTGA CTTTCTGCTG GGGATGGCCA CTGTGAATAA CTGTGTTTCC 1260
 TACCGAAACC CTGCAGAGGG AACCTGGTAC ATCCAGTCAC TTTGCCAGAG CCTGAGAGAG 1320
 CGATGTCCTC GAGGCGATGA TATTCTCACC ATCCTGACTG AAGTGAACATA TGAAGTAAGC 1380
 10 AACAGGATG ACAAGAAAAA CATGGGGAAA CAGATGCCTC AGCCTACTTT CACACTAAGA 1440
 AAAAAACTTG TCTTCCCTTC TGATTGATGG TGCTATTTTG TTTGTTTTGT TTTGTTTTGT 1500
 TTTTTTGAGA CAGAATCTCG CTCTGTGCGC CAGGCTGGAG TGCAGTGGCG TGATCTCGGC 1560
 15 TCACCGCAAG CTCCGCTCC CCGGTTCCAG CCATTCTCCT GCCTCAGCCT CCCGAGTAGC 1620
 TGGGACTACA GGGGCCCGCC ACCACACCTG GCTAATTTTT TAAAAATATT TTTAGTAGAG 1680
 ACAGGGTTTC ACTGTGTTAG CCAGGGTGGT CTTGATCTCC TGACCTCGTG ATCCACCCAC 1740
 CTCGGCTCC CAAAGTGCTG GGATTACAGG CGTGAGCCAC CGCGCTGGC CGATGGTACT 1800
 20 ATTTAGATAT AACACTATGT TTATTTACTA ATTTCTAGA TTTTCTACTT TATTAATTGT 1860
 TTTGCACTTT TTTATAAGAG CTAAAGTTAA ATAGGATATT AACACAATA AACTGTCTC 1920
 CTTTCTCTTA TGCTTAAGGC TTTGGGAATG TTTTAGCTG GTGGCAATAA ATACCAGACA 1980
 25 CGTACAAAAT CCAGCTATGA ATATAGAGGG CTTATGATTC AGATTGTTAT CTATCAACTA 2040
 TAAGCCCACT GTTAATATTC TATTAACCTT AATTCTCTTT CAAAGCTAAA TTCCACACTA 2100
 CCACATTAAT AAAATTAGAA AGTAGCCACG TATGGTGGCT CATGTCTATA ATCCAGCAC 2160
 30 TTTGGGAGGT TGAGGTGGGA GGATTTGCTT GAACCCAAGA GGTCCAAGGC TGCAGTGAGC 2220
 CATGTTTACA CCGCTGCACT CAAGCTTGGG TGACAGAGCA AGACCCCGTC CCCAAAAAAA 2280
 TTTTTTTTTT AATAAACCCA AATTGTTTG AAACTTTTA AAAATTCAA TGATTTTTAC 2340
 35 AAGTTTTAAA TAAGCTCTCC CCAAACCTGC TTTATGCCTT CTTATTGCTT TTATGATATA 2400
 TATATGCTTG GCTAACTATA TTTGCTTTTT GCTAACAAAT CTCTGGGGTC TTTTATGCA 2460
 TTTGCAATTC CTCTTTCATC TCTGCTTGA TTATTTTAAA TCATTAGGAA TTAAGTTATC 2520
 40 TTTAAATTT AAGTATCTTT TTTCCAAAC ATTTTTTAAAT AGAATAAAAT ATAATTTGAT 2580
 CTTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2619

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 464 aminoácidos

50 (B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

60 Met Asp Phe Ser Arg Asn Leu Tyr Asp Ile Gly Glu Gln Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Glu Asp Leu Ala Ser Leu Lys Phe Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Pro Gln
 20 25 30

65

ES 2 326 704 T3

Arg Lys Gln Glu Pro Ile Lys Asp Ala Leu Met Leu Phe Gln Arg Leu
 35 40 45
 Gln Glu Lys Arg Met Leu Glu Glu Ser Asn Leu Ser Phe Leu Lys Glu
 50 55 60
 Leu Leu Phe Arg Ile Asn Arg Leu Asp Leu Leu Ile Thr Tyr Leu Asn
 65 70 75 80
 Thr Arg Lys Glu Glu Met Glu Arg Glu Leu Gln Thr Pro Gly Arg Ala
 85 90 95
 Gln Ile Ser Ala Tyr Arg Val Met Leu Tyr Gln Ile Ser Glu Glu Val
 100 105 110
 Ser Arg Ser Glu Leu Arg Ser Phe Lys Phe Leu Leu Gln Glu Glu Ile
 115 120 125
 Ser Lys Cys Lys Leu Asp Asp Asp Met Asn Leu Leu Asp Ile Phe Ile
 130 135 140
 Glu Met Glu Lys Arg Val Ile Leu Gly Glu Gly Lys Leu Asp Ile Leu
 145 150 155 160
 Lys Arg Val Cys Ala Gln Ile Asn Lys Ser Leu Leu Lys Ile Ile Asn
 165 170 175
 Asp Tyr Glu Glu Phe Ser Lys Gly Glu Glu Leu Cys Gly Val Met Thr
 180 185 190
 Ile Ser Asp Ser Pro Arg Glu Gln Asp Ser Glu Ser Gln Thr Leu Asp
 195 200 205
 Lys Val Tyr Gln Met Lys Ser Lys Pro Arg Gly Tyr Cys Leu Ile Ile
 210 215 220
 Asn Asn His Asn Phe Ala Lys Ala Arg Glu Lys Val Pro Lys Leu His
 225 230 235 240
 Ser Ile Arg Asp Arg Asn Gly Thr His Leu Asp Ala Gly Ala Leu Thr
 245 250 255
 Thr Thr Phe Glu Glu Leu His Phe Glu Ile Lys Pro His Asp Asp Cys
 260 265 270
 Thr Val Glu Gln Ile Tyr Glu Ile Leu Lys Ile Tyr Gln Leu Met Asp
 275 280 285
 His Ser Asn Met Asp Cys Phe Ile Cys Cys Ile Leu Ser His Gly Asp
 290 295 300
 Lys Gly Ile Ile Tyr Gly Thr Asp Gly Gln Glu Ala Pro Ile Tyr Glu
 305 310 315 320
 Leu Thr Ser Gln Phe Thr Gly Leu Lys Cys Pro Ser Leu Ala Gly Lys
 325 330 335
 Pro Lys Val Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gln Gly Asp Asn Tyr Gln Lys
 340 345 350
 Gly Ile Pro Val Glu Thr Asp Ser Glu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu Met
 355 360 365
 Asp Leu Ser Ser Pro Gln Thr Arg Tyr Ile Pro Asp Glu Ala Asp Phe
 370 375 380
 Leu Leu Gly Met Ala Thr Val Asn Asn Cys Val Ser Tyr Arg Asn Pro
 385 390 395 400
 Ala Glu Gly Thr Trp Tyr Ile Gln Ser Leu Cys Gln Ser Leu Arg Glu
 405 410 415
 Arg Cys Pro Arg Gly Asp Asp Ile Leu Thr Ile Leu Thr Glu Val Asn
 420 425 430
 Tyr Glu Val Ser Asn Lys Asp Asp Lys Lys Asn Met Gly Lys Gln Met
 435 440 445
 Pro Gln Pro Thr Phe Thr Leu Arg Lys Lys Leu Val Phe Pro Ser Asp
 450 455 460

ES 2 326 704 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1301 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

```

15      CCAAATGCAA ACTGGATGAT GACATGAACC TGCTGGATAT TTTCATAGAG ATGGAGAAGA      60
      GGGTCATCCT GGGAGAAGGA AAGTTGGACA TCCTGAAAAG AGTCTGTGCC CAAATCAACA      120
      AGAGCCTGCT GAAGATAATC AACGACTATG AAGAATTCAG CAAAGGGGCT TTGACCACGA      180
20      CCTTTGAAGA GCTTCATTTT GAGATCAAGC CCCACGATGA CTGCACAGTA GAGCAAATCT      240
      ATGAGATTTT GAAAATCTAC CAACTCATGG ACCACAGTAA CATGGACTGC TTCATCTGCT      300
      GTATCCTCTC CCATGGAGAC AAAGGCATCA TCTATGGCAC TGATGGACAG GAGGCCCCCA      360
25      TCTATGAGCT GACATCTCAG TTCACTGGTT TGAAGTGCCC TTCCCTTGCT GGAAAACCCA      420
      AAGTGTTTTT TATTCAGGCT TGTCAAGGGG ATAAC TACCA GAAAGGTATA CCTGTTGAGA      480
      CTGATTGAGA GGAGCAACCC TATTTAGAAA TGGATTTATC ATCACCTCAA ACAGATATA      540
30      TCCCGGATGA GGCTGACTTT CTGCTGGGGA TGGCCACTGT GAATAACTGT GTTTCCTACC      600
      GAAACCTGCG AGAGGGAACC TGGTACATCC AGTCACTTTG CCAGAGCCTG AGAGAGCGAT      660
      GTCCTCGAGG CGATGATATT CTCACCATCC TGAAGTGAAGT GAACTATGAA GTAAGCAACA      720
35      AGGATGACAA GAAAAACATG GGGAAACAGA TGCCCTCAGCC TACTTTTACA CTAAGAAAAA      780
      AACTTGTCTT CCCTTCTGAT TGATGGTGCT ATTTTGTTTG TTTTGTTTGG TTTTGTTTTT      840
      TTGAGACAGA ATCTCGCTCT GTCGCCAGG CTGGAGTGCA GTGGCGTGAT CTCGGCTCAC      900
40      CGCGAGCTCC GCCTCCCGGG TTCACGCCAT TCTCTGCCT CAGCCTCCCG AGTAGCTGGG      960
      ACTACAGGGG CCCGCCATCA CACCTGGCTA ATTTTTTAAA AATATTTTGA GTAGAGACAG      1020
      GGTTCCTACTG TGTTAGCCAG GGTGGTCTTG ATCTCCTGAC CTCGTGATCC ACCCACCTCG      1080
45      GCCTCCCAA A GTGCTGGGAT TACAGGCGTG AGCCACGCG CCTGGCCGAT GGTACTATTT      1140
      AGATATAACA CTATGTTTAT TTAATAATTT TCTAGATTTT CTACTTTATT AATTGTTTTG      1200
      CACTTTTTTA TAAGAGCTAA AGTTAAATAG GATATTAACA ACAATAACAC TGTCTCCTTT      1260
50      CTCTTACGCT TAAGGCTTTG GGAATGTTTT TAGCTGGTGG C      1301

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 266 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

ES 2 326 704 T3

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

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 334 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

CCAAATGCAA ACTGGATGAT GACATGAACC TGCTGGATAT TTTCATAGAG ATGGAGAAGA 60
 60 GGGTCATCCT GGGAGAAGGA AAGTTGGACA TCCTGAAAAG AGTCTGTGCC CAAATCAACA 120
 AGAGCCTGCT GAAGATAATC AACGACTATG AAGAATTCAG CAAAGACTTT GGACAAAGTT 180
 TACCAAATGA AAAGCAAACC TCGGGGATAC TGTCTGATCA TCAACAATCA CAATTTTGCA 240
 65 AAAGCACGGG AGAAAGTGCC CAACTTCAC AGCATTAGGG ACAGGAATGG AACACACTTG 300
 GATGCAGGGT TTGAGAATGT TTTAGCTGG TGGC 334

ES 2 326 704 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 91 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

```

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

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 829 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

```

ATGGACTTCA GCAGAAATCT TTATGATATT GGGGAACAAC TGGACAGTGA AGATCTGGCC      60
TCCCTCAAGT TCCTGAGCCT GGACTACATT CCGCAAAGGA AGCAAGAACC CATCAAGGAT      120
GCCTTGATGT TATTCCAGAG ACTCCAGGAA AAGAGAATGT TGGAGGAAAG CAATCTGTCC      180
TTCCTGAAGG AGCTGCTCTT CCGAATTAAT AGACTGGATT TGCTGATTAC CTACCTAAAC      240
ACTAGAAAGG AGGAGATGGA AAGGGAACCT CAGACACCAG GCAGGGCTCA AATTTCTGCC      300

TACAGGGTCA TGCTCTATCA GATTCAGAA GAAGTGAGCA GATCAGAATT GAGGTCTTTT      360
AAGTTTCTTT TGCAAGAGGA AATCTCCAAA TGCAAACTGG ATGATGACAT GAACCTGCTG      420
GATATTTTCA TAGAGATGGA GAAGAGGGTC ATCCTGGGAG AAGGAAAGTT GGACATCTTG      480
AAAAGAGTCT GTGCCCAAAT CAACAAGAGC CTGCTGAAGA TAATCAACGA CTATGAAGAA      540
TTCAGCAAAG AGAGAAGCAG CAGCCTTGAA GGAAGTCCTG ATGAATTTTC AAATGGGGAG      600
GAGTTGTGTG GGGTAATGAC AATCTCGGAC TCTCCAAGAG AACAGGATAG TGAATCACAG      660
ACTTTGGACA AAGTTTACCA AATGAAAAGC AAACCTCGGG GATACTGTCT GATCATCAAC      720
AATCACAATT TTGCAAAAGC ACGGGAGAAA GTGCCCAAAC TTCACAGCAT TAGGGACAGG      780
AATGGAACAC ACTTGGATGC AGGGTTTGGG AATGTTTTTA GCTGGTGGC      829

```

ES 2 326 704 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 784 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

```

ATGGACTTCA GCAGAAATCT TTATGATATT GGGGAACAAC TGGACAGTGA AGATCTGGCC      60
TCCCTCAAGT TCCTGAGCCT GGACTACATT CCGCAAAGGA AGCAAGAACC CATCAAGGAT      120
GCCTTGATGT TATTCCAGAG ACTCCAGGAA AAGAGAATGT TGGAGGAAAG CAATCTGTCC      180
TTCCTGAAGG AGCTGCTCTT CCGAATTAAT AGACTGGATT TGCTGATTAC CTACCTAAAC      240
ACTAGAAAGG AGGAGATGGA AAGGGAACCT CAGACACCAG GCAGGGCTCA AATTTCTGCC      300
TACAGGGTCA TGCTCTATCA GATTTCAGAA GAAGTGAGCA GATCAGAATT GAGGTCTTTT      360
AAGTTTCTTT TGCAAGAGGA AATCTCCAAA TGCAAAGTGG ATGATGACAT GAACCTGCTG      420
GATATTTTCA TAGAGATGGA GAAGAGGGTC ATCCTGGGAG AAGGAAAGTT GGACATCCTG      480
AAAAGAGTCT GTGCCCAAAT CAACAAGAGC CTGCTGAAGA TAATCAACGA CTATGAAGAA      540
TTCAGCAAAG GGGAGGAGTT GTGTGGGGTA ATGACAATCT CGGACTCTCC AAGAGAACAG      600
GATAGTGAAT CACAGACTTT GGACAAAGTT TACCAAATGA AAAGCAAACC TCGGGGATAC      660
TGTCTGATCA TCAACAATCA CAATTTTGCA AAAGCACGGG AGAAAGTGCC CAAACTTCAC      720
AGCATTAGGG ACAGGAATGG AACACACTTG GATGCAGGGT TTGGGAATGT TTTTAGCTGG      780
TGGC

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 261 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

ES 2 326 704 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

GACTCGAGTC TAGAGTCGAC TTTTTTTTTT TTTTTT

37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 326 704 T3

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

GACTCGAGTC TAGAGTCGAC

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

GAGGATCCCC AAATGCAAAC TGGATGATGA C

31

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:

TTGGATCCAG ATGGACTTCA GCAGAAATCT T

31

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 277 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:

ES 2 326 704 T3

```

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

Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe
115     120     125
Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg
130     135     140
Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile
145     150     155     160
Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
165     170     175
Gly Val Asp Asp Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Asp Ala Asp
180     185     190
Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
195     200     205
Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
210     215     220
Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
225     230     235     240
Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
245     250     255
His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
260     265     270
Leu Tyr Phe Tyr His
275

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 293 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:

ES 2 326 704 T3

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

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 398 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:

ES 2 326 704 T3

	AAATGCAAAC TGGATGATGA CATGAACCTG CTGGATATTT TCATAGAGAT GGAGAAGAGG	60
	GTCATCCTGG GAGAAGGAAA GTTGGACATC CTGAAAAGAG TCTGTGCCCA AATCAACAAG	120
5	AGCCTGCTGA AGATAATCAA CGACTATGAA GAATTCAGCA AAGGGGAGGA GTTGTGTGGG	180
	GTAATGACAA TCTCGGACTC TCCAAGAGAA CAGGATAGTG AATCACAGAC TTTGGACAAA	240
	GTTTACCAAA TGAAAAGCAA ACCTCGGGGA TACTGTCTGA TCATCAACAA TCACAATTTT	300
	GCAAAAGCAC GGGAGAAAGT GCCCAAACCT CACAGCATTG GGGACAGGAA TGGAACACAC	360
10	TTGGATGCAG GGTTTGAGAA TGTTTTIAGC TGGTGGCA	398

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 33:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1443 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 33:

	CCAAATGCAA ACTGGATGAT GACATGAACC TGCTGGATAT TTTCATAGAG ATGGAGAAGA	60
	GGGTCATCCT GGGAGAAGGA AAGTTGGACA TCCTGAAAAG AGTCTGTGCC CAAATCAACA	120
30	AGAGCCTGCT GAAGATAATC AACGACTATG AAGAATTCAG CAAAGACTTT GGACAAAGTT	180
	TACCAATGA AAAGCAAACC TCGGGGATAC TGTCTGATCA TCAACAATCA CAATTTTGCA	240
	AAAGCACGGG AGAAAGTGCC CAAACTTCAC AGCATTAGGG ACAGGAATGG AACACACTTG	300
35	GATGCAGGGG CTTTGACCAC GACCTTTGAA GAGCTTCATT TTGAGATCAA GCCCCACGAT	360
	GACTGCACAG TAGAGCAAAT CTATGAGATT TGGAAAATCT ACCAACTCAT GGACCACAGT	420
	AACATGGACT GCTTCATCTG CTGTATCCTC TCCCATGGAG ACAAAGGCAT CATCTATGGC	480
40	ACTGATGGAC AGGAGGGCCC CATCTATGAG CTGACATCTC AGTTCACTGG TTTGAAGTGC	540
	CCTTCCCTTG CTGGAAAACC CAAAGTGTTT TTTATTCAGG CTTGTCAGGG GGATAACTAC	600
	CAGAAAGGTA TACCTGTTGA GACTGATTCA GAGGAGCAAC CCTATTTAGA AATGGATTTA	660
45	TCATCACCTC AAACGAGATA TATCCCGGAT GAGGCTGACT TTCTGCTGGG GATGGCCACT	720
	GTGAATAACT GTGTTTCCTA CCGAAACCCT GCAGAGGGAA CCTGGTACAT CCAGTCACTT	780
	TGCCAGAGCC TGAGAGAGCG ATGTCCTCGA GGCAGTGATA TTCTCACCAT CCTGACTGAA	840
50	GTGAACTATG AAGTAAGCAA CAAGGATGAC AAGAAAAACA TGGGGAACA GATGCCTCAG	900
	CCTACTTTCA CACTAAGAAA AAAAATTGTC TTCCCTTCTG ATTGATGGTG CTATTTTGTT	960
	TGTTTTGTTT TGTTTTGTTT TTTTGAGACA GAATCTCGCT CTGTCGCCCA GGCTGGAGTG	1020
55	CAGTGGCGTG ATCTCGGCTC ACCGCGAGCT CCGCCTCCCG GGTTCACGCC ATTCTCCTGC	1080
	CTCAGCCTCC CGAGTAGCTG GGAATACAGG GGCCCGCCAT CACACCTGGC TAATTTTTTA	1140
	AAAATATTTT TAGTAGAGAC AGGGTTTCAC TGTGTTAGCC AGGGTGGTCT TGATCTCCTG	1200
60	ACCTCGTGAT CCACCCACCT CGGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGCG TGAGCCACCG	1260
	CGCCTGGCCG ATGGTACTAT TTAGATATAA CACTATGTTT ATTTACTAAT TTTCTAGATT	1320
	TTCTACTTTA TTAATTGTTT TGCACCTTTT TATAAGAGCT AAAGTTAAAT AGGATATTAA	1380
65	CAACAATAAC ACTGTCTCCT TTCTCTTACG CTTAAGGCTT TGGGAATGTT TTTAGCTGGT	1440
	GGC	1443

ES 2 326 704 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 91 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 34:

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

35

40

45

50

55

60

65