



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 105**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97932575 .0**

86 Fecha de presentación : **11.07.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0939810**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.1999**

54 Título: **Factor intermediario de transcripción-2 TIF2.**

30 Prioridad: **12.07.1996 US 21247 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE;
Universite Louis Pasteur y
Bristol-Myers Squibb Company**

72 Inventor/es: **Chambon, Pierre;
Gronemeyer, Hinrich;
Voegel, Johannes y
Lutz, Yves**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 281 105 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

Factor intermediario de transcripción-2 TIF2.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un mediador de la transcripción de un receptor nuclear (RN). Más específicamente, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican para el factor intermediario de transcripción 2 (TIF2). También se proporcionan métodos recombinantes para preparar polipéptidos de TIF2 como también métodos de selección para identificar agonistas y antagonistas de la función de activación AF-2 de receptores nucleares, así como anticuerpos contra TIF2. También se proporcionan métodos de selección para identificar agonistas y antagonistas de la actividad del dominio de activación DA1 de TIF2, como también métodos de selección para identificar agonistas y antagonistas de la actividad del dominio de activación DA2 de TIF2.

15 **Antecedentes de la invención**

Los activadores que potencian la iniciación de la transcripción por ARN polimerasa B (II) se componen de al menos dos dominios funcionales: un dominio de unión a ADN y un dominio de activación (M. Ptashne, *Nature* 335:683-689 (1988); P.J. Mitchell *et al.*, *Science* 245:371-378 (1989)). Estos dos dominios son generalmente unidades funcionales separables y cada uno puede intercambiarse realmente con la región complementaria de un activador no relacionado, creando así activadores quiméricos funcionales (S. Green *et al.*, *Nature* 325:75-78 (1987)).

Se han realizado varios análisis de estructura-función de transcripcionales eucariotas, centrándose principalmente en las proteínas GAL4 y GCN4 de levaduras y en miembros de la familia de receptores nucleares. Las proteínas GAL4 y GCN4 activan la transcripción mediante la unión a una secuencia de activación en sentido 5' específica, que tiene muchas de las características de elementos potenciadores de eucariotas superiores (K. Struhl, *Cell* 49:295-297 (1987)). El activador de herpes simple VP16 representa otro tipo de activador, que activa la transcripción mediante la unión al factor de transcripción octamérico unido a ADN en lugar de la unión al ADN directamente (T. Gerster *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6347-6351 (1988)).

La familia de receptores nucleares, que incluye receptores para hormonas esteroideas, hormonas tiroideas, vitamina D, y el derivado de la vitamina A ácido retinóico, son también factores potenciadores de la transcripción que se unen directamente a ADN en presencia de su ligando relacionado mediante reconocimiento de elementos potenciadores específicos, es decir, elementos que responden a ligandos u hormonas (R.M. Evans, *Cell* 240:889-895 (1988)). Estos ligandos relacionados tienden a ser pequeñas moléculas hidrófobas, incluyendo hormonas esteroideas tales como estrógeno y progesterona, hormona tiroidea, vitamina D, y diversos retinoides (S. Halachmi *et al.*, *Science* 264:1455-1458 (1994); Gronemeyer, H. y Laudet, V., *Protein Profile* 2:1173-1308 (1995)).

Sin embargo, a pesar de su pequeño tamaño y estructura aparentemente sencilla, se sabe que los ligandos relacionados asociados con los RN provocan una amplia gama de respuestas fisiológicas. Los esteroides suprarrenales por ejemplo, tales como cortisol y aldosterona, influyen ampliamente en la homeostasis corporal, controlando el metabolismo del glucógeno y mineral, tienen efectos generalizados sobre los sistemas inmunitario y nervioso, e influyen en el crecimiento y la diferenciación de células cultivadas. Las hormonas sexuales (progesterona, estrógeno y testosterona) provocan el desarrollo y la determinación del sistema reproductor embrionario, masculinizan/feminizan el cerebro en el nacimiento, controlan la reproducción y el comportamiento relacionado en los adultos y son responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. La vitamina D es necesaria para el desarrollo óseo apropiado y desempeña un papel crítico en el metabolismo del calcio y la diferenciación ósea. De manera significativa, la producción aberrante de estas hormonas se ha asociado con un amplio espectro de enfermedad clínica, incluyendo cáncer y estados patológicos similares.

Todos los RN presentan una estructura modular, con de cinco a seis regiones definidas, denominadas A-F. La región N-terminal A/B contiene la función de activación AF-1, que puede activar constitutivamente la transcripción. La región C engloba el dominio de unión a ADN (DUA), que reconoce elementos relacionados de acción en cis. La región E contiene el dominio de unión a ligandos (DUL), una superficie de dimerización y la función de activación de la transcripción dependiente de ligandos AF-2 (revisado en Mangelsdorf, D.J. *et al.*, *Cell* 83:835-839 (1995a); Mangelsdorf & Evans, (*Cell* 83:841-850 (1995b); Beato, M. *et al.*, *Cell* 83:851-857 (1995); Gronemeyer & Laudet, "Transcription Factors 3: Nuclear Receptors", en *Protein Profile*, vol. 2, Academic Press (1995); Kastner, P. *et al.*, *EMBO J.* 11:629-642 (1992); Chambon, P., *FASEB J* 10:940-954 (1996)).

Varias clases de dominios en los activadores pueden mediar la activación de la transcripción. Los activadores de levaduras GAL4 y GCN4 y VP16 de herpes simple contienen todos dominios de activación que se componen de tramos ácidos de aminoácidos, que pueden actuar formando hélices α anfipáticas (I.A. Hope *et al.*, *Cell* 46:885-894 (1986); J. Ma *et al.*, *Cell* 48:847-853 (1987); E. Giniger *et al.*, *Nature* 330:670-672 (1987); S.J. Triezenberg *et al.*, *Genes Dev.* 2:718-729 (1988)). Las funciones de activación de las proteínas humanas Sp1 y CTF/NFI contienen zonas ricas en glutamina y prolina, respectivamente (A.J. Courey *et al.*, *Cell* 55:887-898 (1988); N. Mermod *et al.*, *Cell* 58:741-753 (1989)). Los estudios con receptores de las hormonas esteroideas han mostrado que tanto el dominio N-terminal A/B como el dominio C-terminal de unión a hormonas (DUH) contienen funciones de activación de la transcripción (AF) (M.T. Bocquel *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:2581-2595(1989); L. Tora *et al.*, *Cell* 59:477-487 (1989)). Las AF

del receptor de estrógenos humano (REh) no contienen tramos de aminoácidos ácidos (S. Halachmi *et al.*, *Science* 264:1455-1458 (1994)). Sin embargo, por el contrario, el receptor de glucocorticoides humano (RGh) contiene dos funciones de activación, τ -1 (ubicada en el dominio A/B) y τ -2 (ubicada en la región N-terminal del DUH), siendo ambas ácidas (S.M. Hollenberg *et al.*, *Cell* 55:899-906 (1988)).

A partir de los resultados de estudios sobre interferencia/secuestro ("squenching") transcripcional entre receptores nucleares y sobre la estimulación homo y heterosinérgica de la iniciación de la transcripción a partir de promotores mínimos mediante las funciones de activación presentes en REh (AF-1 y AF-2) y el activador ácido VP16, se ha propuesto que las AF pueden activar la transcripción interaccionando con diferentes componentes del complejo de iniciación básico (Bocquel *et al.*, *Nucl. Acid Res.* 17:2581-2595 (1989); Meyer *et al.*, *Cell* 57:433-442 (1989); L. Tora *et al.*, *Cell* 59:477-487 (1989)). Los estudios de las propiedades de interferencia/secuestro transcripcional de los DAA (dominios ácidos de activación), AF-1 de REh y AF-2 de REh, sin embargo, mostraron que tanto AF-1 como AF-2 de REh puede secuestrar activadores ácidos, tales como VP16, pero que lo contrario no era cierto, es decir, los DAA no secuestran las AF-1 o AF-2 de REh. Además, AF-1 y AF-2 de REh, que se distinguen claramente por sus propiedades sinérgicas, no obstante se secuestran entre sí (D. Tasset *et al.*, *Cell* 62:1177-1187 (1990)).

Basándose en estos resultados, se propuso que existe una cadena de factores intermediarios de transcripción (TIF), interpuesta entre factores potenciadores y los factores de transcripción básicos. Por ejemplo, se ha sugerido que AF-1 y AF-2 entran en contacto con la cadena de TIF en puntos funcionalmente equivalentes, mientras que se cree que los DAA interaccionan en un punto anterior en la serie (D. Tasset *et al.*, *Cell* 62:1177-1187 (1990)).

Se han caracterizado varios supuestos TIF coactivadores para las AF-2 de RN (véase Chambon, P., *FASEB J* 10:940-954 (1996); Glass, C.K. *et al.*, *Current Opin. Cell Biol.* 9:222-232 (1997); Horwitz, K.B. *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 10:1167-1177 (1996) para revisiones recientes). En particular, LeDouarin, B. *et al.*, *EMBO J* 15:6701-6715 (1996) han demostrado que es necesario y suficiente un fragmento de 10 aminoácidos de TIF1 α para mediar en la interacción con RXR de manera dependiente de ligando y de la integridad de AF-2. Notablemente, dentro de este fragmento de TIF1 α , identificaron un motivo LxxLLL (SEQ ID NO: 13), denominado caja RN, cuya integridad es necesaria para la interacción con receptores nucleares, y señalaron que este motivo se conserva en varios otros supuestos coactivadores (LeDouarin, B. *et al.*, *EMBO J* 15:6701-6715 (1996)). Mientras que TIF1 α y varios otros supuestos coactivadores no, o sólo escasamente, estimulan la transactivación mediante los RN en células de mamífero transfectadas de manera transitoria, se ha mostrado inequívocamente que la familia de TIF2/CRE-1 (Ofiate, S.A. *et al.*, *Science* 270:1354-1357 (1995); Voegel, J.J. *et al.*, *EMBO J* 15:3667-3675 (1996)), la familia de CBP/p300 (Kamei, Y. *et al.*, *Cell* 85:403-414 (1996); Chakravarti, D. *et al.*, *Nature* 5:99-103 (1996); Hanstein, B., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11540-11545 (1996); Smith, C.L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8884-8888 (1996); para revisiones recientes véase Eckner, R., *Biol. Chem.* 377:685-688 (1996); Janknecht & Hunter, *Current Biol.* 6:951-954 (1996b); Shikama, N. *et al.*, *Trends in Cell Biol.* 7:230-236 (1997)) y el coactivador del receptor de andrógenos ARA70 (Yeh & Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5517-5521 (1996)) potencian la actividad AF-2.

Además de la unión a los RN, CBP/p300 también puede interaccionar directamente con CRE-1 (Kamei, Y. *et al.*, *Cell* 85:403-414 (1996); Yao, T.P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10626-10631 (1996)) y se ha mostrado que ambos ejercen actividad histona acetiltransferasa (Bannister & Kouzarides, *Nature* 384:641-643 (1996); Ogryzko, V.V. *et al.*, *Cell* 87:953-959 (1996)). Además, CBP/p300 puede reclutar p/CAF que es en sí mismo una histona acetiltransferasa nuclear (Yang, X.J. *et al.*, *Nature* 382:319-324 (1996)). Sin embargo, aparte de interaccionar con coactivadores de manera dependiente de ligando, también se ha mostrado que los RN interaccionan, a menudo de manera independiente de ligando, directa o indirectamente con componentes de la maquinaria transcripcional, tal como TFIIB, TBP, TAF, o TFIIF (Baniahmad *et al.*, (1993)); Jacq, X. *et al.*, *Cell* 79:107-117 (1994); Schulman, I.G. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 16:3807-3813 (1996); May, M. *et al.*, *EMBO J* 15:3093-3104 (1996); Mengus, G. *et al.*, *Genes & Dev.* 11:1381-1395 (1997)).

Hong, H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4948-4952 (1996) describieron originalmente un ADNc parcial del homólogo de ratón de de TIF2, denominado GRIP1, y notificaron recientemente el aislamiento de un ADNc de longitud completa de GRIP1 (Hong, H. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 17:2735-2744 (1997)). Usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo, han demostrado que la activación de la transcripción mediante TR, RAR y RXR, podría estimularse también mediante la coexpresión de GRIP1, lo que sugiere que TIF2/GRIP1 podría ser un coactivador general para los RN (Hong, H. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 17:2735-2744 (1997)).

El panorama global resultante de múltiples estudios recientes sobre los mecanismos mediante los cuales los receptores nucleares modulan la transcripción génica diana supone tres etapas posteriores, (i) la transconformación inducida por ligando del DUL de RN, que da como resultado (ii) la disociación de correpresores y la formación de complejos de TIF/coactivador, que ellos mismos (iii) a través de la interacción con factores posteriores adicionales (por ejemplo, CBP, p300) modulan el estado de acetilación de las histonas del núcleo y, por tanto, la condensación/descondensación de la cromatina. Sin embargo, la acetilación de histonas por sí misma es insuficiente para la activación de la transcripción (Wong *et al.*, (1997)), y un cuarto acontecimiento simultáneo o posterior comprende el reclutamiento directo y/o indirecto de elementos de la maquinaria transcripcional (por ejemplo, TFIIB, TBP, TAF, TFIIF; Jacq, X. *et al.*, *Cell* 79: 107-117 (1994); Schulman, I.G. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 16:3807-3813 (1996); May, M. *et al.*, *EMBO J* 15:3093-3104 (1996); Mengus, G. *et al.*, *Genes & Dev.* 11:1381-1395 (1997)). Obsérvese que tales interacciones no necesitan ser dependientes de ligando, si la función primaria del DUL unido a ligando (AF-2) es regular la accesibilidad al ADN a través de remodelación de la cromatina. De hecho, varias de las interacciones notificadas entre los RN y los factores

de transcripción generales se producen de manera independiente de ligando. En consecuencia, hay una necesidad en la técnica para el aislamiento y caracterización de factores intermediarios de transcripción.

Sumario de la invención

Examinando 340.000 clones de una biblioteca de expresión de ADNc de placenta humana con una sonda de receptor de estrógenos unida a estradiol, los presentes inventores han identificado un clon de ADNc que contiene el gen que codifica para el factor intermediario de transcripción 2 (TIF2). Mediante la invención, se ha demostrado que TIF2 muestra todas las propiedades esperadas para un TIF/mediador de AF-2: interacciona directamente con los DUL de varios RN de una manera dependiente de agonista y de la integridad de AF-2 *in vitro* e *in vivo*, alberga una AF autónoma, alivia el autosecuestro de RN, y potencia la actividad de los AF2 de RN cuando están sobreexpresados en células de mamíferos.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica para TIF2 cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO:2) o un fragmento del mismo que tiene una actividad tal como se describe a continuación en el presente documento. En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican para TIF2, que tienen una secuencia de aminoácidos según se codifica por el ADNc depositado como ATCC número de registro 97612.

También se describe una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones restrictivas a las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas. Además, se describen variantes de moléculas de ácido nucleico de la presente invención, que codifican para fragmentos, análogos o derivados de la proteína TIF2, por ejemplo, polipéptidos que tienen al menos una actividad biológica que es sustancialmente similar a al menos una actividad biológica de la proteína TIF2.

La presente invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido TIF2 citoplásmico. Métodos para generar moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido TIF2 citoplásmico incluyen mutar o eliminar la región N-terminal que codifica para los NLS de la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO:1). Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido TIF2 citoplásmico serán fragmentos que tienen una eliminación en todo o en parte de la región N-terminal que codifica para los NLS. Mediante la invención, los polipéptidos TIF2 citoplásmicos descritos en el presente documento muestran al menos una actividad biológica que es sustancialmente similar a al menos una actividad biológica de TIF2 tal como se describe en el presente documento.

Realizaciones adicionales de la invención incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica en al menos un 90%, y más preferiblemente idéntica en al menos un 95%, un 96%, un 97%, un 98%, o un 99% a las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas.

La presente invención también se refiere a vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas, células huésped transformadas con los vectores y la producción de polipéptidos TIF2 mediante métodos recombinantes.

La presente invención proporciona además polipéptidos TIF2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 2). En un aspecto adicional, se proporcionan polipéptidos TIF que tienen una secuencia de aminoácidos según se codifica por el ADNc depositado como ATCC número de registro 97612.

También se proporcionan métodos de selección para identificar agonistas y antagonistas de la función AF-2 de receptor nuclear, para identificar agonistas y antagonistas de la actividad DA1 de TIF2, y para identificar agonistas y antagonistas de la actividad DA2 de TIF2. También se proporcionan anticuerpos contra TIF2.

Breve descripción de las figuras

Figura 1(a-b). Las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) y aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la proteína del factor intermediario de transcripción (TIF2). Esta proteína tiene un peso molecular deducido de aproximadamente 160 kDa. Se muestra la secuencia de aminoácidos del fragmento de proteína TIF2.1 del coactivador funcional desde el residuo de aminoácido 624 hasta el residuo 1287.

Figura 2(a-c). TIF2 es el factor de interacción con el receptor nuclear de 160 kDa.

(a) los experimentos pull-down GST (determinación de interacción física entre dos o más proteínas) identifican una proteína de 160 kDa que interacciona con dominios de unión a ligando (DUL) del receptor de ácido retinóico (RAR)- α y del receptor de estrógenos (RE) unido a ligandos (RE(DEF) y RAR α (DEF), respectivamente). Obsérvese que se usa menos material en el carril 5 que en los carriles 1-4.

(b) La inmunoreducción seguido de detección por inmunotransferencia tipo Far-Western demuestra la identidad de TIF2 con la proteína de 160 kDa bioquímicamente identificada. Triángulo en blanco, TIF2; punta de flecha, TIF1; círculo, reacción cruzada de anticuerpo con GST-RE(DEF). La especie inmunodetectada por α -TIF2 menor que

TIF2 (carriles 2 y 6) es lo más probablemente un producto de degradación de TIF2, dado que se elimina mediante inmunoreducción con α -TIF2 (carriles 4 y 8).

(c) La inmunotransferencia tipo Northern revela un transcrito de ≈ 9 kb de TIF2 en varios tejidos humanos.

Métodos. (a) Extractos de células completas MCF7 marcados con ^{35}S -Met *in vivo* (Cavaillès, V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10009-100013 (1994)) preacclarados dos veces con glutatión sepharose cargada con GST se incubaron (Le Douarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 14:2020-2033 (1995)) con GST, GST-REh (DEF) o GST RAR α (DEF), en presencia o ausencia de E2 o T-AR 10^{-6} M. Se recuperaron las proteínas unidas con un tampón de muestra SDS y se revelaron mediante fluorografía (Amplify, Amersham) de geles SDS-poliacrilamida.

(b) Se preacclararon extractos de células completas HeLa (2 ml en NaCl 500 mM, TrisHCl 250 mM pH 7,5, glicerol al 20%, DTT 5 mM), con proteína-G sepharose (400 μl) y se trataron con proteína-G sepharose (3 x 400 μl) cargada con α -TIF2 (obtenido contra un péptido sintético que engloba los aminoácidos E624-Q643 acoplados a ovalbúmina) o suero IgG de ratón no específico. Tras aclarados adicionales con proteína-G sepharose (400 μl), se incubó el sobrenadante (Le Douarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 14:2020-2033 (1995)) con GST-REh(DEF) en presencia o ausencia de E2 (10^{-6} M). Se recuperaron las proteínas retenidas con tampón de muestra SDS, se separaron mediante SDS-PAGE y se sometieron a electroinmunotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa. La inmunotransferencia tipo Far Western fue tal como se describe (Cavaillès, V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10009-100013 (1994)). Para la inmunotransferencia se usó antisuero policlonal de conejo (α -TIF2), obtenido contra (Chen, Z-P. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:25770-25776 (1994)) TIF2.1 marcada con His expresada en *E. coli* recombinante purificada. Se diluyeron α -TIF2 y α -TIF1 policlonal de conejo 1:2000 para inmunotransferencia tipo Western basada en ECL (Amersham). Se verificaron todas las construcciones usados en este estudio mediante secuenciación de ADN.

(c) Se reveló una inmunotransferencia tipo Northern Humano (Clontech, No 7760-1; Lote 5x332) con TIF2.1 marcado con P. Para confirmar una carga proporcionada, se rehibridó la membrana con ADNc de β -actina marcado con ^{32}P (Clontech).

Figura 3(a-b). La secuencia de aminoácidos de TIF2: homología con CRE-1 indica la existencia de una familia novedosa de mediadores de RN.

(a) Alineamiento y secuencia de aminoácidos de TIF-2 (SEQ ID NO:2) y el coactivador del receptor de esteroides CRE-1 (SEQ ID NO:3) (Onate, S.A. *et al.*, *Science* 270:1354-1357 (1995)). Se resaltan dos agrupaciones cargadas ricas en restos de aminoácidos ácidos y básicos, tres regiones ricas en serina/treonina (S/T) y una región rica en glutamina. La agrupación cargada en el extremo N-terminal contiene señales de localización nuclear (NLS) bipartitas supuestas (subrayado superior). Se indican las regiones que codifican para TIF2.1 (aminoácidos 624 a 1287; fragmento coactivador funcional) y dnCRE-1 (aminoácidos 865 a 1061; fragmento negativo dominante). Un asterisco identifica el codón de terminación de TIF2. Obsérvese que TIF2.1 y dnCRE-1 no solapan, lo que indica que dnCRE-1 puede posiblemente contener una región que interacciona con RN distinta de la de TIF2.1.

(b) Comparación esquemática de TIF2 y CRE-1. Se indican las identidades en porcentaje (similitudes entre paréntesis) de regiones homólogas. La agrupación cargada en el extremo N-terminal que alberga las NLS supuestas y la región rica en S/T C-terminal de TIF2 no están, o sólo débilmente, conservadas en CRE-1.

Métodos. Se examinaron 340.000 clones de una biblioteca de expresión λ EXIox de ADNc de placenta humana con una sonda GST-REh(DEF) marcada con ^{32}P en presencia de E2 10^{-6} M usando la técnica de inmunotransferencia tipo Far-Western (Cavaillès, V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10009-100013 (1994)). Se usó un inserto de 1992 pb correspondiente al clon inicial (TIF2.1) para reexaminar la misma biblioteca. Cinco insertos de ADNc sumamente solapados cubren una región de 6 kb que contienen un ORF de 1.464 aminoácidos. Se secuenciaron todos los insertos en ambas cadenas. La expresión transitoria de los insertos de ADNc ensamblado que engloban el ORF predicho dio una proteína de 160 kDa.

Figura 4(a-n). Interacciones *in vivo* e *in vitro* de TIF2 con receptores nucleares.

(a) La proteína TIF2 sobreexpresada se localiza principalmente en cuerpos nucleares discretos y se excluye de los nucleolos. Se muestra una imagen superpuesta de tinción Hoechst de ADN e inmunotinción de TIF2.

(b-i) TIF2.1 citoplásmico interacciona de una manera dependiente de agonista con receptores nucleares en células de mamíferos. Una tinción débil indica un colocalización de TIF2.1-NO.

(k-n) TIF2.1 interacciona directamente *in vitro* de una manera dependiente de agonista con receptores nucleares, y las mutaciones puntuales dentro del núcleo del dominio de activación (DA) de AF-2 suprimen esta interacción. WT, tipo natural. Concentraciones de ligando para n: 9C-AR, T-AR y T3, 10^{-6} M; E2, 5×10^{-8} M; OHT, 5×10^{-6} M. El polipéptido inmunodetectado menor es un producto de degradación de TIF2.1. Obsérvese que el suero anti-TIF2 reacciona de manera cruzada débilmente con GST-REh(DEF).

Métodos. (a-i) Se transfectaron transitoriamente células Cos-1 con TIF2.1 (10 μg) o bien (a) solas o bien (b-i) junto con los vectores de expresión de RN indicados (10 μg , excepto RAR α , 1 μg) en ausencia o presencia del ligando

ES 2 281 105 T3

relacionado (10^{-6} M, excepto R5020, 10^{-8} M). En d-f se usó HE0 (Webster, N.J. *et al.*, *Cell* 54:199-207(1988)). Los ensayos de inmunocitofluorescencia fueron tal como se describen (Kastner, P. *et al.*, *EMBO J.* 11: 629-642 (1992)). Se grabaron imágenes mediante microscopía láser confocal.

(k-n) Se realizaron ensayos de interacción de GST con TIF2.1 recombinante que expresa en *E. coli* (Figura 2b) tal como se describen (Le Douarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 14:2020-2033 (1995)). Se revelaron proteínas unidas mediante inmunotransferencia tipo Western con antisuero α -TIF2 (dilución 1:30.000), se verificó igual carga de matrices de afinidad mediante SDS-PAGE y tinción Coomassie. Los carriles de “entrada” contienen un tercio de la entrada de TIF2.1.

Figura 5 (a-e). TIF2 contiene una AF autónoma, “anti-secuestra”, y estimula la actividad NO-AF2 de una manera dependiente de célula, promotor y agonista.

(a) Aumentar la cantidad de proteína de fusión GAL-TIF2.1 (carriles 2-4) activa la transcripción de un indicador relacionado en células transfectadas. El número de veces de inducción se da debajo de los ensayos CAT.

(b) TIF2.1 invierte parcialmente la autointerferencia transcripcional de RE. Se muestra la expresión CAT normalizada (media $\pm$ e.e. de 4 experimentos independientes).

Círculos blancos, +E2, +TIF2; cuadrados, +E2, -TIF2; cruces, +OHT, +TIF2.

(c) TIF2 potencia la transactivación mediada por algunas AF-2 de RN, pero no aquellas mediadas por otros factores de transcripción. Se dan las estimulaciones de TIF2 medias de 3 experimentos independientes (variación $< 13\%$). Ligandos: carriles 3-4, E2; carriles 7-8, DHT (dihidrotosterona); carriles 11-12, R5020; carriles 15-16, T-AR.

(d) TIF2 potencia la activación de la transcripción mediada por RP de un promotor tanto mínimo (GRE-TATA) como complejo (MMTV): esta estimulación es significativamente mayor en células Cos-1 que en células HeLa.

(e) TIF2 potencia mucho la activación inducida de agonista mediante RE en Cos-1 y más débilmente en células HeLa. Obsérvese que la inducción por TIF2 aparentemente independiente de ligando, débil, de RE (compárense carriles 1 con 2 y 7 con 8) se debe a estradiol residual en el medio de cultivo. En d y e, se muestran inducciones por TIF2 de ≥ 3 experimentos (variación $\leq 10\%$).

Métodos. Con la excepción de GAL-TIF2.1, TIF2.1 y TIF2, se ha descrito la construcción de plásmidos indicadores y vectores de expresión (Meyer, M-E. *et al.*, *Cell* 57:433-442 (1989); Bocquel, M-T. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:2581-2595 (1989); Tasset, D. *et al.*, *Cell* 62:1177-1187 (1990); Gronemeyer, H. y Laudet, V., *Protein Profile* 2:1173-1308 (1995); Webster, N. J. *et al.*, *Cell* 54:199-207(1988); Strahle, U. *et al.*, *EMBO J.* 7:3389-3395 (1988); Seipel, K. *et al.*, *EMBO J.* 11:4961-4968 (1992); Nagpal, S. *et al.*, *EMBO J.* 12:2349-2360 (1993); Chen, J-Y. *et al.*, *EMBO J.* 14:1187-1197(1995)). Se realizaron ensayos CAT tal como se describe (Bocquel, M-T. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:2581-2595 (1989)).

(a) Se cotransfectaron células HeLa con 1 μ g de (17m) $_5$ - β G-CAT y 10 μ g de GAL(1-147) o 1,3 y 10 μ g de GAL(1-147)-TIF2.1, respectivamente.

(b) Se cotransfectaron células HeLa con 5 μ g de Vit-tk-CAT y la cantidad indicada de HEG0, con o sin 5 μ g de TIF2.1 en la presencia de OHT o E2 10^{-6} M. Se da la actividad CAT con respecto a la inducida por 100 ng de HEG0 en presencia de E2.

(c) Se cotransfectaron células HeLa con 1 μ g de 17m-tk-CAT y 1 μ g de los vectores de fusión-GAL indicados con o sin la adición de 3 μ g de vector de expresión de TIF2 en presencia o ausencia de ligando 10^{-6} M.

(d) Se transfectaron células HeLa (carriles 1-12) o Cos-1 (carriles 13-18) con 5 μ g de GRE-TATA-CAT (carriles 1-6) o 1 μ g de MMTV-CAT (carriles 7-18) junto con 1 μ g de RPh con o sin 3 μ g de TIF 2 en presencia o ausencia de 10^{-6} M del ligando indicado.

(e) Se cotransfectaron células Cos-1 con 1 μ g de Vit-tk-CAT y 1 μ g de HEG0 con o sin 3 μ g de TIF2 en presencia o ausencia de 10^{-6} M de los ligandos indicados.

Figura 6 (a-b). Representación esquemática de genes indicadores (A) y vectores de expresión de receptor (B) (véase la sección de Materiales y Métodos de Nagpal *et al.*, *EMBO J* 12(6):2349-2360 (1993) para una descripción detallada de la construcción). Se indican secuencias de mCRBP II (SEQ ID NO: 11) y mCRBP II(17m-ERE)/CAT (SEQ ID NO:11). Los números positivos y negativos son con respecto al sitio de inicio de ARN (+1). En (B), se representan esquemáticamente (no en escala) las distintas regiones (A-F) de RAR y RXR de tipo natural, así como sus mutantes de truncación, mutantes de sustitución y construcciones de receptores quiméricos (véase Zelent *et al.*, *Nature* 339:714-717 (1989); Leid *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 17:427-433 (1992); Leid *et al.*, *Cell* 68:377-395 (1992); Nagpal *et al.*, *Cell* 70:1007-1019 (1992); y Allenby *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:30-34 (1993)). Los números indican las posiciones de los aminoácidos en los receptores de tipo natural. Las posiciones de las sustituciones de los aminoácidos están indicadas con una flecha.

Figura 7(a-e). Mapeo de dominios TIF2.

(a) Representación esquemática de dominios funcionales identificados en TIF2. Se indican las distintas construcciones de TIF2; los restos expresados se dan entre paréntesis. Las líneas en negrita indican las secuencias expresadas. Las construcciones que puntúan positivo o negativo para la interacción, transactivación o unión a CBP del RN se identifican en la derecha mediante signos “+” y “-” respectivamente; nd, no determinado.

(b) Mapeo del dominio de TIF2 que interacciona con el receptor nuclear. Se realizan experimentos pull-down en glutatión-S-transferasa (GST) con polipéptidos TIF2 traducidos *in vitro* marcados con ^{35}S y GST, GSTREh α (DEF) y GST-RARh α (DEF) producidos de manera bacteriana, en la presencia o ausencia de 10^{-6} M del ligando relacionado (E2, estradiol para RE; AR, ácido todo *trans-retinóico* para RAR).

(c) Análisis de la actividad de transcripción de las proteínas de fusión GAL-TIF2. Se transfectaron células Cos-1 y HeLa con 3 μg de plásmidos que expresan distintas regiones de TIF2 fusionadas al dominio de unión a ADN del factor de transcripción GAL4 de levadura con 1 μg del plásmido indicador (17m) $_5$ -G-CAT. Se realizaron ensayos CAT tal como se describe (Bocquel, M.T. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:2581 2595 (1989)). Se obtuvieron datos cuantitativos sobre la expresión del indicador CAT o bien mediante análisis de sistema de detección y cuantificación de la radiactividad (BAS2000, Fuji) de productos de reacción CAT marcados con ^{14}C separados mediante cromatografía de capa fina, o usando el kit CAT ELISA (Boehringer Mannheim). En todos los casos, se normalizaron las actividades CAT con respecto a las concentraciones de β -galactosidasa resultantes de la cotransfección de 1 μg de pCMV β Gal (regalo de T. Lerouge) como control interno. Se indica el número de veces de inducciones por encima del valor de DUA GAL4. Se muestran la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos. Se muestra en la izquierda una inmunotransferencia tipo Western representativa, que ilustra los niveles de expresión de las proteínas de fusión GAL4-TIF2, expresadas a partir de 10 μg de los correspondientes vectores de expresión. La inmunotransferencia se reveló con anticuerpos monoclonales de ratón 2GV3 y 3GV2 específico para DUA de GAL4 y 2GV4B7 específico para el dominio de activación VP16.

(d) Mapeo del dominio de TIF2 que interacciona con GBP. Se realizaron experimentos pull-down con polipéptidos TIF2 traducidos *in vitro* marcados con ^{35}S y GST y GST-CBP (que expresa restos de CBP 1872 a 2165) producidos de manera bacteriana.

(e) Análisis de dos híbridos de la interacción de CBP-TIF2 en células de mamífero *in vivo*. Se transfectaron células HeLa con 0,2 μg de vectores de expresión GAL4 o GAL4-CBP (que expresa los restos de CBP 1872 a 2165) junto con 0,2 μg de vectores de expresión VP16-TIF2 o VP16 en presencia de 1 μg de plásmido informador (17m) $_5$ -TATA-CAT. Se indica el número de veces de inducción con respecto a la actividad de GAL-CBP. Se muestra la media de tres experimentos; en cada caso, los valores variaron en menos de un $\pm 20\%$.

Figura 8(a-e). Mapeo del dominio de interacción con el receptor nuclear (DIN) de TIF2.

(a) Alineamiento del DIN de TIF2 (SEQ ID NO: 2) con las regiones correspondientes de CRE-1 (SEQ ID NO: 3) y P/CIP (SEQ ID NO: 5) y descripción de mutaciones del DIN. Se muestran las tres regiones conservadas con los números de aminoácidos correspondientes de TIFh2 o CREh-1 de longitud total (F-CRE-1); se recuadran las leucinas relativas a los tres motivos de cajas de RN (I, II, III). Se indican las diversas construcciones de mutaciones puntuales de leucina a alanina y de eliminación.

(b) Alineamiento de las cajas de RN de TIF2 (SEQ ID NO: 2) con cajas de RN identificadas en varios cofactores: TIF1 α (SEQ ID NO: 6), RIP140 (SEQ ID NO: 7), y TRIP3 (SEQ ID NO: 8). Las leucinas conservadas están recuadradas.

(c-d) Interacción de mutantes de DIN de TIF2 con los RN *in vitro*. Se llevaron a cabo experimentos de cromatografía por afinidad en GST con fusiones DUA de GAL4 traducidas *in vitro* marcadas con ^{35}S de mutantes de eliminación de TIF2 (c) o mutantes puntuales de TIF2.1 (d) y fusiones de GST y GST expresada de manera bacteriana de RE (DEF) y RAR(DEF) en ausencia o presencia de estradiol 10^{-6} M o ácido todo *trans-retinoico*, respectivamente. Para la cuantificación de interacciones de mutantes puntuales, véase a continuación.

(e) Efecto de mutaciones puntuales de DIN de TIF2 sobre la estimulación de la actividad de AF-2 de RN. Se co-transfectaron células Cos-1 con 1 μg del informador (17m) $_5$ -TATA-CAT, 0,2 μg de GAL-REh α (EF) o GAL-RXRm α (DE), y 2,5 μg de TIF2.1 tipo natural o fragmentos mutados, según se indica. Se indica la activación del gen indicador con respecto a la actividad de tipo natural de TIF2.1 y en presencia de estradiol (E2) 10^{-6} M o ácido todo *trans-retinoico* (AR), respectivamente, para cada mutante (barras negras); para comparar se indican mediante barras blancas la unión *in vitro* de los mutantes respectivos con respecto a la unión de tipo natural de TIF2.1 en presencia de ligando. Cada barra representa el valor medio obtenido a partir de al menos tres (interacción) o al menos cuatro (transactivación) experimentos, respectivamente; se indican las desviaciones estándar. Obsérvese que los valores absolutos para la actividad de tipo natural de TIF2.1 varía en un $\pm 16\%$ cuando se cotransfectan con GAL-REh α (EF) y en un $\pm 34\%$ cuando se cotransfectan con GAL-RXRm α (DE). En los ensayos de interacción *in vitro*, la afinidad del patrón de tipo natural de TIF2.1 variaba en menos de un $\pm 25\%$. Se verificaron los niveles de expresión de mutantes de TIF2 en las células mediante inmunotransferencia tipo Western (no mostrados) con anticuerpo 3Ti3F1 monoclonal de ratón, que se dirige contra un epítipo fuera del área mutada.

Figura 9(a-c). Mapeo de la función de activación-1 (AF-1) de TIF2 e interacción del dominio de AF-1 con CBP.

(a) Alineamiento de la AF-1 de TIF2 con la región correspondiente de CRE-1 (SEQ ID NO: 3) y P/CIP (SEQ ID NO: 9). Descripción de los mutantes de eliminación de AF-1 de TIF2 y sus propiedades. Las regiones de TIF2 y CREh-1 que se predijo se doblarían en hélices α se recuadran (programa PHD). Las construcciones GAL-TIF2 que puntúan positivo o negativo para la transactivación de un indicador de GAL4 se identifican a la derecha mediante signos “+” y “-”, respectivamente; nd, no determinado.

(b) Activación de la transcripción de mutantes de AF-1 de TIF2. Se cotransfectaron células Cos-1 y HeLa con 3 μ g de plásmidos que expresan distintos mutantes de AF-1 de TIF2 fusionados al dominio de unión a ADN del factor de transcripción de la levadura GAL4 junto con 1 μ g del plásmido indicador (17m)₅-G-CAT. Se indican las veces de inducción sobre la activación observada con el DUA de GAL4 sólo. Los valores representan la media de al menos tres experimentos. Obsérvese que todas las proteínas de fusión GAL4-TIF2 se expresaron a niveles similares, tal como se revela mediante inmunotransferencia tipo Western con anticuerpos dirigidos contra DUA de GAL4 (datos no mostrados).

(c) Interacción de mutantes de AF-1 de TIF2 con CBP *in vitro*. Se realizaron experimentos pull-down en GST con proteínas de fusión GAL-TIF2 traducidas *in vitro* marcadas con ³⁵S y GST y GST-CBP producidas de manera bacteriana. Obsérvese, que DUA de GAL4 por sí mismo no interacciona con la matriz de afinidad GST-CBP.

Figura 10(a-c). Identificación de mutantes de AF-1 de TIF2 que están dañados tanto en la activación transcripcional como en la interacción CBP.

(a) Activación de la transcripción mediante TIF2.13 y mutantes de TIF2.13. Se cotransfectaron células Cos-1 y HeLa con 3 μ g de plásmidos que expresan la región TIF2.13 y los mutantes de TIF2.13 indicados fusionados al dominio de unión a ADN del factor de transcripción GAL4 de levadura junto con 1 μ g de plásmido indicador (17m)₅-G-CAT. Se indican las veces de inducción sobre el valor de 1 vez de DUA de GAL4. Se muestran la media y la desviación estándar obtenida de al menos cuatro experimentos. Se confirmaron los niveles de expresión de las proteínas de fusión GAL4-TIF2.13 mediante inmunotransferencia tipo Western (datos no mostrados).

(b) Interacción de TIF2.13 tipo natural y mutantes de TIF2.13 con CBP en células de mamíferos revelada mediante análisis de dos híbridos. Se transfectaron células HeLa con 0,2 μ g de vectores de expresión GAL-CBP o GAL4 junto con 0,2 μ g de vectores de expresión VP16 o VP16-TIF2.13 en la presencia de 1 μ g de plásmido indicador (17m)₅-TATA-CAT. Los datos se representan como veces de inducción de la actividad observada con GAL-CBP sólo. Se muestran la media y la desviación estándar obtenidas a partir de diez experimentos. Se confirmaron los niveles de expresión mediante inmunotransferencia tipo Western con anticuerpos dirigidos contra DUA de GAL4 y DAA de VP16 (datos no mostrados).

(c) Interacción de TIF2.13 de tipo natural y mutantes de TIF2.13 con CBP *in vitro*. Se realizaron experimentos pull-down GST con polipéptidos VP16-TIF2.13 traducidos *in vitro* marcados con ³⁵S y GST y GST CBP producidos de manera bacteriana. Obsérvese que el dominio de activación de VP16 por sí mismo no interacciona con GST-CBP.

Figura 11. El fragmento coactivador de TIF2.1 estimula eficazmente la AF-2 dependiente de ligando de RE, RAR y RXR en levadura. No es observable ningún efecto estimulante de TIF2.1 sobre la AF-1 aislada de RE (HE15). Se introdujeron plásmidos que expresan distintas regiones de REh α (blanco), RARh α (gris) y RXRm α (negro) fusionado con el DUA de RE (REh α (C)) dentro de la cepa indicadora PL3(α) de levadura junto con TIF2.1 tal como se indica. Las cajas blancas representan las secuencias de transformantes que se hicieron crecer en presencia o ausencia de 10⁻⁶ M del ligando relacionado (estradiol para RE, ácido todo *trans-retinoico* para RAR, ácido 9-*cis-retinoico* para RXR). Se expresan las actividades de OMP descarboxilasa determinadas en cada extracto libre de células en nmol/min/mg de proteína; se muestran la media y la desviación estándar de al menos cuatro experimentos.

Figura 12(a-d). El dominio de interacción con el receptor nuclear aislado (DIN) de TIF2 actúa negativamente como dominante sobre la activación de la transcripción mediante los DUL de RE, RXR y RAR. Se indica el valor medio de inducción obtenido a partir de la cuantificación de al menos tres experimentos (con respecto a la actividad del DUL del receptor respectivo en ausencia de TIF2 recombinante) debajo de cada panel. Se verificaron rutinariamente los niveles de expresión de TIF2, TIF2.1 y TIF2.5 mediante inmunotransferencia tipo Western con anticuerpo 3Ti3C11 monoclonal de ratón dirigido contra una región de TIF2.5 (no mostrada).

(a) La sobreexpresión de fragmento de TIF2.5 que contiene el DIN aislado invierte el efecto estimulante de un fragmento coactivador potente de TIF2.1. Se cotransfectaron células Cos-1 con 1 μ g de indicador (17m)₅-TATA-CAT y 0,2 μ g de vector de expresión GAL-REh α (EF) en presencia o ausencia de estradiol 10⁻⁶ M. Cuando se indica, se cotransfectaron además 0,1 μ g de vectores de expresión TIF2.1 y 2,5 μ g de TIF2.5.

(b-d) El TIF2 de longitud completa y fragmento coactivador de TIF2.1 potencian, mientras que el dominio de interacción con el receptor nuclear TIF2.5 bloquea, la actividad de los DUL de RE, RXR y RAR. Se cotransfectaron células Cos-1 y HeLa con 1 μ g del indicador (17m)₅-TATA-CAT y 0,2 μ g de vector de expresión que codifica para la fusión respectiva de DUA de GAL de REh α (EF), RXRm α (DE) o RARm α (DEF). En presencia o ausencia de ligando

10^{-6} M (E2, estradiol; 9C-AR, ácido 9-cis-retinoico; T-AR, ácido todo *trans-retinoico*), junto con 0,25 μ g o 2,5 μ g de vectores de expresión de TIF2, TIF2.1 y TIF2.5.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica para el factor intermediario de transcripción 2 (TIF2) cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 2). La proteína TIF2 de la presente invención comparte homología de secuencia con el coactivador de receptor de esteroides humano CRE-1 (SEQ ID NO: 3) (figura 3). La secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) se obtuvo mediante secuenciación de un clon de ADNc que se había depositado el 14 de Junio, 1996 en el ATCC y facilitado el número de registro 97612.

Moléculas de ácido nucleico

En una realización de la presente invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican para la proteína TIF2. Las similitudes de secuencia entre TIF2 y CRE-I (Onate *et al.*, *Science* 270:1354 (1995)) indica la existencia de una familia novedosa de genes mediadores transcripcionales de RN. Usando la información proporcionada en el presente documento, tales como la secuencia de nucleótidos en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) o el clon depositado anteriormente descrito, una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifican para un polipéptido TIF2 puede obtenerse usando procedimientos de clonación y selección habituales. Ilustrativa de la invención, la molécula de ácido nucleico descrita en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) se descubrió en una biblioteca de expresión de ADNc de tejido de placenta humana. El ADNc de TIF2 de la presente invención codifica para una proteína de aproximadamente 159 kDa (1,464 aminoácidos), que incluye señales de localización nuclear (NLS) N-terminales, una región rica en Gln y tres ricas en Ser/Thr, y dos agrupaciones cargadas (figura 3). TIF2 se expresa ampliamente, dado que el transcrito correspondiente se encontró en varios tejidos humanos, incluyendo páncreas, riñón, músculo, hígado, pulmón, placenta, cerebro y corazón (figura 2c).

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar en la forma de ARN, tales como ARNm, o en la forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc y ADN genómico obtenido mediante clonación o producido sintéticamente. El ADN puede ser de doble cadena o de cadena sencilla. El ARN o ADN de cadena sencilla puede ser la cadena codificante, también conocida como la cadena de sentido, o también puede ser la cadena no codificante, también referida como la cadena anti-sentido.

Por molécula(s) de ácido nucleico "aislada(s)" se pretende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su entorno nativo. Por ejemplo, moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Ejemplos ilustrativos adicionales de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células huésped heterólogas y moléculas de ADN purificadas (parcial o sustancialmente) en disolución. Moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vitro* de las moléculas de ADN de la presente invención así como moléculas de ARNm parcial o sustancialmente purificadas. Las moléculas aisladas de ácido nucleico según la presente invención incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen moléculas de ADN que comprenden un marco de lectura abierto (ORF) con un codón de iniciación en la posición 163-165 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1); y moléculas de ADN que comprenden una secuencia sustancialmente diferente de la descrita anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, todavía codifica para la proteína TIF2. Por supuesto, el código genético se conoce bien en la técnica. Por tanto, será rutina para un experto en la técnica generar las variantes generadas descritas anteriormente.

En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican para el polipéptido TIF2 que tiene una secuencia de aminoácidos según se codifica por el clon de ADNc depositado en ATCC con el número de registro 97612 el 14 de junio, 1996 (American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo), (ATCC) Rockville, MD). La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) o la secuencia de nucleótidos de ADNc de TIF2 contenida en el clon anteriormente descrito, o una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria con respecto a una de las secuencias anteriores. Dichas moléculas de ácido nucleico, preferiblemente moléculas de ADN, son útiles como sondas para el mapeo de genes mediante hibridación *in situ* con cromosomas y para detectar la expresión del gen de TIF2 en tejido humano, por ejemplo, mediante análisis de inmunotransferencia tipo Northern.

En otro aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones restrictivas a las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas. Tal como se usa en el presente documento "condiciones restrictivas" se refiere a, como un ejemplo no limitante, incubación durante la noche a 42°C en una disolución que comprende formamida al 50%, 5xSSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón cortado, desnaturalizado 20 μ g/ml, seguido de lavado de los filtros en 0,1xSSC a aproximadamente 65°C. Preferiblemente, dicha "una molécula aislada de ácido nucleico que hibrida en condiciones restrictivas" será de al menos 15 pb, preferiblemente de al menos 20 pb, más preferiblemente de al menos 30 pb, y lo más preferiblemente, de al menos 50 pb de longitud.

Tal como se usa en el presente documento, “fragmentos” de una molécula de ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de ADNc depositado o la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) se refiere a fragmentos de ADN de al menos 15 pb, más preferiblemente de al menos 20 pb, y lo más preferiblemente de al menos 30 pb de longitud, que son útiles como sondas de diagnóstico y cebadores tal como se trató anteriormente y con más detalle a continuación. Fragmentos de ADN mayores, de hasta, por ejemplo, 500 pb de longitud, también son útiles como sondas según la presente invención. Un fragmento de al menos 20 pb de longitud, por ejemplo, se refiere a fragmentos que incluyen 20 o más bases contiguas de la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado o la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 1). Tal como se indica, dichos fragmentos son útiles para diagnosticar o bien como una sonda según las técnicas convencionales de hibridación de ADN o bien como cebadores para amplificación de una secuencia objetivo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Dado que el gen se ha depositado y se proporciona la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1), generar dichos fragmentos de ADN será rutinario para un experto en la técnica relevante. Puede usarse fácilmente la escisión de endonucleasa de restricción o el cizallamiento por sonicación, por ejemplo, para generar fragmentos de varios tamaños. Alternativamente, pueden generarse los fragmentos de ADN de la presente invención sintéticamente según los métodos y técnicas conocidas y disponibles para aquellos expertos en la técnica. Se identificaron diez etiquetas de secuencia expresadas con homología con respecto a parte de la secuencia de nucleótidos de TIF-2 por los inventores en GenBank: números de registro de GenBank T77249, R77864, T77464, R77770, R08880, T85560, R25318, T85561, R08986 y R26517.

Además, se describen variantes de moléculas de ácido nucleico de la presente invención, que codifican para fragmentos, análogos o derivados de la proteína TIF2, por ejemplo, polipéptidos que tienen actividad biológica sustancialmente similar a la de la proteína TIF2. Las variantes pueden producirse de manera natural, tales como isoformas y variantes alélicas. Las variantes que se producen de manera no natural pueden producirse usando cualquiera de las técnicas de mutagénesis conocidas y disponibles para los expertos en la técnica.

Tales variantes incluyen aquellas producidas mediante sustituciones, eliminaciones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones, eliminaciones o adiciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Las variantes pueden alterarse en regiones codificantes o no codificantes o en ambas. Las alteraciones en las regiones codificantes pueden producir sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Entre éstas, se prefieren especialmente las sustituciones, adiciones o eliminaciones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades de la proteína TIF2 o fragmento de la misma. También se prefieren especialmente en este aspecto las sustituciones conservativas.

La presente invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido TIF2 citoplásmico. TIF2 de longitud total es una proteína nuclear debido a la presencia de señales de localización nuclear (NLS) N-terminales (figura 3). Por un “polipéptido TIF2 citoplásmico”, se hace referencia a un polipéptido TIF2 que se encuentra esencialmente en el citoplasma tras expresarse de manera recombinante en células de mamíferos. Los métodos para generar moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido TIF2 citoplásmico incluyen mutar o eliminar la región N-terminal que codifica para las NLS de la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1). Ejemplos de secuencias de NLS incluyen los aminoácidos 13-20 y 31-39 y los nucleótidos 199-222 y 253-279 de la figura 1 (véase también la figura 3). Mutaciones adecuadas para la región N-terminal que codifica para las NLS incluyen sustituciones, eliminaciones e inserciones que dan como resultado una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido TIF2 que carece de función de localización nuclear. Los métodos para generar dichas mutaciones resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, editado por Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido TIF2 citoplásmico serán fragmentos que tienen una eliminación en todo o parte de la región N-terminal que codifica para las NLS. Métodos para generar dichos fragmentos se describen a continuación. Según la presente invención, tales fragmentos de ácido nucleico incluyen además eliminaciones N-terminales que se extienden más allá de la región que codifica para las NLS y también pueden incluir eliminaciones C-terminales. Por ejemplo, los presentes inventores han generado una molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido TIF2.1 citoplásmico (aminoácidos 624 a 1287 en las figuras 1 y 3 (SEQ ID NO: 2)), que, como el TIF2 de longitud total nuclear, interacciona de una manera dependiente de agonista con los receptores nucleares y potencia la activación de la transcripción mediada por receptores nucleares. Los presentes inventores también han generado una molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido TIF2.5 citoplásmico (aminoácidos 624-869 en las figuras 1 y 3 (SEQ ID NO: 2)), que interacciona con el dominio DIN de receptores nucleares, pero no potencia la transcripción. También se generaron ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos TIF2.8 y TIF 2.12 citoplásmicos (aminoácidos 1010-1179 y aminoácidos 940-1131, respectivamente, en las figuras 1 y 3 (SEQ ID NO: 2)), que potencian la transcripción, pero no se unen a receptores nucleares. Por tanto, mediante la invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican para polipéptidos TIF2 citoplásmicos que interaccionan de una manera dependiente de agonista con receptores nucleares y potencian la activación de la transcripción mediada por receptores nucleares. También se proporcionan polipéptidos TIF2 citoplásmicos que se unen a receptores nucleares, pero no potencian la transcripción como se proporcionan polipéptidos TIF2 citoplásmicos que potencian la transcripción pero no se unen a receptores nucleares. Tal como reconocerá un experto en la técnica, la longitud de dichas moléculas de ácido nucleico puede variar.

Realizaciones adicionales de la invención incluyen moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica al menos en un 90%, y mas preferiblemente idéntica en al menos un 95%, en un 96%, en un 97%, en un 98%, o en un 99% idéntica a: (a) la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado como ATCC 97612; (b) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1); (c) la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado como ATCC 97612 que codifica para proteína TIF2 de longitud total; (d) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1), que codifica para la proteína TIF2 de longitud total; (e) la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado como ATCC 97612, que codifica para la proteína TIF2.1 del coactivador funcional; (f) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1), que codifica para la proteína TIF2.1 del coactivador funcional; (g) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.0; (h) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.2; (i) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.3; (j) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.4; (k) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.5; (l) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.6; (m) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.7; (n) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.8; (o) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.9; (p) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.10; (q) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido TIF2.12 polipéptido; y (r) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias en (a-q).

Puede determinarse si dos moléculas cualquiera de ácido nucleico tienen secuencias de nucleótidos que son “idénticas” en al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de manera convencional usando algoritmos computacionales conocidos tales como el programa “fastA” usando, por ejemplo, los parámetros por defecto (Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1998)). La presente solicitud se refiere a dichas moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos idéntica en al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácido nucleico anteriormente citadas independientemente de si codifican para un polipéptido que tiene actividad TIF2. Esto es porque, incluso cuando una molécula de ácido nucleico particular no codifica para un polipéptido que tiene actividad TIF2, un experto en la técnica aún sabría como usar la molécula de ácido nucleico como una sonda. Usos de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que no codifican para un polipéptido que tiene actividad TIF2 incluyen, entre otros, (1) aislar el gen de TIF2 o variantes alélicas del mismo en una biblioteca de ADNc; (2) hibridación *in situ* (FISH) a extensiones cromosómicas de metafase para proporcionar una ubicación cromosómica precisa del gen de TIF2 tal como se describe en Verma *et al.*, *Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, New York (1988); y análisis por inmunotransferencia tipo Northern para detectar expresión de ARNm de TIF2 en tejidos específicos, tal como tejido de placenta.

Sin embargo, se prefieren moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos idéntica en al menos un 90%, y preferiblemente idéntica al menos en un 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas, que de hecho, codifican para un polipéptido que tiene al menos una actividad de proteína TIF2. Tal como se usa en el presente documento, “un polipéptido que tiene una actividad de proteína TIF2” se refiere a polipéptidos que muestran actividad similar, pero no necesariamente idéntica, como al menos una actividad biológica de la proteína TIF2 tal como se mide en un ensayo biológico particular. Por ejemplo, la proteína TIF2 de la presente invención interacciona directamente de una manera dependiente de agonista con los dominios de unión a ligandos de varios receptores nucleares. Es más, cuando se expresa de manera recombinante en células de mamíferos, la proteína TIF2 de la presente invención potencia la transcripción por medio de rutas dependientes de CBP e independientes de CBP.

Por tanto, “un polipéptido que tiene una actividad de proteína TIF2” incluye polipéptidos que tienen una o más de las siguientes actividades: interacción con el DUL de uno o más RN de una manera dependiente de agonista; potenciación de la activación de la transcripción dependiente de CBP; o potenciación de la activación de la transcripción independiente de CBP.

Ensayos de selección para determinar si un polipéptido candidato tiene o no una actividad de proteína TIF2 se describen en detalle en los ejemplos 1, 3, 4, y 6 a continuación. Por ejemplo, realizando tales ensayos, los presentes inventores han descubierto que el fragmento de coactivador funcional TIF2.1 (aminoácidos 624 a 1287 en las figuras 1 y 3 (SEQ ID NO: 2)) es “un polipéptido que tiene una actividad de la proteína TIF2”. Los presentes inventores han descubierto también que el fragmento TIF2.5 (aminoácidos 624-869) se une al DUL de los RN sin activar la transcripción, y es “un polipéptido que tiene una actividad de la proteína TIF2”. También se descubrió que el fragmento TIF2.2 (aminoácidos 1288-1464 tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 2)), que potencia la transcripción independiente de CBP. Por tanto, TIF2.2 es “un polipéptido que tiene una actividad de la proteína TIF2”. Otro fragmento descubierto por los inventores, TIF 2.8 (aminoácidos 1010-1179 tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 2)) es “un polipéptido que tiene una actividad de la proteína TIF2” ya que activa la transcripción dependiente de CBP.

Debido a la degeneración del código genético, un experto habitual en la técnica reconocerá inmediatamente que un gran número de las moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos idéntica en al menos el 90%, preferiblemente en al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% a la secuencia de nucleótidos de las moléculas

de ácido nucleico descritas anteriormente codificarán para “un polipéptido que tiene una actividad de la proteína TIF2.” De hecho, puesto que las variantes degeneradas codifican todas para un mismo polipéptido, esto será evidente para el experto en la técnica incluso sin realizar los ensayos de selección descritos anteriormente. Los expertos en la técnica reconocerán además que, para tales moléculas de ácido nucleico que no son variantes degeneradas, un número

5 razonable también codificará para un polipéptido que tiene una actividad de la proteína TIF2. Esto es debido a que el experto es completamente consciente de posibles sustituciones de aminoácidos que o bien son menos probables o bien no es probable que afecten significativamente a la función de la proteína (por ejemplo, la sustitución de un aminoácido alifático por un segundo aminoácido alifático).

10 Se proporciona orientación sobre cómo realizar sustituciones de aminoácidos silenciosas desde un punto de vista fenotípico, por ejemplo, en J.U. Bowie *et al.*, “Deciphering the Message in Proteína Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions,” *Science* 247:1306-1310 (1990), en el que los autores indican que existen dos enfoques principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio. El primer método se basa en el proceso de evolución, en el que las mutaciones son o bien aceptadas o bien rechazadas por la selección natural. El segundo

15 enfoque usa la ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado y selecciona o examina para identificar secuencias que mantienen la funcionalidad. Como establecen los autores, estos estudios han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además qué cambios de aminoácidos es probable que sean permisivos en ciertas posiciones de la proteína. Por ejemplo, la mayor parte de los restos de aminoácido internos (“buried”) requieren cadenas laterales

20 apolares, mientras que generalmente se conservan algunas características de las cadenas laterales superficiales. Otras sustituciones silenciosas desde el punto de vista fenotípico se describen en Bowie *et al.*, anteriormente, y las referencias citadas en ese documento.

Vectores y células huésped

25 La presente invención también se refiere a vectores que incluyen las moléculas de ADN de la presente invención, células huésped que se modifican mediante ingeniería genética con los vectores recombinantes, y la producción de polipéptidos de TIF2 o fragmentos del mismo, tales como TIF2.1, mediante técnicas recombinantes.

30 Se pueden introducir construcciones recombinantes en células huésped usando técnicas muy conocidas tales como la infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, vector viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser competentes en la replicación o defectuosos en la replicación. En este último caso, generalmente sólo se producirá la propagación viral en células huésped de complementación.

35 Los polinucleótidos pueden unirse a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un huésped. Generalmente, se introduce un vector de plásmido en un precipitado, tal como un precipitado con fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede empaquetarse *in vitro* usando una línea célula de empaquetamiento apropiada y luego transducirse en células huésped.

40 Se prefieren los vectores que comprenden regiones de control de acción en cis para el polinucleótido de interés. Pueden suministrarse factores de acción en trans apropiadas por el huésped, suministrarse por un vector de complementación o suministrarse por el propio vector con la introducción en el huésped.

45 En ciertas realizaciones preferidas a este respecto, los vectores proporcionan la expresión específica, que puede ser inducible y/o específica del tipo de célula. Se prefieren particularmente entre tales vectores aquellos inducibles mediante factores ambientales que son fáciles de manipular, tales como la temperatura y los aditivos de nutrientes.

50 Vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófago, episomas de levaduras, elementos cromosómicos de levaduras, virus tales como baculovirus, virus papova, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela de las aves de corral, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como cósmidos y fagémidos.

55 El inserto de ADN debe estar unido operativamente a un promotor apropiado, tal como the el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp y tac de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40 y promotores de LTR retrovirales, por nombrar unos cuantos. Los expertos en la técnica conocerán otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para la iniciación de la transcripción, la terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosomas para la traducción. La parte codificante de los transcritos maduros

60 expresados por las construcciones incluirá preferiblemente un AUG de iniciación de la transcripción al comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) situado apropiadamente al final del polipéptido que va a traducirse.

Tal como se indica, los vectores de expresión incluirán preferiblemente al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen genes de dihidrofolato reductasa o resistencia a la neomicina para un cultivo de células eucariotas y de resistencia a la tetraciclina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Ejemplos representativos de huéspedes adecuados incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levaduras; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como células CHO, Cos y de melanoma de Bowes; y células

vegetales. En la técnica se conocen medios de cultivo y condiciones apropiados para las células huésped descritas anteriormente.

Ejemplos ilustrativos de vectores preferidos para su uso en bacterias incluyen, pero no se limitan a, pA2, pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNR18A, pNH46A, disponibles de Stratagene; y ptre99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia. Los vectores eucariotas preferidos incluyen, pero no se limitan a, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto.

Entre los promotores bacterianos conocidos adecuados para su uso en la presente invención se incluyen los promotores lacI y lacZ de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor gpt, los promotores PR y PL de lambda y el promotor trp. Los promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor precoz de CMV, el promotor de timidina cinasa de VHS, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTR retrovirales, tales como los del virus del sarcoma de Rous ("VRS"), y promotores de metalotioneínas, tales como el promotor de metalotioneína I de ratón.

La introducción de la construcción en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, cationic lipid-mediated transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (1986).

La transcripción del ADN que codifica para los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de acción en cis de ADN, generalmente de aproximadamente 10 a 300 pb de tamaño, que actúan para aumentar la actividad de transcripción de un promotor en un tipo de célula huésped dado. Ejemplos ilustrativos de potenciadores incluyen, pero no se limitan a, el potenciador de SV40, que está ubicado en el lado tardío del origen de replicación en las pb 100 a 270, el potenciador temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus.

Para la secreción de la proteína traducida en la luz del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

El polipéptido puede expresarse en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no sólo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por tanto, por ejemplo, puede añadirse una región de aminoácidos adicional, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N-terminal del polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula huésped, durante la purificación, o durante el manejo y almacenamiento posteriores. También pueden añadirse restos peptídicos al polipéptido para facilitar la purificación.

La proteína TIF2 o una fracción de la misma puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos muy conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácidos, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxipatita y cromatografía con lectina. Lo más preferiblemente, se emplea cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación.

Los polipéptidos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, productos purificados de manera natural, productos de procedimientos de síntesis química, y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped procarionta o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levaduras, de plantas superiores, insectos y mamíferos. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden modificarse de manera postraducciona (por ejemplo, glucosilarse, fosforilarse, farnesilarse, etc.). Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo de metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el huésped.

Polipéptidos y fragmentos de TIF2

La invención proporciona además un polipéptido TIF2 aislado que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el ADN depositado, o la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO:2), o un fragmento de la misma. Los fragmentos de polipéptido preferidos tendrán una actividad de la proteína TIF2. Con el fin de que un polipéptido TIF2 interaccione de manera dependiente de agonista con receptores nucleares y para potenciar la activación de la transcripción mediada por receptores nucleares, tales fragmentos del polipéptido TIF2 deben incluir al menos los restos de aminoácido 624 a 1131 tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO:2) o sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos de los mismos que no son perjudiciales significativamente para la capacidad de los polipéptidos para interactuar de manera dependiente de agonista con receptores nucleares y para potenciar la activación de la transcripción mediada por receptores nucleares. Con el fin de que un fragmento del polipéptido TIF2 interaccione con el DUL de un RN sin activar la transcripción, los fragmentos del polipéptido TIF2 deben incluir al menos los aminoácidos 624-869 tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO:2), o sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos de los mismos que no son perjudiciales significativamente para la capacidad de los polipéptidos de interactuar con el DUL de un RN. Con el fin de que un fragmento del polipéptido TIF2 active la

transcripción dependiente de CBP, el polipéptido TIF2 debe incluir al menos los restos de aminoácido 1010-1131 tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO:2) o sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos de los mismos que no son perjudiciales significativamente para la capacidad de los polipéptidos de activar la transcripción dependiente de CBP. Para que un polipéptido TIF2 active la transcripción independiente de CBP, el polipéptido TIF2 debe incluir al menos los restos de aminoácido 1288-1464 tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO:2) o sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos de los mismos que no son perjudiciales significativamente para la capacidad de los polipéptidos de activar la transcripción independiente de CBP.

Fragmentos del polipéptido TIF2 a modo de ejemplo según la presente invención incluyen polipéptidos citoplásmicos de TIF2 que tienen al menos mutación o deleción en una región NSL N-terminal que interfiere con la función de localización nuclear. A continuación, se describen métodos para generar polipéptidos citoplásmicos de TIF2.

Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido o proteína “aislado” pretende significar un polipéptido o proteína extraído de su entorno nativo, tal como polipéptidos y proteínas producidos de manera recombinante, expresados en células huésped y polipéptidos nativos o recombinantes que se han purificado sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada (por ejemplo, el método de purificación de una sola etapa descrito en Smith y Johnson, *Gene* 67:31-40 (1988), que se incorpora como referencia al presente documento). Polipéptidos o proteínas aislados según la presente invención incluyen además tales compuestos producidos de manera sintética.

Los presentes inventores han descubierto que la proteína TIF2 de longitud completa es una proteína de aproximadamente 1464 restos de aminoácido con un peso molecular deducido de aproximadamente 160 kDa. Los expertos en la técnica reconocerán que puede variarse parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína TIF2 sin un efecto significativo sobre la estructura o función de la proteína. Si se contemplan tales diferencias en la secuencia, debe recordarse que existirán zonas críticas en la proteína que determinan la actividad, tal como la región descrita anteriormente que los inventores han determinado como crítica para la capacidad de la proteína para potenciar la activación de la transcripción mediada por receptores nucleares. En general, a menudo es posible sustituir restos que forman la estructura terciaria, siempre que se usen restos que realicen una función similar. En otros casos, el tipo de residuo puede no tener importancia en absoluto si la alteración se produce en una región no crítica de la proteína.

Por tanto, la presente descripción incluye además variaciones del polipéptido TIF2 que muestran una sustancial actividad del polipéptido TIF2 o que incluyen regiones de la proteína TIF2 tales como los fragmentos de la proteína tratados anteriormente. Tales mutantes incluyen deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones, y sustituciones tipo (por ejemplo, sustituir un residuo hidrófilo por otro, pero no uno fuertemente hidrófilo por uno fuertemente hidrófobo como regla). Pequeños cambios o tales sustituciones de aminoácidos “neutras” tendrán generalmente poco efecto sobre la actividad.

Normalmente se consideran como sustituciones conservativas los reemplazos, de uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y Ile; el intercambio de los restos hidroxílicos Ser y Thr, el intercambio de los restos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los restos de amida Asn y Gin, el intercambio de los restos básicos Lys y Arg y los reemplazos entre los restos aromáticos Phe y Tyr.

Tal como se indica en detalle a continuación, puede encontrarse una orientación adicional sobre qué cambios de aminoácidos es probable que sean silenciosos desde un punto de vista fenotípico (es decir, no es probable que tengan un efecto perjudicial significativo sobre una función) en Bowie *et al.*, “Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions,” *Science* 247:1306-1310 (1990)).

Los polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc depositado, una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO:2, así como una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 80%, más preferiblemente idéntica en al menos un 90%, y lo más preferiblemente idéntica en al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, a la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc depositado, a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO:2, o a la secuencia de aminoácidos de un fragmento de polipéptido descrito anteriormente. Puede determinarse si dos polipéptidos tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 80%, 90% o 95% usando un algoritmo informático tal como se describió anteriormente.

Tal como se describe en detalle a continuación, las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos de la presente invención son útiles en ensayos de selección para identificar agonistas y antagonistas de la transactivación mediada por AF2 de RN. Por ejemplo, en Halachmi, S., *et al.*, *Science* 264: 1455 (1994), los autores muestran que el tamoxifeno, que tiene efectos inhibidores del crecimiento en el cáncer de mama, perturba la formación de un complejo que incluye el receptor de estrógenos y ERAP160. En consecuencia, las moléculas de ácido nucleico y los polipéptidos de la presente invención son útiles en ensayos para identificar fármacos que pueden potenciar o inhibir rutas mediadas por receptores nucleares.

Las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos de la presente invención son útiles en ensayos de selección para identificar agonistas y antagonistas de la actividad AD1 de TIF2, y en ensayos de selección para identificar agonistas y antagonistas de la actividad AD2 de TIF2, tal como se describe en detalle a continuación.

Métodos de selección

Los receptores nucleares (RN) son miembros de una superfamilia de factores reguladores de la transcripción inducibles por ligandos que incluyen receptores de hormonas esteroideas, hormonas tiroideas, vitamina D3 y retinoides (Leid, M., *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 17:427-433 (1992); Leid, M., *et al.*, *Cell* 68:377-395 (1992); y Linney, E. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 27:309-350 (1992)). Los RN muestran una estructura modular que refleja la existencia de varios dominios funcionales autónomos. Basado en la similitud de la secuencia de aminoácidos entre el receptor de estrógenos del pollo, los receptores de estrógenos y glucocorticoides humanos y el oncogén v-erb-A, Krust, A., *et al.*, *EMBO J.* 5:891-897 (1986), se definieron seis regiones, A, B, C, D, E y F (véase la figura 6) que muestran diferentes grados de conservación evolutiva entre diversos miembros de la superfamilia de receptores nucleares. La región C altamente conservada contiene dos dedos de zinc y corresponde al núcleo del dominio de unión a ADN (DUA), que es responsable del reconocimiento específico de los elementos de respuesta relacionados. La región E es funcionalmente compleja, puesto que además del dominio de unión a ligandos (DUL), contiene una función de activación dependiente de ligando (AF-2) y una interfase de dimerización. Está presente una función de activación de la transcripción autónoma (AF-1) en las regiones A/B N-terminales no conservadas de los receptores de esteroides. De manera interesante, ambas AF-1 y AF-2 de los receptores de esteroides muestran propiedades diferenciales de activación de la transcripción que parecen ser específicas tanto del contexto del promotor como del tipo celular (Gronemeyer, H. *Annu. Rev. Genet.* 25:89-123 (1991)).

Las señales de ácido retinoico todo-*trans* (T-AR) y 9-*cis* (9C-AR) se transducen por dos familias de receptores nucleares, RAR α , β y γ (y sus isoformas) se activan tanto por T-AR como 9C-AR, mientras que RXR α , β y γ se activan exclusivamente por 9C-AR (Allenby, G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:30-34 (1993)). Los tres tipos de RAR difieren en sus regiones B, y sus principales isoformas (α 1 y α 2, β 1-4, y γ 1 y γ 2) tienen diferentes regiones A N-terminales (Leid, M. *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 17:427-433 (1992)). De manera similar, los tipos de RXR difieren en sus regiones A/B (Mangelsdorf, D.J. *et al.*, *Genes Dev.* 6:329-344 (1992)).

La región E de los RAR y RXR también ha demostrado que contiene una interfase de dimerización (Yu, V.C. *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:597-602 (1992)). De manera más interesante, se demostró que los heterodímeros RAR/RXR se unen de manera mucho más eficaz *in vitro* que los homodímeros de cualquier receptor a varios elementos de respuesta a AR (RARE) (Yu, V.C. *et al.*, *Cell* 67:1251-1266 (1991); Berrodin, T. J. *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 6:1468-1478 (1992); Bugge, T. H. *et al.*, *EMBO J.* 11:1409-1418 (1992); Hall, R. K. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 12: 5527-5535 (1992); Hallenbeck, P. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5572-5576 (1992); Husmann, M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1558-1564 (1992); Kliewer, S.A. *et al.*, *Nature* 355:446-449 (1992b); Leid, M. *et al.*, *Cell* 68:377-395 (1992); Marks, M. S. *et al.*, *EMBO J.* 11:1419-1435 (1992); Zhang, X. K. *et al.*, *Nature* 355:441-446 (1992)). Los heterodímeros de RAR y RXR también se forman preferentemente en disolución *in vitro* (Yu, V.C. *et al.*, *Cell* 67:1251-1266 (1991); Leid, M. *et al.*, *Cell* 68:377-395 (1992); Marks, M. S. *et al.*, *EMBO J.* 11:1419-1435 (1992)), aunque la adición de 9C-AR parece potenciar la formación de los homodímeros de RXR *in vitro* (Lehman, J. M. *et al.*, *Science* 258:1944-1946 (1992); Zhang, X. K. *et al.*, *Nature* 358:587-591 (1992b)). Los experimentos descritos en Durand, B. *et al.*, *Cell* 71:73-85 (1992) han apoyado fuertemente que los heterodímeros de RAR-RXR, en lugar de los correspondientes homodímeros, se unen preferentemente a RARE en células cultivadas *in vivo*.

Como se sabe que el ácido retinoico regula las capacidades proliferativas y diferenciativas de varios tipos de células de mamíferos (Gudas, L.J. *et al.* (1994) en Sporn, M.B., Roberts, A.B. y Goodman, D.S. (eds), *The Retinoids*. 2ª edición, Raven Press, Nueva York, págs. 443-520), se usan retinoides en una variedad de prácticas quimiopreventivas y quimioterapéuticas. Se ha notificado la prevención de cánceres bucales, de piel y de cabeza y cuello en pacientes en riesgo de desarrollar estos tumores (Hong, W. K. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 315:1501-1505 (1986); Hong, W. K. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 323:795-801 (1990); Kraemer, K. H. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 318:1633-1637 (1988); Bollag, W. *et al.*, *Ann. Oncol.* 3:513-526 (1992); Chiesa, F. *et al.*, *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.* 28:97-102 (1992); Costa, A. *et al.*, *Cancer Res.* 54:Supl. 7, 2032-2037 (1994)), y se usan retinoides en el tratamiento de leucemia promielocítica aguda (Huang, M.E. *et al.*, *Blood* 72:567-572 (1988); Castaigne, S. *et al.*, *Blood* 76:1704-1709 (1990); Chomienne, C. *et al.*, *Blood* 76:1710-1717 (1990); Chomienne, C. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 88:2150-2154 (1991); Chen Z. *et al.*, *Leukemia* 5:288-292 (1991); Lo Coco, F. *et al.*, *Blood* 77:165701659 (1991); Warrell, R. P., Jr. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 324:1385-1393 (1991)), carcinoma de células escamosas del cuello uterino y la piel (Verma, A. K., *Cancer Res.* 47:5097-5101 (1987); Lippman S. M. *et al.*, *J. Natl Cancer Inst.* 84:235-241 (1992); Lippman S. M. *et al.*, *J. Natl Cancer Inst.* 84:241-245 (1992)) y sarcoma de Kaposi (Bonhomme, L. *et al.*, *Ann. Oncol.* 2:234-235 (1991)).

Por ejemplo, en Chen, J-Y *et al.*, *EMBO J.* 14 (6):1 187-1197 (1995), se caracterizan varios retinoides sintéticos de disociación que inducen selectivamente la función de activación AF-2 presente en el DUL de RAR β (β AF-2). Los autores también informan de que estos retinoides sintéticos, como AR, pueden inhibir el crecimiento independiente de anclaje de las células 3T3 transformadas con oncogén. Además, el promotor del gen de la interleucina-6 (IL-6), cuyo producto participa en la regulación de la hematopoyesis, las respuestas inmunitarias y la inflamación (Kishimoto, T. *et al.*, *Science* 258:593-597 (1992)), está inducido por AR pero no por los retinoides "de disociación" que reprimen su actividad.

Además de los receptores de retinoides, también se ha informado sobre compuestos con propiedades agonistas y antagonistas sobre las funciones de los receptores de esteroides. Por ejemplo, en Meyer, M-E. *et al.*, *EMBO J.* 9 (12): 3923-3932 (1990), se usó un sistema de retardo en gel/expresión transitoria para estudiar los efectos de RU486 y R5020 sobre la función del receptor de glucocorticoides y progesterona. Además, en Halachimi, S., *et al.*, *Science*

264:1455-1458 (1994), se muestra que el tamoxifeno inhibe de manera competitiva la unión de ERAP160 inducida por estradiol al receptor de estrógenos, lo que sugiere un mecanismo para sus efectos inhibidores del crecimiento en el cáncer de mama. En consecuencia, debido a su importancia clínica, hay un gran interés en desarrollar métodos de selección que puedan identificar agonistas y antagonistas de la transactivación de receptores nucleares.

Tal como se indicó, los presentes inventores han clonado un gen que codifica para TIF2 y han demostrado que TIF2 y un fragmento citoplásmico del mismo se unen, de manera dependiente de agonista, a todos los receptores nucleares analizados, RAR, RXR, RE, RT, RVD, GR y RA. Además, los presentes inventores han mostrado que los polipéptidos de TIF2 son mediadores de la transcripción de la AF-2 del receptor nuclear. Por tanto, la presente invención proporciona además un método de selección para identificar un antagonista del receptor nuclear (RN), que supone: (a) proporcionar una célula huésped que contiene genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ligandos (DUL) de RN y un polipéptido que comprende el factor intermediario de transcripción 2 (TIF-2) o un fragmento de TIF-2, en el que, en presencia de un agonista, dicho TIF-2 y dicho fragmento de TIF-2 se unen a dicho DUL de RN; (b) administrar un antagonista candidato a dicha célula; y (c) determinar si dicho antagonista candidato reduce o bien: (1) la unión de TIF-2 o fragmento de TIF-2 a la AF-2 de dicho DUL de RN en comparación con dicha unión en ausencia de dicho antagonista candidato; o bien (2) la transactivación mediada por AF-2 de DUL de RN estimulada por TIF-2 o fragmento de TIF-2 en comparación con dicha transactivación en ausencia de dicho antagonista candidato.

En un aspecto adicional, se proporciona un método de selección para identificar un agonista del receptor nuclear (RN), que supone: (a) proporcionar una célula huésped que contiene genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ligandos (DUL) de RN y un polipéptido que comprende el factor intermediario de transcripción 2 (TIF-2) o un fragmento de TIF-2, en el que, en presencia de un agonista, dicho TIF-2 y dicho fragmento de TIF-2 se unen a dicho DUL de RN; (b) administrar un agonista candidato a dicha célula; y (c) determinar si dicho agonista candidato potencia o bien: (1) la unión de TIF-2 o fragmento de TIF-2 a la AF-2 de dicho DUL de RN en comparación con dicha unión en ausencia de dicho agonista candidato; o bien (2) la transactivación mediada por AF-2 de DUL de RN estimulada por TIF-2 o fragmento de TIF-2 en comparación con dicha transactivación en ausencia de dicho agonista candidato.

Por “una célula huésped que contiene genes recombinantes” se pretenden células huésped en las que se ha introducido uno o más de las construcciones recombinantes descritas en el presente documento o una progenie de tales células huésped.

Los antagonistas y agonistas candidatos según la presente invención incluyen ligandos “de disociación” para los receptores nucleares tales como los descritos en Chen *et al.*, *EMBO J.* 14:1187-1197 (1995) y Ostrowski *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1812-1816 (1995). Se describen agonistas y antagonistas del receptor de progesterona y glucocorticoides en Meyer *et al.*, *EMBO J.* 9(12): 3923-3932 (1990). Se describe un antagonista del receptor de estrógenos en Halachmi *et al.*, *Science* 264: 1455-1458 (1994). Por tanto, se conocen métodos en la técnica para desarrollar agonistas y antagonistas de receptores nucleares candidatos para la selección según la presente invención. Por ejemplo, se ha descrito la estructura cristalina de los dominios de unión a ligandos de ciertos receptores nucleares. En particular, la estructura cristalina del DUL de RXR se describe en Bourguet *et al.*, *Nature* 375:377-382 (1995); la estructura cristalina del DUL de RAR se describe en Renaud *et al.*, *Nature* 378:681-689 (1995); y la estructura cristalina de un receptor de hormonas tiroideas se describe en Wagner *et al.*, *Nature* 378:690-697 (1995). Usando información procedente de la estructura cristalina de un receptor nuclear, se dispone de programas informáticos para diseñar la estructura de agonistas y antagonistas candidatos que se unirían probablemente al dominio de unión a ligandos. Los paquetes de programas informáticos adecuados para este fin incluyen WHAT IF (Vriend, G., *J. Mol. Graphics* 8:52-56 (1990)), y GRID (Goodford, *J. Med. Chem.* 28:849-857 (1985)).

Se describieron anteriormente genes recombinantes que codifican para un polipéptido que comprende TIF2 o un fragmento de TIF2 que puede unirse a receptores nucleares de manera dependiente de agonista. Se han descrito con mucho detalle en la técnica genes recombinantes que codifican para un polipéptido que comprende un DUL de RN. Se conocen en la técnica métodos para determinar si un agonista o antagonista candidato potencia o interfiere en la unión de TIF-2 o un fragmento de TIF-2 a un RN. Por ejemplo, puede estudiarse el efecto de un agonista o antagonista candidato sobre la unión de TIF-2 o un fragmento de TIF-2 a un DUL de RN usando ensayos de interacción con glutatión-S-transferasa (GST) marcando con etiqueta DUL de RN con GST tal como se describe en detalle en la sección experimental a continuación y en Le Douarin *et al.*, *EMBO J* 14:2020-2033 (1995).

Cuando va a someterse a ensayo el efecto de un agonista o antagonista candidato sobre la transactivación de AF-2 de RN, preferiblemente, los genes recombinantes codificarán para un polipéptido quimérico que comprende un DUL de RN fusionado a un dominio de unión a ADN de una proteína transactivadora. En una realización preferida adicional, las células huésped que expresan los genes recombinantes también expresarán un gen indicador. Por ejemplo, en Chen *et al.*, *EMBO J.* 14(6) 1187-1197 (1995), se han establecido tres líneas celulares “indicadoras” en las que agonistas de RAR α , RAR β , o RAR γ inducen actividad luciferasa que puede medirse en las células intactas usando una cámara de recuento de fotón único. Estas líneas celulares expresan de manera estable proteínas quiméricas que contienen el dominio de unión a ADN del transactivador de levaduras GAL4 fusionado a las regiones EF (que contienen ese DUL y la función de activación AF-2) de RAR α (GAL-RAR α), RAR β (GAL-RAR β) o RAR γ (GAL-RAR γ), y un gen indicador de luciferasa activado por un pentámero de la secuencia de reconocimiento de GAL4 (“17m”) delante del promotor de β -globina (17mx5-G-Luc). Este sistema indicador no es sensible a receptores endógenos que

no pueden reconocer el sitio de unión a GAL4. Se proporcionan ejemplos adicionales de genes indicadores y vectores de expresión indicadores para su uso según la presente invención para seleccionar agonistas y antagonistas candidatos de receptores de retinoides en la figura 6.

- 5 Los vectores de expresión de RE, HEO, HE19 y HE15, los vectores de expresión de RG, HGI y HG3 y de expresión de RP, cPR1 y cPR3 se describen en Kumar *et al.*, *Cell* 51:941-951 (1987) y Gronemeyer *et al.*, *EMBO J.* 6:3985-3994 (1987). El vector de expresión de RG, HG8 y el vector de expresión de RP, cPR5A se describen en Bocquel *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:2581-2595 (1989). Los genes indicadores para los vectores de expresión de RE, RG y RP descritos anteriormente incluyen MMTV-CAT (en el caso de de RP y RG; Cato *et al.*, *EMBO J.* 5:2237-2240 (1986)) y vit-tk-CAT (en el caso de RE; Klein-Hitpass *et al.*, *Cell* 41:1055-1061 (1986)).

El vector de expresión de RT, LexA-TR se describe en Lee *et al.*, *Nature* 374:91-94 (1995), que también describe el uso de un sistema de dos híbridos de levaduras para identificar compuestos que afectan a la transactivación de RT.

- 15 Aún referencias adicionales describen plásmidos indicadores que contienen un gen indicador y vectores de expresión que codifican para un DUL de RN incluyen Meyer *et al.*, *Cell* 57:433-442 (1989); Meyer *et al.*, *EMBO J.* 9 (12):3923-3932 (1990); Tasset *et al.*, *Cell* 62:1177-1187 (1990); Gronemeyer, H. y Laudet, V., *Protein Profile* 2:1173-1308 (1995); Webster *et al.*, *Cell* 54:199-207 (1988); Strähle *et al.*, *EMBO J.* 7:3389-3395 (1988); Seipel *et al.*, *EMBO J.* 11:4961-4968 (1992); y Nagpal *et al.*, *EMBO J.* 12:2349-2360 (1993). En una realización particularmente preferida, se somete a ensayo el efecto de un agonista o antagonista candidato sobre la transactivación mediada por AF-2 de RN según el método descrito en la leyenda de la figura 5 anterior.

- Los presentes inventores han identificado un dominio de activación de TIF2, DA1 (aminoácidos 1010-1131 tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO:2)), que media la función de activación de la transcripción dependiente de CBP de TIF2. Además, los presentes inventores han mostrado que polipéptidos que contienen este dominio de activación, cuando se fusionan a un dominio de unión a ADN de un activador de la transcripción, pueden activar la transcripción a través de una ruta dependiente de CBP. En consecuencia, la presente invención proporciona además un método de selección de identificación de un agonista de la actividad del dominio de activación DA1 de TIF2, que supone: (a) proporcionar una célula huésped que contiene un gen o genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN (DUA) de un activador de la transcripción y un dominio de activación DA1 de TIF2; (b) administrar un agonista candidato a dicha célula; y (c) determinar si dicho agonista candidato potencia la actividad del dominio de activación DA1 de TIF2.

- La invención proporciona además un método de selección para identificar un antagonista de la actividad del dominio de activación DA1 de TIF2, que comprende: (a) proporcionar una célula huésped que contiene un gen o genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN (DUA) de un activador de la transcripción y un dominio de activación DA1 de TIF2; (b) administrar un antagonista candidato a dicha célula; y (c) determinar si dicho antagonista candidato potencia la actividad del dominio de activación DA1 de TIF2.

- Por "activador de la transcripción" se quiere decir moléculas que potencian la iniciación de la transcripción mediante ARN polimerasa B (II). Los activadores de la transcripción incluyen activadores de la transcripción de levaduras, tales como GAL4 y GCN4; el activador de herpes simple, VP16; y los miembros de la familia de receptores nucleares, que incluye RAR, RXR, RE, RT, RVD, RG y RA.

- A continuación se describen genes recombinantes que codifican para un polipéptido que comprende un dominio de activación DA1 de TIF2. Se conocen bien en la técnica genes recombinantes que codifican para un polipéptido que comprende un DUA de un activador de la transcripción. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar si un agonista o antagonista candidato potencia o interfiere en la transcripción. Por ejemplo, puede determinarse el efecto de un agonista o antagonista candidato de la actividad del dominio de activación DA1 de TIF2 usando ensayos CAT según se describe a continuación y en Gronemeyer *et al.* (1987) y Bocquel *et al.*, *Nucl. Acids Res.* (1989).

- Cuando va a determinarse el efecto de un agonista o antagonista candidato de la actividad del dominio de activación DA1 de TIF2, preferiblemente, genes recombinantes codificarán para un polipéptido quimérico que comprende un DUA de un activador de la transcripción fusionado a un polipéptido TIF2 que comprende el dominio de activación DA1. En una realización adicional, la célula huésped que expresa los genes recombinantes también expresará un gen indicador. Anteriormente se describieron ejemplos de genes indicadores. En una realización particularmente preferida, se determinará el efecto de un agonista o antagonista candidato de la función del dominio de activación DA1 de TIF2 según se describe en la leyenda de la figura 7(c).

- Los presentes inventores también han identificado un segundo dominio de activación de TIF2, DA2 (aminoácidos 1288-1464 tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO:2)), que media la activación de la transcripción independiente de CBP. Además, los presentes inventores han mostrado que los polipéptidos que contienen este dominio de activación, cuando se fusionan a un dominio de unión a ADN de un activador de la transcripción, pueden activar la transcripción a través de una ruta independiente de CBP. En consecuencia, la presente invención proporciona además un método de selección para identificar un agonista de la actividad del dominio de activación DA2 de TIF2, que comprende: (a) proporcionar una célula huésped que contiene un gen o genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN (DUA) de un activador de la transcripción y un dominio

de activación DA2 de TIF2; (b) administrar un agonista candidato a dicha célula; y (c) determinar si dicho agonista candidato potencia la actividad del dominio de activación DA2 de TIF2.

La invención proporciona además un método de selección para identificar un antagonista de la actividad del dominio de activación DA2 de TIF2, que comprende: a) proporcionar una célula huésped que contiene un gen o genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN (DUA) de un activador de la transcripción y un dominio de activación DA2 de TIF2; (b) administrar un antagonista candidato a dicha célula; y (c) determinar si dicho antagonista candidato inhibe la actividad del dominio de activación DA2 de TIF2.

Se describen a continuación genes recombinantes que codifican para un polipéptido que comprende un dominio de activación DA2 de TIF2. Se conocen bien en la técnica genes recombinantes que codifican para un polipéptido que comprende un DUA de un activador de la transcripción. Se conocen en la técnica métodos para determinar si un agonista o antagonista candidato potencia o interfiere en la transcripción.

Cuando va a determinarse el efecto de un agonista o antagonista candidato de la actividad del dominio de activación DA2 de TIF2, preferiblemente, genes recombinantes codificarán para un polipéptido quimérico que comprende un DUA de un activador de la transcripción fusionado a un polipéptido TIF2 que comprende el dominio de activación DA2. Anteriormente, se describieron activadores de la transcripción. En una realización adicional, la célula huésped que expresa los genes recombinantes expresará también un gen indicador. Anteriormente se describieron ejemplos de genes indicadores. En una realización particularmente preferida, se determinará el efecto de un agonista o antagonista candidato de la actividad del dominio de activación DA2 de TIF2 según se describe en la leyenda de la figura 7(c).

Anticuerpos contra TIF-2 y métodos

También se proporcionan anticuerpos contra TIF2 mediante la presente invención, específicos para una proteína TIF2, un polipéptido TIF2, un fragmento de la proteína TIF2 o un fragmento del polipéptido TIF2. El término “anticuerpo” pretende incluir anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (Acm), anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) contra anticuerpos que pueden marcarse en forma soluble o unida, así como fragmentos de los mismos proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como, pero sin limitarse a escisión enzimática, síntesis peptídica o técnicas recombinantes. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno. Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para antígenos, población que contiene sitios de unión a epítopos sustancialmente similares. Los Acm pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); patente de los EE.UU. número 4.376.110; Ausubel *et al.*, eds., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1987-1996); y Harlow y Lane *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992-1996), incorporándose el contenido de tales referencias en su totalidad al presente documento como referencia.

Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de las mismas. Puede cultivarse *in vitro*, *in situ* o *in vivo* un hibridoma que produce un Acm de la presente invención. La producción de altos títulos de Acm *in vivo* o *in situ* hacen éste el método de producción preferido actualmente.

Los anticuerpos quiméricos son partes diferentes de moléculas que se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen la región variable derivada de un Acm murino y una región constante de inmunoglobulina humana, que se usan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos en la producción, por ejemplo, cuando Acm murinos tienen rendimientos superiores a partir de hibridomas pero una inmunogenicidad superior en seres humanos, de tal manera que se usan Acm quiméricos humanos/murinos. Se conocen en la técnica anticuerpos quiméricos y métodos para su producción (Cabilly *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3273-3277 (1984); solicitud de patente europea 125023 (publicada el 14 de noviembre de 1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 314:268-270 (1985); Taniguchi *et al.*, solicitud de patente europea 171496 (1985); Morrison *et al.*, solicitud de patente europea 173494 (1986); Neuberger *et al.*, solicitud PCT WO 86/01533, (1986); Kudo *et al.*, solicitud de patente europea 184187 (1986); Morrison *et al.*, solicitud de patente europea 173494 (1986); Robinson *et al.*, Publicación PCT, PCT/US86/02269 (1987); Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443 (1987); Sun *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218 (1987); Better *et al.*, *Science* 240:1041-1043 (1988); y Harlow y Lane, *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Estas referencias se incorporan en su totalidad como referencia al presente documento.

Un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión a antígenos de un anticuerpo. Un anticuerpo Id puede prepararse inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, raza de ratón) como la fuente del Acm con el Acm con el que se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo de inmunización produciendo un anticuerpo contra estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. número 4.699.880, que se incorpora en su totalidad como referencia al presente documento.

El anticuerpo anti-Id también puede usarse como “inmunógeno” para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal más, produciendo un denominado anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser idéntico con respecto a los epítomos al Acm original que indujo el anti-Id. Por tanto, usando anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un Acm, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica. Por tanto, los Acm anti-Id tienen sus propios epítomos idiotípicos, o “idiotópos” similares estructuralmente al epítomo que se está evaluando, tal como la proteína α de GRB.

El término “anticuerpo” también pretende incluir tanto moléculas de inmunoglobulina intactas, así como fragmentos de las mismas, tales como, por ejemplo, Fab y $F(ab')_2$, que pueden unirse al antígeno. Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se elimina más rápidamente de la circulación, y puede tener menos unión a tejido no específica que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)). Se apreciará que Fab y $F(ab')_2$ y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención pueden usarse para la detección y cuantificación de un TIF2 según los métodos descritos en el presente documento para moléculas de anticuerpo intactas. Tales fragmentos se producen normalmente mediante escisión proteolítica, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$).

Se dice que un anticuerpo “puede unirse a” una molécula si puede reaccionar específicamente con la molécula para unirse así a la molécula al anticuerpo. El término “epítomo” pretende referirse a esa parte de cualquier molécula que puede unirse por un anticuerpo que puede también reconocerse por ese anticuerpo. Los epítomos o “determinantes antígenicos” consisten normalmente en agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas.

Un “antígeno” es una molécula o una parte de una molécula que puede unirse por un anticuerpo que puede adicionalmente inducir a un animal a producir un anticuerpo que puede unirse a un epítomo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno, o más de un epítomo. La reacción específica a la que se hace referencia anteriormente pretende indicar que le antígeno reaccionará, de manera altamente selectiva, con su correspondiente anticuerpo y no con los otros innumerables anticuerpos que pueden provocarse mediante otros antígenos.

Los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, útiles en la presente invención pueden utilizarse cuantitativa o cualitativamente para detectar una proteína TIF2, polipéptido o fragmento, en una muestra o para detectar la presencia de células que expresan una TIF2 de la presente invención. Esto puede conseguirse mediante técnicas de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo marcado de forma fluorescente (véase a continuación), acoplado con detección con microscopía óptica, con citometría de flujo o fluorométrica.

Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) útiles en la presente invención pueden emplearse de manera histológica, como en inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica, para detección *in situ* de una proteína TIF2, polipéptido o fragmento, de la presente invención. La detección *in situ* puede conseguirse extrayendo una muestra histológica de un paciente, y proporcionando un anticuerpo marcado de la presente invención a tal muestra. El anticuerpo (o fragmento) se proporciona preferiblemente aplicando o superponiendo el anticuerpo marcado (o fragmento) a una muestra biológica. A través del uso de tal procedimiento, es posible determinar no solo la presencia de una proteína TIF2, polipéptido o fragmento, sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente invención, aquellos expertos habituales percibirán fácilmente que puede modificarse cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) con el fin de alcanzar tal detección *in situ*.

Tales ensayos para una proteína TIF2, polipéptido, o fragmento, de la presente invención comprende normalmente incubar una muestra biológica, tal como un fluido biológico, un extracto de tejido, células recién recogidas tales como linfocitos o leucocitos, o células que se han incubado en un cultivo de tejido, en presencia de un anticuerpo marcado de manera que pueda detectarse que puede identificar una proteína TIF2, polipéptido, o fragmento, y detectar el anticuerpo mediante cualquiera de las varias técnicas bien conocidas en la técnica.

La muestra biológica puede tratarse con un portador o soporte en fase sólida tal como nitrocelulosa, u otro portador o soporte sólido que puede inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte o portador puede entonces lavarse con tampones adecuados, seguido de tratamiento con un anticuerpo específico de TIF-2 marcado de manera que pueda detectarse. El portador o soporte en fase sólida pueden lavarse entonces con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcador unido en dicho portador o soporte sólido puede detectarse entonces mediante medios convencionales.

Por “soporte en fase sólida”, “portador en fase sólida”, “soporte sólido”, “portador sólido”, “soporte” o “portador” se entiende cualquier soporte o portador que puede unirse a antígeno o anticuerpos. Soportes o portadores muy conocidos, incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros, y magnetita. La naturaleza del portador puede ser o bien soluble hasta cierto punto o bien insoluble para los fines de la presente invención. El material de soporte puede tener prácticamente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada pueda unirse a un antígeno o anticuerpo. Por tanto, la configuración de soporte o portador puede ser esférica, tal como en una perla, o cilíndrica, tal como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie exterior de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tira reactiva, etc. Los portadores o soportes preferidos incluyen perlas de polies-

tireno. Aquellos expertos en la técnica conocerán muchos otros portadores adecuados para la unión de anticuerpos o antígenos, o podrán determinar los mismos mediante el uso de experimentación rutinaria.

La actividad de unión de un lote dado de anticuerpo anti-TIF2 puede determinarse según métodos bien conocidos. Aquellos expertos en la técnica podrán determinar las condiciones de ensayo óptimas y operativas para cada determinación empleando experimentación rutinaria. Otras etapas tales como lavar, remover, agitar, filtrar y similares pueden añadirse a los ensayos según sea habitual o necesario para la situación particular.

Uno de los modos en los que el anticuerpo específico de TIF2 puede marcarse de manera que pueda detectarse es uniendo el mismo a una enzima y usando un inmunoensayo enzimático (EIA). Esta enzima, a su vez, cuando se exponga más tarde a un sustrato adecuado, reaccionará con el sustrato de tal manera que se produzca un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, mediante medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Enzimas que pueden usarse para marcar el anticuerpo de manera que pueda detectarse incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococo, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La detección puede conseguirse mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección puede conseguirse mediante comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de manera similar.

La detección puede conseguirse usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando por radioactividad los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, es posible detectar R-PTPasa a través del uso de un radioinmunoensayo (RIA). Puede encontrarse una buena descripción de RIA en *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, por Work, T.S. *et al.*, North Holland Publishing Company, NY (1978) con particular referencia al capítulo titulado "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" por Chard, T., incorporado como referencia en el presente documento. El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador γ o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

También es posible marcar un anticuerpo anti-TIF2 con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado de forma fluorescente se expone a luz de longitud de onda apropiada, puede detectarse su presencia debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcado fluorescente más comúnmente usados son isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftalaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo también puede marcarse de manera que pueda detectarse utilizando metales que emiten fluorescencia tales como ^{152}Eu , u otros de las series de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo utilizando grupos quelantes de metales tales como ácido dietilentriaminopentaacético (EDTA).

El anticuerpo también puede marcarse de manera que pueda detectarse acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia de un anticuerpo marcado con etiqueta quimioluminiscente se determina entonces detectando la presencia de la luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcado quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

De la misma manera, puede usarse un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos, en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes para fines de marcado son luciferina, luciferasa y acuorina.

Una molécula de anticuerpo de la presente invención puede adaptarse para su utilización en un ensayo inmunométrico, también conocido como un ensayo "de doble sitio" ("two-site") o de "intercalación" ("sandwich"). En un ensayo inmunométrico normal, se une una cantidad de anticuerpo no marcado (o fragmento de anticuerpo) se une a un portador o soporte sólido y se añade una cantidad de anticuerpo soluble marcado de manera que puede detectarse para permitir la detección y/o cuantificación del complejo ternario formado entre el anticuerpo en fase sólida, antígeno y anticuerpo marcado.

Ensayos inmunométricos preferidos, y habituales incluyen ensayos "hacia delante" ("forward") en los que el anticuerpo unido a la fase sólida se pone en contacto en primer lugar con la muestra que se está sometiendo a prueba para extraer el antígeno de la muestra mediante la formación de un complejo antígeno-anticuerpo en fase sólida binario. Tras un periodo de incubación adecuado, el portador o soporte sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra de fluido, que incluye el antígeno que no ha reaccionado, si lo hubiera, y después se pone en contacto con la disolución que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo marcado (que funciona como una "molécula indicadora"). Tras un segundo periodo de incubación para permitir que el anticuerpo marcado forme un complejo con el antígeno unido al portador o soporte sólido a través del anticuerpo no marcado, el soporte sólido o portador se lava una segunda vez para eliminar el anticuerpo marcado que no ha reaccionado.

En otro tipo de ensayo "de intercalación", que puede ser útil con los antígenos de la presente invención, se utilizan los ensayos denominados "simultáneo" e "inverso". Un ensayo simultáneo implica una única etapa de incubación

puesto que el anticuerpo unido al soporte sólido o portador y el anticuerpo marcado se añaden ambos a la muestra que se está sometiendo a prueba al mismo tiempo. Después de completarse la incubación, el soporte sólido o portador se lava para eliminar el residuo de la muestra de fluido y el anticuerpo marcado no complejoado. La presencia de anticuerpo marcado asociado con el soporte sólido o portador se determina entonces como si fuese un ensayo de intercalación “hacia delante” convencional.

En el ensayo “inverso”, se utiliza la adición progresiva, en primer lugar de una disolución de anticuerpo marcado a la muestra de fluido seguida de adición de anticuerpo no marcado unido a un portador o soporte sólido tras un periodo de incubación adecuado. Tras una segunda incubación, la fase sólida se lava de forma convencional para liberarla del residuo de la muestra que se está sometiendo a prueba y la disolución de anticuerpo marcado que no ha reaccionado. La determinación de anticuerpo marcado asociado con un portador o soporte sólido se determina entonces como en los ensayos “simultáneo” y “hacia delante”.

Habiendo descrito de manera general la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 1

Clonación y expresión de TIF2

En sintonía con informes anteriores (Halachmi, S. *et al.*, *Science* 264:1455-1458 (1994); Cavaillès, V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10009-10013 (1994); Kurokawa, R. *et al.*, *Nature* 377:451-454 (1995)), se observó unión dependiente de agonista *in vitro* de una proteína de 160 kDa a partir de extractos de células completas marcadas con ³⁵S (HeLa, Cos-1, P19.6, MCF-7) a los DUL marcados con etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST) de receptores de ácido retinoico (RAR) y estrógenos (RE) (figura 2a). Un clon de ADNc, identificado examinando 340.000 clones de la biblioteca de expresión de ADNc de placenta humana con una sonda de RE(DEF) marcado con ³²P unido a estradiol (E2), codificaba para un fragmento de proteína (TIF2.1) que interaccionaba en inmunotransferencias de tipo Far-Western con tres DUL de RN (RE, RAR, RXR) marcados con ³²P de manera dependiente de agonista (no mostrado), y podría por tanto corresponder a la proteína de 160 kDa anterior. La secuencia codificante de TIF2 (figura 3a), precedida por codones de terminación en marco en 5' del iniciador AUG, se obtuvo tras volver a seleccionar con una sonda de ADNc de TIF2. El ADNc de TIF2 humano codifica para una proteína de 159.160 Da (1.464 aminoácidos), que incluye supuestas señales de localización nuclear N-terminales (NLS), una región rica en Gln y tres ricas en Ser/Thr, y dos agrupaciones cargadas (figura 3). Algunas regiones de TIF2 muestran similitudes de secuencia significativas con el coactivador del receptor de esteroides, CRE-1, descrito recientemente (Onate, S.A. *et al.*, *Science* 270:1354-1357 (1995)) (figura 3). TIF2 aparece expresarse ampliamente, puesto que se encontró el transcrito correspondiente en varios tejidos humanos, aunque a un nivel mucho menor en el riñón (figura 2c y no mostrado).

Estudios de inmunoreducción apoyan firmemente que TIF2 es la especie de proteína de 160 kDa que interacciona de una manera dependiente de agonista con DUL de RN (véase anteriormente y Halachmi, S. *et al.*, *Science* 264:1455-1458 (1994); Cavaillès, V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10009-10013 (1994); y Kurokawa, R. *et al.*, *Nature* 377:451-454 (1995)). La inmunotransferencia de tipo Western con un antisuero de conejo (α -TIF2), obtenido contra TIF2.1 expresado por bacterias, reveló predominantemente una proteína de células HeLa de 160 kDa que interaccionaba con GST-RE(DEF) unido a agonista (figura 2b, carriles 1 y 2; véase también la leyenda de la figura 2b). La inmunoreducción con un anticuerpo contra TIF2 monoclonal de ratón (α -TIF2) antes de la purificación por afinidad dio como resultado una disminución específica de las cantidades TIF2, pero no de TIF1 (Le Douarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 14:2020-2033 (1995)), retenidas en el GST-RE(DEF) unido a E2 (figura 2b, compárense los carriles 2 con 4 y 6 con 8). De manera importante, el posterior análisis de inmunotransferencia de tipo Far-Western con una sonda de ³²P-GST-RE(DEF) unido a E2 reveló la especie de 160 kDa sólo en el control, pero no en extractos con inmunoreducción de TIF2 (figura 2b, compárense los carriles 10 y 12).

El TIF2 de longitud completa expresado de manera transitoria fue nuclear y principalmente asociado con corpúsculos diferenciados (figura 4a). Puesto que el fragmento de TIF2.1 sobreexpresado era esencialmente citoplásmico (apoyando la asignación anterior de NLS de TIF2 N-terminal), la interacción de TIF2.1 con RN podría estudiarse en células de mamíferos utilizando ensayos de cotranslocación nuclear. En ausencia de ligando, el TIF2.1 siguió siendo citoplásmico y los RN fueron nucleares (para RAR α , RE y RP, véanse las figuras 4b, d, g). La exposición a agonista, sin embargo, dio como resultado la localización nuclear conjunta de TIF2.1 y RN en los tres casos, indicando la interacción de TIF2-RN *in vivo* (figuras 4c, e, h). La interacción dependiente de agonista de TIF2.1 con los RN se observó para todos los demás receptores analizados (RXR, RT, RVD, RG y RA; no mostrados). De forma interesante, no se detectó interacción entre RE y TIF2.1 en presencia del antagonista de AF-2 de RE hidroxitamoxifeno (OHT) (figura 4f), y el antagonista de AF-2 de RP RU 486 invirtió la interacción de TIF2.1-PR inducida por R5020 (figura 4).

De acuerdo con los experimentos de inmunotransferencia de tipo Far-Western, los RN y TIF2 interaccionaban directamente, a medida que la proteína TIF2.1 purificada se unió *in vitro* en presencia de un agonista a GST-RE(DEF), GST-RAR α (DEF), GST-RXR α (DE) y GST-RT(DE) (figura 4k, l, m, carriles 3 y 4; figura 4n, carriles 5 y 6). Tal como se esperaba, la unión de TIF2 a GST-RXR α (DE) se producía con 9-*cis*-AR (9C-AR) pero no con todo-*trans*-AR (T-RA) (figura 4n, carriles 1 y 2), y OHT impidió la unión dependiente de E2 de TIF2 a GST-RE(DEF) (figura 4n, carriles 7 a 9). La integridad del núcleo conservado de los dominios de activación de AF-2 (DA de AF-2) de RE, RAR α y RXR α que se demostró que era crítico para la actividad de AF-2 (Le Douarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 11:1025-1033 (1995);

Danielian, P.S. *et al.*, *EMBO J.* 11:1025-1033 (1992); Durand, B. *et al.*, *EMBO J.* 13:5370-5382 (1994); y Gronemeyer, H. y Laudet, V., *Protein Profile* 2:1173-1308 (1995), y en esos documentos), se requirió para la interacción de TIF2 *in vitro*. La mayoría de los mutantes de núcleo de DA de AF-2 que han perdido la actividad de AF-2 (RE, figura 4k, carriles 5 a 8; RAR α , figura 4l, carriles 5 a 10; RXR α , figura 4m, carriles 5 a 8) no se asociaron de manera detectable, o sólo débilmente, con TIF2, mientras que la fusión de GST-DUL del mutante de RXR α E461Q, cuya AF-2 está sólo parcialmente afectada (Le Douarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 14:2020-2033 (1995)), todavía mostraba una interacción dependiente de RA significativa con TIF2.1 *in vitro* (figura 4m, carriles 9 y 10). No se observó interacción significativa de TIF2 ni con GST-VP16 (dominio ácido de activación), GST-TBP, GST-TFIIB, o una serie de GST-TAF (hTAF $_{II}$ 18, hTAF $_{II}$ 20, hTAF $_{II}$ 28 y hTAF $_{II}$ 55; véase Jacq, X. *et al.*, *Cell* 79:107-117 (1994); Mengus, G. *et al.*, *EMBO J.* 14:1520-1531 (1995)) (no mostrado).

Desde un punto de vista conceptual, un TIF que puede mediar la actividad de transcripción de una AF relacionada con la maquinaria de transcripción, podría ser en sí mismo un activador cuando se fusiona a un dominio de unión de ADN heterólogo. De forma interesante, en células HeLa transfectadas de manera transitoria, TIF2.1 fusionado al dominio de unión de ADN de GAL4 transactivó fuertemente un indicador de GAL4 (figura 5a). Por tanto, TIF2 puede corresponder a uno del (de los) hipotético(s) factor(es) limitante(s) que se propusieron anteriormente que participan en la interferencia/secuestro transcripcional de RN (Meyer, M.-E. *et al.*, *Cell* 57:433-442 (1989); Bocquel, M.-T. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:2581-2595 (1989); Tasset, D. *et al.*, *Cell* 62:1177-1187(1990)). Apoyando esta posibilidad, experimentos "anti-secuestro" demostraron que la expresión de TIF2.1 en células transfectadas con RE pudieron, al menos de manera parcial, invertir la autointerferencia transcripcional (Bocquel, M.-T. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:2581-2595 (1989)) generada al expresar cantidades aumentadas de RE (figura 5b; obsérvese el desplazamiento marcado de la curva de activación con forma de campana a concentraciones superiores de RE en presencia de TIF2.1). A niveles de expresión de RE elevados, la transactivación estimulada por TIF2.1 disminuyó, posiblemente debido a secuestro de otros supuestos mediadores (Jacq, X. *et al.*, *Cell* 79:107-117 (1994); Lee, J.W. *et al.*, *Nature* 374:91-94 (1995); Le Douarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 14:2020-2033 (1995); vom Baur, E. *et al.*, *EMBO J.* 15:110-124 (1996); Lee, J.W. *et al.*, *Endocrinology* 9:243-254 (1995); Cavaillès, V. *et al.*, *EMBO J.* 14:3741-3751 (1995); Onate, S.A. *et al.*, *Science* 270:1354-1357 (1995)) y/u otros factores de transcripción.

Tal como se esperaba, la coexpresión de TIF2.1 con RN unido a antagonista no condujo a ninguna estimulación de la transactivación provocada por AF-1 en presencia de antagonistas de AF-2 puros (Berry, M. *et al.*, *EMBO J.* 9:2811-2818 (1990); Meyer, M.E. *et al.*, *EMBO J.* 9:3923-3932 (1990)), apoyando además que TIF2 es específico de AF-2 (figura 5b y 5e para RE, OHT; figura 5d para PR, RU486). La expresión de TIF2 también aumentó la transactivación mediada por agonista/AF-2 mediante los receptores de andrógenos (RA) y progesterona (RP), pero no la transactivación mediante GAL-VP16 y GAL-AP2 (figura 5c). En condiciones similares, la transactivación mediante GAL-RAR, GAL-RXR, GAL-RVD, GAL-RT y GAL-RG no se vieron afectadas por TIF2 (figura 5c, y no mostrado), lo que sugiere que para estos RN ni TIF2 está implicado de manera crítica en la mediación de sus actividades de AF-2 ni las cantidades de TIF2 endógeno son suficientes para apoyar óptimamente la transactivación, por ejemplo, porque TIF2 tiene una afinidad superior por estos receptores. La estimulación de TIF2 se ve afectada hasta cierto punto por el entorno del promotor del gen que responde, ya que el efecto de TIF2 sobre la transactivación inducida por RP/5020 fue mayor para un complejo (MMTV) que para un promotor mínimo (GRE-TATA), aunque este último también se estimuló de forma reproducible (figura 5d). Tal como se esperaba a partir de los niveles definidos de transcritos de TIF2 en diferentes tejidos (figura 2c), el efecto de TIF2 era dependiente del tipo de célula, puesto que TIF2 tenía un efecto mucho más fuerte sobre las transactivaciones inducidas por RE o RP en células Cos-1 que en células HeLa (figuras 5d, e).

Los estudios de secuestro (Meyer, M.-E. *et al.*, *Cell* 57:433-442(1989); Bocquel, M.-T. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:2581-2595 (1989); Tasset, D. *et al.*, *Cell* 62:1177-1187 (1990)) y estructurales (Bourguet, M. *et al.*, *Nature* 375:377-382 (1995); Benaud, J.-P. *et al.*, *Nature* 378:681-689 (1995); Wagner, R.L. *et al.*, *Nature* 378:690-697 (1995); Wurtz, J.-M. *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:87-94 (1996)) han apoyado un modelo en el que la unión del ligando al DUL de los RN da como resultado cambios conformacionales que generan la(s) superficie(s) requerida(s) para la interacción con factores intermediarios de transcripción (TIF/mediadores) que transducen la actividad de AF-2 a la maquinaria de transcripción. Desde un punto de vista conceptual, tales mediadores deben mostrar las siguientes propiedades: (i) deben unirse a DUL de RN unidos a agonista, pero no a agonista, (ii) debe impedirse su unión mediante mutaciones que supriman la actividad de AF-2, (iii) deben mostrar colectivamente una(s) función(ones) de transactivación, (iv) su expresión debe mitigar el autosecuestro de AF-2, y (v) su sobreexpresión debe estimular la actividad de AF-2, siempre que estén presentes en cantidades limitantes. El presente estudio es el primer informe de un mediador auténtico de AF-2 de RN que muestra todas estas propiedades.

Ejemplo 2

Producción de anticuerpos contra TIF2

Los siguientes anticuerpos contra TIF2 se prepararon utilizando técnicas conocidas, a menos que se especifique a continuación. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1987-1996); Harlow y Lane *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992-1996), incorporándose en su totalidad el contenido de tales referencias al presente documento como referencia.

ES 2 281 105 T3

Anticuerpos policlonales. La secuencia codificante de TIF2.1 (aminoácidos 624-1287) se clonó en pET15b y el plásmido resultante se transformó en una cepa BL21 (DE3) de *E. Coli*. Tras la sobreexpresión de la proteína (His)₆-TIF2.2, se lisaron las bacterias y se purificó la proteína a partir del extracto bruto mediante cromatografía de afinidad en una columna de quelación HiTrap (Pharmacia) tal como se describe (véase Bourguet *et al.*, *Prot. Expr. Purif.* 6:604-608 (1995) para detalles técnicos). Se inyectaron alícuotas de la proteína purificada (50 µg) en emulsión (adyuvante de Freund) (sólo una vez) en un conejo de Nueva Zelanda utilizando un protocolo de inyección intradérmica en múltiples sitios. El antisuero obtenido a partir de extracciones de sangre en serie revelaron una única banda de aproximadamente 160 kDa en inmunotransferencias de tipo Western de extractos a partir de células Cos-1 transformadas con un vector de expresión de TIF2 de longitud completa.

Anticuerpos monoclonales. Se seleccionó un péptido de aminoácidos 20-mérico de TIF2 (con una cisteína C-terminal añadida) basándose en sus características inmunogénicas potenciales en cuanto a hidrofobicidad, flexibilidad, probabilidad superficial e "índice antigénico" según los programas de software Plot y Peptidestructure del paquete GCG.

El péptido elegido corresponde al fragmento N-terminal codificado por el ADNc parcial de TIF2 aislado inicialmente (que codifica para los aminoácidos 624 a 1287) y corresponde a los aminoácidos 624 a 643 de la proteína total (SEQ ID NO:2):

ERADGQSRLHDSKGGTKLLQ(C) (SEQ ID NO:4)
624 643

Se acopló el péptido a ovalbúmina mediante la cisteína adicional utilizando el agente de reticulación heterobifuncional MBS. Se llevaron a cabo las inyecciones en ratones Balb/c por vía intraperitoneal y por vía intravenosa.

Se fusionaron células de bazo de los ratones inmunizados al mieloma Sp2/0-Ag14. Los hibridomas en crecimiento se seleccionaron en primer lugar mediante ELISA utilizando la proteína TIF2.1 recombinante y el péptido libre. Entonces, se sometieron a prueba los cultivos positivos mediante inmunocitofluorescencia en células Cos transfectadas con TIF2.1 (en el vector pSG5) así como mediante inmunotransferencia de tipo Western usando los extractos de células Cos transfectadas y un extracto nuclear de HeLa. También se sometieron a prueba los cultivos positivos para determinar su capacidad para inmunoprecipitar la proteína TIF2.1 a partir de células Cos transfectadas.

Los cultivos se clonaron dos veces en agar blando. Se han establecido 5 hibridomas, 4 que secretan anticuerpos IgG₁, κ y 1 IgG_{2a}, κ, tal como se muestra en la tabla:

Hibridoma	ELISA	Inmuno- fluorescencia (Cos)	Inmuno- transferencia de tipo Western (Cos)	Inmuno- precipitación (Cos)
IT1-1B6 (IgG ₁ , κ)	+	+	+	+
ITi-1C9 (IgG, κ)	+	+	+	+
ITi-1D8 (IgG, κ)	+	+	++	+
ITi-1D12 (IgG, κ)	+	+	++	+
ITi-1G3 (IgG, κ)	+	+	++	+

Ejemplo 3

Identificación de DIN de TIF2

5 Todo el trabajo de ADN recombinante se llevo a cabo según procedimientos habituales (Ausubel, F.M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1993)). Se expresaron fusiones con GST de receptores nucleares de los siguientes plásmidos descritos anteriormente: GST (pGEX2T; Pharmacia), GST-RE (pGEX2T-REh α (DEF), también denominado pGEX2THE14G, aminoácidos 282-595), GST-RXR (pGEX2T-RXRm α (DE), aminoácidos 205-467), y GST-RAR (pGEX2T-RARh α (DEF), aminoácidos 153-462) (todos LeDouarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 14:2020-2033 (1995a)).

15 Para definir además el dominio de interacción con RN (DIN) de TIF2, se estudió la interacción entre una serie de mutantes de delección de TIF2 y los DUL de RE o RAR α , utilizando ensayos *in vitro* basados en proteínas de fusión con GST. En ambos casos, se mapeó un DIN en la región central de TIF2 (aminoácidos 624-869 en el mutante TIF2.5; véanse las figuras 7a y b). No se pudo identificar ningún DIN adicional en los extremos N o C-terminales de TIF2 (figuras 7a y b; mutantes TIF2.0, TIF2.2 y TIF2.7). Obsérvese que, al contrario, CRE-1, un paralog de TIF2, aparentemente alberga dos DIN no contiguos distintivos ubicados en las regiones central y C-terminal (Onate, S.A. *et al.*, *Science* 270:1354-1357 (1995); Yao, T.P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10626-10631 (1996); Zhu, Y. *et al.*, *Gene Expression* 6:185-195(1996)).

20 Para delimitar más el DIN de TIF2, se truncó TIF2.5 en el extremo C-terminal a Pro775, produciendo TIF2.34 que también interaccionó con los DUL de RE y RAR α de manera dependiente de ligando (figuras 8a y 8c). En el truncamiento adicional a Ser697, el mutante resultante todavía interaccionó tanto con los DUL de RE como de RAR α pero, sorprendentemente, se encontró también una interacción dependiente de ligando con TIF2.36 (figuras 8a y 8c), indicando así que el DIN de TIF2 se compone de al menos dos módulos autónomos de interacción con NO.

30 Una alineación de la secuencia de aminoácidos del DIN de TIF2 presente en TIF2.34 con la correspondiente región de CRE-1 (Oñate, S.A. *et al.*, *Science* 270:1354-1357 (1995)) reveló 3 regiones altamente conservadas (figura 8a). De forma interesante, las tres contienen el motivo LxxLL (SEQ ID NO:12) (figura 8b), identificado originalmente en la denominada “caja de receptor nuclear” (caja RN) de TIF1 α como el motivo LxxLLL (SEQ ID NO:13), que también estaba presente en RIP140 (Cavaillès, V. *et al.*, *EMBO J.* 14:3741-3751 (1995)) y TRIP3 (Lee, J.W. *et al.*, (1995)) (véase LeDouarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 15:6701-6715 (1996) y la figura 8b). De forma interesante, secuencias de 10 aminoácidos que comprenden las cajas RN de TIF1 α o RP140 fueron suficientes para la interacción funcional con RXR de manera dependiente de ligando e integridad de DA de AF-2, y la mutación de las leucinas en la posición 4 y 5 (LL $\rightarrow$ AA) del motivo LxxLLL de TIF1 α (SEQ ID NO: 13) suprimió la interacción TIF1 α -RXR (LeDouarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 15:6701-6715 (1996)). Se confirmó recientemente la funcionalidad de la caja RN RIP140 (Heery, D.M. *et al.*, *Nature* 387:733-736 (1997)).

40 Para investigar la importancia funcional de estos tres motivos en el DIN de TIF2, se introdujo la mutación LL $\rightarrow$ AA anterior en TIF2.1, o bien en cada motivo solo o en todas las combinaciones posibles de los tres motivos (m1 a m123 de TIF2.1 en la figura 8a; los números que siguen a “m” hacen referencia a los motivos mutados). Se requiere la mutación de las tres cajas RN para suprimir tanto la unión a RE, RAR α y RXR α (figura 8d, cuantificación en la figura 8e, barras blancas) y la estimulación dependiente de TIF2 de la transactivación inducida por ligando mediante las AF-2 de RE y RXR α (figura 8e, barras negras, y datos no mostrados; en el caso de AF-2 de RAR α , la estimulación fue débil y no se cuantificó). Las construcciones de TIF2.1 en los que se mutaron dos motivos de cajas RN todavía mostraron unión a RE y estimulación de la actividad de AF-2, en particular cuando el motivo II de la caja RN estaba intacto, sugiriendo que los tres módulos que contienen cajas RN son al menos en parte, redundantes funcionalmente (figuras 8d y e; m12, m13, y m23 de TIF2.1). Esta redundancia fue obvia cuando se mutó sólo un motivo de caja RN; al contrario que TIF1 α , que contiene sólo una caja RN (LeDouarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 15:6701-6715 (1996)), la mutación de una única caja RN de TIF2 no suprimió la unión de RE y estimulación de la actividad de AF-2 de RE. Los tres mutantes (m1 a m3 de TIF2.1) unidos a RE y la transactivación dependiente de estradiol estimulada, mediante RE con eficiencia similar que el propio TIF2.1 (figuras 8d y e). Las mutaciones tuvieron, en el caso de RAR α y RXR α , en general, un efecto más perjudicial sobre la unión de DUL del receptor y la estimulación de la actividad de AF-2 que en el caso de RE (figuras 8d y e). Esto puede reflejar posiblemente una interacción más débil entre TIF2 y o bien RAR α o bien RXR α que con RE. Sin embargo, a pesar de mostrar en general una actividad menor, los patrones de unión de RN y estimulación de la actividad de AF-2 de los mutantes de la caja RN fueron similares para RE y para RAR α y RXR α , debido a que la mutación del motivo II fue siempre más perjudicial en mutantes dobles que la mutación de motivos I y III (véase figura 8e). De forma importante, tanto para RE como para RXR α , había una buena correlación entre el efecto de cualquiera de las diversas mutaciones en la unión TIF2.1-receptor *in vitro* y la estimulación mediada por TIF2 de la actividad de AF-2 (figura 8e), apoyando un mecanismo mediante el cual la estimulación de la actividad de AF-2 mediante TIF2 implica la interacción TIF2-NO a través de la(s) interfase(s) de caja RN holo-DUL-TIF2 de RN.

65 El presente análisis de función-estructura revela que TIF2 contiene un único dominio de interacción con receptor nuclear (DIN). Obsérvese la diferencia con el otro miembro de la familia de TIF2, CRE-1, que se notificó que contiene dos DIN (Oñate, S.A. *et al.*, *Science* 270:1354-1357 (1995); Yao, T.P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10626-10631(1996); Zhu, Y. *et al.*, *Gene Expression* 6:185-195 (1996)). Obsérvese, sin embargo, que uno de los dos DIN de CRE-1 es más probablemente homólogo al DIN de TIF2 caracterizado en el presente documento (véase la figura 8a).

El DIN de TIF-2 se compone de tres módulos, y cada uno puede unirse independientemente de manera dependiente de ligando a los RN sometidos a prueba en este estudio. De forma interesante, estos módulos contienen el motivo LxxLL de la caja RN (SEQ ID NO:12), que fue registrada originalmente (como el motivo LxxLLL (SEQ ID NO: 13), figura 8b) dentro de un módulo de unión a RN de 10 aminoácidos de TIF1 α que se encontró que se conservaba en el DIN de RIP140 y que también estaba presente en TRIP3 (LeDouarin, B. *et al*, *EMBO J.* 15:6701-6715 (1996) y referencias en ese documento). Además, los módulos TIF1 α y RIP140 demostraron interactuar funcionalmente con los RN (LeDouarin, B. *et al*, *EMBO J.* 15:6701-6715 (1996)). La implicación de los motivos de la caja RN en uniones NO-coactivador y su presencia en varios coactivadores diferentes se señaló en informes recientes (Heery, D.M. *et al.*, *Nature* 387:733-736(1997); Torchia, J. *et al.*, *Nature* 387:677-684 (1987); LeDouarin, B. *et al.*, *EMBO J.* 15:6701-6715 (1996)). Obsérvese que los tres motivos de caja RN de TIF2 descritos en el presente documento se conservan en el paralogo de TIF2 descubierto recientemente p/CIP (Torchia, J. *et al.*, *Nature* 387:677-684 (1987)). Al contrario que TIF1 α , para el que la mutación de leucinas en las posiciones 4 y 5 a alanina de su único motivo de caja RN (LL $\rightarrow$ AA) suprime la unión a RN, se requiere la mutación de los tres motivos en el DIN de TIF2 para suprimir la unión a RN, indicando que cada uno de estos motivos puede contribuir a una superficie de TIF2 que interactúa con una superficie relacionada de holo-DUL de RN. Que las cajas RN de TIF2 muestren redundancia funcional está apoyado por la observación de que la mutación LL $\rightarrow$ AA en cualquiera de los tres motivos de DIN de TIF2 aparentemente no reducen (en el caso de RE) o solo débilmente (en el caso de RAR α , RXR α) la eficiencia de la interacción con RN. Además, en el entrono de TIF2.1, cualquier motivo de una única caja RN intacta por sí mismo (es decir, cuando se mutaron los otros dos motivos) fue suficiente para la interacción con el DUL de holo-RE, aunque solamente el motivo II por sí mismo pudo provocar una eficiencia de unión a RN casi de tipo natural. Por el contrario, para la interacción con RAR α y RXR α , los mutantes con cajas RN únicas e intactas fueron de 5 (caja II) a 20 (caja I o III) veces menos eficaces que el TIF2 de tipo natural que contiene las tres cajas RN. Serán necesarios estudios cristalográficos para distinguir entre dos modelos posibles, en los que los tres motivos de caja RN (i) contribuyen a la formación de una superficie de DIN tripartita que reconoce específicamente una superficie de DUL de holo-NO relacionado, o (ii) pertenece a superficies independientes que pueden cada una interactuar, aunque con eficacias diferentes, con la misma superficie de holo-NO. Obsérvese, sin embargo, que el segundo modelo podría permitir que TIF2 interactuara cooperativamente con componentes tanto de holo como de heterodímeros de RN, haciendo así la transactivación por RN sensible a pequeñas variaciones en los niveles de TIF2. Obsérvese también que, tanto para RE como para RXR α , los efectos de las mutaciones de caja RN sobre la unión a RN y la estimulación de la actividad de AF-2 se correlacionaban, apoyando además la conclusión de que el efecto transcripcional de TIF2 implica la formación de una interfase de interacción caja RN - DUL de NO.

Se ha encontrado el motivo LxxLL (SEQ ID NO:12) en otros varios coactivadores de RN (véase anteriormente), sugiriendo así cierta similitud en el modo de interacciones NO-coactivador. Sin embargo, esto no excluye la modulación específica de NO de estas interacciones, puesto que las secuencias que rodean la caja RN son altamente variables. Con respecto a esto, obsérvese también que se prevé que las cajas II y III de RN de TIF2 formen hélices α , mientras que se prevé que la caja I de RN se pliegue en una estructura de lámina β (predicciones de estructura según SOPMA; Geourjon y Deleage, 1994).

Ejemplo 4

Identificación de los dominios de activación DA1 y DA2 de TIF2

Ensayos de transfección transitoria con un plásmido indicador de GAL4 y quimeras que contienen varios fragmentos de TIF2 unidos al dominio de unión a ADN de GAL4 (DUA) demostró la presencia de de dos dominios de activación transcripcionales autónomos en los 460 aminoácidos C-terminales de TIF2, denominados como DA1 y DA2 (definidos por los mutantes TIF2.8, TIF2.12, y TIF2.2 en las figuras 7a y c). Se realizaron transfecciones transitorias de células HeLa y Cos-1 tal como se describe (Gronemeyer *et al.*, (1987); Bocquel, M.T. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:2581-2595(1989)).

El DA1 N-terminal (aminoácidos 1010-1131), que está presente en TIF2.1, mostró una actividad más fuerte que el DA2 C-terminal (aminoácidos 1288-1464) (compárense TIF2.8 y TIF2.12 con TIF2.2 en las figuras 7a y c). Obsérvese, sin embargo, que la actividad más débil de DA2 (con respecto a DA1) podría deberse a un nivel de expresión menor de la proteína de fusión GAL-TIF2.2 (compárese con GAL-TIF2.8 y GAL-TIF2.12 en la figura 7c). Ambas funciones de activación de TIF2 estaban activas en células Cos-1 y HeLa (figura 7c). Notablemente, las construcciones de DA1 (TIF2.8) y DA2 (TIF2.2) mínimas mostraron algunas actividades específicas de células, ya que GAL-TIF2.8 era más activo en células HeLa que en células Cos, mientras que se observó lo contrario para GAL-TIF2.2 (figura 7c). De forma interesante, la región de TIF2 rica en glutamina no pudo ni activar la transcripción por sí misma cuando se fusionó al DUA de GAL4 (figuras 7a y c; mutante TIF2.6), ni se requirió para la activación de la transcripción por DA1 o DA2. No pudo detectarse ninguna función de activación en la parte N-terminal de TIF2 (véanse las figuras 7a y c; mutante TIF2.0).

Se concluyó a partir de estos datos que el dominio de interacción del receptor nuclear (DIN) y las dos funciones de activación de transcripción de TIF2 corresponden a dominios modulares distintos, puesto que el TIF2.5 puede unirse a RN, pero no puede activar la transcripción, mientras que TIF2.2 y TIF2.8 no pueden unirse a RN pero pueden activar la transcripción (figura 7a).

Ejemplo 5

Caracterización de los dominios de activación DA1 y DA2 de TIF2

Recientemente se mostró que CBP y p300, identificados originalmente como coactivadores del factor de transcripción CREB, actúan como integradores generales de múltiples rutas de señalización, incluyendo la activación mediante RT y RAR α unido a un agonista (para publicaciones y referencias véase Eckner, R., *Biol. Chem.* 377:685-688 (1996); Janknecht & Hunter, (1996); Glass, C.K. *et al.*, *Current Opin. Cell Biol.* 9:222-232 (1997); Shikama, N. *et al.*, *Trends in Cell Biol.* 7:230-236 (1997)). Además, se notificó que el CRE-1, que pertenece a la misma familia de genes que TIF2, interacciona con CBP y p300 (Kamei, Y. *et al.*, *Cell* 85:403-414 (1996); Yao, T.P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10626-10631 (1996); Hanstein, B., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11540-11545 (1996)). Utilizando la interacción basada en proteína de fusión de GST y ensayos de dos híbridos basados en células animales, se analizó así si TIF2 también podía interaccionar con CBP. En el sistema de dos híbridos sólo el fragmento de TIF2.1 central, pero no los fragmentos de TIF2.0 N-terminal ni TIF2.2 C-terminal (figura 7a), dieron puntuación positiva para la interacción con GAL-CPB (que contiene los aminoácidos 1872-2165 de CBP, que abarcan el dominio de interacción de CRE-1; figura 7e). Se expresó una proteína de fusión de CBP-GST en *E. coli* y se usó para ensayos pull-down con polipéptidos TIF2 traducidos *in vitro* (figura 7d). El TIF2 interaccionó con CBP y, de forma interesante, el dominio de interacción con CBP (DIC) se solapó aparentemente al dominio de activación DA1 de TIF2 (compárense las figuras 7a, c y d; mutantes TIF2.8 y TIF2.12). La interacción de TIF2 con CBP fue directa, como una proteína TIF2.1 expresada en *E. Coli* purificada también interaccionó con GST-CBP (datos no mostrados). Solo esta región de TIF2 interaccionó significativamente con la proteína de fusión GST CBP, sugiriendo así que la actividad de DA1 de TIF2 podría originarse de la inclusión de CBP. La purga de regiones N-terminales (figuras 7a y d; mutantes TIF2.10 y TIF2.4) del dominio de activación DA2 C-terminal (figuras 7a y d; mutante TIF2.2) no mostró ninguna unión a GST-CBP. Obsérvese que el TIF2.2 tampoco interaccionó con CBP de longitud completa (datos no mostrados), sugiriendo que la actividad de DA de TIF2 está mediada por (un) factor(es) distintos de CBP.

Para investigar si el DIC de TIF2 podía separarse del dominio de activación DA1, se comparó la capacidad de una serie de mutantes de truncación de GAL-TIF2 para activar un indicador de GAL4 con su capacidad para interaccionar con la proteína GST-CBP *in vitro* (figura 9). TIF2.13 (que abarca de Pro₁₀₁₁ a Ser₁₁₂₂) mostró una actividad de transcripción potente, comparable a la de fragmentos de TIF2 más grandes (compárense las figuras 7 y 9). La eliminación de restos de 26 aminoácidos C-terminales (TIF2.15) o 20 N-terminales (TIF2.18) sólo redujo la actividad de transcripción débilmente (figuras 9a y b). Obsérvese que el TIF2.13 también interaccionó con CBP *in vivo*, como se mostró utilizando un ensayo de dos híbridos en células de mamíferos transfectadas (figura 10b).

Mientras que la eliminación interna de restos Asp₁₀₆₁ a Ala₁₀₇₀ (TIF2.19) solo tuvo un efecto menor sobre la capacidad del TIF2.13 para transactivar, la eliminación del segmento Glu₁₀₇₁ a Leu₁₀₈₀ (mutante TIF2.20) redujo significativamente la actividad de transcripción del DA1 de TIF2. Notablemente, estos restos pertenecen a una secuencia que se predijo que se doblaba en una estructura de hélice α anfipática que está sumamente conservada entre TIF2 y CRE-1 (figura 9a). La implicación de esta región en la transactivación se confirmó mediante el análisis de mutantes de TIF2.21 a TIF2.32 (figuras 9a y b). Todas las construcciones que contienen la secuencia natural de TIF2 de Asp₁₀₇₅ a Leu₁₀₈₇ estimularon la transcripción, mientras que incluso una delección de solo algunos de estos restos redujo significativamente la activación transcripcional. Sin embargo, por si mismo, este péptido helicoidal α transactivó muy poco, y tuvo que incorporarse en secuencias de TIF2 adicionales en sentido 5' y/o en sentido 3' para generar actividad de transcripción significativa (figuras 9a y b; compárense los mutantes TIF2.13, TIF2.21, TIF2.32). De forma importante, en todos los casos, la actividad ADD coincidió con la interacción de CBP, puesto que construcciones transcripcionalmente inactivas no interaccionaron con CBP (TIF2.24, TIF2.27, TIF2.29 en las figuras 9a-c), mientras que los mutantes transcripcionalmente activos también se unieron a CBP. Además, la fuerza de la interacción *in vitro* con GST-CBP se correlacionó aparentemente con la eficacia de la transactivación (figuras 9a-c; por ejemplo, compárense TIF2.21 y TIF2.31).

Para investigar si la integridad de la región helicoidal α anfipática se requiere tanto para la actividad de transcripción de DA1 como la interacción con CBP, se introdujeron mutaciones puntuales en TIF2.13; se convirtieron los tres restos hidrófobos conservados Leu o los hidrófilos Asp-Glu en alaninas [figura 9a; TIF2.13(LL) y TIF2.13(DQ)]. De forma interesante, la mutación de los tres restos de leucina suprimió casi completamente la actividad de DA1, mientras que la mutación de la secuencia Asp-Glu tuvo muy poco efecto, si tuvo alguno (figura 10a). Una vez más, la actividad de DA1 y la interacción con CBP *in vitro* (figura 10c), así como *in vivo* (figura 10b), se correlacionaron rigurosamente, puesto que GAL-TIF2.13 (DQ), que transactivó tan eficazmente como GAL-TIF2.13 de tipo natural, interaccionó fuertemente con CBP, mientras que el GAL-TIF2.13 (LL) transcripcionalmente inactivo interaccionó muy débilmente con CBP. Estos resultados juntos indican que (i) el CBP media la actividad de DA1 de TIF2, (ii) un motivo de hélice α anfipático supuesto localizado en el dominio DA1 está críticamente implicado en, pero no es suficiente para, la unión/transactivación eficaz de CBP y (iii) no se requiere la anfipicidad de este motivo para actividad de DA1 y unión a CBP.

Las dos funciones de activación DA1 y DA2 de TIF2 operan aparentemente a través de cascadas de activación de transcripción diferentes. Mientras que el dominio de activación DA1 de TIF2 no pudo separarse mediante análisis mutacional del dominio de TIF2 que interacciona *in vitro* e *in vivo* con una región de la superficie de CBP que también media la unión a CRE-1 (Kamei, Y. *et al.*, *Cell* 85:403-414 (1996)), ni esta región, ni CBP de longitud completa, interaccionaron con el DA2 de TIF2. También se sugiere que las dos funciones de activación de TIF2 puedan operar a través de rutas distintas mediante la especificidad de células diferenciales de los fragmentos mínimos que muestran

actividad de DA1 (por ejemplo, TIF2.8, TIF2.7, TIF2.9, TIF2.12) y actividad de DA2 (TIF2.2). Mientras que el TIF2.2 es más activo en células Cos-1 que en células HeLa, todos los fragmentos mínimos que contienen DA1 son más activos en células HeLa. A lo largo de las mismas líneas, la eliminación en TIF2.3 de secuencias N-terminales de TIF2.8 dio como resultado un aumento de transactivación de 10 veces y 2 veces en células HELa y Cos-1, respectivamente, y la eliminación en TIF2.1 de secuencias C-terminales de TIF2.3 dio una transactivación 9 veces y 3 veces superior en células HeLa y Cos-1, respectivamente. Esto sugiere que las secuencias eliminadas pueden ejercer o bien represión intramolecular o bien intermolecular de la actividad de DA1 de TIF2/interacción con CBP. Además, la actividad de coactivador de TIF2 puede modularse de manera específica para células mediante la eficacia diferencial de sus dos DA y factores de interacción con las secuencias N- y C-terminales de la función de activación DA1.

Merece la pena observar que el núcleo de DA1 (TIF2.32) por si mismo es un transactivador y grupo de unión de CBP muy malo, y requiere secuencias adicionales alrededor para generar una superficie totalmente activa (es decir, unión a CBP eficaz). Sin embargo, el análisis mutacional del núcleo de DA1 en el contexto de un fragmento activador fuerte (TIF2.13) revela la importancia crítica para la transactivación y unión de CBP *in vivo* e *in vitro* de tres restos de leucina (figura 10). Estas leucinas pertenecen al motivo LLxLxxxL (SEQ ID NO: 14) conservado en los tres miembros de la familia del coactivador de TIF2 (figura 9a; Torchia, J. *et al.*, *Nature* 387:677-684 (1987)) que es distintivo del motivo de la caja de RN LxxLL (SEQ ID NO:12). Notablemente, aunque estas leucinas están incrustadas en una hélice α anfipática prevista, la anfifilicidad no se requiere para la función, puesto que una mutación de restos hidrófilos (compárense TIF2.13 con TIF2.13 (DQ)) no afecta la transactivación/unión de CBP.

El TIF2 puede aparentemente satisfacer al menos dos funciones mediadoras, (i) como un “factor de puente” entre la función de AF-2 de receptores nucleares y CBP por medio del dominio de activación DA1 y (ii) como un mediador transcripcional a través de ruta(s) independiente(s) de unión de CBP aún desconocida(s) por medio de su función DA2. Actualmente, no existen pruebas de que el TIF2 pueda tener una actividad enzimática intrínseca; ninguno de los fragmentos de TIF2 purificados expresados de manera bacteriana, en particular TIF2.1 que se demostró que era totalmente competente en interacciones de CBP y RN *in vitro*, mostraron cualquier actividad histona acetilasa en condiciones en las que GCN5 de levadura purificada expresada de manera bacteriana era altamente activa (resultados no publicados).

Ejemplo 6

Potenciación por TIF2 de la actividad de AF-2 de RN

La observación de que activadores transcripcionales animales, tales como el RE humano (Metzger, D. *et al.*, *Nature* 334:31-36 (1988)), también son activos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* demostró que los principios básicos de la potenciación transcripcional se han conservado desde la levadura hasta el hombre. Por tanto se investigó si TIF2 podía potenciar la activación de transcripción mediante varias construcciones de RN expresados en *S. cerevisiae*. Tanto RN como TIF2.1 se expresaron a partir de plásmidos de tipo multicopia en la cepa de levadura PL3(α), que contiene un gen indicador URA3 bajo el control de tres elementos de respuesta a estrógenos ((ERE)₃-URA3; Pierrat, B. *et al.*, *Gene* 119:237-245 (1992)).

En levadura, las construcciones de REh α se expresaron a partir de los siguientes plásmidos basados en YEp90: HEG0 (REh α , YEp90-HEG0, aminoácidos 1-595), HE15 (YEp90-HE15, aminoácidos 1-282), y HEG19 (YEp90-HEG19, aminoácidos 179-595) (todo Pierrat, B. *et al.*, *Gene* 119:237-245 (1992)), HE179-338; Pierrat, B. *et al.*, *Gene* 143:193-200 (1994)). A partir del plásmido de tipo multicopia pBL1 de levadura (LeDouarin, B. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 23:876-878 (1995b)), que codifica para fusiones de RE(C) marcadas con epítomos de RE(F), se expresaron los siguientes plásmidos RE(C)-RAR(DEF) (pBL1 -RARh α (DEF), aminoácidos 154-462) y RE(C)-RXR(DE)(pBL1-RARh(DE), aminoácidos 205-467) (ambos vom Baur, E. *et al.*, *EMBO J.* 15:110-124 (1996)). Se expresó TIF2 en levadura a partir del plásmido de tipo multicopia pAS3 (obsequio de B. LeDouarin), que es un derivado de YEp90 que contiene el marcador LEU2. Se hicieron crecer exponencialmente transformantes PL3(α) de levadura (Pierrat, B. *et al.*, *Gene* 119:237-245 (1992)) en presencia o ausencia de ligando durante aproximadamente cinco generaciones en un medio selectivo que contiene uracilo. Se prepararon extractos de levadura y se sometieron a ensayo para determinar la actividad de OMP descarboxilasa tal como se describió anteriormente (Pierrat, B. *et al.*, *Gene* 119:237-245 (1992)).

Tal como se esperaba a partir de estudios anteriores (Metzger, *Nucl. Acids Res.* (1992); Pierrat, B. *et al.*, *Gene* 119:237-245 (1992); Pierrat, B. *et al.*, *Gene* 143:193-200 (1994)) el RE de longitud completa (HEG0) indujo la actividad de 5'-monofosfato de orotidina descarboxilasa (OMP descarboxilasa) en una manera dependiente de ligando (figura 11, carriles 1 y 3). De forma interesante, se potenció adicionalmente la actividad de transcripción de RE mediante la coexpresión del fragmento de TIF2.1 (figura 11, compárense los carriles 3 y 4). En ausencia de hormona, TIF2.1 no tuvo efecto significativo sobre la activación de transcripción inducida por RE (figura 11, compárense los carriles 1 y 2). Se observaron esencialmente los mismos resultados para HEG19 que carece de la región A/B N-terminal, indicando que TIF2 ejerce su efecto sobre AF-2 de RE dependiente de ligando (figura 11, carriles 5-8). Al contrario, ni la actividad de AF-1 de HE15, (que abarca las regiones A, B y C de RE; Kumar & Chambon, *Cell* 145-156 (1988)), ni la actividad de AF-2a de la construcción HE179-338 (Pierrat, B. *et al.*, *Gene* 143:193-200 (1994)) se estimularon mediante coexpresión de TIF2.1 (figura 11, carriles 9-12). Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en células de mamíferos, y con la observación de que se requiere un DUL intacto para que TIF2.1 interaccione con el RE (Voegel, J.J. *et al.*, *EMBO J.* 15:3667-3675 (1996)).

TIF2.1 también estimuló la actividad de AF-2 de la región RXR α (DEF) unida a ligando en levadura (figura 11, compárense los carriles 19 y 20). Esta potenciación fue dependiente de ligando; no se observó activación mediante la región RXR α (DEF) cuando se coexpresó la quimera de RE(C)-RXR α (DEF) con TIF2.1 en ausencia de ligando (figura 11, compárense los carriles 18 y 20). De nuevo, estas observaciones son paralelas a aquellas realizadas en células HeLa y Cos-1 (véase la figura 12c).

Sorprendentemente, incluso en ausencia de ligando y al contrario que las observaciones realizadas con RE y RAR α , el TIF2.1 potenció de forma muy eficaz la transactivación mediante el DUL de RAR α (figura 11, carriles 13 y 14). La adición de ácido retinoico aumentó adicionalmente su activación de transcripción (figura 11, carriles 14 y 16). Obsérvese que, tal como se notificó previamente (Heery, D.M. *et al.*, *Nature* 387:733736 (1997)), AF-2 tanto de RAR α como de RXR α activaron poco por sí mismos la transcripción a partir del indicador URA3.

La potenciación de la actividad de AF-2 que fue particularmente fuerte en células de levadura, se ha observado también recientemente para GRIP1, el homólogo de TIF2 de ratones (Hong, H. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 17:2735-2744 (1997)). Estas observaciones sugieren que las células de levadura contienen coactivadores que sólo imitan poco la acción de los coactivadores de RN de mamíferos. Puesto que las células de levadura no contienen aparentemente un homólogo de CBP, será interesante investigar qué factor de levadura media la actividad de TIF2. Obsérvese en este respecto que GAL-TIF2.1 es un transactivador fuerte en levadura (resultados no publicados).

De forma interesante, la expresión de TIF2 en levadura condujo a una estimulación marcada de la transactivación mediante el RE(C)-RAR α (DEF) no unido a ligando, que no se observó con DUL no unidos a ligando de RE o RXR α . Estudios estructurales han revelado que la unión del ligando da como resultado un cambio conformacional del DUL, que genera la(s) superficie(s) para la unión del coactivador (Renaud, J.P. *et al.*, *Nature* 378:681-689 (1995)). El presente resultado, por tanto, sugiere que un alto nivel de coactivadores puede, en ausencia de ligando, conducir el DUL de algunos receptores a una conformación de tipo holo-DUL, dando lugar así a actividad de transcripción independiente de ligando. Por analogía, puede especularse que altos niveles de correpressores pueden "bloquear" DUL de RN en la conformación apo-DUL. Por tanto, sería interesante investigar si niveles de correpressores podrían conducir a actividad constitutiva (incluso en la presencia de antagonistas) o por el contrario a la falta de capacidad de inducción de receptores nucleares en algunos estados patológicos.

Ejemplo 7

Inhibición por DIN de TIF2 de la actividad de AF-2 de RN

La sobreexpresión del fragmento de TIF2.1, que contiene la función de activación tanto de DIN como de DA1, estimula la actividad de AF-2 de RE del DUL de RE de forma transitoria en células Cos-1 (figura 12a, carriles 2 y 3; Voegel, J.J. *et al.*, *EMBO J.* 15:3667-3675 (1996)). Se sugirió firmemente que esta estimulación se debió a la interacción directa entre el DUL de RE y el DIN de TIF2, mediante la observación de que la sobreexpresión del mutante de TIF2.5 que contiene el DUL aislado, pero que carece de DA1 (véase la figura 7a) impidió el efecto estimulante de TIF2.1 (figura 12a, compárense los carriles 3 y 4). Obsérvese que en ausencia de TIF2.1, la sobreexpresión de TIF2.5 también disminuyó la transactivación por el AF-2 de RE, que se medió, presumiblemente, a través de coactivadores endógenos de Cos-1 (figura 12a, compárense el carril 4 con el carril 2), sugiriendo así que estos mediadores de Cos-1 correspondían o bien a TIF2 endógenos, o interaccionaban con el holo-DUL de RE a través de superficies que son idénticas a, o en proximidad directa de, la superficie de interacción de DIN de TIF2.

Se notificó previamente una interacción dependiente de agonista de TIF2 con DUL de RAR y RXR, que era dependiente de la integridad del núcleo del DA de AF-2 de RN, pero no consiguió observarse un efecto estimulante de TIF2 sobre la activación de transcripción de un indicador (17m)₅-promotor de globina-CAT mediante proteínas de fusión de DUL de GAL-RAR o GAL-RXR (Voegel, J.J. *et al.*, *EMBO J.* 15:3667-3675 (1996)). Puesto que este fracaso se debió posiblemente a la presencia de cantidades suficientes de mediadores endógenos para alcanzar la transactivación máxima a partir de este gen indicador, se modificaron las condiciones de transfección y se utilizó una construcción indicadora que llevaba un promotor mínimo. Se observó una actividad estimulante clara de TIF2 y TIF2.1 para AF2 de RXR α en células HeLa y Cos-1 cuando se usó el indicador (17m)₅-TATA-CAT (figura 12c, compárense los carriles 3-6 y 11-14). Este efecto estimulante fue menos marcado con AF-2 de RAR α y pudo observarse reproducibilidad solo con el fragmento de TIF2.1 en células Cos-1 (figura 12d, compárense el carril 10 con los carriles 13 y 14; obsérvese que TIF2.1 se expresa a niveles > 10 veces superiores a TIF2; datos no mostrados). Los plásmidos indicadores (17m)₅-TATA-CAT (May, M. *et al.*, *EMBO J.* 15:3093-3104 (1996)) y 17M5-G/CAT ((17m)₅- β -globina-CAT; Durand, B. *et al.*, *EMBO J.* 13:5370-5382 (1994)) contienen cada uno cinco copias del elemento de respuesta de GAL4 delante de un motivo sencillo TATA o del promotor de β -globina, respectivamente, en sentido 5' del gen indicador CAT.

Assumiendo que TIF2 o coactivadores que reconocen la superficie de interacción de TIF2 en DUL de RN, median generalmente la función AF2 de RN, el TIF2.5 que contiene DIN debe ejercer su actividad negativa dominante no sólo sobre RE, sino también sobre otros RN, independientemente del contexto celular. Se analizó por tanto el efecto de TIF2.5 sobre la actividad de AF-2 de RE, RXR α y RAR α en células HeLa y Cos-1 (figuras 12b-d). En todos los casos, la expresión de TIF2.5 condujo a una inhibición de la actividad de AF-2 de RN dependiente de la dosis, indicando que los mediadores presentes de manera endógena estaban en competición con DUL de TIF2 sobreexpresado aislado, sugiriendo firmemente que los factores intermediarios de transcripción o TIF2 que reconocen superficies iguales o de

ES 2 281 105 T3

solapamiento median la actividad de AF-2 de RN en estas células transfectadas (figuras 12b-d, compárese el carril 2 con los carriles 7 y 8; carril 10 con carriles 15 y 16).

Es importante enfatizar que los presentes datos demuestran que TFI2 interacciona con RN a través de una superficie (DIN) que es crítica para la actividad de AF-2 de RN, ya que la expresión de TIF2.5 que abarca el DIN bloqueó la actividad inducida por ligandos para todas las AF-2 de RN examinadas. Esta observación que establece claramente que, al menos en células transfectadas, TIF2 u otros coactivadores que interaccionan con una superficie holo-DUL de solapamiento, si no idéntica, son esenciales para mediar la función de activación de AF-2 de RN. Esto es manteniendo la presencia de tres motivos de caja RN en el DIN de TIF2, y de al menos un motivo de caja RN LxxLL conservado (SEQ ID NO:12) en todos los coactivadores descritos hasta la fecha.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un Polinucleótido seleccionado del grupo que consisten en:

(a) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para los aminoácidos 1 a 1464 de SEQ ID NO:2;

(b) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos según codificada por el ADNc que codifica para un polipéptido TIF2 que tiene actividad de TIF2 que es la unión al dominio de unión a ligando de un receptor nuclear contenido en el número de registro 97612 de la ATCC;

(c) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un fragmento citoplásmico de un polipéptido codificado por un polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (b), en el que dicho fragmento citoplásmico tiene la actividad que es la unión al dominio de unión a ligando de un receptor nuclear;

(d) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para los aminoácidos 624 a 1287 de SEQ ID NO:2;

(e) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 163 a 4554 ó 2032 a 4023 de SEQ ID NO:1;

(f) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos un 90% con la secuencia de nucleótidos de uno cualquiera de los polinucleótidos de (a) a (e), en el que dicho polinucleótido codifica para un polipéptido que tiene actividad de TIF2 que es la unión al dominio de unión a ligando de un receptor nuclear;

(g) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por un polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (e), en el que dicho polinucleótido codifica para un polipéptido TIF2 que tiene actividad de TIF2 que es la unión al dominio de unión a ligandos de un receptor nuclear;

(h) un polinucleótido que consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica para los restos de aminoácidos 624 a 1287 de SEQ ID NO:2;

(i) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos un 90% con la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de (h), en el que dicho polinucleótido codifica para un polipéptido TIF2 que tiene actividad de TIF2 que es la unión al dominio de unión a ligando de un receptor nuclear;

(j) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por un polinucleótido de (h), en el que dicho polinucleótido codifica para un polipéptido TIF2 que tiene actividad de TIF2 que es la unión al dominio de unión a ligando de un receptor nuclear;

(k) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene 500 nucleótidos de SEQ ID NO:1; y

(l) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los polinucleótidos de (a) a (k).

2. El polinucleótido de la reivindicación 1 que es ADN o ARN.

3. El ADN de la reivindicación 2 que es ADN genómico.

4. Un método para preparar un vector recombinante que comprende insertar un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un vector.

5. Un vector que contiene el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o producido mediante el método de la reivindicación 4.

6. El vector de la reivindicación 5 en el que el polinucleótido está operativamente unido a las secuencias de control de la expresión permitiendo la expresión en células huésped procariotas o eucariotas.

7. Un método para preparar una célula huésped recombinante que comprende introducir el vector de la reivindicación 5 ó 6 en una célula huésped.

8. Una Célula huésped modificada genéticamente con el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el vector de la reivindicación 5 ó 6 o producida mediante el método de la reivindicación 7.

ES 2 281 105 T3

9. Un procedimiento para producir un polipéptido de TIF2 que comprende: cultivar la célula huésped de la reivindicación 8 y recuperar el polipéptido codificado por dicho polinucleótido a partir del cultivo.

10. Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 u obtenible mediante el procedimiento de la reivindicación 9.

11. Un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 10.

12. Un método de selección para identificar un antagonista del receptor nuclear (RN), que comprende:

(a) proporcionar una célula huésped que contiene genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ligandos (DUL) de RN y un polipéptido que comprende el factor intermediario de transcripción-2 (TIF-2) de SEQ ID NO:2 o un fragmento de TIF2, en el que, en presencia de un agonista, dicho TIF-2 y dicho fragmento de TIF-2 se unen a dicho DUL de RN;

(b) administrar un antagonista candidato a dicha célula; y

(c) determinar si dicho antagonista candidato reduce o bien:

(1) la unión de TIF-2 o del fragmento de TIF-2 a la función de activación 2 (AF-2) de dicho DUL de RN comparado con dicha unión en ausencia de dicho antagonista candidato; o bien

(2) la transactivación mediada por AF-2 de DUL de RN estimulada por TIF-2 o por fragmento de TIF-2 comparado con dicha transactivación en la ausencia de dicho antagonista candidato.

13. Un método de selección para identificar un agonista de receptor nuclear (RN), que comprende:

(a) proporcionar una célula huésped que contiene genes recombinantes que expresan un polipéptido que comprende un dominio de unión a ligandos (DUL) de RN y un polipéptido que comprende un factor intermediario de transcripción-2 (TIF2) de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de TIF-2, en el que, en presencia de un agonista, dicho TIF-2 y dicho fragmento de TIF2 se unen a dicho DUL de RN;

(b) administrar un agonista candidato a dicha célula; y

(c) determinar si dicho agonista candidato potencia o bien

(1) la unión de TIF-2 o fragmento de TIF-2 a la función de activación 2 (AF-2) de dicho DUL de RN comparado con dicha unión en ausencia de dicho agonista candidato; o bien

(2) la transactivación mediada por AF-2 de DUL de RN estimulada por TIF-2 o por fragmento de TIF-2 comparado con dicha transactivación en ausencia de dicho candidato agonista.

14. El método de la reivindicación 12 ó 13, en el que dicha célula huésped expresa además un gen indicador.

15. El método de la reivindicación 12 ó 13, en el que dicha célula huésped expresa un polipéptido que comprende un DUL de RN y GAL4.

16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que dicha unión de TIF-2 o de fragmento de TIF-2 a dicha AF-2 de dicho DUL de RN se determina usando un ensayo de interacción de glutatión-S-transferasa (GST).

[illegible]

FIG. 1A

33

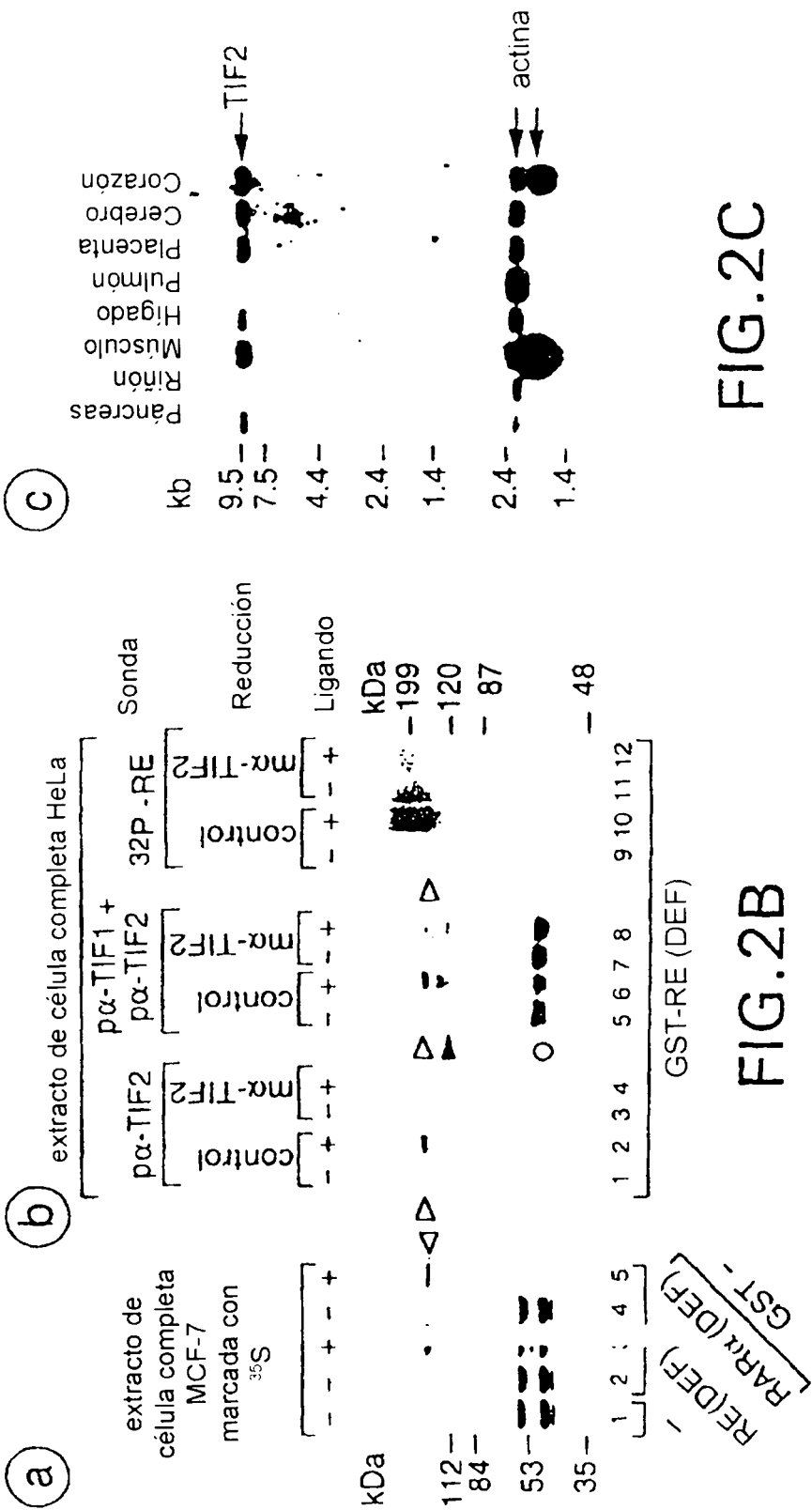


FIG.2C

FIG.2B

FIG.2A

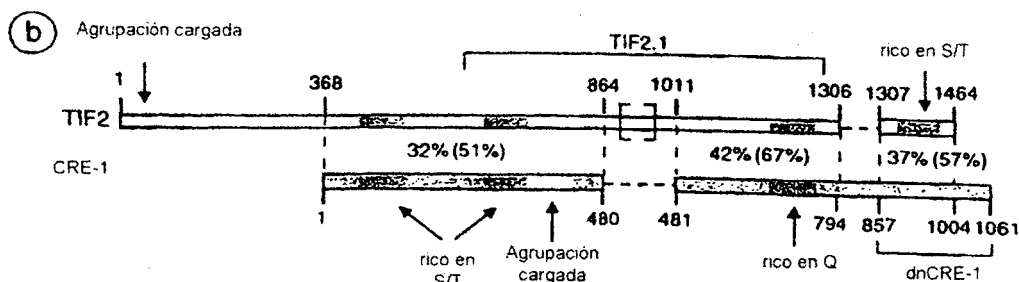
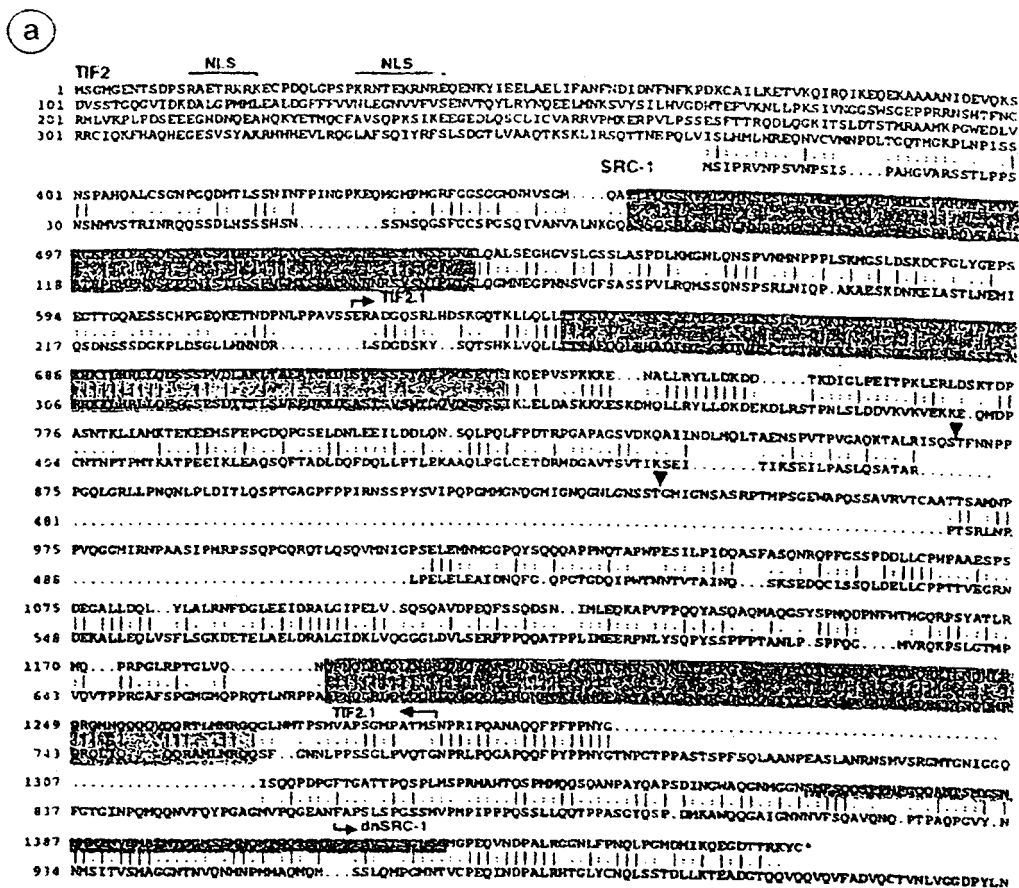


FIG.3A-B

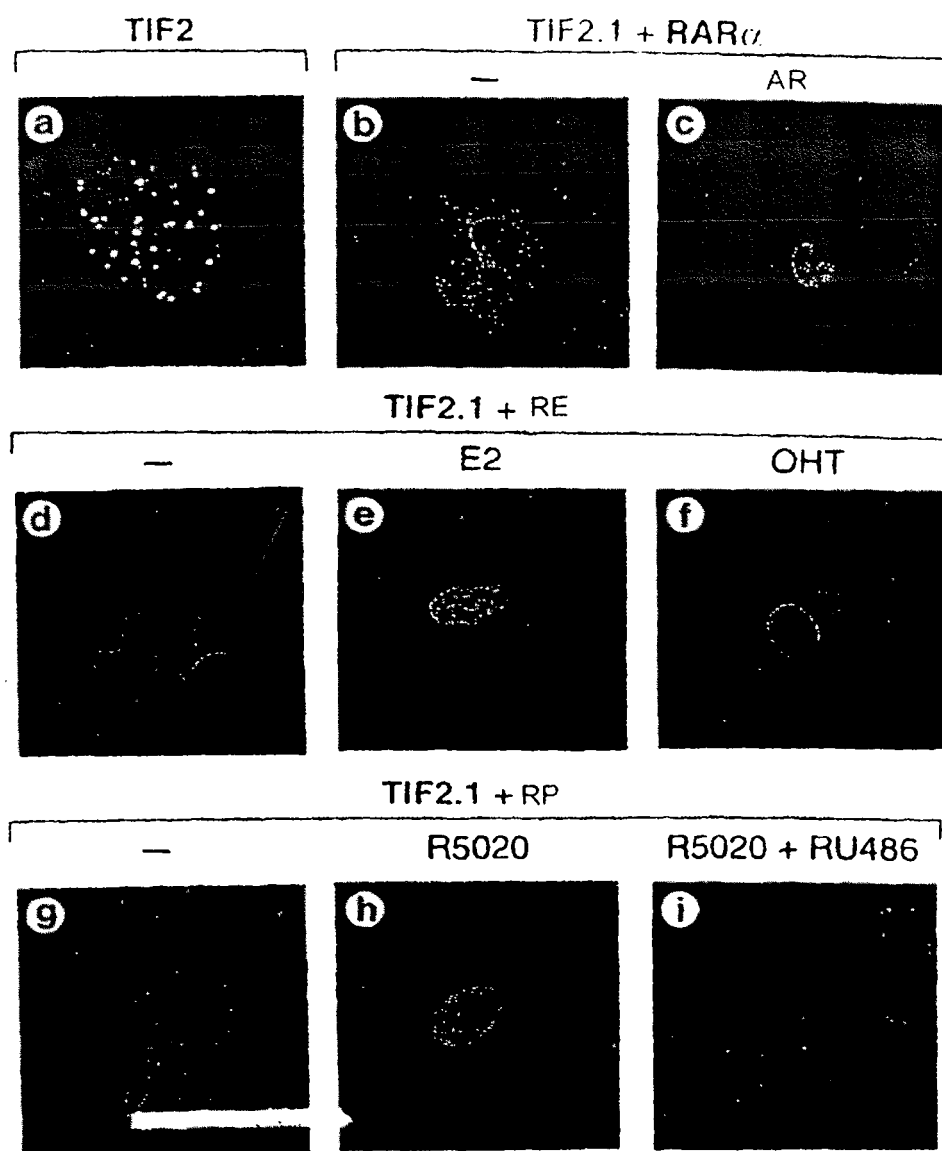
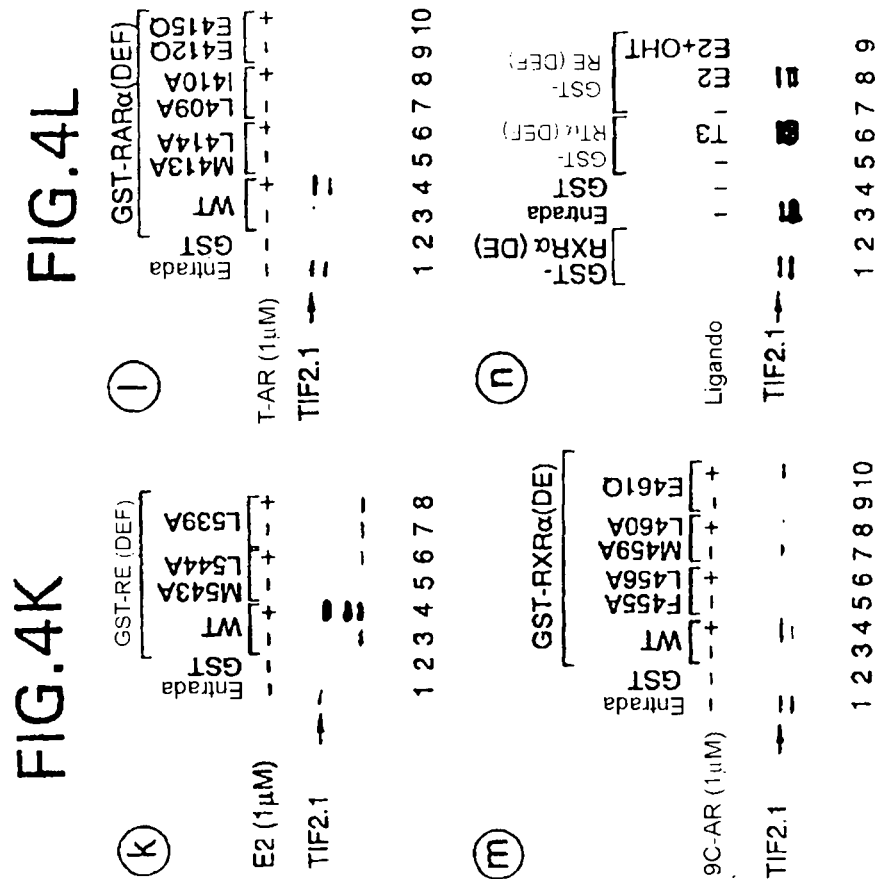


FIG.4A-I



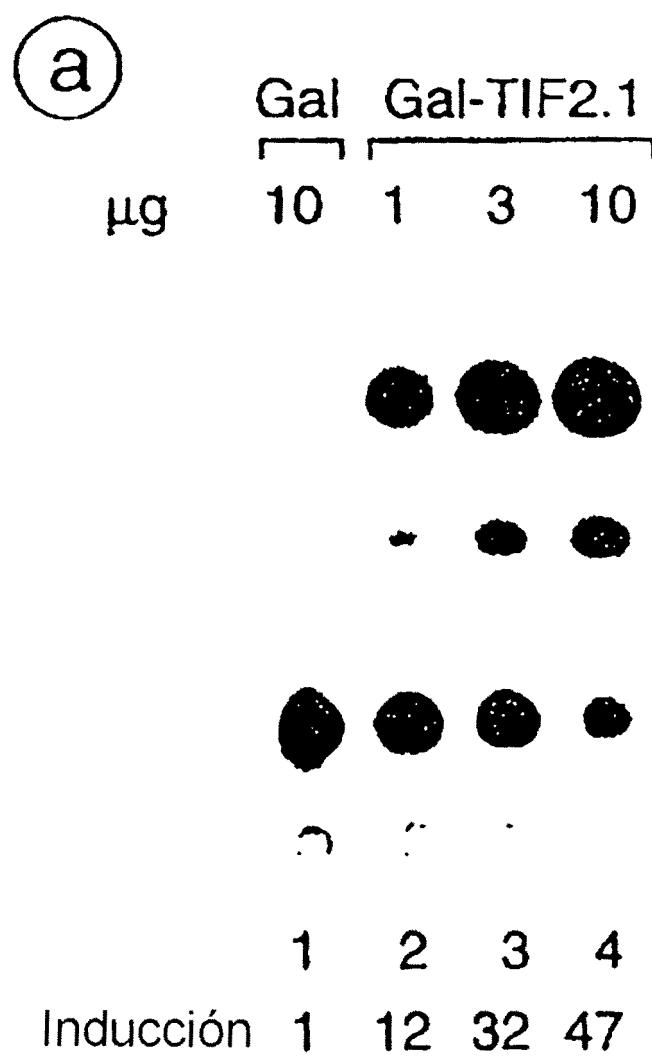


FIG.5A

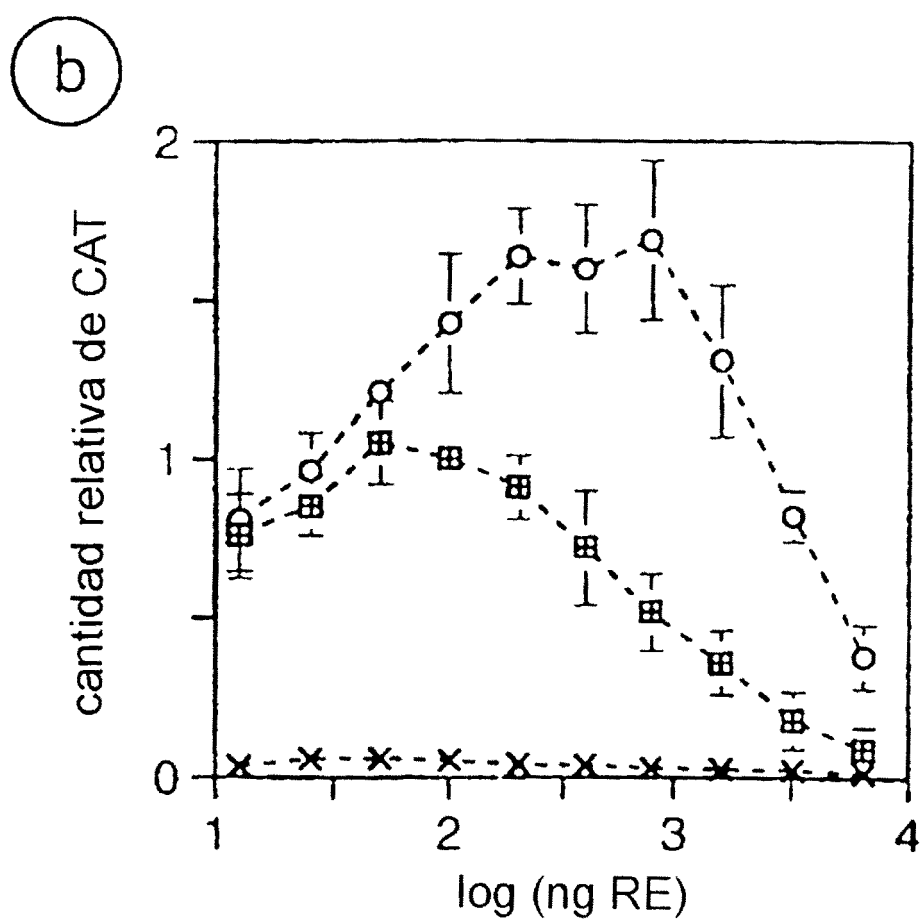


FIG.5B

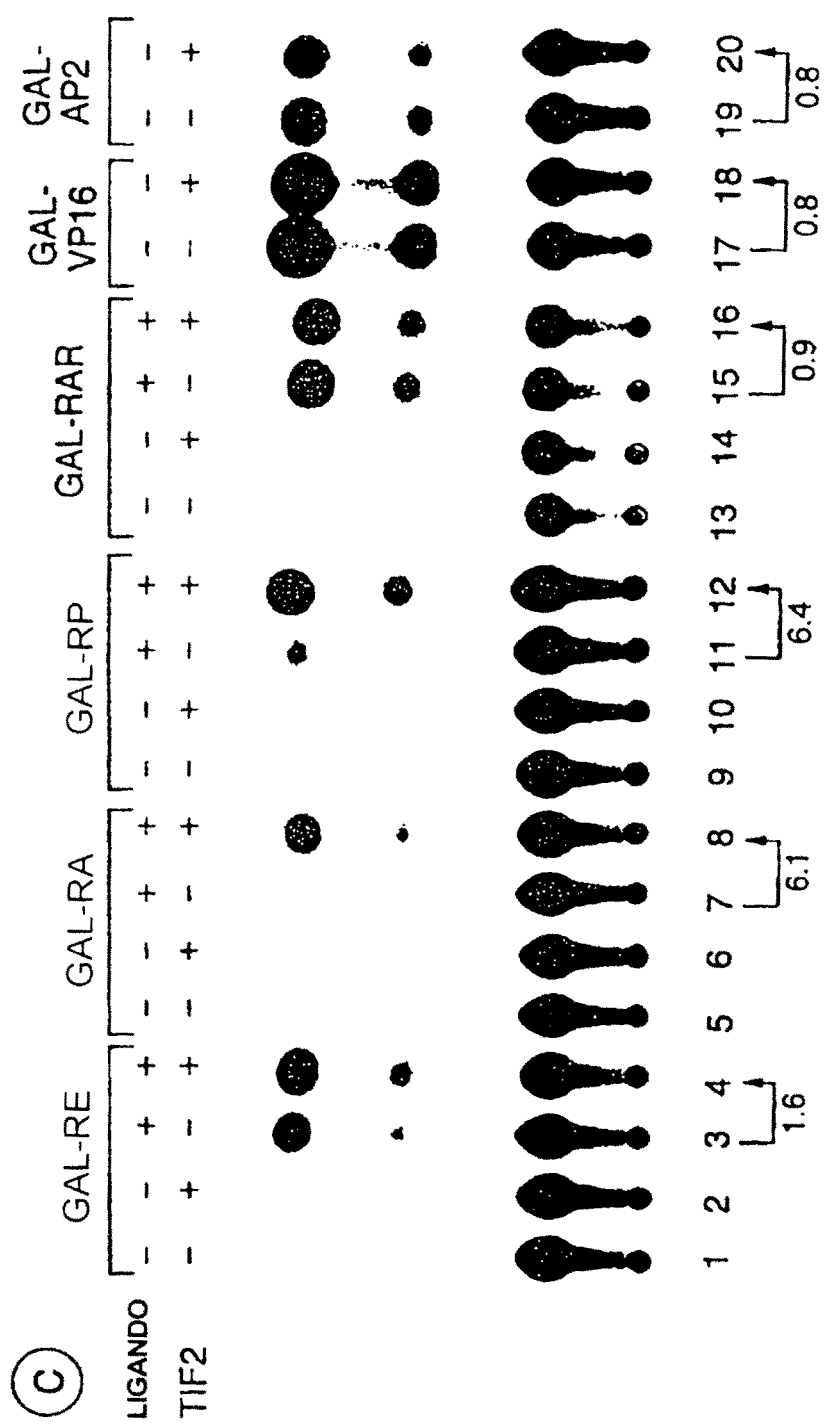
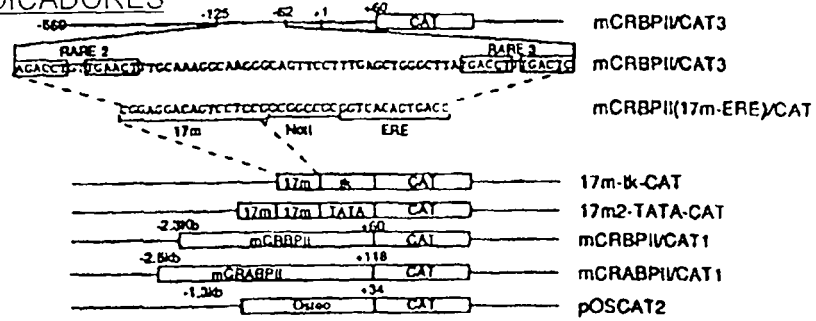


FIG.5C

(A) INDICADORES



(B) RECEPTORES

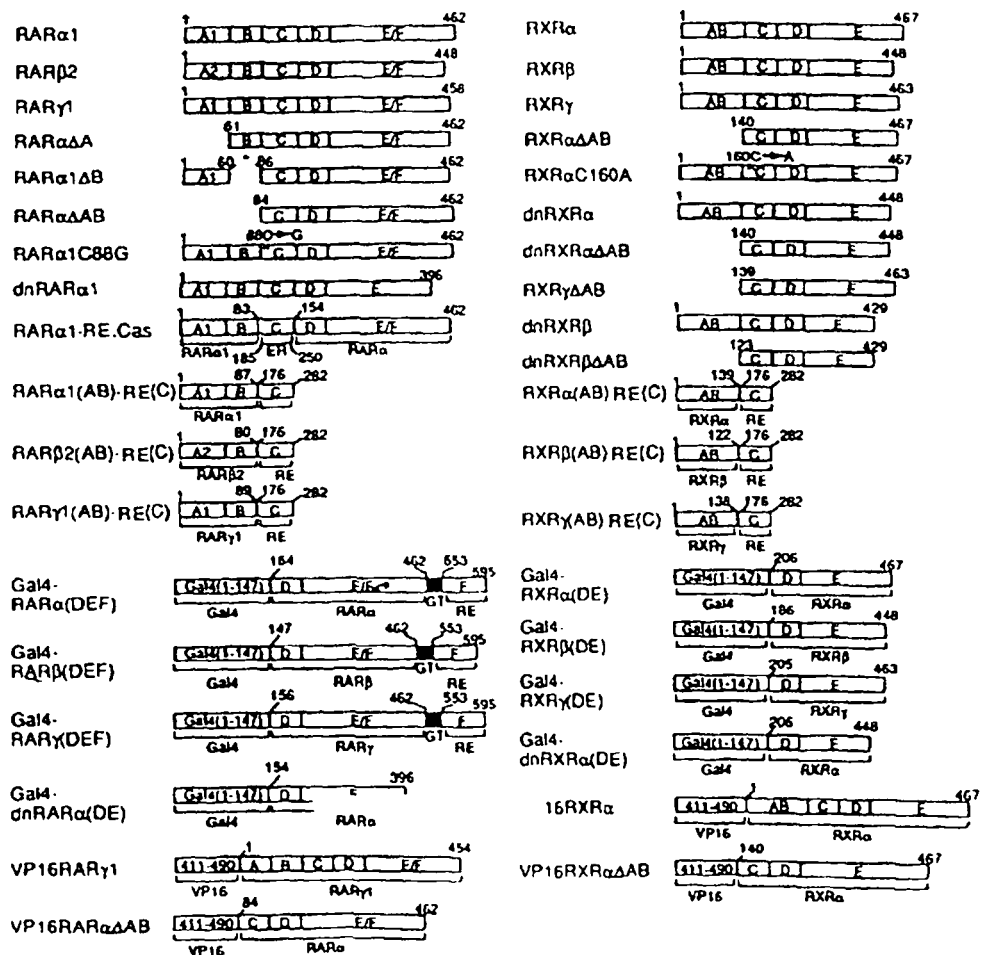


FIG.6A-B

ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL

INTERACCIÓN RN

INTERACCIÓN CBP

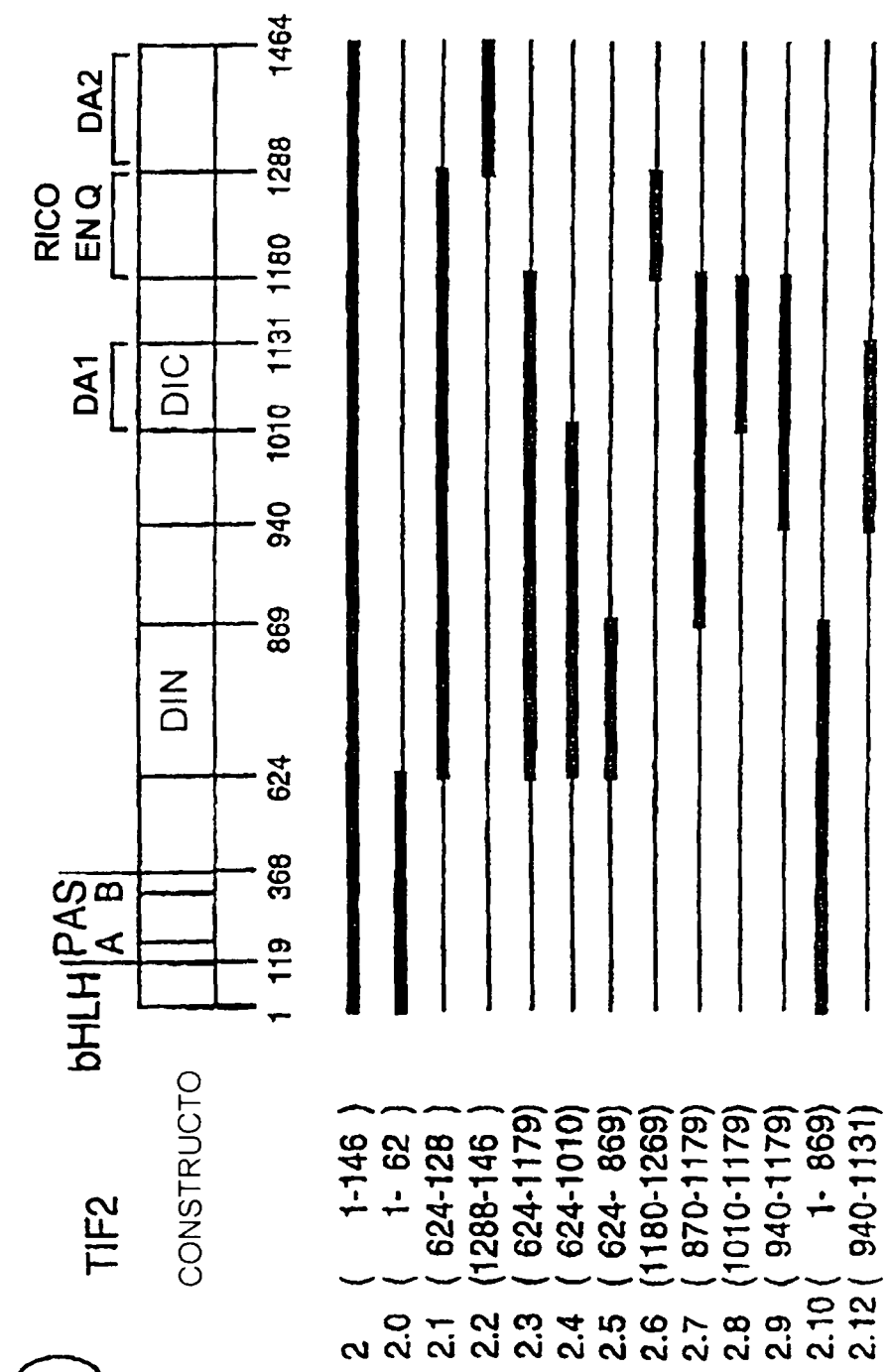


FIG. 7A

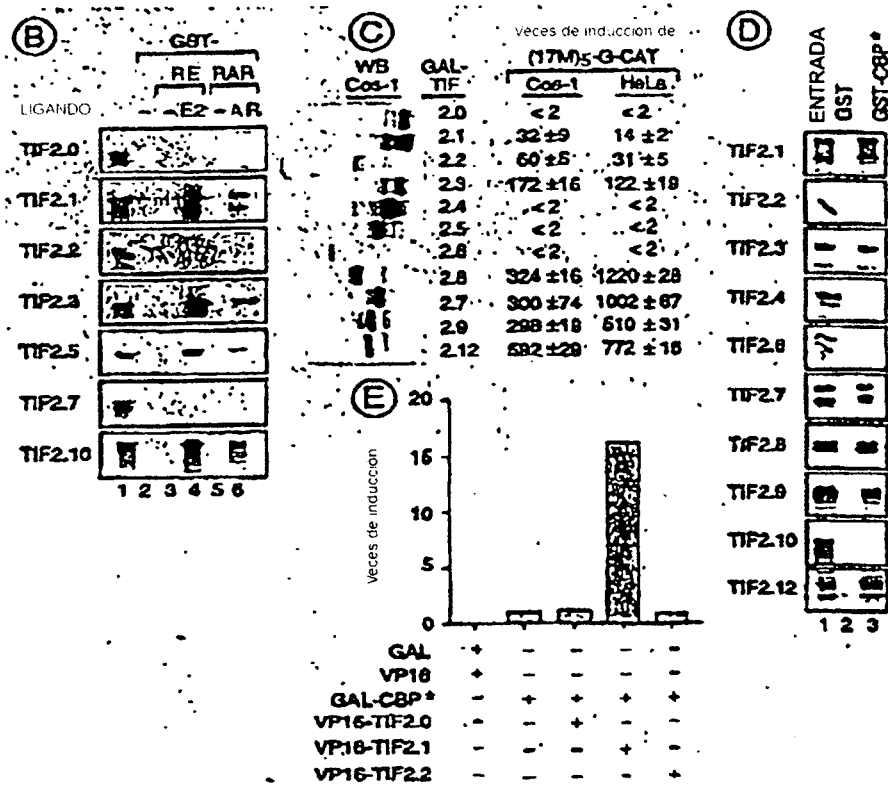
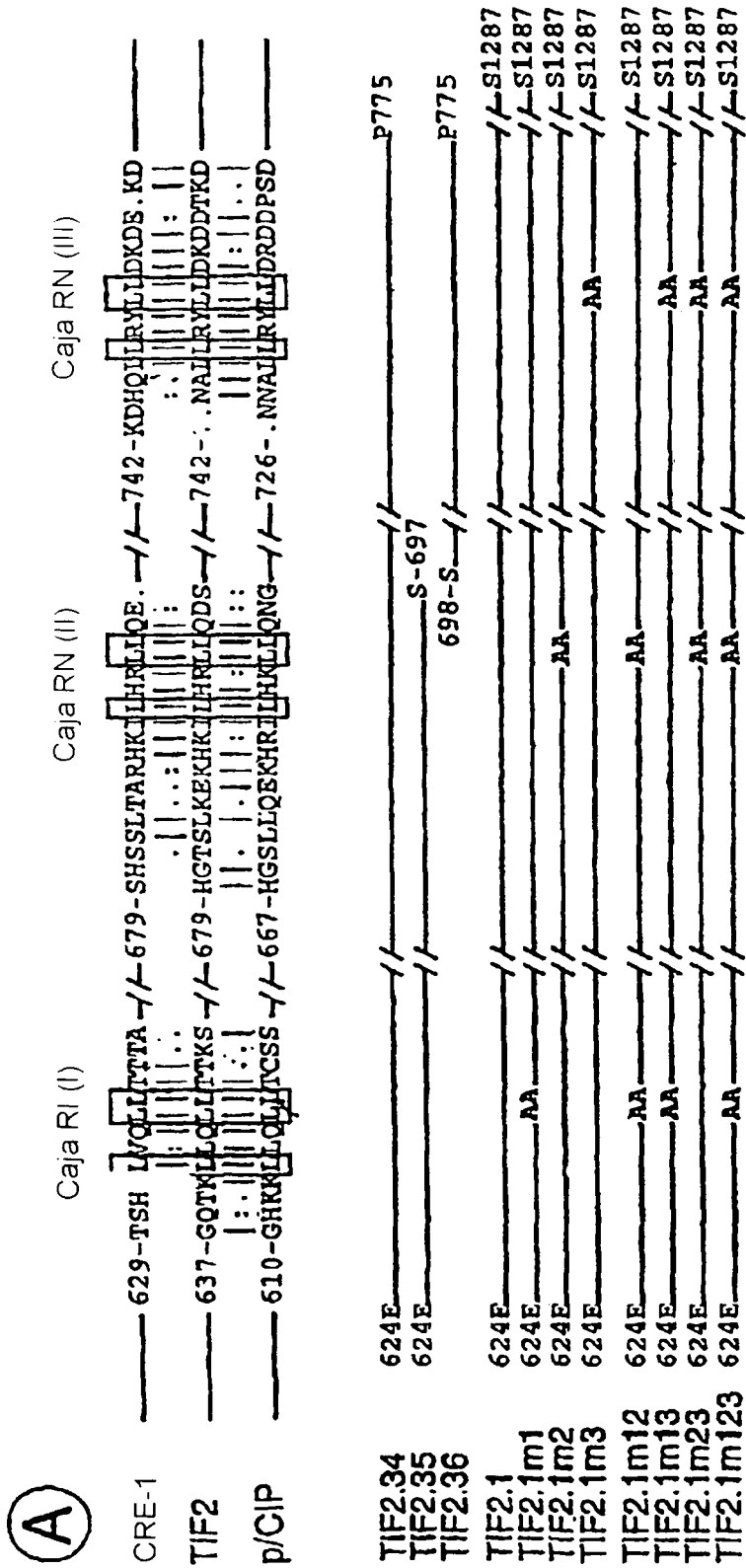


FIG. 7B - E

. FIG. 8A



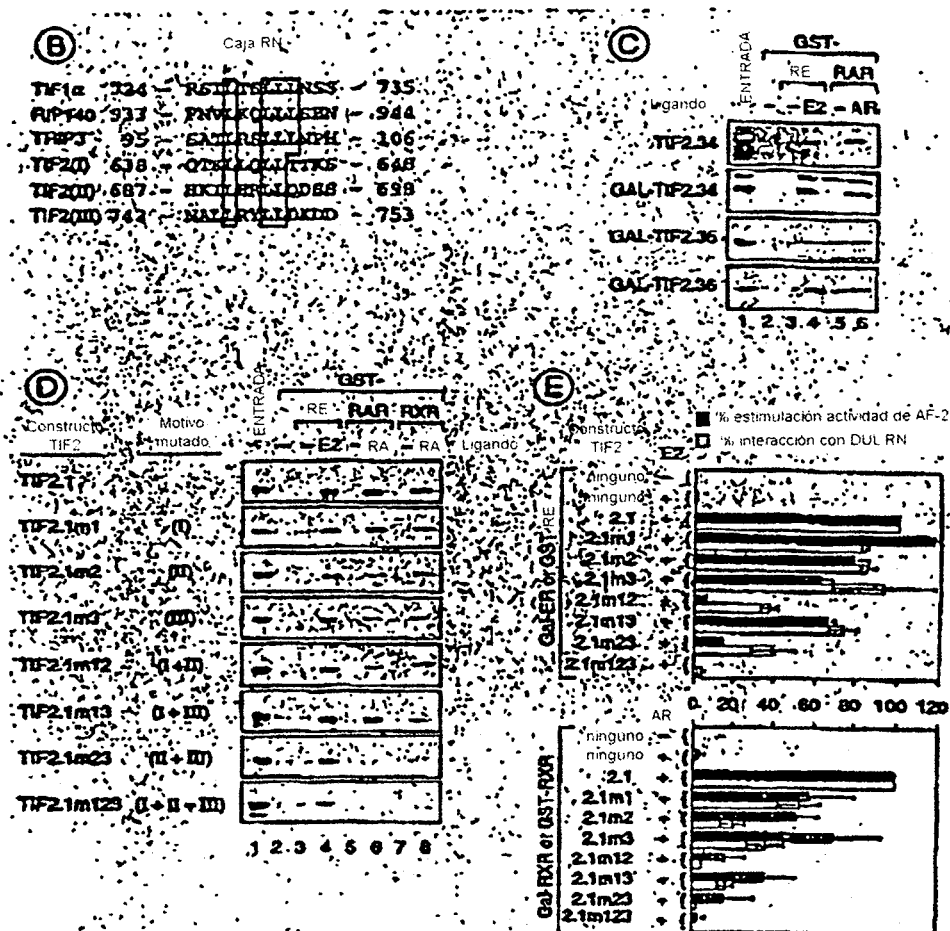


FIG. 8B - E

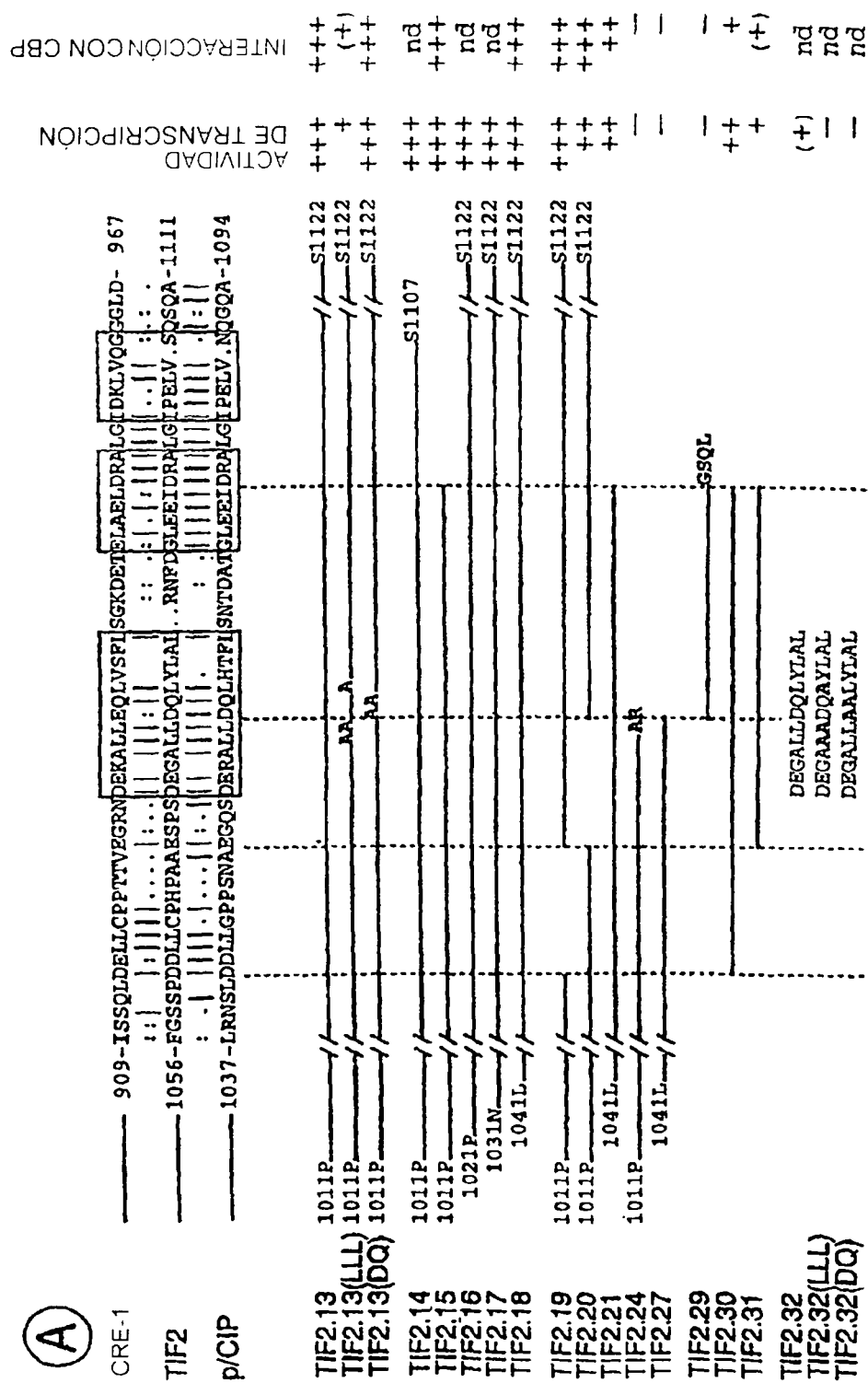


FIG. 9A

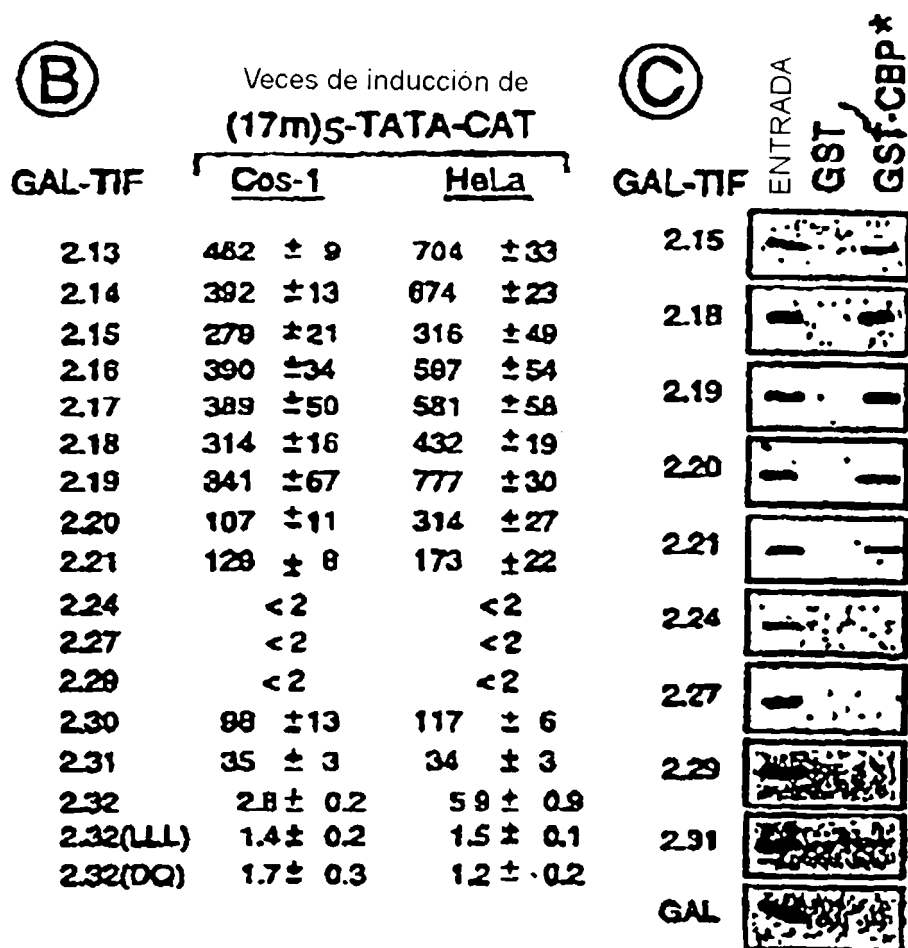


FIG. 9B - C

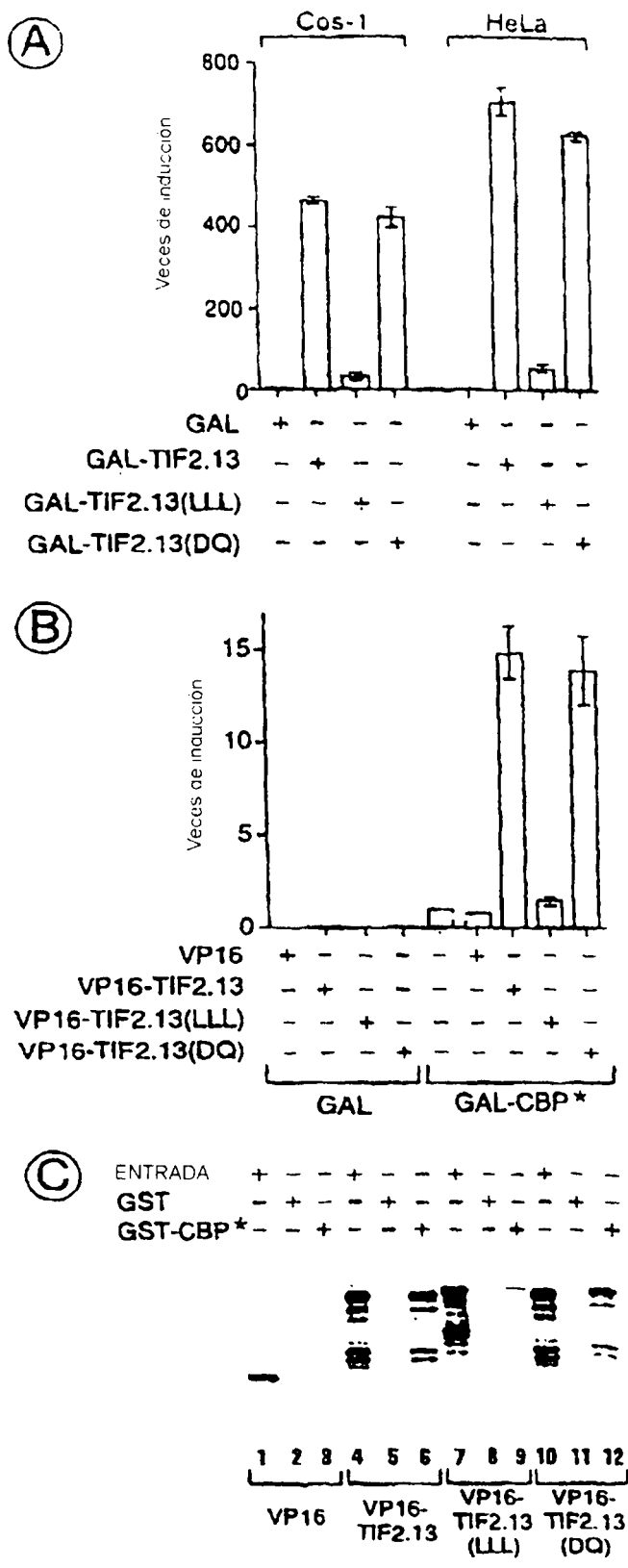


Figura 10 A-C

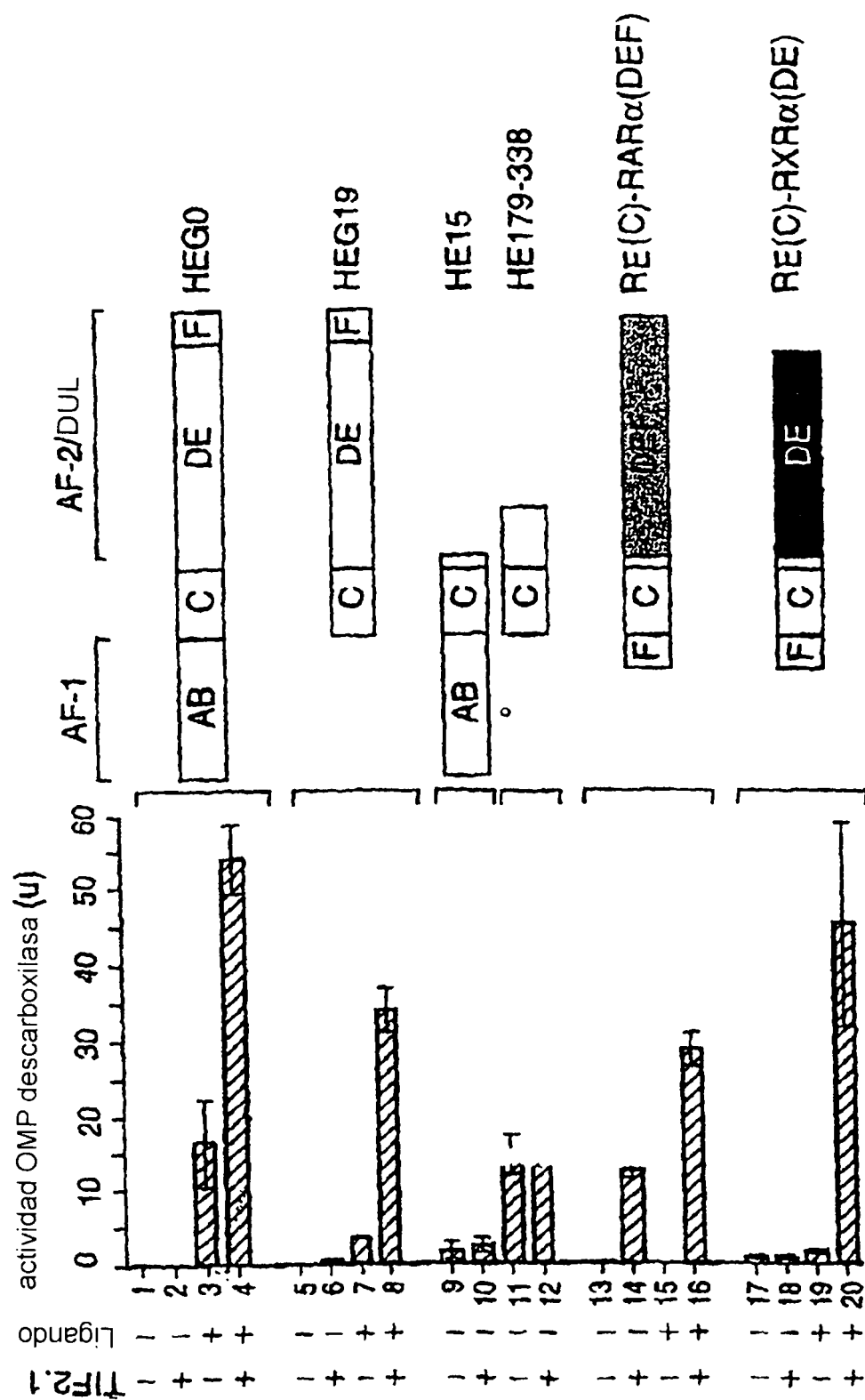


Figura 11

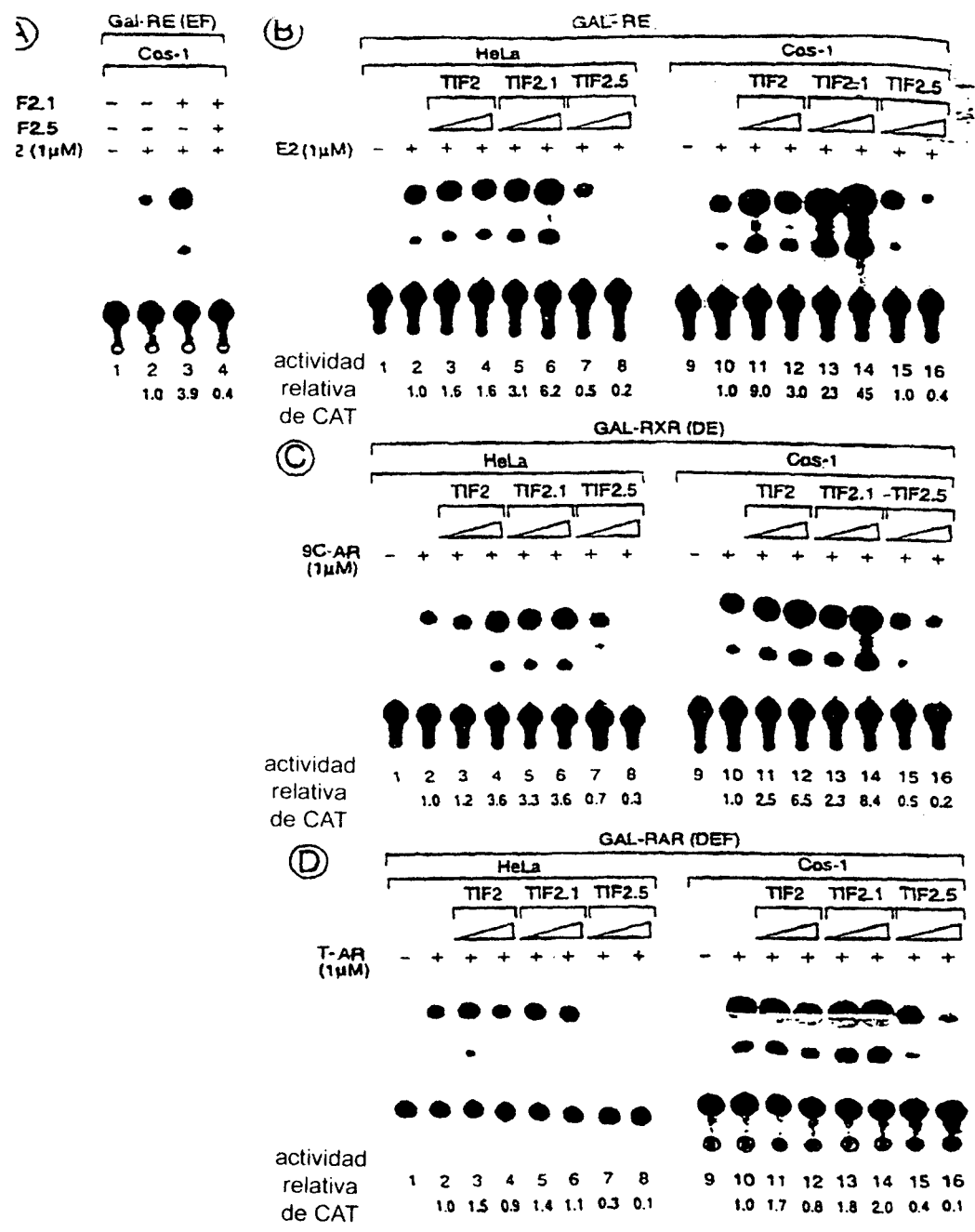


Figura 12 A-D

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE
101 rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13
Francia
- 10 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3 rue Michel Ange
75794 Paris Cedex 16
Francia
- 15 UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
4 rue Blaise Pascal, BP 1032F
67070 Strasbourg Cedex
Francia
- 20 BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
Route 206 & Provinceline Road
Princeton, New Jersey 08543-4000
Estados Unidos de América
- 25 INVENTORES: Chambon, Pierre
Gronemeyer, Hinrich
Voegel, Johannes
Lutz, Yves
- 30 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Factor intermediario de transcripción 2
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 14
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 35 (A) DESTINATARIO: Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C.
(B) CALLE: 1100 New York Avenue, NW, Suite 200
(C) CIUDAD: Washington
- 40 (D) ESTADO: DC
(E) PAÍS: EE.UU.
(F) Código postal: 20005-3934
- 45 (v) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
(B) ORDENADOR: PC IBM Compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- 50 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.3
- (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD
- 55 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: Por asignar
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: Adjunta
(C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS ANTERIORES DE LA SOLICITUD
- 60 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 60/021.247
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 12-JUL-1996
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- 65 (A) NOMBRE: Steffe, Eric K.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 36.688

ES 2 281 105 T3

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 1383.01PC01/EKS

(ix) INFORMACIÓN SOBRE COMUNICACIONES TELEFÓNICAS:

(A) TELÉFONO: 202-371-2600

(B) TELEFAX: 202-371-2540

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6156 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 163..4554

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

5	GGCGGCCGCA GCCTCGGCTA CAGCTTCGGC GGCGAAGGTC AGCGCGGACG GCAGCGGGCA	60
30	CCTGACGGCG TGACCGACCC GAGCCGATTT CTCTTGGATT TGGCTACACA CTTATAGATC	120
	TTCTGCACTG TTTACAGGCA CAGTTGCTGA TATGTGTTCA AG ATG AGT GGG ATG Met. Ser Gly Met 1	174
35	GGA GAA AAT ACC TCT GAC CCC TCC AGG GCA GAG ACA AGA AAG CGC AAG Gly Glu Asn Thr Ser Asp Pro Ser Arg Ala Glu Thr Arg Lys Arg Lys 5 10 15 20	222
40	GAA TGT CCT GAC CAA CTT GGA CCC AGC CCC AAA AGG AAC ACT GAA AAA Glu Cys Pro Asp Gln Leu Gly Pro Ser Pro Lys Arg Asn Thr Glu Lys 25 30 35	270
45	CGT AAT CGT GAA CAG GAA AAT AAA TAT ATA GAA GAA CTT GCA GAG TTG Arg Asn Arg Glu Gln Glu Asn Lys Tyr Ile Glu Glu Leu Ala Glu Leu 40 45 50	318
50	ATT TTT GCA AAT TTT AAT GAT ATA GAC AAC TTT AAC TTC AAA CCT GAC Ile Phe Ala Asn Phe Asn Asp Ile Asp Asn Phe Asn Phe Lys Pro Asp 55 60 65	366
55	AAA TGT GCA ATC TTA AAA GAA ACT GTG AAG CAA ATT CGT CAG ATC AAA Lys Cys Ala Ile Leu Lys Glu Thr Val Lys Gln Ile Arg Gln Ile Lys 70 75 80	414
60	GAA CAA GAG AAA GCA GCA GCT GCC AAC ATA GAT GAA GTG CAG AAG TCA	462

ES 2 281 105 T3

	Glu	Gln	Glu	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Ile	Asp	Glu	Val	Gln	Lys	Ser	
	85					90					95					100	
5	GAT	GTA	TCC	TCT	ACA	GGG	CAG	GGT	GTC	ATC	GAC	AAG	GAT	GCG	CTG	GGG	510
	Asp	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Gln	Gly	Val	Ile	Asp	Lys	Asp	Ala	Leu	Gly	
					105					110					115		
10	CCT	ATG	ATG	CTT	GAG	GCC	CTT	GAT	GGG	TTC	TTC	TTT	GTA	GTG	AAC	CTG	558
	Pro	Met	Met	Leu	Glu	Ala	Leu	Asp	Gly	Phe	Phe	Phe	Val	Val	Asn	Leu	
					120				125						130		
15	GAA	GGC	AAC	GTT	GTG	TTT	GTG	TCA	GAG	AAT	GTG	ACA	CAG	TAT	CTA	AGG	606
	Glu	Gly	Asn	Val	Val	Phe	Val	Ser	Glu	Asn	Val	Thr	Gln	Tyr	Leu	Arg	
			135					140					145				
20	TAT	AAC	CAA	GAA	GAG	CTG	ATG	AAC	AAA	AGT	GTA	TAT	AGC	ATC	TTG	CAT	654
	Tyr	Asn	Gln	Glu	Glu	Leu	Met	Asn	Lys	Ser	Val	Tyr	Ser	Ile	Leu	His	
		150					155					160					
25	GTT	GGG	GAC	CAC	ACG	GAA	TTT	GTC	AAA	AAC	CTG	CTG	CCA	AAG	TCT	ATA	702
	Val	Gly	Asp	His	Thr	Glu	Phe	Val	Lys	Asn	Leu	Leu	Pro	Lys	Ser	Ile	
	165					170					175					180	
30	GTA	AAT	GGG	GGA	TCT	TGG	TCT	GGC	GAA	CCT	CCG	AGG	CGG	AAC	AGC	CAT	750
	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Arg	Arg	Asn	Ser	His	
					185					190					195		
35	ACC	TTC	AAT	TGT	CGG	ATG	CTG	GTA	AAA	CCT	TTA	CCT	GAT	TCA	GAA	GAG	798
	Thr	Phe	Asn	Cys	Arg	Met	Leu	Val	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Ser	Glu	Glu	
				200					205					210			
40	GAG	GGT	CAT	GAT	AAC	CAG	GAA	GCT	CAT	CAG	AAA	TAT	GAA	ACT	ATG	CAG	846
	Glu	Gly	His	Asp	Asn	Gln	Glu	Ala	His	Gln	Lys	Tyr	Glu	Thr	Met	Gln	
			215					220					225				
45	TGC	TTC	GCT	GTC	TCT	CAA	CCA	AAG	TCC	ATC	AAA	GAA	GAA	GGA	GAA	GAT	894
	Cys	Phe	Ala	Val	Ser	Gln	Pro	Lys	Ser	Ile	Lys	Glu	Glu	Gly	Glu	Asp	
		230					235					240					
50	TTG	CAG	TCC	TGC	TTG	ATT	TGC	GTG	GCA	AGA	AGA	GTT	CCC	ATG	AAG	GAA	942
	Leu	Gln	Ser	Cys	Leu	Ile	Cys	Val	Ala	Arg	Arg	Val	Pro	Met	Lys	Glu	
	245					250					255					260	
55	AGA	CCA	GTT	CTT	CCC	TCA	TCA	GAA	AGT	TTT	ACT	ACT	CGC	CAG	GAT	CTC	990
	Arg	Pro	Val	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	Ser	Phe	Thr	Thr	Arg	Gln	Asp	Leu	
					265					270					275		
60	CAA	GGC	AAG	ATC	ACG	TCT	CTG	GAT	ACC	AGC	ACC	ATG	AGA	GCA	GCC	ATG	1038
	Gln	Gly	Lys	Ile	Thr	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Thr	Met	Arg	Ala	Ala	Met	
				280					285					290			
65	AAA	CCA	GGC	TGG	GAG	GAC	CTG	GTA	AGA	AGG	TGT	ATT	CAG	AAG	TTC	CAT	1086
	Lys	Pro	Gly	Trp	Glu	Asp	Leu	Val	Arg	Arg	Cys	Ile	Gln	Lys	Phe	His	
			295				300						305				
70	GCG	CAG	CAT	GAA	GGA	GAA	TCT	GTG	TCC	TAT	GCT	AAG	AGG	CAT	CAT	CAT	1134
	Ala	Gln	His	Glu	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Tyr	Ala	Lys	Arg	His	His	His	

ES 2 281 105 T3

	310	315	320	
5	GAA GTA CTG AGA CAA GGA TTG GCA TTC AGT CAA ATC TAT CGT TTT TCC Glu Val Leu Arg Gln Gly Leu Ala Phe Ser Gln Ile Tyr Arg Phe Ser 325 330 335 340	1182		
10	TTG TCT GAT GGC ACT CTT GTT GCT GCA CAA ACG AAG AGC AAA CTC ATC Leu Ser Asp Gly Thr Leu Val Ala Ala Gln Thr Lys Ser Lys Leu Ile 345 350 355	1230		
15	CGT TCT CAG ACT ACT AAT GAA CCT CAA CTT GTA ATA TCT TTA CAT ATG Arg Ser Gln Thr Thr Asn Glu Pro Gln Leu Val Ile Ser Leu His Met 360 365 370	1278		
20	CTT CAC AGA GAG CAG AAT GTG TGT GTG ATG AAT CCG GAT CTG ACT GGA Leu His Met Glu Gln Asn Val Cys Val Met Asn Pro Asp Leu Thr Gly 375 380 385	1326		
25	CAA ACG ATG GGG AAG CCA CTG AAT CCA ATT AGC TCT AAC AGC CCT GCC Gln Thr Met Gly Lys Pro Leu Asn Pro Ile Ser Ser Asn Ser Pro Ala 390 395 400	1374		
30	CAT CAG GCC CTG TGC AGT GGG AAC CCA GGT CAG GAC ATG ACC CTC AGT His Gln Ala Leu Cys Ser Gly Asn Pro Gly Gln Asp Met Thr Leu Ser 405 410 415 420	1422		
35	AGC AAT ATA AAT TTT CCC ATA AAT GGC CCA AAG GAA CAA ATG GGC ATG Ser Asn Ile Asn Phe Pro Ile Asn Gly Pro Lys Glu Gln Met Gly Met 425 430 435	1470		
40	CCC ATG GGC AGG TTT GGT GGT TCT GGG GGA ATG AAC CAT GTG TCA GGC Pro Met Gly Arg Phe Gly Gly Ser Gly Gly Met Asn His Val Ser Gly 440 445 450	1518		
45	ATG CAA GCA ACC ACT CCT CAG GGT AGT AAC TAT GCA CTC AAA ATG AAC Met Gln Ala Thr Thr Pro Gln Gly Ser Asn Tyr Ala Leu Lys Met Asn 455 460 465	1566		
50	AGC CCC TCA CAA AGC AGC CCT GGC ATG AAT CCA GGA CAG CCC ACC TCC Ser Pro Ser Gln Ser Ser Pro Gly Met Asn Pro Gly Gln Pro Thr Ser 470 475 480	1614		
55	ATG CTT TCA CCA AGG CAT CGC ATG AGC CCT GGA GTG GCT GGC AGC CCT Met Leu Ser Pro Arg His Arg Met Ser Pro Gly Val Ala Gly Ser Pro 485 490 495 500	1662		
60	CGA ATC CCA CCC AGT CAG TTT TCC CCT GCA GGA AGC TTG CAT TCC CCT Arg Ile Pro Pro Ser Gln Phe Ser Pro Ala Gly Ser Leu His Ser Pro 505 510 515	1710		
65	GTG GGA GTT TGC AGC AGC ACA GGA AAT AGC CAT AGT TAT ACC AAC AGC Val Gly Val Cys Ser Ser Thr Gly Asn Ser His Ser Tyr Thr Asn Ser 520 525 530	1758		
	TCC CTC AAT GCA CTT CAG GCC CTC AGC GAG GGG CAC GGG GTC TCA TTA Ser Leu Asn Ala Leu Gln Ala Leu Ser Glu Gly His Gly Val Ser Leu 535 540 545	1806		

ES 2 281 105 T3

	GGG TCA TCG TTG GCT TCA CCA GAC CTA AAA ATG GGC AAT TTG CAA AAC	1854
	Gly Ser Ser Leu Ala Ser Pro Asp Leu Lys Met Gly Asn Leu Gln Asn	
	550 555 560	
5	TCC CCA GTT AAT ATG AAT CCT CCC CCA CTC AGC AAG ATG GGA AGC TTG	1902
	Ser Pro Val Asn Met Asn Pro Pro Pro Leu Ser Lys Met Gly Ser Leu	
	565 570 575 580	
10	GAC TCA AAA GAC TGT TTT GGA CTA TAT GGG GAG CCC TCT GAA GGT ACA	1950
	Asp Ser Lys Asp Cys Phe Gly Leu Tyr Gly Glu Pro Ser Glu Gly Thr	
	585 590 595	
15	ACT GGA CAA GCA GAG AGC AGC TGC CAT CCT GGA GAG CAA AAG GAA ACA	1998
	Thr Gly Gln Ala Glu Ser Ser Cys His Pro Gly Glu Gln Lys Glu Thr	
	600 605 610	
20	AAT GAC CCC AAC CTG CCC CCG GCC GTG AGC AGT GAG AGA GCT GAC GGG	2046
	Asn Asp Pro Asn Leu Pro Pro Ala Val Ser Ser Glu Arg Ala Asp Gly	
	615 620 625	
25	CAG AGC AGA CTG CAT GAC AGC AAA GGG CAG ACC AAA CTC CTG CAG CTG	2094
	Gln Ser Arg Leu His Asp Ser Lys Gly Gln Thr Lys Leu Leu Gln Leu	
	630 635 640	
30	CTG ACC ACC AAA TCT GAT CAG ATG GAG CCC TCG CCC TTA GCC AGC TCT	2142
	Leu Thr Thr Lys Ser Asp Gln Met Glu Pro Ser Pro Leu Ala Ser Ser	
	645 650 655 660	
35	TTG TCG GAT ACA AAC AAA GAC TCC ACA GGT AGC TTG CCT GGT TCT GGG	2190
	Leu Ser Asp Thr Asn Lys Asp Ser Thr Gly Ser Leu Pro Gly Ser Gly	
	665 670 675	
40	TCT ACA CAT GGA ACC TCG CTC AAG GAG AAG CAT AAA ATT TTG CAC AGA	2238
	Ser Thr His Gly Thr Ser Leu Lys Glu Lys His Lys Ile Leu His Arg	
	680 685 690	
45	CTC TTG CAG GAC AGC AGT TCC CCT GTG GAC TTG GCC AAG TTA ACA GCA	2286
	Leu Leu Gln Asp Ser Ser Ser Pro Val Asp Leu Ala Lys Leu Thr Ala	
	695 700 705	
50	GAA GCC ACA GGC AAA GAC CTG AGC CAG GAG TCC AGC AGC ACA GCT CCT	2334
	Glu Ala Thr Gly Lys Asp Leu Ser Gln Glu Ser Ser Ser Thr Ala Pro	
	710 715 720	
55	GGA TCA GAA GTG ACT ATT AAA CAA GAG CCG GTG AGC CCC AAG AAG AAA	2382
	Gly Ser Glu Val Thr Ile Lys Gln Glu Pro Val Ser Pro Lys Lys Lys	
	725 730 735 740	
60	GAG AAT GCA CTA CTT CGC TAT TTG CTA GAT AAA GAT GAT ACT AAA GAT	2430
	Glu Asn Ala Leu Leu Arg Tyr Leu Leu Asp Lys Asp Asp Thr Lys Asp	
	745 750 755	
65	ATT GGT TTA CCA GAA ATA ACC CCC AAA CTT GAG AGA CTG GAC AGT AAG	2478
	Ile Gly Leu Pro Glu Ile Thr Pro Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Lys	
	760 765 770	
65	ACA GAT CCT GCC AGT AAC ACA AAA TTA ATA GCA ATG AAA ACT GAG AAG	2526

ES 2 281 105 T3

	Thr	Asp	Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Lys	Leu	Ile	Ala	Met	Lys	Thr	Glu	Lys	
			775					780					785				
5	GAG	GAG	ATG	AGC	TTT	GAG	CCT	GGT	GAC	CAG	CCT	GGC	AGT	GAG	CTG	GAC	2574
	Glu	Glu	Met	Ser	Phe	Glu	Pro	Gly	Asp	Gln	Pro	Gly	Ser	Glu	Leu	Asp	
			790				795					800					
10	AAC	TTG	GAG	GAG	ATT	TTG	GAT	GAT	TTG	CAG	AAT	AGT	CAA	TTA	CCA	CAG	2622
	Asn	Leu	Glu	Glu	Ile	Leu	Asp	Asp	Leu	Gln	Asn	Ser	Gln	Leu	Pro	Gln	
	805					810					815					820	
15	CTT	TTC	CCA	GAC	ACG	AGG	CCA	GGC	GCC	CCT	GCT	GGA	TCA	GTT	GAC	AAG	2670
	Leu	Phe	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Asp	Lys	
					825					830					835		
20	CAA	GCC	ATC	ATC	AAT	GAC	CTC	ATG	CAA	CTC	ACA	GCT	GAA	AAC	AGC	CCT	2718
	Gln	Ala	Ile	Ile	Asn	Asp	Leu	Met	Gln	Leu	Thr	Ala	Glu	Asn	Ser	Pro	
					840				845					850			
25	GTC	ACA	CCT	GTT	GGA	GCC	CAG	AAA	ACA	GCA	CTG	CGA	ATT	TCA	CAG	AGC	2766
	Val	Thr	Pro	Val	Gly	Ala	Gln	Lys	Thr	Ala	Leu	Arg	Ile	Ser	Gln	Ser	
			855				860						865				
30	ACT	TTT	AAT	AAC	CCA	CGA	CCA	GGG	CAA	CTG	GGC	AGG	TTA	TTG	CCA	AAC	2814
	Thr	Phe	Asn	Asn	Pro	Arg	Pro	Gly	Gln	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Pro	Asn	
			870				875					880					
35	CAG	AAT	TTA	CCA	CTT	GAC	ATC	ACA	TTG	CAA	AGC	CCA	ACT	GGT	GCT	GGA	2862
	Gln	Asn	Leu	Pro	Leu	Asp	Ile	Thr	Leu	Gln	Ser	Pro	Thr	Gly	Ala	Gly	
	885					890					895					900	
40	CCT	TTC	CCA	CCA	ATC	AGA	AAC	AGT	AGT	CCC	TAC	TCA	GTG	ATA	CCT	CAG	2910
	Pro	Phe	Pro	Pro	Ile	Arg	Asn	Ser	Ser	Pro	Tyr	Ser	Val	Ile	Pro	Gln	
					905					910					915		
45	CCA	GGA	ATG	ATG	GGT	AAT	CAA	GGG	ATG	ATA	GGA	AAC	CAA	GGA	AAT	TTA	2958
	Pro	Gly	Met	Met	Gly	Asn	Gln	Gly	Met	Ile	Gly	Asn	Gln	Gly	Asn	Leu	
					920				925					930			
50	GGG	AAC	AGT	AGC	ACA	GGA	ATG	ATT	GGT	AAC	AGT	GCT	TCT	CGG	CCT	ACT	3006
	Gly	Asn	Ser	Ser	Thr	Gly	Met	Ile	Gly	Asn	Ser	Ala	Ser	Arg	Pro	Thr	
			935				940						945				
55	ATG	CCA	TCT	GGA	GAA	TGG	GCA	CCG	CAG	AGT	TCG	GCT	GTG	AGA	GTC	ACC	3054
	Met	Pro	Ser	Gly	Glu	Trp	Ala	Pro	Gln	Ser	Ser	Ala	Val	Arg	Val	Thr	
			950				955					960					
60	TGT	GCT	GCT	ACC	ACC	AGT	GCC	ATG	AAC	CGG	CCA	GTC	CAA	GGA	GGT	ATG	3102
	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Ser	Ala	Met	Asn	Arg	Pro	Val	Gln	Gly	Gly	Met	
	965					970					975					980	
65	ATT	CGG	AAC	CCA	GCA	GCC	AGC	ATC	CCC	ATG	AGG	CCC	AGC	AGC	CAG	CCT	3150
	Ile	Arg	Asn	Pro	Ala	Ala	Ser	Ile	Pro	Met	Arg	Pro	Ser	Ser	Gln	Pro	
					985					990					995		
70	GGC	CAA	AGA	CAG	ACG	CTT	CAG	TCT	CAG	GTC	ATG	AAT	ATA	GGG	CCA	TCT	3198
	Gly	Gln	Arg	Gln	Thr	Leu	Gln	Ser	Gln	Val	Met	Asn	Ile	Gly	Pro	Ser	

ES 2 281 105 T3

	1000	1005	1010	
5	GAA TTA GAG ATG AAC ATG GGG GGA CCT CAG TAT AGC CAA CAA CAA GCT Glu Leu Glu Met Asn Met Gly Gly Pro Gln Tyr Ser Gln Gln Gln Ala 1015 1020 1025	3246		
10	CCT CCA AAT CAG ACT GCC CCA TGG CCT GAA AGC ATC CTG CCT ATA GAC Pro Pro Asn Gln Thr Ala Pro Trp Pro Glu Ser Ile Leu Pro Ile Asp 1030 1035 1040	3294		
15	CAG GCG TCT TTT GCC AGC CAA AAC AGG CAG CCA TTT GGC AGT TCT CCA Gln Ala Ser Phe Ala Ser Gln Asn Arg Gln Pro Phe Gly Ser Ser Pro 1045 1050 1055 1060	3342		
20	GAT GAC TTG CTA TGT CCA CAT CCT GCA GCT GAG TCT CCG AGT GAT GAG Asp Asp Leu Leu Cys Pro His Pro Ala Ala Glu Ser Pro Ser Asp Glu 1065 1070 1075	3390		
25	GGA GCT CTC CTG GAC CAG CTG TAT CTG GCC TTG CGG AAT TTT GAT GGC Gly Ala Leu Leu Asp Gln Leu Tyr Leu Ala Leu Arg Asn Phe Asp Gly 1080 1085 1090	3438		
30	CTG GAG GAG ATT GAT AGA GCC TTA GGA ATA CCC GAA CTG GTC AGC CAG Leu Glu Glu Ile Asp Arg Ala Leu Gly Ile Pro Glu Leu Val Ser Gln 1095 1100 1105	3486		
35	AGC CAA GCA GTA GAT CCA GAA CAG TTC TCA AGT CAG GAT TCC AAC ATC Ser Gln Ala Val Asp Pro Glu Gln Phe Ser Ser Gln Asp Ser Asn Ile 1110 1115 1120	3534		
40	ATG CTG GAG CAG AAG GCG CCC GTT TTC CCA CAG CAG TAT GCA TCT CAG Met Leu Glu Gln Lys Ala Pro Val Phe Pro Gln Gln Tyr Ala Ser Gln 1125 1130 1135 1140	3582		
45	GCA CAA ATG GCC CAG GGT AGC TAT TCT CCC ATG CAA GAT CCA AAC TTT Ala Gln Met Ala Gln Gly Ser Tyr Ser Pro Met Gln Asp Pro Asn Phe 1145 1150 1155	3630		
50	CAC ACC ATG GGA CAG CGG CCT AGT TAT GCC ACA CTC CGT ATG CAG CCC His Thr Met Gly Gln Arg Pro Ser Tyr Ala Thr Leu Arg Met Gln Pro 1160 1165 1170	3678		
55	AGA CCG GGC CTC AGG CCC ACG GGC CTA GTG CAG AAC CAG CCA AAT CAA Arg Pro Gly Leu Arg Pro Thr Gly Leu Val Gln Asn Gln Pro Asn Gln 1175 1180 1185	3726		
60	CTA AGA CTT CAA CTT CAG CAT CGC CTC CAA GCA CAG CAG AAT CGC CAG Leu Arg Leu Gln Leu Gln His Arg Leu Gln Ala Gln Gln Asn Arg Gln 1190 1195 1200	3774		
65	CCA CTT ATG AAT CAA ATC AGC AAT GTT TCC AAT GTG AAC TTG ACT CTG Pro Leu Met Asn Gln Ile Ser Asn Val Ser Asn Val Asn Leu Thr Leu 1205 1210 1215 1220	3822		
	AGG CCT GGA GTA CCA ACA CAG GCA CCT ATT AAT GCA CAG ATG CTG GCC Arg Pro Gly Val Pro Thr Gln Ala Pro Ile Asn Ala Gln Met Leu Ala 1225 1230 1235	3870		

ES 2 281 105 T3

5	CAG AGA CAG AGG GAA ATC CTG AAC CAG CAT CTT CGA CAG AGA CAA ATG Gln Arg Gln Arg Glu Ile Leu Asn Gln His Leu Arg Gln Arg Gln Met 1240 1245 1250	3918
10	CAT CAG CAA CAG CAA GTT CAG CAA CGA ACT TTG ATG ATG AGA GGA CAA His Gln Gln Gln Gln Val Gln Gln Arg Thr Leu Met Met Arg Gly Gln 1255 1260 1265	3966
15	GGG TTG AAT ATG ACA CCA AGC ATG GTG GCT CCT AGT GGT ATG CCA GCA Gly Leu Asn Met Thr Pro Ser Met Val Ala Pro Ser Gly Met Pro Ala 1270 1275 1280	4014
20	ACT ATG AGC AAC CCT CGG ATT CCC CAG GCA AAT GCA CAG CAG TTT CCA Thr Met Ser Asn Pro Arg Ile Pro Gln Ala Asn Ala Gln Gln Phe Pro 1285 1290 1295 1300	4062
25	TTT CCT CCA AAC TAC GGA ATA AGT CAG CAA CCT GAT CCA GGC TTT ACT Phe Pro Pro Asn Tyr Gly Ile Ser Gln Gln Pro Asp Pro Gly Phe Thr 1305 1310 1315	4110
30	GGG GCT ACG ACT CCC CAG AGC CCA CTT ATG TCA CCC CGA ATG GCA CAT Gly Ala Thr Thr Pro Gln Ser Pro Leu Met Ser Pro Arg Met Ala His 1320 1325 1330	4158
35	ACA CAG AGT CCC ATG ATG CAA CAG TCT CAG GCC AAC CCA GCC TAT CAG Thr Gln Ser Pro Met Met Gln Gln Ser Gln Ala Asn Pro Ala Tyr Gln 1335 1340 1345	4206
40	GCC CCC TCC GAC ATA AAT GGA TGG GCG CAG GGG AAC ATG GGC GGA AAC Ala Pro Ser Asp Ile Asn Gly Trp Ala Gln Gly Asn Met Gly Gly Asn 1350 1355 1360	4254
45	AGC ATG TTT TCC CAG CAG TCC CCA CCA CAC TTT GGG CAG CAA GCA AAC Ser Met Phe Ser Gln Gln Ser Pro Pro His Phe Gly Gln Gln Ala Asn 1365 1370 1375 1380	4302
50	ACC AGC ATG TAC AGT AAC AAC ATG AAC ATC AAT GTG TCC ATG GCG ACC Thr Ser Met Tyr Ser Asn Asn Met Asn Ile Asn Val Ser Met Ala Thr 1385 1390 1395	4350
55	AAC ACA GGT GGC ATG AGC AGC ATG AAC CAG ATG ACA GGA CAG ATC AGC Asn Thr Gly Gly Met Ser Ser Met Asn Gln Met Thr Gly Gln Ile Ser 1400 1405 1410	4398
60	ATG ACC TCA GTG ACC TCC GTG TCT ACG TCA GGG CTG TCC TCC ATG GGT Met Thr Ser Val Thr Ser Val Ser Thr Ser Gly Leu Ser Ser Met Gly 1415 1420 1425	4446
65	CCC GAG CAG GTT AAT GAT CCT GCT CTG AGG GGA GGC AAC CTG TTC CCA Pro Glu Gln Val Asn Asp Pro Ala Leu Arg Gly Gly Asn Leu Phe Pro 1430 1435 1440	4494
	AAC CAG CTG CCT GGA ATG GAT ATG ATT AAG CAG GAG GGA GAC ACA ACA Asn Gln Leu Pro Gly Met Asp Met Ile Lys Gln Glu Gly Asp Thr Thr 1445 1450 1455 1460	4542
	CGG AAA TAT TGC TGACACTGCT GAAGCCAGTT GCTTCTTCAG CTGACCGGGC	4594

ES 2 281 105 T3

Arg Lys Tyr Cys

5	TCACCTTGCTC AAAACACTTC CAGTCTGGAG AGCTGTGTCT ATTTGTTTCA ACCCAACTGA	4654
	CCTGCCAGCC GGTTCCTGCTA GAGCAGACAG GCCTGGCCCT GGTTCCTCAGG GTGGCGTCCA	4714
	CTCGGCTGTG GCAGGAGGAG CTGCCTCTTC TCTTGACAGT CTGAAGCTCG CATCCAGACA	4774
10	GTCGCTCAGT CTGTTCCCTG CATTACACCTT AGTGCAACTT AGATCTCTCC TCCCCAAGTA	4834
	AATGTTGACA GGCCAATTTC ATACCCATGT CAGATTGAAT GTATTTAAAT GTATGTATTT	4894
15	AAGGAGAACC ATGCTCTTGT TCTGTTCTCG TTCGGTTCCA GACACTGGTT TCTTGCTTTG	4954
	TTTTCCCTGG CTAACAGTCT AGTGCCAAAG ATTAAGATTT TATCTGGGGG AAAGAAAAGA	5014
	ATTTTTTAAA AAATTAAACT AAAGATGTTT TAAGCTAAAG CCTGAATTTG GGATGGAAGC	5074
20	AGGACAGACA CCGTGGACAG CGCTGTATTT ACAGACACAC CCAGTGCGTG AAGACCAACA	5134
	AAGTCACAGT CGTATCTCTA GAAAGCTCTA AAGACCATGT TGGAAAGAGT CTCCAGTTAC	5194
25	TGAACAGATG AAAAGGAGCC TGTGAGAGGG CTGTTAACAT TAGCAAATAT TTTTTCCTTG	5254
	TTTTTTCTTT GTTAAACCA AACTGGTTCA CCTGAATCAT GAATTGAGAA GAAATAATTT	5314
	TCATTTCTAA ATTAAGTCCC TTTTAGTTTG ATCAGACAGC TTGAATCAGC ATCTCTTCTT	5374
30	CCCTGTCAGC CTGACTCTTC CCTTCCCCTC TCTCATTCCC CATACTCCCT ATTTTCATTC	5434
	CTTTTTTAAA AAATAATATA AGCTACAGAA ACCAGGTAAG CCCTTTATTT CCTTAAATGT	5494
35	TTTGCCAGCC ACTTACCAAT TGCTAAGTAT TGAATTTTCAG AAAAAAAAAA TGCATTTACT	5554
	GGCAAGGAGA AGAGCAAAGT TAAGGCTTGA TACCAATCGA GCTAAGGATA CCTGCTTTGG	5614
	AAGCATGTTT ATTCTGTTCC CCAGCAACTC TGGCCTCCAA AATGGGAGAA ACGCCAGTGT	5674
40	GTTTAAATTG ATAGCAGATA TCACGACAGA TTAAACCTCT GCCATGTGTT TTTTATTTTG	5734
	TTTTTTTAGCA GTGCTGACTA AGCCGAAGTT TTGTAAGGTA CATAAAATCC AATTTATATG	5794
45	TAAACAAGCA ATAATTAAAG TTGAGAACTT ATGTGTTTTA ATTGTATAAT TTTTGTGAGG	5854
	TATACATATT GTGGAATTGA CTCAAAAATG AGGTACTTCA GTATTAAATT AGATATCTTC	5914
	ATAGCAATGT CTCCTAAAGG TGTTTTGTAAG AGGATATCAA TGCCTTGATT AGACCTAATT	5974
50	TGTAGACTTA AGACTTTTTA TTITCTAAAC CTTGTGATTC TGCTTATAAG TCATTTATCT	6034
	AATCTATATG ATATGCAGCC GCTGTAGGAA CCAATTCCTG ATTTTATATG GTTTATATTC	6094
55	TTTCTTAATG AACCTTAGAA AGACTACATG TTAATAAGCA GGCCACTTTT ATGGTTGTTT	6154
	TT	6156

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

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1464 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 281 105 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

ES 2 281 105 T3

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

ES 2 281 105 T3

	545		550		555		560									
5	Asn	Leu	Gln	Asn	Ser	Pro	Val	Asn	Met	Asn	Pro	Pro	Pro	Leu	Ser	Lys
				565				570							575	
	Met	Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Lys	Asp	Cys	Phe	Gly	Leu	Tyr	Gly	Glu	Pro
10				580				585						590		
	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	Gly	Gln	Ala	Glu	Ser	Ser	Cys	His	Pro	Gly	Glu
			595					600					605			
15	Gln	Lys	Glu	Thr	Asn	Asp	Pro	Asn	Leu	Pro	Pro	Ala	Val	Ser	Ser	Glu
		610					615					620				
	Arg	Ala	Asp	Gly	Gln	Ser	Arg	Leu	His	Asp	Ser	Lys	Gly	Gln	Thr	Lys
20	625					630				635						640
	Leu	Leu	Gln	Leu	Leu	Thr	Thr	Lys	Ser	Asp	Gln	Met	Glu	Pro	Ser	Pro
				645				650							655	
25	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Ser	Asp	Thr	Asn	Lys	Asp	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu
				660				665						670		
	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	His	Gly	Thr	Ser	Leu	Lys	Glu	Lys	His	Lys
30			675					680					685			
	Ile	Leu	His	Arg	Leu	Leu	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Pro	Val	Asp	Leu	Ala
		690					695					700				
35	Lys	Leu	Thr	Ala	Glu	Ala	Thr	Gly	Lys	Asp	Leu	Ser	Gln	Glu	Ser	Ser
	705					710					715					720
	Ser	Thr	Ala	Pro	Gly	Ser	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Gln	Glu	Pro	Val	Ser
40				725					730						735	
	Pro	Lys	Lys	Lys	Glu	Asn	Ala	Leu	Leu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Asp	Lys	Asp
			740					745						750		
45	Asp	Thr	Lys	Asp	Ile	Gly	Leu	Pro	Glu	Ile	Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Arg
			755					760					765			
	Leu	Asp	Ser	Lys	Thr	Asp	Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Lys	Leu	Ile	Ala	Met
50		770				775						780				
	Lys	Thr	Glu	Lys	Glu	Glu	Met	Ser	Phe	Glu	Pro	Gly	Asp	Gln	Pro	Gly
	785					790					795					800
55	Ser	Glu	Leu	Asp	Asn	Leu	Glu	Glu	Ile	Leu	Asp	Asp	Leu	Gln	Asn	Ser
				805						810					815	
	Gln	Leu	Pro	Gln	Leu	Phe	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly
60				820					825					830		
	Ser	Val	Asp	Lys	Gln	Ala	Ile	Ile	Asn	Asp	Leu	Met	Gln	Leu	Thr	Ala
			835					840					845			
65	Glu	Asn	Ser	Pro	Val	Thr	Pro	Val	Gly	Ala	Gln	Lys	Thr	Ala	Leu	Arg

ES 2 281 105 T3

	850	855	860
5	Ile Ser Gln Ser Thr Phe Asn Asn Pro Arg Pro Gly Gln Leu Gly Arg 865 870 875 880		
	Leu Leu Pro Asn Gln Asn Leu Pro Leu Asp Ile Thr Leu Gln Ser Pro 885 890 895		
10	Thr Gly Ala Gly Pro Phe Pro Pro Ile Arg Asn Ser Ser Pro Tyr Ser 900 905 910		
15	Val Ile Pro Gln Pro Gly Met Met Gly Asn Gln Gly Met Ile Gly Asn 915 920 925		
	Gln Gly Asn Leu Gly Asn Ser Ser Thr Gly Met Ile Gly Asn Ser Ala 930 935 940		
20	Ser Arg Pro Thr Met Pro Ser Gly Glu Trp Ala Pro Gln Ser Ser Ala 945 950 955 960		
25	Val Arg Val Thr Cys Ala Ala Thr Thr Ser Ala Met Asn Arg Pro Val 965 970 975		
	Gln Gly Gly Met Ile Arg Asn Pro Ala Ala Ser Ile Pro Met Arg Pro 980 985 990		
30	Ser Ser Gln Pro Gly Gln Arg Gln Thr Leu Gln Ser Gln Val Met Asn 995 1000 1005		
35	Ile Gly Pro Ser Glu Leu Glu Met Asn Met Gly Gly Pro Gln Tyr Ser 1010 1015 1020		
	Gln Gln Gln Ala Pro Pro Asn Gln Thr Ala Pro Trp Pro Glu Ser Ile 1025 1030 1035 1040		
40	Leu Pro Ile Asp Gln Ala Ser Phe Ala Ser Gln Asn Arg Gln Pro Phe 1045 1050 1055		
45	Gly Ser Ser Pro Asp Asp Leu Leu Cys Pro His Pro Ala Ala Glu Ser 1060 1065 1070		
	Pro Ser Asp Glu Gly Ala Leu Leu Asp Gln Leu Tyr Leu Ala Leu Arg 1075 1080 1085		
50	Asn Phe Asp Gly Leu Glu Glu Ile Asp Arg Ala Leu Gly Ile Pro Glu 1090 1095 1100		
55	Leu Val Ser Gln Ser Gln Ala Val Asp Pro Glu Gln Phe Ser Ser Gln 1105 1110 1115 1120		
	Asp Ser Asn Ile Met Leu Glu Gln Lys Ala Pro Val Phe Pro Gln Gln 1125 1130 1135		
60	Tyr Ala Ser Gln Ala Gln Met Ala Gln Gly Ser Tyr Ser Pro Met Gln 1140 1145 1150		
65	Asp Pro Asn Phe His Thr Met Gly Gln Arg Pro Ser Tyr Ala Thr Leu		

ES 2 281 105 T3

	1155	1160	1165
5	Arg Met Gln Pro Arg Pro Gly Leu Arg Pro Thr Gly Leu Val Gln Asn 1170	1175	1180
	Gln Pro Asn Gln Leu Arg Leu Gln Leu Gln His Arg Leu Gln Ala Gln 1185	1190	1195 1200
10	Gln Asn Arg Gln Pro Leu Met Asn Gln Ile Ser Asn Val Ser Asn Val 1205	1210	1215
15	Asn Leu Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Thr Gln Ala Pro Ile Asn Ala 1220	1225	1230
	Gln Met Leu Ala Gln Arg Gln Arg Glu Ile Leu Asn Gln His Leu Arg 1235	1240	1245
20	Gln Arg Gln Met His Gln Gln Gln Gln Val Gln Gln Arg Thr Leu Met 1250	1255	1260
25	Met Arg Gly Gln Gly Leu Asn Met Thr Pro Ser Met Val Ala Pro Ser 1265	1270	1275 1280
	Gly Met Pro Ala Thr Met Ser Asn Pro Arg Ile Pro Gln Ala Asn Ala 1285	1290	1295
30	Gln Gln Phe Pro Phe Pro Pro Asn Tyr Gly Ile Ser Gln Gln Pro Asp 1300	1305	1310
35	Pro Gly Phe Thr Gly Ala Thr Thr Pro Gln Ser Pro Leu Met Ser Pro 1315	1320	1325
	Arg Met Ala His Thr Gln Ser Pro Met Met Gln Gln Ser Gln Ala Asn 1330	1335	1340
40	Pro Ala Tyr Gln Ala Pro Ser Asp Ile Asn Gly Trp Ala Gln Gly Asn 1345	1350	1355 1360
45	Met Gly Gly Asn Ser Met Phe Ser Gln Gln Ser Pro Pro His Phe Gly 1365	1370	1375
	Gln Gln Ala Asn Thr Ser Met Tyr Ser Asn Asn Met Asn Ile Asn Val 1380	1385	1390
50	Ser Met Ala Thr Asn Thr Gly Gly Met Ser Ser Met Asn Gln Met Thr 1395	1400	1405
55	Gly Gln Ile Ser Met Thr Ser Val Thr Ser Val Ser Thr Ser Gly Leu 1410	1415	1420
	Ser Ser Met Gly Pro Glu Gln Val Asn Asp Pro Ala Leu Arg Gly Gly 1425	1430	1435 1440
60	Asn Leu Phe Pro Asn Gln Leu Pro Gly Met Asp Met Ile Lys Gln Glu 1445	1450	1455
65	Gly Asp Thr Thr Arg Lys Tyr Cys		

ES 2 281 105 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1036 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

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

```

Met Ser Ile Pro Arg Val Asn Pro Ser Val Asn Pro Ser Ile Ser Pro
1          5          10          15

Ala His Gly Val Ala Arg Ser Ser Thr Leu Pro Pro Ser Asn Ser Asn
20          20          25          30

Met Val Ser Thr Arg Ile Asn Arg Gln Gln Ser Ser Asp Leu His Ser
35          35          40          45

Ser Ser His Ser Asn Ser Ser Asn Ser Gln Gly Ser Phe Gly Cys Ser
50          50          55          60

Pro Gly Ser Gln Ile Val Ala Asn Val Ala Leu Asn Lys Gly Gln Ala
65          70          75          80

Ser Ser Gln Ser Ser Lys Pro Ser Leu Asn Leu Asn Asn Pro Pro Met
85          85          90          95

Glu Gly Thr Gly Ile Ser Leu Ala Gln Phe Met Ser Pro Arg Arg Gln
100         100         105         110

Val Thr Ser Gly Leu Ala Thr Arg Pro Arg Met Pro Asn Asn Ser Phe
115         115         120         125

Pro Pro Asn Ile Ser Thr Leu Ser Ser Pro Val Gly Met Thr Ser Ser
130         130         135         140

Ala Cys Asn Asn Asn Asn Arg Ser Tyr Ser Asn Ile Pro Val Thr Ser
145         145         150         155         160

Leu Gln Gly Met Asn Glu Gly Pro Asn Asn Ser Val Gly Phe Ser Ala
165         165         170         175

Ser Ser Pro Val Leu Arg Gln Met Ser Ser Gln Asn Ser Pro Ser Arg
180         180         185         190

Leu Asn Ile Gln Pro Ala Lys Ala Glu Ser Lys Asp Asn Lys Glu Ile
195         195         200         205

Ala Ser Thr Leu Asn Glu Met Ile Gln Ser Asp Asn Ser Ser Ser Asp

```

ES 2 281 105 T3

	210	215	220
5	Gly Lys Pro Leu Asp Ser Gly Leu Leu His Asn Asn Asp Arg Leu Ser 225 230 235 240		
	Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ser Gln Thr Ser His Lys Leu Val Gln Leu 245 250 255		
10	Leu Thr Thr Thr Ala Glu Gln Gln Leu Arg His Ala Asp Ile Asp Thr 260 265 270		
15	Ser Cys Lys Asp Val Leu Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Ser Ala Ser 275 280 285		
	Ala Asn Ser Ser Gly Gly Ser Cys Pro Ser Ser His Ser Ser Leu Thr 290 295 300		
20	Ala Arg His Lys Ile Leu His Arg Leu Leu Gln Glu Gly Ser Pro Ser 305 310 315 320		
25	Asp Ile Thr Thr Leu Ser Val Glu Pro Asp Lys Lys Asp Ser Ala Ser 325 330 335		
	Thr Ser Val Ser Val Thr Gly Gln Val Gln Gly Asn Ser Ser Ile Lys 340 345 350		
30	Leu Glu Leu Asp Ala Ser Lys Lys Lys Glu Ser Lys Asp His Gln Leu 355 360 365		
35	Leu Arg Tyr Leu Leu Asp Lys Asp Glu Lys Asp Leu Arg Ser Thr Pro 370 375 380		
	Asn Leu Ser Leu Asp Asp Val Lys Val Lys Val Glu Lys Lys Glu Gln 385 390 395 400		
40	Met Asp Pro Cys Asn Thr Asn Pro Thr Pro Met Thr Lys Ala Thr Pro 405 410 415		
45	Glu Glu Ile Lys Leu Glu Ala Gln Ser Gln Phe Thr Ala Asp Leu Asp 420 425 430		
	Gln Phe Asp Gln Leu Leu Pro Thr Leu Glu Lys Ala Ala Gln Leu Pro 435 440 445		
50	Gly Leu Cys Glu Thr Asp Arg Met Asp Gly Ala Val Thr Ser Val Thr 450 455 460		
55	Ile Lys Ser Glu Ile Thr Ile Lys Ser Glu Ile Leu Pro Ala Ser Leu 465 470 475 480		
	Gln Ser Ala Thr Ala Arg Pro Thr Ser Arg Leu Asn Arg Leu Pro Glu 485 490 495		
60	Leu Glu Leu Glu Ala Ile Asp Asn Gln Phe Gly Gln Pro Gly Thr Gly 500 505 510		
65	Asp Gln Ile Pro Trp Thr Asn Asn Thr Val Thr Ala Ile Asn Gln Ser		

ES 2 281 105 T3

	515	520	525
5	Lys Ser Glu Asp Gln Cys Ile Ser Ser Gln Leu Asp Glu Leu Leu Cys 530 535 540		
	Pro Pro Thr Thr Val Glu Gly Arg Asn Asp Glu Lys Ala Leu Leu Glu 545 550 555 560		
10	Gln Leu Val Ser Phe Leu Ser Gly Lys Asp Glu Thr Glu Leu Ala Glu 565 570 575		
15	Leu Asp Arg Ala Leu Gly Ile Asp Lys Leu Val Gln Gly Gly Gly Leu 580 585 590		
	Asp Val Leu Ser Glu Arg Phe Pro Pro Gln Gln Ala Thr Pro Pro Leu 595 600 605		
20	Ile Met Glu Glu Arg Pro Asn Leu Tyr Ser Gln Pro Tyr Ser Ser Pro 610 615 620		
25	Phe Pro Thr Ala Asn Leu Pro Ser Pro Phe Gln Gly Met Val Arg Gln 625 630 635 640		
	Lys Pro Ser Leu Gly Thr Met Pro Val Gln Val Thr Pro Pro Arg Gly 645 650 655		
30	Ala Phe Ser Pro Gly Met Gly Met Gln Pro Arg Gln Thr Leu Asn Arg 660 665 670		
35	Pro Pro Ala Ala Pro Asn Gln Leu Arg Leu Gln Leu Gln Gln Arg Leu 675 680 685		
	Gln Gly Gln Gln Gln Leu Ile His Gln Asn Arg Gln Ala Ile Leu Asn 690 695 700		
40	Gln Phe Ala Ala Thr Ala Pro Val Gly Ile Asn Met Arg Ser Gly Met 705 710 715 720		
45	Gln Gln Gln Ile Thr Pro Gln Pro Pro Leu Asn Ala Gln Met Leu Ala 725 730 735		
	Gln Arg Gln Arg Glu Leu Tyr Ser Gln Gln His Arg Gln Arg Gln Leu 740 745 750		
50	Ile Gln Gln Gln Arg Ala Met Leu Met Arg Gln Gln Ser Phe Gly Asn 755 760 765		
55	Asn Leu Pro Pro Ser Ser Gly Leu Pro Val Gln Thr Gly Asn Pro Arg 770 775 780		
	Leu Pro Gln Gly Ala Pro Gln Gln Phe Pro Tyr Pro Pro Asn Tyr Gly 785 790 795 800		
60	Thr Asn Pro Gly Thr Pro Pro Ala Ser Thr Ser Pro Phe Ser Gln Leu 805 810 815		
65	Ala Ala Asn Pro Glu Ala Ser Leu Ala Asn Arg Asn Ser Met Val Ser		

ES 2 281 105 T3

	820	825	830
5	Arg Gly Met Thr Gly Asn Ile	Gly Gly Gln Phe Gly Thr Gly Ile Asn	
	835	840	845
	Pro Gln Met Gln Gln Asn Val	Phe Gln Tyr Pro Gly Ala Gly Met Val	
	850	855	860
10	Pro Gln Gly Glu Ala Asn Phe Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser		
	865	870	875 880
15	Met Val Pro Met Pro Ile Pro Pro Pro Gln Ser Ser Leu Leu Gln Gln		
	885	890	895
	Thr Pro Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Ser Pro Asp Met Lys Ala Trp Gln		
	900	905	910
20	Gln Gly Ala Ile Gly Asn Asn Asn Val Phe Ser Gln Ala Val Gln Asn		
	915	920	925
	Gln Pro Thr Pro Ala Gln Pro Gly Val Tyr Asn Asn Met Ser Ile Thr		
25	930	935	940
	Val Ser Met Ala Gly Gly Asn Thr Asn Val Gln Asn Met Asn Pro Met		
	945	950	955 960
30	Met Ala Gln Met Gln Met Ser Ser Leu Gln Met Pro Gly Met Asn Thr		
	965	970	975
	Val Cys Pro Glu Gln Ile Asn Asp Pro Ala Leu Arg His Thr Gly Leu		
	980	985	990
35	Tyr Cys Asn Gln Leu Ser Ser Thr Asp Leu Leu Lys Thr Glu Ala Asp		
	995	1000	1005
40	Gly Thr Gln Gln Val Gln Gln Val Gln Val Phe Ala Asp Val Gln Cys		
	1010	1015	1020
	Thr Val Asn Leu Val Gly Gly Asp Pro Tyr Leu Asn		
45	1025	1030	1035

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

55 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

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

Glu	Arg	Ala	Asp	Gly	Gln	Ser	Arg	Leu	His	Asp	Ser	Lys	Gly	Gln	Thr
1				5				10					15		

Lys	Leu	Leu	Gln	Cys
			20	

65

ES 2 281 105 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 48 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 10 (D) TOPOLOGÍA: no relevante

(iii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

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

15 Gly His Lys Lys Leu Leu Gln Leu Leu Thr Cys Ser Ser His Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Gln Glu Lys His Arg Ile Leu His Lys Leu Leu Gln Asn Gly
 20 25 30
 20 Asn Asn Ala Leu Leu Arg Tyr Leu Leu Asp Arg Asp Asp Pro Ser Asp
 35 40 45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 30 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

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

35 Arg Ser Ile Leu Thr Ser Leu Leu Leu Asn Ser Ser
 1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

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

50 Phe Asn Val Leu Lys Gln Leu Leu Leu Ser Glu Asn
 1 5 10
 55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 65 (D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

ES 2 281 105 T3

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

Ser Ala Thr Leu Arg Ser Leu Leu Leu Asn Pro His
1 5 10

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 9

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 58 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

15

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

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

20

Leu Arg Asn Ser Leu Asp Asp Leu Leu Gly Pro Pro Ser Asn Ala Glu
1 5 10 15

25

Gly Gln Ser Asp Glu Arg Ala Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Phe Leu
20 25 30

30

Ser Asn Thr Asp Ala Thr Gly Leu Glu Glu Ile Asp Arg Ala Leu Gly
35 40 45

35

Ile Pro Glu Leu Val Asn Gln Gly Gln Ala
50 55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 64 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

45

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

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

50

AGACCTGTTG AACTTTGCAA AGGCAAGGGC AGTCCTTTG AGCTGGGCTT ATGACCTTTG 60

ACTC 64

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 11

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

65

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

ES 2 281 105 T3

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

CGGAGGACAG TCCTCCGGCG GCCGCGGTCA CAGTGACC

38

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 12

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

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

20

Leu Xaa Xaa Leu Leu
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 13

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

30

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

35

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

Leu Xaa Xaa Leu Leu Leu
1 5

40

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 14

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

45

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: no relevante

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

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

55

Leu Leu Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu
1 5

60

65