



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 205**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/19 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98919575 .5**

86 Fecha de presentación : **13.05.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1004669**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2000**

54 Título: **Nuevo inhibidor de diferenciación.**

30 Prioridad: **14.05.1997 JP 9-124064**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **Asahi Kasei Kabushiki Kaisha**
2-6, Dojimahama 1-chome
Kita-ku, Osaka-shi, Osaka, JP

72 Inventor/es: **Sakano, Seiji**

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

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

Nuevo inhibidor de diferenciación.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a una nueva sustancia bioactiva.

Técnicas anteriores

10

La sangre humana y la linfa contienen varios tipos de células, y cada célula desempeña funciones importantes. Por ejemplo, los eritrocitos llevan el oxígeno; las plaquetas o trombocitos tienen una acción hemostática; y los linfocitos previenen las infecciones. Estas distintas células se originan a partir de los hemocitoblastos en la médula ósea. Recientemente, se ha descubierto que los hemocitoblastos se diferencian en varias células de la sangre, osteoclastos y mastocitos, por la estimulación *in vivo* de distintas citocinas y factores medioambientales. En las citocinas se ha encontrado, por ejemplo, la eritropoyetina (EPO) para la diferenciación a eritrocitos; el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) para la diferenciación a leucocitos; y el factor de crecimiento de trombocitos (ligando mpl) para la diferenciación a megacariocitos, que son células productoras de trombocitos, y los dos primeros ya se han aplicado clínicamente.

20

Generalmente, las células de la sangre indiferenciadas se clasifican en dos grupos que consisten en células precursoras de la sangre, que están destinadas a diferenciarse en series de la sangre específicas, y en hemocitoblastos que tienen la capacidad de diferenciarse en todas las series y actividad de autorreplicación. Las células precursoras de la sangre se pueden identificar mediante diferentes análisis de colonias; sin embargo, no se ha establecido el método de identificación para los hemocitoblastos. En estas células, se ha descrito que el factor de las células madre (SCF), la interleucina-3 (IL-3), el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-1 (IL-1), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y la oncostatina M estimulan la diferenciación y la proliferación celular.

25

Los ensayos *in vitro* para la expansión de los hemocitoblastos se han examinado para reemplazar el trasplante de médula ósea por la aplicación del tratamiento de trasplante de hemocitoblastos o la terapia génica. Sin embargo, cuando se cultivan los hemocitoblastos en presencia de las citocinas antes mencionadas, las actividades de multidiferenciación y las actividades autorreplicativas, que originalmente están en la posición de los hemocitoblastos, desaparecen gradualmente y cambian a las células precursoras de la sangre que están solamente para diferenciarse a series específicas después de 5 semanas de cultivo, y se pierde la actividad de multidiferenciación, que es una de las características específicas de los hemocitoblastos (Wagner y otros, *Blood* 86, 512-523, 1995).

30

35

Para que se efectúe la proliferación de las células precursoras de la sangre, no basta con una sola citocina, sino que es importante la acción sinérgica de varias citocinas. En consecuencia, para que los hemocitoblastos proliferen manteniendo sus características específicas de hemocitoblastos, es necesario añadir citocinas que supriman la diferenciación junto con las citocinas que hacen que las células de la sangre indiferenciadas proliferen y se diferencien. En general, se conocen muchas citocinas que estimulan la proliferación o la diferenciación de las células, pero se conocen pocas citocinas que supriman la diferenciación celular. Por ejemplo, el factor inhibidor de la leucemia (LIF) tiene una acción de proliferación sobre los embriocitoblastos indiferenciados de ratón, pero no tiene ninguna acción frente a los hemocitoblastos o las células precursoras de la sangre. El factor de crecimiento transformante (TGF- β) tiene una acción supresora de la proliferación frente a diferentes células, pero ninguna acción fija frente a los hemocitoblastos o las células precursoras de la sangre.

40

45

Se cree que no sólo las células de la sangre sino también las células indiferenciadas, especialmente las células madre, están implicadas en la regeneración de los tejidos. Esta regeneración de los tejidos y la proliferación de las células indiferenciadas en cada tejido se puede aplicar de diferentes maneras, refiriéndose a la referencia conocida (Katsutoshi Yoshizato, *Regeneration: a mechanism of regeneration*, 1996, Yodosha Publ. Co.).

50

Notch es una proteína de la membrana de tipo receptor, que participa en la regulación de la diferenciación de las células nerviosas encontradas en *Drosophila*. Se encuentran homólogos de Notch en varias clases de animales que van más allá de los invertebrados y los vertebrados, incluidos los nematodos (Lin-12), *Xenopus laevis* (Xotch), ratón (Motch) o humano (TAN-1).

55

Se conoce el ligando de Notch en *Drosophila*. Éstos son *Drosophila Delta* (Delta) y *Drosophila Serrate* (Serrate). Los homólogos del ligando de Notch se encuentran en varias clases de animales, al igual que los receptores Notch (Artavanis-Tsakonas y otros, *Science* 268, 225-232, 1995).

60

El homólogo humano de Notch, TAN-1, se encuentra ampliamente en los tejidos *in vivo* (Ellisen y otros, *Cell* 66, 649-661, 1991). Se han descrito tres moléculas análogas a Notch diferentes a TAN-1 (Artavanis-Tsakonas y otros, *Science* 268, 225-232, 1995). También se observó la expresión de TAN-1 en los linfocitos CD34+ de las células de la sangre mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Milner y otros, *Blood* 83, 2057-2062, 1994). Sin embargo, en relación con los humanos, el gen y las secuencias de aminoácidos del Delta humano y el

65

Serrate humano, que se cree que son el ligando de Notch, no se han descrito en informes científicos hasta abril de 1997.

En el Notch de *Drosophila* se estudió y se investigó en detalle la unión con el ligando, y se encontró que Notch se puede unir al ligando con Ca^{++} en la región de unión, que es una secuencia de aminoácidos repetida n.º 11 y n.º 12 en la repetición de la secuencia de aminoácidos similar a la repetición en el factor de crecimiento epidérmico (FCE) (Fehon y otros, *Cell* 61, 523-534, 1990; Rebay y otros, *ibid.* 67, 687-699, 1991 y publicación de la patente internacional WO 92/19734). Las secuencias repetidas de tipo FCE se conservan en los homólogos de Notch de otras especies. En consecuencia, se supone que el mecanismo de unión con el ligando es el mismo. En el ligando se conservan una secuencia de aminoácidos que se denomina DSL (Delta-Serrate-Lag-2) cerca del extremo del aminoácido y la secuencia repetida de tipo FCE del mismo modo que en el receptor (Artavanis-Tsakonas y otros, *Science* 268, 225-232, 1995).

La secuencia de tipo FCE se ha encontrado en la trombomodulina (Jackman y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 83, 8834-8838, 1986), el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Russell y otros, *Cell* 37, 577-585, 1984) y en el factor de la coagulación de la sangre (Furie y otros, *Cell* 53, 505-518, 1988), y se cree que desempeña funciones importantes en la coagulación y la adhesión extracelulares.

Recientemente, en el pollo (C-Delta-1) y en *Xenopus laevis* (X-Delta-1) se encontraron homólogos de vertebrados del Delta de *Drosophila* clonado, y se ha descrito que X-Delta-1 había actuado a través de Notch para generar la protoneurona (Henrique y otros, *Nature* 375, 787-790, 1995 y Chitnis y otros, *ibid.* 375, 761-766, 1995). El homólogo de vertebrados del Serrate de *Drosophila* se encontró en las ratas como Jagged de rata (Jagged) (Lindsell y otros, *Cell* 80, 909-917, 1995). De acuerdo con Lindsell y otros, el ARNm del Jagged de rata se detecta en la médula espinal de los fetos de las ratas. Como resultado del cocultivo de una estirpe celular de mioblastos, que está forzada a expresar en exceso el Notch de rata, con una estirpe celular que expresa el Jagged de rata, se observa la supresión de la diferenciación de la estirpe celular de mioblastos. Sin embargo, el Jagged de rata no tiene ninguna acción frente a la estirpe celular de mioblastos que no se fuerza a expresar el Notch de rata.

El presente inventor ha desarrollado una hipótesis en la que Notch y su ligando tienen acción de regulación diferencial no sólo para los neuroblastos y los mioblastos, sino también para distintas células indiferenciadas, especialmente las células de la sangre indiferenciadas. Sin embargo, en el caso de la aplicación clínica en los humanos, diferentes especies conocidas previamente como el ligando de Notch de tipo pollo o *Xenopus laevis* tienen problemas con la especificidad y la antigenicidad de especies. En consecuencia, es esencialmente necesario obtener antes el ligando humano desconocido de Notch. El inventor tuvo la idea de que se pueden encontrar una molécula que tenga un dominio de DSL y un dominio de tipo FCE que son comunes a las moléculas ligando de Notch, y un ligando humano de Notch (TAN-1, etc.), que es un homólogo humano del Delta (a continuación, se designa como Delta humano) y un homólogo humano del Serrate (a continuación, se designa como Serrate humano). También tuvo la idea de que estos resultados pueden ser candidatos a fármaco útil para la regulación diferencial de las células indiferenciadas. Y ha intentado averiguar el mismo.

Como resultado, en la solicitud de patente anterior, se ha realizado la clonación de los genes de tres tipos de moléculas, incluidas las moléculas de Delta-1 humano, Serrate-1 humano y Serrate-2 humano como las moléculas ligando humanas del Notch, y se ha encontrado que estas moléculas tienen una acción sobre las células de la sangre indiferenciadas (véase la patente internacional WO 97/19172 "Differentiation-suppressive polypeptide" ("Polipéptido supresor de diferenciación") y la patente internacional WO 98/02458 "Differentiation-inhibitor" ("Inhibidor de diferenciación")).

En cuanto a la molécula ligando humana de Notch, de acuerdo al informe reciente, se han descrito en la publicación de patente internacional WO 97/01571 las secuencias parciales del gen y los aminoácidos de la molécula de tipo Delta-1 humana, que son, sin embargo, secuencias de longitud incompleta y no total. Además, la patente internacional WO 96/27610 describe la secuencia completa del gen y la secuencia completa de los aminoácidos del Serrate-1 humano (Jagged-1 humano). La patente internacional WO 96/27610 también describe la secuencia parcial del gen y la secuencia parcial de aminoácidos del Serrate-2 humano (Jagged-2 humano). Esta secuencia génica podría tener secuencias erróneas y esta secuencia génica genera un cambio de fase, lo que da lugar a una secuencia de aminoácidos completamente diferente a la de nuestra patente internacional WO 98/02458, "Differentiation-inhibitor". Además, dichas técnicas anteriores no describen la clonación génica de los extremos amino. En consecuencia, las secuencias génicas y las secuencias aminoacídicas son incompletas. Como resultado de buscar en la base de datos de secuencias de genes, GeneBank versión 98 (diciembre de 1996), hay cuatro entradas sobre el Serrate-1 humano, esto es, los números de registro HSU61276, HSU73936, HSU77720 y HSU77914; sin embargo, no se encuentran otras moléculas ligando humanas del Notch en dicha base de datos.

Problemas a solucionar con la invención

Los problemas de la presente invención son aclarar la secuencia del gen y la secuencia de aminoácidos de las nuevas moléculas ligando de Notch, diferentes a las tres moléculas anteriores, y dar a conocer la nueva molécula ligando de Notch y dar a conocer un nuevo método terapéutico con las citadas moléculas.

Medios para solucionar los problemas

Para buscar los nuevos ligandos humanos de Notch, se ha realizado una hibridación cruzada utilizando el gen Delta-1 humano mencionado anteriormente.

Para obtener el gen Delta-1 humano se pueden aplicar los métodos utilizados en los ejemplos 1 y 2 de referencia y en la patente internacional WO 97/19172. Las células transformadas, en las que un vector pUCDL-1 que contiene el ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos total del Delta-1 humano, es decir, el ADN que contiene la secuencia del n.º 179 hasta el n.º 2347 en la SEQ ID n.º 8, se introduce en *E. coli* JM109, se han depositado en el Instituto Nacional de Biociencias y Tecnología humana (*National Institute of Bioscience and Human-Technology*), Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (*Agency of Industrial Science and Technology*), Ministerio de Comercio Internacional e Industria (*Ministry of International Trade and Industry*), en Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, Japón, como colección de cultivo permanente de *E. coli*: JM109-pUCDL-1F. La fecha de registro fue 28 de octubre de 1996, como registro n.º FERM BP-5728.

Se han preparado distintas longitudes de genes parciales de este gen Delta-1 humano. Utilizando estas longitudes parciales de los genes como sondas, se ha intentado detectar el nuevo ligando de Notch en muchas genotecas de ADNc en distintas condiciones de hibridación mediante el método de hibridación cruzada.

Como resultado de los estudios exhaustivos, se ha conseguido exitosamente el aislamiento del ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos del nuevo Delta-2 humano, una nueva molécula que tiene el dominio de DSL común a las moléculas ligando de Notch a partir de la genoteca de ADNc de pulmón fetal humano, y se han preparado los sistemas de expresión de distintas formas de la proteína utilizando el ADNc. También se ha establecido el método de purificación de las proteínas, que se purificaron y se aislaron.

Las secuencias de aminoácidos del nuevo Delta-2 humano se muestran en las listas de secuencias: SEQ ID n.º 1-3. La secuencia de ADN que codifica estas secuencias se muestra en la lista de secuencias: SEQ ID n.º 4.

Se buscaron actividades fisiológicas de estas proteínas preparadas utilizando muchos tipos de células, por ejemplo, células nerviosas indiferenciadas, preadipocitos, hepatocitos, mioblastos, células indiferenciadas de la piel, células de la sangre indiferenciadas y células inmunitarias indiferenciadas. Como resultado, se ha encontrado que el nuevo Delta-2 humano tenía una acción supresora de la diferenciación frente a las células de la sangre indiferenciadas, y que tenía una acción fisiológica en el mantenimiento del estado no diferenciado. Además, se ha encontrado que dicha molécula suprime el crecimiento de las células del endotelio vascular.

No se observaron acciones tóxicas importantes en los estudios de toxicidad con ratones y se sugirieron efectos farmacéuticos útiles. En consecuencia, las preparaciones farmacéuticas que contienen la molécula de la presente invención, el medio que contiene la molécula de la presente invención y el dispositivo inmovilizado con la molécula de la presente invención son nuevos fármacos y materiales médicos que pueden mantener las células de la sangre indiferenciadas en el estado indiferenciado. Se prepara el anticuerpo contra el Delta-2 humano utilizando como antígeno dicho Delta-2 humano, y se establece el método de purificación de dichos anticuerpos. La presente invención se ha completado en conformidad con esto.

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende, al menos, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 2 de la lista de secuencias, y un polipéptido que comprende, al menos, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3 de la lista de secuencias. La presente invención también se refiere a dichos polipéptidos que tienen una acción supresora de la diferenciación frente a las células de la sangre indiferenciadas, y supresora también del crecimiento de las células vasculares. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende dichos polipéptidos, teniendo dicha composición farmacéutica acción supresora de la diferenciación frente a las células, dicha composición farmacéutica en la que las células son células de la sangre indiferenciadas, y suprimiendo dicha composición farmacéutica el crecimiento de las células vasculares. La presente invención se refiere además a un medio de cultivo de células que comprende dichos polipéptidos, el medio de cultivo de células en el que la célula es célula de la sangre indiferenciada, y un material que tiene el polipéptido inmovilizado a éste. Además, la presente invención se refiere a un método para cultivar células utilizando el medio de cultivo de células o el material, y el método en el que las células son células de la sangre indiferenciadas.

La presente invención se refiere además a un ADN que codifica, al menos, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 2 de la lista de secuencias, un ADN que codifica, al menos, los aminoácidos de la SEQ ID n.º 3 de la lista de secuencias, un ADN que tiene una secuencia de bases desde la 355 hasta la 1854 de la SEQ ID n.º 4 de la lista de secuencias, y un ADN que tiene una secuencia de bases desde la 355 hasta la 2331 de la SEQ ID n.º 4 de la lista de secuencias.

La presente invención se refiere además a un ADN recombinante que comprende un ADN seleccionado entre el grupo que consiste en los ADN que tienen ligado a éstos un ADN de vector que puede expresar dicho ADN en la célula hospedadora, una célula transformada por el ADN recombinante, un método para cultivar células humanas con dichas células y un procedimiento para la producción de dicho polipéptido al cultivar dichas células y al aislar el compuesto producido en la masa cultivada. La presente invención se refiere además a un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 3.

A continuación, la presente invención se explicará en detalle.

La preparación del ADNc necesario para la manipulación génica, el análisis de expresión mediante la transferencia Northern, la detección mediante hibridación, la preparación del ADN recombinante, la determinación de la secuencia de bases del ADN y la preparación de la genoteca de ADNc, todo lo cual son series de experimentos de biología molecular, se pueden realizar de acuerdo con la descripción del manual de texto convencional para los experimentos. El manual de texto convencional anterior para los experimentos es, por ejemplo, Maniatis y otros ed., *Molecular Cloning, A laboratory manual*. 1989, Eds., Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Un polipéptido de la presente invención tiene, al menos, polipéptidos de las SEQ ID n.º 2 ó 3 de la lista de secuencias. Un mutante y un alelo, que se producen de forma natural en la naturaleza, se incluyen en el polipéptido de la presente invención, a no ser que los polipéptidos en la lista de secuencias SEQ ID n.º 1 a 3 pierdan sus propiedades. La modificación y la sustitución anterior para los experimentos se describen detalladamente en la solicitud de patente a nombre de Benntt y otros (publicación nacional sin examinar de la patente internacional WO 96/2645) y se pueden preparar según la descripción de la misma.

Una secuencia de ADN que codifica los polipéptidos de la SEQ ID n.º 2 ó 3 de la lista de secuencias se muestra en la SEQ ID n.º 4 de la lista de secuencias, junto con sus secuencias de aminoácidos. En estas secuencias de ADN, incluso aunque no se genere una mutación a nivel de aminoácidos, el ADN cromosómico aislado de forma natural o el ADNc del mismo pueden tener la posibilidad de mutar en la secuencia de bases del ADN como resultado de la degeneración del código genético, sin cambiar la secuencia de aminoácidos codificada por el ADN. Una región sin traducir en el extremo 5' y una región sin traducir en el extremo 3' no participan en la determinación de la secuencia de aminoácidos del polipéptido, por lo que las secuencias de ADN de estas regiones mutan con facilidad. La secuencia de bases obtenida por estas degeneraciones de los códigos genéticos se incluye en el ADN de la presente invención.

Las células de la sangre indiferenciadas en la presente invención se definen como células, que crecen mediante la estimulación específica, y células, que se pueden diferenciar a células que tienen funciones específicas como resultado de la estimulación específica.

Estas células incluyen la célula con actividad de autorreplicación que se llama célula madre y la célula que tiene una capacidad para generar las células de estas estirpes. La actividad supresora de la diferenciación significa acción supresora de la diferenciación autónoma o heterónoma de las células indiferenciadas, y es una actividad que mantiene el estado indiferenciado.

Las células de la sangre indiferenciadas en la presente invención se pueden definir como grupos de células que consisten en células precursoras de la sangre que se diferencian a series de la sangre específicas identificadas mediante el análisis de las colonias de la sangre, y en hemocitoblastos que se diferencian a todas las series y actividades de autorreplicación. Además, en la presente invención, células vasculares se define como la denominación general para las células que forman los vasos de la sangre, en los que las células del endotelio vascular son las principales células que los forman.

La secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 1, es una secuencia del centro activo del nuevo Delta-2 humano de la presente invención, de la que se deleciona el péptido señal, es decir, la secuencia de aminoácidos desde el extremo amino hasta el dominio DSL, y corresponde a los aminoácidos desde el n.º 1 al 191 en la SEQ ID n.º 3 de la secuencia de aminoácidos madura de longitud completa del nuevo Delta-2 humano de la presente invención.

La secuencia de aminoácidos en la SEQ ID n.º 2 es la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del nuevo Delta-2 humano de la presente invención, de la que se deleciona el péptido señal, y corresponde a los aminoácidos n.º 1 a 500 en la SEQ ID n.º 3 de la secuencia de aminoácidos madura de longitud completa del nuevo Delta-2 humano de la presente invención.

La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3 es la secuencia de aminoácidos madura de longitud completa del nuevo Delta-2 humano de la presente invención.

La secuencia de la SEQ ID n.º 4 es la secuencia del ADNc y la secuencia de aminoácidos completa del nuevo Delta-2 humano de la presente invención, que corresponde a la región codificante de dicho ADNc.

La secuencia de la SEQ ID n.º 5 es la secuencia de ADN que codifica el péptido FLAG y la secuencia de aminoácidos del péptido FLAG utilizada en la presente invención.

Las secuencias de las SEQ ID n.º 6 y 7 son las secuencias de ADN de los cebadores utilizados en el ejemplo 1 de referencia.

La secuencia de la SEQ ID n.º 8 es la secuencia del ADNc y la secuencia de aminoácidos completa del Delta-1 humano utilizado en la presente invención.

ES 2 284 205 T3

Las secuencias de las SEQ ID n.º 9, 10, 12 y 13 son las secuencias de ADN de los cebadores utilizados en el ejemplo 1.

La secuencia de la SEQ ID n.º 11 es una secuencia de ADN de una sonda utilizada en el ejemplo 1.

La secuencia de la SEQ ID n.º 14 es una secuencia de ADN de una sonda utilizada en los ejemplos 1 y 2.

Las secuencias de las SEQ ID n.º 15 hasta n.º 24 son las secuencias de ADN de los cebadores utilizados en el ejemplo 3.

Los extremos izquierdo y derecho de las secuencias de aminoácidos en las listas de secuencias indican extremo amino (a continuación, se designa como extremo N) y extremo carboxilo (a continuación, se designa como extremo C), respectivamente, y los extremos izquierdo y derecho de las secuencias de nucleótidos son el extremo 5' y el extremo 3', respectivamente.

La clonación del gen humano del ligando desconocido de Notch se puede realizar mediante el método siguiente. Durante la evolución de los organismos, se conserva una parte de las secuencias de aminoácidos y de las secuencias del gen del ligando humano de Notch. La clonación puede ser teóricamente posible utilizando otra molécula ligando de Notch como sonda. Sin embargo, en tal hibridación cruzada hay muchos problemas, por ejemplo, qué parte es preferible para la sonda y cómo establecer una condición para la hibridación, y no son tan simples. Además, dado que el procedimiento de hibridación cruzada tiende a hacer clonar simultáneamente muchos miembros de genes similares, se necesita mucho tiempo para analizar la secuencia del gen y, por consiguiente, identificar las moléculas objetivo de los genes clonados es realmente difícil.

Se han preparado más de 10 fragmentos génicos del gen del Delta-1 humano. Utilizando dichas sondas, los cribados de las genotecas de ADNc que proceden de más de 10 órganos diferentes se realizaron en muchas condiciones de hibridación y condiciones de lavado. Se ha intentado encontrar una nueva molécula de tipo Delta.

En la hibridación de calvas se pueden obtener clones mediante la marcación isotópica y la marcación no isotópica de la sonda. La marcación isotópica se puede realizar, por ejemplo, mediante la marcación de los extremos utilizando [³²P]γ-ATP y T4 polinucleótido cinasa, o se pueden aplicar otros métodos de marcación tales como la incisión ambulatoria (*nick translation*) o la extensión de cebadores.

Como resultado, en el ejemplo 1, se ha realizado el cribado de una genoteca de ADNc de pulmón fetal humano utilizando un gen parcial del gen de longitud completa del Delta-1 humano, tal como se muestra en la SEQ ID n.º 8 de la lista de secuencias, es decir, la secuencia del gen mostrada en la SEQ ID n.º 11 de la lista de secuencias, como sonda. Como resultado del primer cribado, se aislaron unas 120 calvas positivas y, en el segundo cribado, se clonaron unas 80 calvas positivas y, luego, se determinaron las secuencias génicas de estos clones. La mayoría de estos genes clonados eran el gen del Delta-1 humano utilizado como sonda. Entre ellos, se encontraron cinco clones del gen del nuevo Delta-2 humano, que es similar al gen del Delta-1 humano, y se encontró la nueva molécula ligando humana de Notch buscada.

Entre los cinco clones anteriores, dado que no había ninguna secuencia señal y ninguna secuencia aminoterminal, se preparó una nueva sonda que tiene la secuencia del gen tal como se muestra en la SEQ ID n.º 14 para obtener el gen de longitud completa. Además, se ha realizado de nuevo un cribado de dicha genoteca de ADNc de pulmón fetal humano con esta sonda. Como resultado, se ha tenido éxito a la hora de clonar el ADNc que codifica la longitud completa del gen.

Se comparó esta secuencia con la base de datos (GenBank versión 89, diciembre de 1996), y se encontró que era una secuencia nueva.

Ejemplos de plásmidos integrados con el ADNc son, por ejemplo, otros además del pBluescript KS descrito a modo de ejemplo, pBR322, pUC18, pUC19, pUC118 y pUC119 (Takara Shuzo Co., Japón) originados en *E. coli*, pero se pueden utilizar otros plásmidos con tal de que se puedan replicar y proliferen en las células hospedadoras. Ejemplos de vectores fágicos integrados con el ADNc son, por ejemplo, λgt10 y λgt11, pero se pueden utilizar otros vectores con tal de que se puedan desarrollar en las células hospedadoras. Los plásmidos obtenidos así se transducen a las células hospedadoras adecuadas tales como el género *Escherichia* y el género *Bacillus* utilizando el método del cloruro de calcio. Ejemplos del género *Escherichia* anterior son *Escherichia coli* K12HB101, MC1061, LE392 y JM109. Un ejemplo del género *Bacillus* anterior es *Bacillus subtilis* MI114. El vector fágico se puede introducir en la *E. coli* proliferada mediante el método de empaquetamiento *in vitro* (Enquist y Sternberg, *Meth. Enzymol.*, 68. 281, 1979).

Se analizó la parte hidrófoba y la parte hidrófila de dicha secuencia de aminoácidos de acuerdo con el método de Kyte-Doolittle (*J. Mol. Biol.* 151: 105, 1982). Como resultado, el nuevo Delta-2 humano de la presente invención se expresó en las células como una proteína de la membrana celular que tiene un dominio transmembranario.

De acuerdo con el análisis de la secuencia de aminoácidos del nuevo Delta-2 humano, la secuencia de aminoácidos de un precursor del nuevo Delta-2 humano consiste en 685 restos de aminoácidos mostrados en la lista de secuencias,

SEQ ID n.º 4, y se estima que el dominio del péptido señal corresponde a la secuencia de aminoácidos de 26 restos de aminoácidos desde la metionina n.º -26 hasta la glicina n.º -1 en la lista de secuencias; dominio extracelular: 500 restos de aminoácidos desde la serina n.º 1 hasta la serina n.º 500; dominio transmembranario: 26 restos de aminoácidos desde la fenilalanina n.º 501 hasta la valina n.º 526; y dominio intracelular: 133 restos de aminoácidos desde la arginina n.º 527 hasta la valina n.º 659. Estos dominios son una construcción de dominios estimados a partir de las secuencias de aminoácidos, y la forma presente en realidad en las células y en disolución puede ser posible que difiera de la estructura anterior, y los aminoácidos que forman de cada dominio definido anteriormente puede que haya que cambiarlos de 5 a 10 aminoácidos en la secuencia.

La secuencia de aminoácidos extremo N del polipéptido del Delta-2 humano, que se expresa en las células COS-7, producido y purificado tal como se describe en el ejemplo 5, tiene al menos la secuencia de aminoácidos que comienza a partir de la serina n.º 1 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 2. De forma similar, se puede esperar un extremo N idéntico si dicho péptido se expresa en las otras células animales.

De acuerdo con una comparación en la secuencia de aminoácidos de longitud completa del nuevo Delta-2 humano de la presente invención con otras moléculas ligando de Notch, que se describió en abril de 1997, la homología con el Delta-1 humano (secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 8 de la lista de secuencias) como una molécula originada de humano es del 48,5%; con el Serrate-1 humano (GenBank HSU61276 y HSU73939) es del 40,3%; y con el Serrate-2 humano (solicitud de patente japonesa n.º 8 - 18622, *Differentiation-suppressive polypeptide* a nombre de los presentes inventores) es del 42,7%. Las homologías con los Delta de otros vertebrados son: Delta-1 de ratón (D111, GenBank MMDELTA1), 48,7%; Delta-1 de rana (GenBank XELXDEL), 47,0%; Delta-2 de rana (GenBank XLU70843), 49,7%, y Delta-1 de pollo (GenBank GGU26590), 47,9%.

Como resultados, el Delta-2 humano de la presente invención es una nueva molécula, que nunca se ha descrito no sólo en los humanos sino tampoco en otros homólogos biológicos, y es la nueva sustancia que tiene una nueva secuencia de aminoácidos diferente de estas sustancias, y es sustancia nueva que ha sido esclarecida por primera vez por los presentes inventores. Además, no se ha encontrado ningún polipéptido que tenga la misma secuencia de aminoácidos que la del nuevo Delta-2 humano mediante una búsqueda de homología en todos los tipos de organismos.

Los homólogos del ligando de Notch tienen una secuencia común conservada evolutivamente, es decir, la secuencia del DSL y la secuencia repetida de tipo FCE. Se estiman estas secuencias de aminoácidos conservadas del nuevo Delta-2 humano como resultado de la comparación con el nuevo Delta-2 humano y el Delta-1 humano.

A saber, la secuencia del DSL corresponde a 43 restos de aminoácidos desde la cisteína n.º 149 hasta la cisteína n.º 191 de la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4. La secuencia de tipo FCE existe con 8 repeticiones en la que, en la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4, la primera secuencia de tipo FCE corresponde a la secuencia desde la cisteína n.º 196 hasta la cisteína n.º 224; la segunda secuencia de tipo FCE corresponde a la secuencia desde la cisteína n.º 227 hasta la cisteína n.º 255; la tercera secuencia de tipo FCE corresponde a la secuencia desde la cisteína n.º 262 hasta la cisteína n.º 295; la cuarta secuencia de tipo FCE corresponde a la secuencia desde la cisteína n.º 302 hasta la cisteína n.º 333; la quinta secuencia de tipo FCE corresponde a la secuencia desde la cisteína n.º 340 hasta la cisteína n.º 373; la sexta secuencia de tipo FCE corresponde a la secuencia desde la cisteína n.º 380 hasta la cisteína n.º 411; la séptima secuencia de tipo FCE corresponde a la secuencia desde la cisteína n.º 418 hasta la cisteína n.º 449; y la octava secuencia de tipo FCE corresponde a la secuencia desde la cisteína n.º 458 hasta la cisteína n.º 491.

Una parte donde se añade la cadena de azúcares se ha estimado a partir de la secuencia de aminoácidos del nuevo Delta-2 humano, y puede ser el resto de asparragina n.º 82, 157, 179 y 367 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4, como un posible sitio de unión para formación de un enlace N-glucosídico con la N-acetil-D-glucosamina. Se estima que el enlace O-glucosídico de la N-acetil-D-galactosamina está en una parte rica en restos de serina o treonina. Por lo general, se cree que la unión de la proteína con una cadena de azúcares es estable *in vivo* y que tiene una actividad fisiológica fuerte. En consecuencia, en la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene la secuencia en la lista de secuencias SEQ ID n.º: 1, 2 ó 3, se incluyen en la presente invención los polipéptidos que tienen un enlace N-glucosídico u O-glucosídico con una cadena de azúcares de N-acetil-D-glucosamina o N-acetil-D-galactosamina. Tal como se muestra en el ejemplo 5, si el Delta-2 humano de la presente invención se expresa mediante la inserción del gen en las células COS-7, se expresan al menos más de dos formas debido a la cadena de azúcares añadida, como proteínas que tienen diferente masa molecular.

Como resultado de los estudios sobre la unión del Notch de *Drosophila* y su ligando, la región de aminoácidos necesaria para la unión con el ligando de Notch de *Drosophila* con el Notch es desde el extremo N hasta la secuencia del DSL de la proteína madura, en la que se retira el péptido señal (publicación de patente internacional WO 92/19734). Además, de forma similar, los estudios de Fitzgerald y Greenwald (*Development*, 121, 4275-4282, 1995) utilizando nematodos indican claramente que basta desde el extremo amino hasta el dominio de DSL de la secuencia de longitud completa de APX-1, la molécula de tipo ligando de Notch necesaria para la activación del receptor de tipo Notch.

Este hecho indica que un dominio necesario para la expresión de la acción del ligando de la molécula ligando humano de Notch es, al menos, el dominio de DSL, es decir, un dominio que contiene la secuencia de aminoácidos desde la cisteína n.º 149 hasta la cisteína n.º 191 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 1, y un dominio al menos necesario para la expresión de la acción del ligando del Delta-2 humano es la nueva secuencia de aminoácidos mostrada

en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 1, además de un dominio al menos necesario para la expresión de la acción del ligando del Delta-2 humano es la nueva secuencia de aminoácidos mostrada en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 2.

Tal como se muestra en el ejemplo 2, el ARNm del Delta-2 humano se puede detectar utilizando el ADN que codifica una parte o toda la secuencia del gen en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4. Por ejemplo, se puede conseguir un método para detectar la expresión de estos genes al aplicar la hibridación o la PCR utilizando ácidos nucleicos complementarios del 12mero anterior o el 16mero anterior, preferiblemente, el 20mero anterior que tiene la secuencia del ácido nucleico de una parte de la secuencia en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4, es decir, ADN antisentido o ARN antisentido, sus derivados metilados, metilfosfatados, desaminados o tiofosfatados. Utilizando el mismo método, se puede conseguir la detección de los homólogos del gen en otros organismos tales como el ratón, o la clonación del gen. Además, se puede realizar la clonación de los genes en el genoma, incluido el de los humanos. Utilizando estos genes clonados mediante tales métodos, se pueden esclarecer adicionalmente funciones concretas del Delta-2 humano. Por ejemplo, utilizando las técnicas de manipulación génica recientes, se puede aplicar cualquier método en el que se inactivan los genes que se refieren al gen de la presente invención, entre ellos ratón transgénico, ratón genosustituido o ratón con doble genosupresión. Si se encuentran anomalías en el genoma del gen de la presente invención, se puede realizar la aplicación para el diagnóstico génico y la genoterapia.

Un transformante en el que el vector pBSDL-2, que contiene el ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos completa del nuevo Delta-2 humano de la presente invención, se transforma en *E. coli* JM109, se ha depositado en el Instituto Nacional de Biociencias y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industriales, Ministerio de Comercio Internacional e Industria, de 1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, Japón, como *E. coli*: JM109-pBSDL-2. La fecha de registro fue el 9 de mayo de 1997, y el n.º de registro es FBRM BP-5941.

El procedimiento para la producción del polipéptido del nuevo Delta-2 humano se puede realizar, tal como se muestra en el ejemplo 3, utilizando el vector de expresión pcDNA 3. La producción y la purificación de varias formas del polipéptido del nuevo Delta-2 humano utilizando ADNc, que codifica la secuencia de aminoácidos del nuevo Delta-2 humano aislado mediante el método anterior, se conoce en las referencias (Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual*, Stockton Press, 1990 y Yokota y otros, *Biomaterial Series 4, Gene Transfer and Expression and Analysis*, Yodosha Co., 1994). Un ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de dicho Delta-2 humano aislado se liga al vector de expresión preferente y se produce en las células hospedadoras de células eucariotas tales como las células animales y las células de insectos, o células procariotas tales como las bacterias.

En la expresión del nuevo Delta-2 humano de la presente invención, el ADN que codifica el polipéptido de la presente invención puede tener el codón de inicio de la traducción en el extremo 5' y el codón de terminación de la traducción en el extremo 3'. Estos codón de inicio de la traducción y codón de terminación de la traducción se pueden añadir utilizando el adaptador de ADN sintético preferente. Además, para la expresión de dicho ADN, el promotor está ligado antes del extremo 5' de la secuencia del ADN. Ejemplos de vector son el plásmido procedente de la *E. coli* anteriormente citada, el plásmido procedente de *Bacillus*, el plásmido procedente de las levaduras o el bacteriófago tal como el fago λ , y los virus animales tales como retrovirus y virus de la variolovacuna.

Ejemplos de promotores utilizados en la presente invención son cualquier promotor preferente que se corresponda con las células hospedadoras utilizadas para la expresión génica.

En caso de que la célula hospedadora en la transformación sea del género *Escherichia*, son preferentes el promotor tac, el promotor trp y el promotor lac y, en el caso de un hospedador del género *Bacillus*, son preferentes el promotor SP01 y el promotor SP02 y, en caso de que el hospedador sea levadura, son preferentes el promotor PGK, el promotor GAP y el promotor ADH.

En caso de que la célula hospedadora sea una célula animal, se puede aplicar un promotor obtenido del SV40, el promotor de retrovirus, el promotor de metalotioneína y un promotor de choque térmico.

La expresión del polipéptido de la presente invención se puede realizar utilizando solamente el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, las SEQ ID n.º 1, 2 ó 3. Sin embargo, la proteína añadida con función específica se puede producir utilizando ADN, al que se le añade ADNc que codifica el epítipo de antígeno conocido para detectar con más facilidad el polipéptido producido o el ADNc añadido que codifica el Fc de inmunoglobulina para formar multímeros.

Tal como se muestra en el ejemplo 3, se han preparado vectores de expresión, los cuales expresan proteínas extracelulares del nuevo Delta-2 humano, de la siguiente forma:

- 1) ADN que codifica los aminoácidos desde el n.º 1 hasta el n.º 500 en la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 2;
- 2) ADN que codifica la proteína quimérica, al que se añadió el polipéptido que tiene 8 aminoácidos, es decir, una secuencia de aminoácidos que consiste en Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys (a continuación, se designa como secuencia FLAG, un ejemplo de secuencia de ADN que codifica el mismo se muestra en la lista de secuencias: la SEQ ID n.º 5), en el extremo C de los aminoácidos desde el n.º 1 al 500 en la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 2; y

- 3) ADN que codifica la proteína quimérica, al que la secuencia Fc añadida de la región bisagra de la IgG1 humana en el extremo C de los aminoácidos desde el n.º 1 hasta el n.º 500 en la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 2, se liga a cada uno por separado con el vector de expresión pcDNA 3 (INVITROGEN Corp., EE. UU.), y luego se prepara el vector de expresión que expresa la región extracelular del nuevo Delta-2 humano.

El vector de expresión para la expresión del nuevo Delta humano de longitud completa se prepara de la siguiente forma:

- 4) ADN que codifica los aminoácidos desde el n.º 1 hasta el n.º 659 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 3; y
- 5) ADN que codifica la proteína quimérica, al que el polipéptido añadido que tiene la secuencia FLAG en el extremo C de los aminoácidos desde el n.º 1 hasta el n.º 659 en la lista de secuencias, SEQ ID n.º 3, se liga individualmente al vector de expresión pcDNA para preparar el vector de expresión, que puede expresar el nuevo Delta-2 humano de longitud completa.

Los transformantes se preparan utilizando estos plásmidos de expresión que contienen el ADN que codifica dicho Delta-2 humano construido así.

Ejemplos del hospedador son el género *Escherichia*, el género *Bacillus*, levadura y células animales. Ejemplos de células animales son las células de simio COS-7 y Vero, las células de hámster chino CHO y las células del gusano de seda SF9.

Tal como se muestra en el ejemplo 4, los anteriores vectores de expresión de 1) a 5) se transducen de forma individual; el nuevo Delta-2 humano se expresa en las células COS-7 (se puede obtener del *Institute of Physical and Chemical Research, Cell Development Bank*, RCB0539), y se pueden obtener los transformantes, que son transformados por estos plásmidos de expresión. Además, el polipéptido del nuevo Delta-2 humano se puede producir cultivando los transformantes en la condición de cultivo preferente en un medio mediante el método de cultivo conocido.

Tal como se muestra en el ejemplo 5, el polipéptido del nuevo Delta-2 humano se puede aislar y purificar a partir de la masa cultivada anterior, en general, mediante los métodos que siguen a continuación.

Para extraer la sustancia de las células microbianas cultivadas o células, se recogen las células microbianas o células mediante los métodos conocidos tales como centrifugación después del cultivo, se suspenden en la disolución tamponada preferente, se lisan las células microbianas o células mediante medios de ultrasonificación, lisozima y/o congelación-descongelación, y se recoge el extracto bruto por centrifugación o filtración. La disolución tamponada puede contener agentes desnaturizantes de proteínas tales como urea y clorhidrato de guanidina o agentes tensioactivos como el Tritón-X. En el caso de la secreción en la disolución cultivada, se separa la masa cultivada, mediante el método conocido tal como centrifugación, para separarla de las células microbianas o células y se recoge la disolución sobrenadante.

El nuevo Delta-2 humano obtenido así, que está contenido en los extractos celulares o en los sobrenadantes de las células, se puede purificar mediante los métodos conocidos de purificación de proteínas. Durante el procedimiento de purificación, para confirmar la existencia de la proteína, en el caso de proteínas fusionadas tales como la FLAG anterior y la IgGFc humana, se pueden detectar mediante inmunoanálisis utilizando anticuerpos contra el epítipo antigénico conocido y se puede purificar. En caso de no expresar como tal la proteína fusionada, se puede utilizar el anticuerpo del ejemplo 6 para la detección.

Se pueden preparar anticuerpos que reconocen específicamente el Delta-2 humano tal como se muestra en el ejemplo 6. Se pueden preparar anticuerpos mediante los métodos descritos en la referencia (*Antibodies a laboratory manual*, E. Harlow y otros, Cold Spring Harbor Laboratory) o anticuerpos recombinantes expresados en células al utilizar genes de inmunoglobulinas aislados mediante el método de clonación de genes. Los anticuerpos preparados así se pueden utilizar para purificar el nuevo Delta-2 humano. El nuevo Delta-2 humano se puede detectar y analizar utilizando anticuerpos que reconocen específicamente el Delta-2 humano nuevo tal como se muestra en el ejemplo 6, y se puede utilizar como agentes diagnósticos para enfermedades acompañadas de la diferenciación anormal de células, tales como tumores malignos.

El método de purificación más útil es la cromatografía de afinidad que utiliza anticuerpos. Los anticuerpos utilizados en este caso son los anticuerpos descritos en el ejemplo 6. Para la proteína fusionada, los anticuerpos contra la FLAG en el caso de FLAG, y la proteína G o la proteína A en el caso de la IgGFc humana, tal como se muestra en el ejemplo 5.

Las funciones fisiológicas de la proteína Delta-2 humana purificada de esta manera se pueden identificar mediante varios métodos de análisis, por ejemplo, métodos de análisis de la actividad fisiológica utilizando estirpes celulares y animales tales como ratones y ratas, métodos de análisis de la transducción de señales intracelulares basados en medios de biología molecular, la unión con el receptor Notch, etc.

Se han observado actividades para las células de la sangre indiferenciadas utilizando proteínas quiméricas con IgG1 del nuevo Delta-2 humano. Como resultado, se ha encontrado que, tal como se muestra en el ejemplo 7, en las células de la sangre indiferenciadas obtenidas de la sangre de cordón umbilical, en la que se concentra la fracción de los linfocitos CD34+, el nuevo Delta-2 humano tiene una acción supresora de la actividad formadora de colonias frente a las células de la sangre indiferenciadas, las cuales muestran formación de colonias en presencia de citocinas.

Además, tal como se observa en el ejemplo 8, se ha encontrado que, como resultado de la evaluación de las CI-CLP (células iniciadoras del cultivo a largo plazo), en las que se encuentran la mayoría de las células madre indiferenciadas en las células de la sangre indiferenciadas, después de cultivar las células de la sangre indiferenciadas derivadas de la sangre de cordón umbilical, en las cuales se concentra la fracción de los linfocitos CD34+, en presencia del Delta-2 humano con varias citocinas en un medio sin suero, el Delta-2 humano tiene una actividad que mantiene el número de CI-CLP. Además, se ha encontrado que, tal como se muestra en el ejemplo 9, el Delta-2 humano se une a las células de la sangre humanas indiferenciadas.

Los resultados indican que el Delta-2 humano suprime la diferenciación de las células de la sangre indiferenciadas, y esta acción es obviamente eficaz para las células desde hemocitoblastos hasta células formadoras de colonias. Estas acciones fisiológicas son esenciales para la proliferación *in vitro* de las células de la sangre indiferenciadas. Especialmente, las células cultivadas en el medio que contiene el Delta-2 humano son eficaces para conseguir la recuperación de la supresión *in vitro* de la médula ósea después de administrar agentes antitumorales y, por consiguiente, puede ser posible la expansión *in vitro* de los hemocitoblastos si se cumplieran otras condiciones. Otros fármacos que contienen el polipéptido de la presente invención tienen acciones protectoras y reductoras frente a la acción supresora de la médula ósea debido a los efectos secundarios de los agentes antitumorales.

En estos experimentos, las CI-CLP que mantienen la actividad y la capacidad de unión de las células de la sangre al nuevo Delta-2 humano de la presente invención son más fuertes que las del Delta-1 humano (patente internacional WO 97/19172), que tienen la misma acción que demuestran los presentes inventores.

Tal como se muestra en el ejemplo 9, la proteína quimérica de IgG1 del Delta-2 humano se une a las células de la sangre indiferenciadas CD34+. Mediante esta actividad de unión, el polipéptido de la presente invención se puede utilizar para aislar y detectar las células. Aunque el método de aislamiento se puede realizar mediante un método que utilice un citómetro de flujo tal como se describe en el ejemplo 9, puede ser más adecuado un método que utilice materiales en los que se inmoviliza el polipéptido de la presente invención, tal como se describe en el ejemplo 11. En consecuencia, se incluye en la presente invención el método de aislamiento de células que utiliza el polipéptido de la presente invención. Además, también se incluyen en la presente invención el método de aislamiento de células que utiliza un material, sobre el que se inmoviliza el polipéptido de la presente invención, y el dispositivo para el aislamiento de células aplicado con dicho método de aislamiento. Cualquier método de aislamiento de células que utilice los anticuerpos descritos en las referencias es aplicable a estos dispositivos de aislamiento y métodos de aislamiento. Por ejemplo, se puede utilizar Dynabeads de Dynal Corp. (Noruega) que es un método que utiliza la combinación de perlas magnéticas y anticuerpos.

Además, tal como se muestra en el ejemplo 12, la proteína quimérica de IgG1 y el nuevo Delta-2 humano de la presente invención tiene actividad supresora de la proliferación de las células endoteliales intravasculares y tiene actividad inhibidora de la vascularización. En consecuencia, el polipéptido de la presente invención se puede utilizar como agente terapéutico para enfermedades y estados de enfermedad, que se pueden curar suprimiendo la vascularización, tal como proponen Folkman y Klagsbrun (*Science* 235, 442-447, 1987). Ejemplos concretos de uso son los descritos en la referencia anterior, y son, por ejemplo, enfermedades que incluyen tumores malignos.

Se espera actividad supresora de la diferenciación de las células en células indiferenciadas diferentes a las células de la sangre, y se puede esperar actividad estimulante de la regeneración de los tejidos.

En el uso farmacéutico, los polipéptidos de la presente invención se liofilizan con los agentes estabilizantes preferentes añadidos, tales como sueroalbúmina humana, y se utilizan en un estado disuelto o suspendido con agua destilada para la inyección cuando está en uso. Por ejemplo, se puede proporcionar la preparación para la inyección o la infusión a una concentración de 0,1 a 1000 $\mu\text{g/ml}$. Una mezcla del compuesto de la presente invención a 1 mg/ml y de sueroalbúmina humana a 1 mg/ml separados en un vial podría mantener la actividad de dicho compuesto a largo plazo. Para cultivar y activar células *in vitro*, se prepara la preparación liofilizada o la preparación líquida del polipéptido de la presente invención y se añade al medio o se inmoviliza en el recipiente para el cultivo. Se comprobó la toxicidad del polipéptido de la presente invención. Se administró a los ratones cualquier polipéptido a 10 mg/kg por vía intraperitoneal, pero no se observó la muerte de ningún ratón.

La actividad fisiológica *in vitro* del polipéptido de la presente invención se puede evaluar al administrar al ratón de modelo de enfermedad, o a ratas o monos con enfermedad parecida, y al examinar la recuperación de las funciones físicas y fisiológicas y los resultados anormales. Por ejemplo, en el caso de buscar anomalías en relación con las células hematopoyéticas, se preparan ratones de modelo supresor de la médula ósea administrándoles series de 5-FU de agentes antitumorales, y se examinan los recuentos de mielohemocitoblastos, los recuentos de células de la sangre periféricas y las funciones fisiológicas en el grupo de ratones con tratamiento y en el grupo de ratones sin tratamiento. Además, en caso de buscar en el cultivo *in vitro* y el crecimiento de las células hematopoyéticas indiferenciadas,

incluidos los hemocitoblastos, se cultivan los mielohemocitoblastos de los ratones en los grupos con o sin adición del compuesto de la presente invención, y se transfieren las células cultivadas a los ratones irradiados con la dosis mortal. Se observa el resultado de la recuperación con las indicaciones de la tasa de supervivencia y la variación de los hemogramas. Estos resultados se pueden extrapolar a los humanos y, por consiguiente, se pueden obtener datos eficaces y útiles para la evaluación de las actividades farmacológicas del compuesto de la presente invención.

Las aplicaciones del compuesto de la presente invención para fármacos incluyen enfermedades con diferenciación anormal de las células, por ejemplo, leucemia y tumores malignos. Éstas son terapia celular, que se realiza mediante el cultivo *in vitro* de células obtenidas de humanos manteniendo sus funciones originales o añadiendo nuevas funciones, y una terapia, que se realiza regenerando sin daño las funciones de las que existen originalmente en los tejidos al administrar el compuesto de la presente invención durante la regeneración después de la lesión del tejido. La cantidad de administración puede diferir según el tipo de preparación y oscila de 10 µg/kg a 10 mg/kg.

Se puede lograr una actividad fisiológica fuerte adicional mediante la expresión del multímero formador del polipéptido de la presente invención.

El Delta-2 humano que tiene una estructura multimérica se puede producir mediante el método de expresar una proteína quimérica con la región Fc de la IgG humana, tal como se describe en los ejemplos 3 y 4, y expresando el multímero que tiene un puente disulfuro con la región bisagra del anticuerpo, o mediante un método que expresa la proteína quimérica, en el que la región de reconocimiento del anticuerpo se expresa en el extremo C o el extremo N, y haciéndola reaccionar con el polipéptido que contiene la parte extracelular de dicho Delta-2 humano expresado de esta manera y el anticuerpo que reconoce específicamente la región de reconocimiento del anticuerpo en el extremo C y el extremo N. En los otros métodos, se puede mencionar un método, en el cual se expresa una proteína fusionada con sólo la región bisagra del anticuerpo y el dímero se forma mediante un puente disulfuro. Se puede obtener el multímero del Delta-2 humano, que tiene una mayor actividad específica que el dímero. Dicho multímero se construye mediante una proteína de fusión que se prepara para expresar el péptido en el extremo C, el extremo N u otra región. La proteína se prepara en forma de un puente disulfuro formador sin ejercer ningún efecto en la actividad de los otros Delta-2 humanos. La estructura multimérica también se puede expresar disponiendo uno o más péptidos, que se seleccionan entre los polipéptidos que contienen la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, las SEQ ID n.º 1, 2 y 3, con un método de ingeniería genética en serie o en paralelo. Se pueden aplicar otros métodos conocidos para proporcionar una estructura multimérica que tiene uno o más dímeros. Por consiguiente, la presente invención incluye cualquier polipéptido que contiene secuencias de aminoácidos descritas en la lista de secuencias, las SEQ ID n.º 1, 2 y 3, en forma de dímero u otra estructura preparada mediante las técnicas de ingeniería genética.

Además, en el otro método, se puede mencionar el método de multimerización que utiliza un interconector químico. Por ejemplo, se pueden mencionar el dihidrocloruro de dimetilsuberimidato para interconectar restos de lisina, la N-(γ-maleimidabutirilo) succinimida para interconectar el grupo tiol del resto de cisteína y glutaraldehído para interconectar los grupos amino. El multímero con dímero o más se puede sintetizar aplicando estas reacciones de interconexión. Por consiguiente, la presente invención incluye cualquier polipéptido que contiene secuencias de aminoácidos descritas en la lista de secuencias, las SEQ ID n.º 1, 2 ó 3, en forma de estructura dimérica o multimérica preparada mediante agentes químicos de interconexión.

En la aplicación de la asistencia médica en la que las células se hacen proliferar y se activan *in vitro*, y se devuelven al organismo, se puede añadir el Delta-2 humano en la forma anteriormente descrita directamente en el medio, pero también se puede llevar a cabo la inmovilización. El método de inmovilización incluye aplicar el grupo amino o el grupo carboxilo del péptido, utilizando espaciadores adecuados o los interconectores mencionados anteriormente, y se puede unir covalentemente el polipéptido a los recipientes del cultivo. En el ejemplo 11, se ilustran el método para la preparación del material inmovilizado y su efecto. Por consiguiente, la presente invención incluye cualquier polipéptido que contenga secuencias de aminoácidos descritas en la lista de secuencias, las SEQ ID n.º 1, 2 ó 3, en la forma de existir sobre la superficie sólida.

Ya que el Delta-2 humano natural es una proteína de la membrana celular, la acción supresora de la diferenciación en el ejemplo 7, 8 y 12 se puede expresar cocultivando con células que expresan estas moléculas y células de la sangre indiferenciadas. En consecuencia, esta invención incluye un método para cocultivar células indiferenciadas con células transformadas utilizando el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, las SEQ ID n.º 1, 2 ó 3. En el ejemplo 10 se ilustra un ejemplo. La célula expresada puede ser célula COS-7 de simio o células Balb 3T3 de ratón, tal como se muestra en los ejemplos, pero se prefieren las células de origen humano, y otras células expresadas pueden ser cualquiera entre células de la sangre humanas *in vivo* y células somáticas en vez de estirpes celulares. En consecuencia, el polipéptido se puede expresar *in vivo* integrándolo en vectores para genoterapia. Ejemplos de vectores para genoterapia son vector de retrovirus, vector de adenovirus o vector de virus relacionados con los adenovirus.

Este hecho sugiere que la inhibición de la unión del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, las SEQ ID n.º 1, 2 ó 3, a estos receptores se puede utilizar para encontrar las moléculas y los compuestos que estimulan la diferenciación celular. Los métodos incluyen un experimento de unión que utiliza radioisótopos, el ensayo de la luciferasa que utiliza factores de control transcripcional, una molécula situada más abajo del receptor Notch y la simulación en el ordenador mediante el análisis estructural por rayos X. Por consiguiente, la presente

invención incluye un método de detección para los fármacos que utilizan un polipéptido en la lista de secuencias, las SEQ ID n.º 1, 2 ó 3.

Breve explicación de los dibujos

Figura 1: análisis por transferencia Northern de la expresión del ARNm del Delta-2 humano en órganos humanos.

Figura 2: unión de HD2EXIG de la presente invención, y de HD1EXIG como un control, a la estirpe celular Jurkat de tipo linfocitos T de origen humano.

Figura 3: unión de HD2EXIG de la presente invención, y de HD1EXIG como un control, a los linfocitos CD34+ de las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical humano.

Realizaciones de la invención

Los siguientes ejemplos ilustran las realizaciones de la presente invención, pero no se interpretarán como ejemplos limitadores.

Ejemplo de referencia 1

Clonación de productos de PCR utilizando el cebador del Delta-1 humano y determinación de la secuencia de bases

Se utilizaron cebadores mixtos que corresponden a la secuencia de aminoácidos conservada en C-Delta-1 y X-Delta-1, es decir, el cebador sentido DLTS1 (lista de secuencias, SEQ ID n.º 6) y el cebador antisentido DLTA2 (lista de secuencias, SEQ ID n.º 7).

Se preparó un oligonucleótido sintético utilizando un sintetizador de ADN automático con el principio del método de inmovilización. El sintetizador automático de ADN utilizado fue 391PCR-MATE de Applied Biosystems Inc., EE. UU. Los nucleótidos, el vehículo inmovilizado con el nucleótido 3', la disolución y los reactivos se utilizan de acuerdo con las instrucciones del mismo fabricante. Se aisló el oligonucleótido del soporte después de finalizar la reacción de acoplamiento designada y de tratar el soporte unido al oligonucleótido, del que se retiró el grupo protector del extremo 5', con amoníaco líquido concentrado a temperatura ambiente durante una hora. Para retirar los grupos protectores del ácido nucleico y el ácido fosfórico, la disolución del reactivo que contenía el ácido nucleico se mantuvo en la disolución de amoníaco concentrado en el vial sellado a 55°C durante aproximadamente 14 horas. Cada oligonucleótido, del que se retiraron el soporte y los grupos protectores, se purificó utilizando un cartucho OPC de Applied Biosystems Inc., y se destriló utilizando ácido trifluoroacético al 2%. Se disolvió el cebador en agua desionizada para establecer la concentración final de 100 pmol/ μ l para la PCR después de la purificación.

La amplificación de estos cebadores por PCR se realizó como sigue. Se utilizó 1 μ l de una disolución mixta de ADNc procedente de cerebro fetal de humanos (QUICK-Clone cDNA, CLONTECH Inc., EE. UU.). Se añadieron a ésta 5 μ l de una disolución de tampón a 10X [KCl a 500 mM, Tris-HCl a 100 mM (pH 8,3), MgCl₂ a 15 mM, gelatina al 0,01%], 4 μ l de la mezcla de dNTP (Takara Shuzo Co., Japón), 5 μ l del cebador sentido DLTS1 (100 pmol/ μ l) que era específico para los vertebrados anteriores y 5 μ l del cebador antisentido DLTA2 (100 pmol/ μ l) y 0,2 μ l de TaqDNA polimerasa (AmpliTaq, Takara Shuzo Co., Japón, 5 U/ μ l) y, finalmente, se añadió agua desionizada para dar un total de 50 μ l. Se realizó la PCR mediante 5 ciclos de un ciclo que consiste en un tratamiento a 95°C durante 45 segundos, a 42°C durante 45 segundos y a 72°C durante 2 minutos, 35 ciclos más de un ciclo que consiste en un tratamiento a 95°C durante 45 segundos, a 50°C durante 45 segundos y a 72°C durante 2 minutos y, finalmente, se mantuvo a 72°C durante 7 minutos. Una parte de los productos de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñó con bromuro de etidio (Nippon Gene Co., Japón) y se observó a la luz ultravioleta para confirmar la amplificación del ADN de unos 400 pb.

La cantidad total del producto de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% preparada con agarosa de bajo punto de fusión (GIBCO BRL Inc., EE. UU.), se tiñó con bromuro de etidio, se recortaron las bandas de aproximadamente 400 pb de los productos de la PCR con el cebador del Delta a la luz ultravioleta, se añadió el mismo volumen de agua destilada que de gel, se calentó a 65°C durante 10 minutos y el gel se disolvió completamente. El gel disuelto se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos para separar la disolución del sobrenadante después de añadir un volumen igual de fenol saturado con TE (Nippon Gene Co., Japón) y se realizó la misma operación de separación después de añadir una disolución de fenol:cloroformo saturado con TE (1:1) y cloroformo. Se recuperó el ADN de la disolución final por precipitación en etanol.

Se utilizó un vector, el vector pCRII (Invitrogen Inc., EE. UU., a continuación, se designa como pCRII). Se mezclaron el vector y el ADN anterior a una proporción molar de 1:3 y se ligó el ADN con el vector utilizando la T4 ADN ligasa (Invitrogen Inc., EE.UU.). El pCRII, en el que se integró el ADN, se sometió a transducción génica en una dosis de células competentes de *E. coli* (Invitrogen Inc., EE. UU.) y se extendió en placas de medio semisólido de L-Broth (Takara Shuzo Co., Japón) que contienen ampicilina (Sigma Corp., EE.UU.) a 50 μ g/ml y se mantuvieron a 37°C durante unas 12 horas. Las colonias que aparecieron se seleccionaron aleatoriamente, se inocularon en 2 ml del medio L-Broth líquido que contenía la misma concentración de ampicilina y se cultivaron con agitación a 37°C durante 18

horas. Se recuperaron las células bacterianas cultivadas y se separó el plásmido utilizando Wizard Miniprep (Promega Inc., EE. UU.) de acuerdo con la hoja de instrucciones que lo acompaña. El plásmido se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*. La integración de dicho producto de PCR se confirmó mediante la inserción de un ADN de unas 400 pb. La secuencia de bases del ADN incorporado en el clon confirmado se determinó con el secuenciador de ADN por fluorescencia (modelo 373S, Applied System Inc., EE. UU.).

Ejemplo de referencia 2

Clonación del Delta-1 humano de longitud completa y su análisis

Se realizó un cribado de los clones que tienen el ADNc de longitud completa mediante la hibridación de una genoteca de ADNc procedente de placenta humana (ADNc insertado en λ gt-11, CLONTECH Inc., EE. UU.) en placas que corresponden a 1×10^6 calvas. Las calvas generadas se transfirieron a un filtro de nilón (HybondN+: Amersham Inc., EE. UU.). El filtro de nilón transferido se sometió a tratamiento alcalino [se mantuvo durante 7 minutos en un papel de filtro empapado con una mezcla de NaCl a 1,5 M y NaOH a 0,5 M], le siguieron dos tratamientos neutralizantes [se mantuvo durante 3 minutos sobre el papel de filtro empapado con una mezcla de NaCl a 1,5 M, Tris-HCl a 0,5 M (pH 7,2) y EDTA a 1 mM]. Posteriormente, se agitó el filtro durante 5 minutos en la disolución de SSPE concentrada 2 veces [NaCl a 0,36 M, fosfato de sodio a 0,02 M (pH 7,7) y EDTA a 2 mM], se lavó y se secó al aire. A continuación, se mantuvo el filtro de nilón durante 20 minutos sobre el papel de filtro, que estaba empapado con NaOH a 0,4 M, y se agitó durante 5 minutos y se lavó con una disolución de SSPE concentrada 5 veces y luego se secó al aire de nuevo. Se realizó el cribado en la sonda del Delta-1 humano, marcada con el radioisótopo ^{32}P utilizando estos filtros.

La sonda de ADN preparada en el ejemplo de referencia 1 se marcó con ^{32}P del modo siguiente. Se recortó un fragmento de ADN de pCRII con *EcoRI*, se introdujo un producto de PCR purificado (unas 400 pb) mediante el cebador del Delta-1 humano y una secuencia génica determinada, y se aisló a partir del gel de agarosa de bajo punto de fusión. El fragmento de ADN obtenido de esta manera se marcó mediante el equipo o kit de marcación de ADN (sistema de marcación de ADN de Megaprime: Amersham, EE. UU.). Se añadieron 5 μl de la disolución del cebador y agua desionizada a los 25 ng de ADN para dar un volumen total de 33 μl , que se trató durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo. Se le añadieron a ésta 10 μl de una disolución de reacción tamponada que contenía dNTP, 5 μl de α - ^{32}P -dCTP y 2 μl de una disolución de T4 ADN polinucleótido cinasa, tratada a 37°C durante 10 minutos en un baño de agua. Posteriormente, se purificó la mezcla por columna de Sephadex (Quick Spin Column Sephadex G-50: Boehringer Mannheim Inc., Alemania), luego se trató durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo y se enfrió en hielo durante 2 minutos para utilizarla.

Se realizó la hibridación como sigue. Se introdujo el filtro preparado anteriormente en la disolución de prehibridación que consiste en una disolución de SSPE, una concentración final de cada componente que se establece a una concentración de 5 veces, una concentración de 5 veces de la disolución de Denhardt (Wako Pure Chemicals, Japón), SDS al 0,5% (dodecil-sulfato de sodio, Wako Pure Chemicals, Japón) y ADN de esperma de salmón (Sigma, EE.UU.) a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ desnaturalizado en agua hirviendo, y se agitó a 65°C durante 2 horas, luego se introdujo el filtro en la disolución de hibridación con la misma composición de la disolución de prehibridación anterior que contiene la sonda marcada con ^{32}P mediante el método descrito en lo anterior y se agitó a 65°C durante 16 horas para realizar la hibridación.

Se sumergió el filtro en una disolución de SSPE que contiene SDS al 0,1%, se agitó a 55°C y se lavó dos veces, se sumergió otra vez en una dilución 10X de una disolución de SSPE que contiene SDS al 0,1% y se lavó cuatro veces a 55°C. Se realizó una autorradiografía del filtro lavado utilizando una pantalla amplificadora. Se recogieron los clones con una señal muy intensa, y las calvas obtenidas se extendieron de nuevo y se cribaron mediante el mismo método descrito anteriormente para aislar los clones individuales completos.

Los clones de los fagos aislados de esta manera fueron siete clones. El fago de todos estos clones se preparó a aproximadamente 1×10^9 ufp, se purificó el ADN del fago utilizando Withered Lambda Rep (Promega Corp., EE. UU.), se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y se introdujo en el pBluescript KS (Stratagene Inc., EE. UU.), que fue digerido con *EcoRI* del mismo modo. Las secuencias de ADN de ambos extremos de estos clones se analizaron mediante el secuenciador de ADN. Tres clones de D5, D6 y D7 fueron el clon que contenía la secuencia del ADN desde la posición n.º 1 hasta la 2244 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 8. Un clon D4 era un clon que contenía una secuencia de ADN desde la n.º 999 hasta la 2663 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 8. Los clones D5 y D4 sirvieron para preparar el mutante de delección utilizando el kit de delección de kilosecuencias (Takara Shuzo Co., Japón) de acuerdo con una descripción del folleto que lo acompaña. La secuencia de bases del ADNc de longitud completa de la presente invención se determinó utilizando el secuenciador de ADN desde ambos extremos en dirección 5' y en dirección 3'.

Empleando el sitio *XhoI* en el n.º 1214 de la secuencia de ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 8, se digirieron D4 y D5 con la enzima de restricción *XhoI* para preparar el plásmido pBSDel-1 que contiene la secuencia de ADN de longitud completa en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 8.

ES 2 284 205 T3

Ejemplo 1

Clonación del ADNc del nuevo Delta-2 humano

5 La clonación del gen del homólogo del nuevo Delta humano se realizó utilizando la sonda del gen del Delta-1 humano en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 8.

10 La sonda se preparó por PCR utilizando un molde del gen de longitud completa del Delta-1 humano pBSDel-1 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 8, obtenido en el ejemplo de referencia 2, o el vector pUCDL-1F, que se ha depositado en la institución descrita anteriormente. Se utilizaron como cebadores un cebador sentido en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 9 (secuencia de ADN que corresponde a una secuencia desde el n.º 636 hasta el 655 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 8), y un cebador antisentido en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 10 (una cadena complementaria de la secuencia del ADN que corresponde a la secuencia desde el n.º 1332 hasta el 1351 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 8).

15 Una composición de la disolución para la amplificación por PCR fue una composición de una disolución tal como se describió en el ejemplo de referencia 1, excepto para el cebador y el molde. Se realizó la PCR en las siguientes condiciones: un ciclo que consiste en ciclar a 95°C durante 45 segundos, a 55°C durante 45 segundos y a 72°C durante 2 minutos, un ciclo que se realizó durante 30 ciclos y, finalmente, se mantuvo la mezcla a 72°C durante 7 minutos. 20 Una parte del producto de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, se tiñó con bromuro de etidio (Nippon Gene Corp., Japón), y se observó a la luz ultravioleta para confirmar la amplificación del ADNc de unos 700 pb.

25 El producto de la PCR se recortó del gel de agarosa, y la sonda del ADN se purificó de acuerdo con una descripción del folleto que acompaña al kit Geneclean II (Bio101 Corp., EE. UU.) y se diluyó con agua destilada a 25 ng/μl para preparar la sonda del ADN que tiene la secuencia que se muestra en la lista de secuencias: la SEQ ID n.º 11.

30 Una genoteca de ADNc de pulmón fetal humano preparada en λgt10 (Clontech Corp., EE. UU.) se cribó utilizando la sonda anterior de acuerdo con un método descrito en el ejemplo de referencia 2. En el cribado, se realizó una hibridación a 55°C durante 16 horas, con unas condiciones de lavado por inmersión en una disolución de SSC que contiene SDS al 1%, agitación a temperatura ambiente y seis lavados. Además, se realizó una condición de inmersión en una disolución de SSC, que estaba diluida 3 veces y que contenía SDS al 0,1%, y lavado a 55°C.

35 Se cribaron unos 120 millones de placas en el primer cribado en las condiciones anteriores y, como resultado, se determinó que unas 120 calvas eran positivas y se sometieron a un segundo cribado mediante el mismo método para separar cada fago.

40 El ADN de fago aislado se purificó de acuerdo con un método en el ejemplo de referencia 2, se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*, se ligó a un pBluescript KS y se analizó la secuencia del ADN mediante un secuenciador de ADN por el mismo método que se describió en el ejemplo de referencia 1.

45 Aproximadamente la mitad de los clones era el Delta-1 humano que tenía la secuencia génica en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 8. Entre éstos, se encontraron cinco clones, que eran similares pero que tenían una secuencia génica diferente de la del Delta-1 humano, que contienen nuevas secuencias, y que no se encontraron en el GenBank versión 98 mediante el programa informático Genetyx CD, versión 36 (Software Development Corp.). El mutante de delección de la secuencia del ADN de estos clones se preparó utilizando el kit de delección de kilosecuencias (Takara Shuzo Co., Japón) de acuerdo con el manual de instrucciones que lo acompaña. La secuencia de las bases del ADN de longitud completa de la presente invención se determinó desde ambos extremos en dirección 5' y en dirección 3', combinándose con el método de paseo con cebadores utilizando dicho secuenciador de ADN.

50 Como resultado, el clon 4A codifica la secuencia del gen desde el n.º 526 hasta el 3339 de la secuencia del ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4 (a condición de que esté delecionada la secuencia desde el n.º 1296 hasta el 1515); el clon 22 codifica la secuencia del gen desde el n.º 1029 hasta el 3213 de la secuencia del ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4; el clon 65 codifica la secuencia del gen desde el n.º 754 hasta el 3228 de la secuencia del ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4; el clon 90 codifica la secuencia génica desde el n.º 552 hasta el 2618 de la secuencia del ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4; y el clon 105 codifica la secuencia del gen desde el n.º 669 hasta el 3339 de la secuencia del ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4 (a condición de que en el clon 105, ya que se observaron muchas inserciones de secuencias desconocidas en muchas regiones, las cuales no se encontraron en los otros clones, pudiera originarse desde el ARNm previo de ajuste inmaduro). Además, en el clon 60 65, la citosina del n.º 2294 de la secuencia de ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4, se reemplazó por timina. Por lo tanto, la serina del n.º 647 de la secuencia del ADN en la lista de secuencias se reemplazó por treonina.

65 Sin embargo, estos clones no contenían la secuencia génica que codificaba la secuencia de aminoácidos de longitud completa, lo que hizo preparar una nueva sonda y repetir el cribado.

Se preparó una sonda nueva por PCR utilizando como molde el clon 4A que se aisló en el procedimiento anterior. Se preparó una sonda utilizando el cebador sentido en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 12 (que corresponde a una secuencia desde el n.º 526 hasta el 545 de la secuencia del ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4), y

el cebador antisentido en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 13 (que corresponde a una secuencia desde el n.º 918 hasta el 937 de la secuencia del ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4), de la misma manera que se describió previamente. La secuencia del ADN de esta sonda se muestra en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 14.

5 El cribado de la genoteca de ADNc utilizando la sonda se realizó igual que el procedimiento del primer cribado. Con tal de que la hibridación se realice a 65°C durante 16 horas, el lavado se realizó sumergiendo en una solución de SSC que contiene SDS al 0,1% con agitación a temperatura ambiente, y una inmersión adicional en una solución de SSC diluida 10X que contiene SDS al 0,1% con dos lavados a 65°C.

10 Mediante el cribado se identificaron nuevos clones. Como resultado de la determinación de la secuencia del gen, se determinaron el clon P que tenía la misma secuencia que el ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4, y el clon RA que tiene la secuencia del ADN desde el n.º 263 hasta el 2768 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4. Se aislaron estos dos clones y se identificaron como clones que codificaban la proteína Delta-2 humana nueva de longitud completa. Un vector que contiene el clon P, el cual se liga en el sitio *EcoRI* del pBluescript KS, se denominó
15 pBSDL-2.

Ejemplo 2

20 *Órganos que expresan el nuevo Delta-2 humano*

Para buscar la expresión del ARNm del nuevo Delta-2 humano, se realizó la hibridación de acuerdo con el manual de instrucciones que acompaña a los filtros usados para detectar la expresión, usando filtros de Human Multiple Tissue Northern Blot, Human Multiple Tissue Northern Blot II, Human Multiple Tissue Northern Blot III y Human Fetal Multiple Tissue Northern Blot II (Clontech Corp., EE. UU.), para lo que se transcribió previamente el ARNm y se
25 realizó la marcación con ³²P mediante el método mencionado con anterioridad usando el kit de marcación de ADN mencionado previamente (Megaprime DNA labeling system (Sistema de marcación de ADN Megaprime): Amersham Corp., EE. UU.) usando como sonda el ADN que tiene la secuencia en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 14, descrita en el ejemplo 1. El resultado se muestra en la figura 1.

30 Como resultado, se encontraron dos tipos de ARNm expresados que tenían una longitud aproximada de 3,8 kpb y 5 kpb. El corazón fue el sitio de expresión en el que la expresión era más fuerte en los tejidos adultos humanos. Se observaron expresiones relativamente fuertes en la placenta, el ovario, el intestino delgado, la glándula tiroides y la médula espinal. Se observó una expresión clara en el músculo esquelético, el pulmón, el hígado, el páncreas, el timo, la próstata, los nódulos linfáticos, la tráquea, la glándula suprarrenal y la médula ósea. Se observaron expresiones
35 extremadamente débiles en el estómago, el bazo y el colon. No se observó expresión alguna en el cerebro, el riñón, el testículo y los linfocitos de la sangre periférica. Entre los tejidos fetales humanos se observó una expresión muy elevada en el pulmón fetal. Se observó una expresión fuerte en el riñón fetal y se observaron expresiones débiles en el hígado fetal y el cerebro fetal.

40 Estos resultados indican que el nuevo Delta-2 humano de la presente invención podría tener una función relacionada con el corazón en el adulto. Además, podría funcionar frente a las células vasculares debido al hallazgo de expresión en el pulmón fetal.

45 Ejemplo 3

Preparación de vectores de expresión del nuevo Delta-2 humano

Se prepararon los vectores de expresión de las proteínas Delta-2 humanas mencionadas en los siguientes puntos 1) a 5) usando el vector pBSDL-2 que codifica el nuevo Delta-2 humano de longitud completa del ejemplo 1. La adición
50 de sitios para enzimas de restricción y la inserción de secuencias cortas del gen se realizaron con el kit ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis (Stratagene Inc., EE. UU.) de acuerdo con el manual de instrucciones.

1) *Vector de expresión de la nueva proteína Delta-2 humana secretada (HD2EX)*

55 El ADNc que codifica el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos desde el n.º 1 hasta el n.º 500 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 2, se ligó con el vector de expresión pcDNA3 que contiene el promotor del citomegalovirus y el gen de resistencia a la neomicina para preparar el vector de expresión.

60 Para preparar el vector de expresión del nuevo Delta-2 humano, de manera que la expresión del producto génico sea estable, se añadió el sitio *EcoRI* a los 20 pb del codón de iniciación cadena arriba en sentido 5' (secuencia génica n.º 277 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4). Usando el kit Mutagenesis anterior, se utilizaron como molde un plásmido pBSDL-2, que contiene la secuencia de ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4, y el ADNc de longitud completa del Delta-2 humano, y se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos que tienen las secuencias
65 génicas en la lista de secuencias, las SEQ ID n.º 15 y SEQ ID n.º 16. A continuación, se preparó la adición del sitio *EcoRI* al ADN a 20 pb cadena arriba en dirección 5'. A continuación, este plásmido se denominará pBSEcoDL-2.

ES 2 284 205 T3

Luego, para añadir el codón de terminación y el sitio para la enzima de restricción *NotI* después de la posición extremo C extracelular, es decir, después de la secuencia del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos hasta el resto de serina n.º 500 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 2, se realizaron la adición del codón de terminación y el sitio *NotI* utilizando de manera similar el kit Mutagénesis, con el pBSEco-DL-2 como molde y cebando con los oligonucleótidos que tienen las secuencias génicas en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 17 y la SEQ ID n.º 18, como cebadores. A continuación, el vector resultante fue digerido por *EcoRI* y *NotI*, y el fragmento escindido del gen de unas 1600 pb se ligó con el pcDNA3, que se trató con las mismas enzimas de restricción, para construir el vector de expresión. Este vector se denominó pHD2EX.

2) Vector de expresión de la proteína quimérica FLAG del nuevo Delta-2 humano secretado (HD2EXFLAG)

El ADNc que codifica la proteína quimérica que tiene la secuencia de aminoácidos desde el n.º 1 hasta el 500 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 2, y, en este extremo C, se ligó la secuencia FLAG con el vector de expresión pcDNA3 para preparar el vector de expresión.

Utilizando pBSEco-DL-2 como molde, se añadió la secuencia FLAG en el extremo C extracelular, es decir, después del resto de serina en el aminoácido n.º 500 en la lista de secuencias: la SEQ ID n.º 2. Luego, para añadir el codón de terminación y el sitio para la enzima de restricción *NotI*, utilizando el kit Mutagénesis, y poniendo los oligonucleótidos que tienen secuencias génicas en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 19 y la SEQ ID n.º 18 como cebadores, se añadieron en el extremo C un gen que codifica una secuencia FLAG, un codón de terminación y un sitio *NotI*. Este vector fue digerido por *EcoRI* y *NotI*, y se ligó el fragmento escindido del gen de unas 1600 pb con el pcDNA3 tratado de manera similar con las enzimas de restricción para construir el vector de expresión. Este vector se denominó pHD2EXFLAG.

3) Vector de expresión de la proteína quimérica IgG1Fc del Delta-2 humano secretado (HD2EXIg)

Una secuencia génica que codifica el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 2, y, en este extremo C, una secuencia de aminoácidos de la región Fc cadena abajo desde la región bisagra de la IgG1 humana, se ligó al vector de expresión pcDNA3 para preparar el vector de expresión.

La preparación de la proteína fusionada con la región Fc de la inmunoglobulina se realizó de acuerdo con el método de Zettlmeissl y otros (Zettlmeissl y otros, *DNA cell Biol.*, 9, 347-354, 1990). Se aplicó un gen que utiliza un ADN genómico con intrones y se preparó dicho gen por PCR.

El ADN del genoma humano se utilizó como molde y la secuencia génica genómica que codifica la región humana de la IgG1Fc se sometió a PCR utilizando como cebadores un oligonucleótido que tiene la secuencia en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 23, con el sitio para la enzima de restricción *BamHI* y un oligonucleótido que tiene la secuencia en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 24, con el sitio para la enzima de restricción *XbaI*. Se purificó la banda obtenida de esta manera de unas 1,4 kpb y se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *XbaI* (Takara Shuzo Co., Japón), y se ligaron los genes con el pBluescript, que se había tratado de manera similar con la enzima de restricción, utilizando la T4 DNA ligasa para realizar la subclonación.

A continuación, se purificó el ADN del plásmido y se confirmó la secuencia génica utilizando un secuenciador y, luego, se confirmó dicha secuencia génica como ADN genómico en la región bisagra de la cadena pesada de la IgG1 humana (la secuencia se refiere a la de Kabat y otros, *Sequence of Immunological Interest*, publicación del NIH n.º 91-3242, 1991). Es decir, este gen tiene el sitio para la enzima de restricción *BamHI* en el extremo 5' y el sitio para *XbaI* en el extremo 3', y está clonado en el sitio *BamHI* y el sitio *XbaI* del pBluescript KS. A partir de ahora, este plásmido se denomina pBShIgFc.

Utilizando el pBSEco-DL-2 como molde, y utilizando el kit Mutagenesis, se añadió el sitio para la enzima de restricción *BamHI* en el extremo C extracelular, es decir, después de la serina en el n.º 500 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 3. Además, para añadir el sitio para la enzima de restricción *NotI* cadena abajo para ligar el ADN que codifica la IgG1Fc de la inmunoglobulina humana anterior, se añadieron estos sitios utilizando oligonucleótidos que tienen las secuencias génicas en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 20 y la SEQ ID n.º 18, y el kit Mutagenesis. Durante este procedimiento, para no cambiar la fase que codifica los aminoácidos como resultado de la adición del sitio *BamHI*, se reemplazó por TCG el AGC en la secuencia de ADN que codifica la serina n.º 500 de la secuencia del ADN en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4.

El vector preparado de esta manera se digirió por *NotI* y *BamHI*, y un fragmento del gen de unas 1200 pb digerido y escindido del pBShIgFc anterior por *NotI* y *BamHI* se ligó al vector digerido para preparar finalmente el vector que contiene los fragmentos del gen que codifican la proteína quimérica IgG1Fc del Delta-2 humano secretado objetivo. Finalmente, este vector se digirió por *EcoRI* y *NotI*, y el fragmento escindido del gen de unas 3000 pb se ligó al pcDNA3, que se había tratado de manera similar con las enzimas de restricción, para construir el vector de expresión. Este vector se denominó pHD2EXIg.

4) *Vector de expresión de la proteína del nuevo Delta-2 humano de longitud completa (HD2F)*

El ADNc que codifica el polipéptido desde el n.º 1 hasta el 659 de la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 4, se ligó al vector de expresión pcDNA3 para preparar el vector de expresión.

Para añadir el codón de terminación y el sitio para la enzima de restricción *NotI* en el extremo C de la secuencia de longitud completa, es decir, después de la Val en el n.º 659 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 3, utilizando el pBSEco-DL-2 como molde, y utilizando el kit Mutagenesis de manera similar, se pusieron como cebadores los oligonucleótidos que tienen las secuencias génicas en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 21 y la SEQ ID n.º 18, y se añadieron el codón de terminación y el sitio *NotI* en el extremo C. Este vector se digirió por *EcoRI* y *NotI*, y el fragmento escindido del gen de unas 2200 pb se ligó al pcDNA3, que se había tratado de manera similar con las enzimas de restricción, para construir el vector de expresión. Este vector se denominó pHD2F.

5) *Vector de expresión de la proteína quimérica del nuevo Delta-2 humano de longitud completa y FLAG (HD2FLAG)*

El ADNc que codifica la proteína quimérica, que tiene una secuencia de aminoácidos desde el n.º 1 hasta el 659 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 3, y, en este extremo C, se ligó la secuencia FLAG al vector de expresión pcDNA3 para preparar el vector de expresión.

Para añadir la secuencia de FLAG, el codón de terminación y el sitio para la enzima de restricción *NotI* en el extremo C, utilizando el pBSEco-DL-2 como molde, se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos que tienen las secuencias génicas en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 22 y la SEQ ID n.º 18, y se añadieron en el extremo C una secuencia génica que codifica la FLAG y el codón de terminación, así como el sitio *NotI*.

Este vector fue digerido por *EcoRI* y *NotI*, y los fragmentos escindidos del gen de unas 2100 pb se ligaron al pcDNA3, que se había tratado de manera similar con las enzimas de restricción, para construir el vector de expresión. Este vector se denominó pHD2FLAG.

Ejemplo 4

Transferencia génica de los vectores de expresión a las células y expresión

Los vectores de expresión preparados en el ejemplo 3 se transfirieron a las células COS-7 (obtenidas del banco de células RIKEN, Instituto de Investigación Físico-Química, Japón, RCB0539).

Se realizó el cultivo de células antes de la transferencia génica cultivando en D-MEM 100% FCS (medio de Eagle modificado de Dulbecco, GIBCO-BRL Inc., EE. UU.). Un día antes de la transferencia génica, se cambió el medio de las células para ajustar los recuentos celulares a 5×10^5 células/ml y se cultivó durante una noche. El día de la transferencia génica, se sedimentaron las células por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS (-) por centrifugación y se prepararon a 1×10^7 células/ml en $MgCl_2$ a 1 mM y PBS (-). Se realizó la transferencia génica mediante electroporación utilizando el dispositivo de transferencia génica Gene-pulsar (BioRad Inc., EE. UU.). Se recogieron los 500 μ l de la suspensión de células anterior en una cubeta exclusivamente para electroporación (0,4 cm), se añadieron 20 μ g del vector de expresión y se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Después, se cargó dos veces el voltaje en la condición de 3 μ F, 450 V y, entre las dos descargas, se mantuvo la mezcla de células a temperatura ambiente durante 1 minuto. Después de mantenerlas 5 minutos en hielo, se extendieron las células en el medio de cultivo, diámetro de 10 cm donde se han añadido previamente 10 ml de medio, y se cultivaron a 37°C en un incubador de dióxido de carbono al 5%.

Al día siguiente, se retiró la disolución del sobrenadante del cultivo y se lavaron las células adheridas a la placa dos veces con 10 ml de PBS (-). En el caso de los vectores de expresión pHD2EX, pHD2EXFLAG y pHD2EXIg, se añadieron 10 ml de D-MEM sin suero y se cultivaron otros 7 días. Se recuperó la disolución del sobrenadante de cultivo y se reemplazó el tampón con PBS (-) mediante Centricon 30 (Amicon Inc., EE. UU.) y, simultáneamente, se concentró 10 veces la disolución para obtener la disolución del sobrenadante de las células cultivadas.

En los casos de pHD2F y pHD2FLAG, se cambió el medio por D-MEM con STF al 10%, y se cultivó 3 días más para preparar el lisado de células. Así, se suspendieron 2×10^6 células en 200 μ l del tampón de lisis celular [Hepes a 50 mM (pH 7,5), Tritón X100 al 1%, glicerol al 10%, EDTA a 4 mM, aprotinina a 50 μ g/ml, leupeptina a 100 μ M, pepstatina A a 25 μ M y PMSF a 1 mM], se mantuvieron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos para retirar la disolución del sobrenadante para obtener el lisado de células.

Utilizando las muestras obtenidas así, se detectó la expresión de las proteínas mediante análisis de inmunotransferencia.

A saber, los sobrenadantes de cultivo concentrados o los lisados de células se sometieron a SDS-PAGE utilizando un tanque de electroforesis y gel de poliacrilamida para SDS-PAGE (gel en gradiente del 5 al 20%) (ACI Japan Inc., Japón) de acuerdo con el manual de instrucciones que lo acompaña. Se prepararon las muestras tratándolas en agua hirviendo durante 5 minutos con 2-mercaptoetanol (2-ME) como reductor, y una condición no reducida no sometida

al tratamiento anterior. Como marcadores, se utilizó el Rainbow Marker (de masas moleculares elevadas, Amersham Inc.). Se prepararon la disolución del tampón de la muestra y el tampón de electroforesis según el manual que lo acompaña. Cuando se acabó la SDS-PAGE, se transfirió el gel de acrilamida a un filtro de membrana de PVDF (BioRad Inc., EE. UU.) utilizando el Mini Trans Blot Cell (BioRad Inc.).

El filtro preparado así se agitó durante una noche a 4°C en Blockace (Dainippon Pharm. Co., Japón) o en TBS-T [Tris a 20 mM, NaCl a 137 mM (pH 7,6) y Tween 20 al 0,1%] que contiene seroalbúmina bovina al 5% (Sigma Co., EE. UU.) para bloquear. Después, de acuerdo con la explicación del manual que acompaña al sistema ECL (Amersham Inc., EE. UU.) de detección de los análisis de inmunotransferencia, se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal de ratón contra el Delta-2 humano descrito en el ejemplo 6 o el anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG M2 (Kodak Inc. EE. UU.) contra la quimera con FLAG (HD2EXFLAG Y HD2FLAG), y se hizo reaccionar el anticuerpo de oveja anti-Ig de ratón marcado con peroxidasa (Amersham Corp., EE. UU.) como anticuerpo secundario. En el caso de la quimera de IgG, se hicieron reaccionar los anticuerpos de oveja anti-Ig humana marcados con peroxidasa (Amersham Inc., EE. UU.).

El tiempo de reacción para los anticuerpos fue de 1 hora a temperatura ambiente y, en un intervalo de cada reacción, se realizó el lavado agitando 10 minutos con TBS-T a temperatura ambiente por 3 veces. Después del lavado final, se introdujo el filtro en la disolución de reacción del sistema ECL (Amersham Inc., EE.UU.) de detección de los análisis de inmunotransferencia durante 5 minutos, y se envolvió en una película envolvente de cloruro de polivinilideno para radiografiarlo.

Como resultado, en la muestra con el tratamiento reductor, las bandas que muestran una proteína obtenida por transferencia de pHD2EX y pHD2EXFLAG se detectaron como una banda de unos 65 kDa, y una proteína obtenida por transferencia del pHD2EXIg se detectó como una banda de unos 95 kDa. En la muestra sin reducción, las bandas que muestran una proteína obtenida por transferencia del pHD2EXIg se detectaron como bandas con una ligera estela de 150 kDa a 200 kDa, principalmente de unos 180 kDa, que mostraron aproximadamente el doble que con la etapa de reducción y, en consecuencia, no se formó el dímero.

Sin embargo, en estos experimentos, aunque se probaron el lisado de células y el sobrenadante del cultivo de las células COS-7, al que se le transfirió el vector pcDNA3 como control, no se detectó ninguna banda que reaccionara frente al anticuerpo monoclonal de ratón contra el Delta-2 humano, el anticuerpo anti-FLAG y el anticuerpo anti-Ig humana.

Por lo tanto, estos cinco vectores de expresión pueden producir los polipéptidos objeto de la invención.

Ejemplo 5

Purificación de las proteínas del nuevo Delta-2 humano secretado de las células con el gen transferido

Se prepararon a gran escala los sobrenadantes cultivados de las células COS-7 que contienen HD2EXFLAG o HD2EXIg, cuya expresión se detectó mediante el método del ejemplo 4, y se purificó cada proteína quimérica por columna de afinidad.

En el caso de HD2EXFLAG, 2 litros del sobrenadante del cultivo obtenido mediante el método del ejemplo 4 se pasaron a través de una columna empaquetada con Anti-FLAG M2 Affinity Gel (Eastman Kodak, EE. UU.) y se adsorbió la proteína quimérica en una columna mediante una reacción de afinidad entre la secuencia FLAG de la proteína quimérica y el anticuerpo anti-FLAG del gel. Se utilizó una columna, columna desechable (BioRad Inc., EE. UU.) con un diámetro interior de 10 mm, empaquetando 5 ml del gel anterior. Se estableció un sistema de circulación que consiste en frasco con el medio → columna → bomba peristáltica → frasco con el medio. Se puso en marcha la circulación con un flujo de 1 ml/min durante 72 horas. Después se lavó la columna con 35 ml de PBS (-) y se eluyó con 50 ml de Tris-glicina a 0,5 M (pH 3,0). El eluido de 25 fracciones, cada 2 ml, se recogió en el tubo y se neutralizó cada fracción con 200 μ l de Tris-HCl a 0,5 M (pH 9,5) que se había añadido previamente a cada tubo.

La fracción del eluido, cada 10 μ l de la proteína quimérica FLAG secretada, que se purificó mediante el método anterior, se sometió al tratamiento de reducción descrito en el ejemplo 4. Se realizó la electroforesis de SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida en gradiente del 5 al 10%. Después de acabar la electroforesis, se tiñó con plata utilizando el kit II de tinción con placa de Wako (Wako Pure Chemicals, Japón) de acuerdo con la explicación del manual que lo acompaña. Como resultado, se detectó una banda de HS2EXFLAG en las fracciones de eluido desde el n.º 4 hasta el 8. La masa molecular del mismo fue idéntica al resultado del análisis de inmunotransferencia con el anticuerpo anti-FLAG obtenido en el ejemplo 4. Por lo tanto, se obtuvo una HD2EXFLAG purificada.

En la proteína quimérica del IgG1Fc, es decir, HD2EXIg, se absorbieron 2 litros del sobrenadante de cultivo a la columna de Sepharose con proteína A (Pharmacia Inc., Suecia) de acuerdo con el mismo método usado con la proteína quimérica FLAG para recoger las fracciones del eluido. Utilizando una parte del eluido al igual que en la proteína quimérica FLAG, se llevó a cabo una determinación de la fracción del eluido, identificación del tamaño y detección de la pureza mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con plata en la condición reducida. Como resultado, se detectaron bandas en la fracción del eluido desde el n.º 4 al 15. Su tamaño es idéntico al resultado del análisis de inmunotransferencia utilizando anti-Ig humana. Por lo tanto, se obtuvo la HD2EXIg purificada.

Además, se analizó en detalle la masa molecular del HD2EXFLAG así purificado mediante SDS-PAGE. Se confirmó la masa molecular como dos bandas, una de las cuales era de 65,8 kDa y la otra era de 61,7 kDa. Estas dos bandas diferentes que tienen diferentes masas moleculares se transcribieron en PVDF de acuerdo con el método del ejemplo 4, y se determinaron diez aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del extremo N mediante un secuenciador de aminoácidos (ABI Corp., EE. UU.). Como resultado, cada secuencia de aminoácidos fue idéntica a la secuencia de aminoácidos desde el n.º 1 hasta el 10 en la lista de secuencias, la SEQ ID n.º 1. Este resultado indica que la diferencia de masa molecular se podría deber a diferencias en la cadena de azúcares unida. De forma similar, en la HD2EXIg purificada, se confirmaron dos bandas que tienen masas moleculares ligeramente diferentes y se piensa que se debía a la misma razón.

Ejemplo 6

Preparación del anticuerpo que reconoce el nuevo Delta-2 humano

Se utilizó como inmunógeno la HD2EXFLAG purificada mediante el método del ejemplo 5 y se inmunizaron conejos. Después de analizar el título del anticuerpo, se recogió toda la sangre y se obtuvo el suero. Se preparó anticuerpo policlonal de conejo anti-Delta-2 humano utilizando el kit Econopack (BioRad Inc., EE. UU.) de purificación de IgG de suero con referencia al manual de instrucciones que lo acompaña.

Se utilizó como inmunógeno la HD2EXFLAG purificada mediante un método descrito en el ejemplo 5 y se preparó el anticuerpo monoclonal de ratón de acuerdo con la explicación del manual. Por ratón inmunizado, se administraron 10 µg de la HD2EXFLAG purificada a ratones Balb/c (Nippon SLC CO., Japón) por vía intracutánea y subcutánea. Después de la segunda inmunización, se confirmó el aumento del título del suero recogiendo sangre por vía oftalmológica y se realizó la tercera inmunización. Posteriormente, se recogieron los esplenocitos de ratón y se fusionaron con células de mieloma de ratón P3X63Ag8 (ATCC TIB9) utilizando polietilenglicol. Se seleccionó el hibridoma en el medio HAT (Instituto de Investigaciones Biológicas e Inmunológicas, Japón), y, mediante inmunoensayo enzimático, se aislaron las cepas del hibridoma, que produjeron un anticuerpo que reconocía específicamente la región extracelular del nuevo Delta-2 humano en el medio. Se comprobaron las cepas del hibridoma que producen anticuerpos monoclonales de ratón que reconocieron específicamente el nuevo Delta-2 humano.

Se purificó y se preparó el anticuerpo monoclonal anti-Delta-2 humano nuevo de humanos utilizando Mab Trap GII (Pharmacia Inc., Suecia) de acuerdo con la explicación del manual de instrucciones que lo acompaña a partir del sobrenadante del hibridoma comprobado así.

Se preparó la columna de afinidad utilizando los anticuerpos monoclonales. La preparación de la columna de afinidad se realizó de acuerdo con el manual de instrucciones que acompaña a la columna Sephadex 4B activada con CNBr (Pharmacia Inc., Suecia). Se preparó una columna de 2 cm² x 1 cm que contenía 2 ml de gel. Una disolución concentrada del sobrenadante de las células COS-7 cultivadas, a las que se les transfirió el gen del pHD2EX, se pasó a través de la columna, para lo cual se unió el anticuerpo monoclonal anti-Delta-2 humano, a 20 ml/h, posteriormente se pasaron 15 ml de PBS (-) a la misma velocidad de flujo, y se lavó la columna. Finalmente, se eluyó el producto mediante una mezcla de acetato de sodio a 0,1 M y NaCl a 0,5 M (pH 4,0). Se recogió el eluido, en el que cada fracción era de 1 ml, y se neutralizó añadiendo 200 µl de Tris-HCl a 1 M (pH 9,1) a cada fracción.

La SDS-PAGE de cada proteína purificada se realizó en condiciones reductoras de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 4, seguida de tinción con plata y análisis de inmunotransferencia para estimar la masa molecular. Como resultado, se purificó la HD2EX de unos 65 kDa a partir del sobrenadante concentrado de las células COS-7 cultivadas, a las que se les transfirió el gen del pHD2EX. En consecuencia, la proteína del nuevo Delta-2 humano se puede purificar mediante columna de afinidad.

Ejemplo 7

Efectos de la HD2EXIg sobre la formación de colonias en las células de la sangre indiferenciadas

Para observar la acción fisiológica de la HD2EXIg sobre las células de la sangre indiferenciadas, se cultivaron linfocitos CD34+ en el medio semisólido sin suero en presencia de HD2EXIg y de citocinas conocidas, y se observó el número de células formadoras de colonias.

Se trató sangre de cordón umbilical humano o sangre de médula ósea normal humana de adulto mediante la disolución de sílice (Instituto de Investigaciones Biológicas e Inmunológicas, Japón) de acuerdo con el manual de instrucciones que le acompaña, luego se fraccionó la fracción celular de baja densidad (<1,077 g/ml) por centrifugación densitométrica del empaquetado de Ficoll (Pharmacia Inc., Suecia) para preparar células mononucleares, y se aislaron linfocitos CD34+ de sangre de cordón umbilical humano o de sangre de médula ósea normal humana a partir de las células mononucleares.

La separación de los linfocitos CD34+ se realizó utilizando Dynabeads M-450 CD34 y DETACHaBEADS CD34 (DynaL Inc., Noruega) de acuerdo con el manual de instrucciones que les acompaña. Después de la separación, se

midio la pureza de la siguiente forma. Se tiñeron las células con el anticuerpo HPCA2 anti-CD34 marcado con FITC (Beckton-Deckinson Inc., EE. UU.) y se examinaron por citómetro de flujo (FACSCalibur, Beckton-Deckinson, EE. UU.). Se confirmó una pureza por encima del 85% para la utilización.

5 Los linfocitos CD34+ aislados así se suspendieron homogéneamente para dar 400 células/ml en el medio de más abajo y se extendieron en una placa de 35 mm (Falcon Inc., EE. UU.), y luego se cultivaron durante 2 semanas en un incubador de dióxido de carbono a 37°C en dióxido de carbono al 5%, oxígeno al 5%, nitrógeno al 90% y humedad al 100%. Se contaron las colonias de sangre así formadas al microscopio de inversión.

10 Un medio utilizado es medio α (GIBCO-BRL, EE. UU.), que contiene seroalbúmina bovina desionizada al 2% (BSA, Sigma, EE. UU.), insulina humana a 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, EE. UU.), transferrina a 200 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, EE. UU.), 2-mercaptoetanol a 10^{-5} M (Nakarai Tesk Co., Japón), lecitina de soja a 160 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, EE. UU.), colesterol a 96 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, EE. UU.) y metilcelulosa al 0,9% (Wako Pure Chemicals, Japón).

15 Al medio anterior se le añadió la proteína quimérica extracelular de Ig con el nuevo Delta-2 humano (HD2EXIg) para obtener una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$. Para el control, se añadió IgG1 humana (Athens Research and Technology Inc., EE. UU.) a la misma concentración para observar el efecto de la región IgGfc.

20 Las condiciones de la adición simultánea de citocinas fueron las siguientes: SCF humano a 100 ng/ml (Intergen Inc., EE. UU.), IL-3 humana a 10 ng/ml (Intergen Inc., EE. UU.) e IL-6 humana a 100 ng/ml (Intergen Inc., EE. UU.).

25 Como resultado, en el grupo de control, el recuento de la formación de colonias fue 42 ± 5 por 400 células, y en el grupo al que se le añadió HD2EXIg, el recuento de la formación de colonias fue de 21 ± 3 , lo que demostró una supresión significativa de la formación de colonias. El resultado indica que el nuevo Delta-2 humano de la presente invención actúa sobre las células de la sangre indiferenciadas.

Ejemplo 8

Acción de HD2EXIg sobre las CI-CLP de las células de la sangre indiferenciadas en cultivo líquido sin suero

30 Para confirmar la acción fisiológica de la HD2EXIg sobre las células de la sangre indiferenciadas en cultivo líquido, se cultivaron linfocitos CD34+ mononucleares de sangre de cordón umbilical en un medio sin suero en presencia de HD2EXIg y de citocinas conocidas. El cultivo ha continuado durante 2 semanas y, a día de hoy en el cultivo de 2 semanas, se confirmaron los cambios en las CI-CLP, que se pensaba que eran principalmente células de la sangre indiferenciadas.

35 Para los estudios comparativos, se llevaron a cabo un experimento de control sin añadir HD2EXIg y un experimento añadiendo HD1EXIg, que era la proteína quimérica con IgG (HD1EXIg) y se encontró que tenía actividad sobre las CI-CLP en el experimento similar descrito en la patente internacional WO 97/19172 a nombre de los presentes inventores. 40 La preparación de HD1EXIg se realizó de acuerdo con la descripción de la patente internacional WO 97/19172.

45 Se cultivaron 16200 linfocitos CD34+ de los linfocitos mononucleares de sangre de cordón umbilical aislados mediante un método descrito en el ejemplo 7 en el medio que sigue. Se contó el número de CI-CLP en los cuatro grupos experimentales del grupo de precultivo, el grupo al que se le añadió HD2EXIg, el grupo al que se le añadió HD1EXIg y el grupo de control. También se contó el número de células y el número de células formadoras de colonias.

50 Se realizó el cultivo en el medio basal del medio α , al que se le añadieron BSA al 2%, insulina humana a 10 $\mu\text{g/ml}$, transferrina a 200 $\mu\text{g/ml}$, lipoproteína de baja densidad a 40 $\mu\text{g/ml}$, 2-mercaptoetanol a 10^{-5} M, SCF humano a 100 ng/ml, IL-3 humana a 10 ng/ml e IL-6 humana a 100 ng/ml. Al grupo al que se le añadió HD2EXIg, se le añadió 1 $\mu\text{g/ml}$ de HD2EXIg purificada; al grupo al que se le añadió HD1EXIg, se le añadió 1 $\mu\text{g/ml}$ de HD1EXIg purificada; y al grupo de control se le añadió la IgG1 humana anterior. El cambio del medio se realizó dos veces a la semana cambiando la mitad del volumen.

55 Se midieron las CI-CLP de acuerdo con el método de Sutherland y otros (*Blood*, 74, 1563-, 1989; *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 87, 3584-, 1990). Para los detalles, véase la patente internacional WO 97/18172 a nombre de los presentes inventores.

60 El recuento de células totales se midió contando el número de células vivas al microscopio utilizando azul de tripano (Gibco BRL, EE. UU.). El número de células formadoras de colonias se realizó de acuerdo con un método en el ejemplo 7 utilizando el medio que sigue. El medio es medio α , al que se le añaden suero de ternera fetal al 30% (STF, ICN Biomedical Japan, Japón), BSA al 1%, 2-mercaptoetanol a 10^{-5} M, metilcelulosa al 0,9% (Wako Pure Chemicals, Japón), SCF humano a 100 ng/ml, IL-3 humana a 10 ng/ml, IL-6 humana a 100 ng/ml, EPO humana a 2 U/ml (Chugai Seiyaku Co., Japón) y G-CSF humano a 10 ng/ml (Intergen Inc., EE. UU.).

65 El resultado se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

Efecto del Delta-2 humano de la presente invención sobre el medio líquido

Recuento de células totales	Células formadoras de colonias	CI-CLP
Grupo de precultivo	16200	2500
Grupo de poscultivo		
Control	445000	23000
HD1EXIg	395000	16700
HD2EXIg	418000	16000

El resultado indica que HD2EXIg tiene una actividad que mantiene el número de CI-CLP en comparación con el grupo de control. Además, la actividad es mayor que en HD1EXg.

Ejemplo 9

Unión y separación de la HD2EXIg por las células de la sangre indiferenciadas

Se estudió la unión de la HD2EXIg purificada con la estirpe Jurkat de células de la sangre de tipo linfocito T humano y linfocitos CD34+ de la sangre mononucleares de cordón umbilical humano. En el experimento de unión, se utilizó la proteína quimérica del Delta-1 humano (HD1EXIg), para la que los presentes inventores han encontrado que tiene una actividad similar, como experimento comparativo al igual que en ejemplo 8.

Se suspendieron las células Jurkat, 1×10^6 células, en una disolución de sal equilibrada de Hank (Gibco BRL, EE. UU.) que contiene STF al 2% y Hepes a 10 mM. Se les añadieron HD2EXIg, HD1EXIg o IgG1 humana, cada una a $1 \mu\text{g/ml}$ y se mantuvieron a 4°C durante 3 horas. Se lavaron las células con la disolución de Hank mediante centrifugación y se añadió $1 \mu\text{g/ml}$ del anticuerpo monoclonal de oveja anti-IgG humana marcado con PE (ficoeritrina) y luego se enfrió la muestra en hielo durante 30 minutos. Después se lavó la muestra dos veces con la solución de Hank. El análisis se realizó utilizando el citómetro de flujo FACScalibur (Beckton and Dickinson, EE. UU.).

Los resultados se muestran en la figura 2. Un eje vertical indica los recuentos de células y un eje horizontal indica la intensidad de la fluorescencia. La parte superior indica el resultado de la HD1EXIg de control y la parte inferior indica el resultado de la HD2EXIg de la presente invención. La tinción con HD1EXIg o HD2EXIg se muestra mediante una línea continua y la tinción con IgG1 humana, un grupo de control, se muestra con una línea discontinua. En todos los casos, se observó la unión con células Jurkat. Al observar las actividades de unión, la intensidad de la fluorescencia de la HD2EXIg de la presente invención fue mayor que la de la HD1EXIg de la parte superior. El promedio de la intensidad de la fluorescencia de la HD2EXIg fue unas dos veces mayor que la de la HD1EXIg. Como resultado, HD2EXIg se une a las células Jurkat con más fuerza que HD1EXIg.

La actividad de unión a los linfocitos CD34+ mononucleares de sangre de cordón umbilical humano aislados mediante el método descrito en el ejemplo 7 se determinó mediante el mismo método de tinción. En este caso, la tinción con el anticuerpo HPCA-2 anti-CD34 humano marcado con FITC (Beckton and Dickinson Corp., EE. UU.) se realizó simultáneamente en la marcación del segundo anticuerpo. Los datos muestran sólo los CD34+, es decir, una fracción positiva con FITC.

El resultado se muestra en la figura 3. El resultado indica que el HD2EXIg y HD1EXIg se unen de forma similar a los linfocitos CD34+, y que la actividad de unión del HD2EXIg es dos veces más fuerte que la del HD1EXIg.

Las células teñidas HD2EXIg se trataron mediante el clasificador de células FACSvantage (Beckton and Dickinson Corp., EE. UU.), de acuerdo con el manual de instrucciones que lo acompaña, para separar las células de la fracción positiva de HD2EXIg.

Ejemplo 10

Efecto del cocultivo de las células que expresan el nuevo Delta-2 humano sobre las células de la sangre indiferenciadas

El vector de expresión pHD2FLAG de la proteína quimérica con FLAG del nuevo Delta-2 humano de longitud completa preparado en el ejemplo 3 se introdujo en la cepa de células de ratón Balb3T3 (*Physical and Chemical Institute, Cell Development Bank RCB0005*) de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 4 y se realizó la selección con G418 (Gibco BRL Inc., EE. UU.) de acuerdo con el método conocido para obtener clones. Se confirmó que los clones obtenidos así expresaban la proteína quimérica con FLAG del Delta-2 humano de longitud completa de acuerdo

ES 2 284 205 T3

con el método descrito en el ejemplo 4, y los clones, cuya expresión se confirmó, se utilizaron en los experimentos siguientes. El clon se denomina Balb/HD2FLAG.

Se cocultivaron los linfocitos CD34+ mononucleares de sangre del cordón umbilical obtenidos mediante el método del ejemplo 7 y Balb/HD2FLAG. El cocultivo con Balb3T3, para el cual no se hizo la transferencia génica, se realizó como un control.

Las condiciones de cultivo son:

- 1) Balb3T3 sin transferencia génica y sin factor hematopoyético,
- 2) Balb/HD2FLAG sin factor hematopoyético,
- 3) Balb3T3 sin transferencia génica y con factor hematopoyético, y
- 4) Balb/HD2FLAG y factor hematopoyético.

El medio utilizado es el medio α complementado con STF al 10% y 2-mercaptoetanol a 10^{-5} M. Al grupo con el factor hematopoyético se le añadieron SCF humano a 100 ng/ml, IL-3 humana a 10 ng/ml e IL-6 humana a 100 ng/ml. Se continúa el cultivo durante 2 semanas y se realizó el cambio del medio tres veces a la semana para la mitad del volumen. Antes del cocultivo con las células de la sangre humanas, las células Balb3T3 previamente cultivadas se irradiaron con rayos X con un máximo de 250 kV para suprimir el crecimiento de las células.

El número de células formadoras de colonias y de CI-CLP se midió en el precultivo y los grupos experimentales 1) hasta 4).

Los resultados son los siguientes.

En el precultivo, el recuento de células totales fue de 20.000 células. Entre éstas, las células formadoras de colonias eran 3200 y las CI-CLP eran 220 células.

En 1), los recuentos de células formadoras de colonias y de CI-CLP fueron tan pequeños que fue imposible medirlos.

En 2), el número de células formadoras de colonias fue tan pequeño que fue imposible medirlo. El recuento de CI-CLP fue de 105 células.

En 3), el número de células formadoras de colonias fue de 26.500 y el recuento de CI-CLP fue de 90.

En 4), el número de células formadoras de colonias fue de 38.000 y el recuento de CI-CLP fue de 120.

El análisis de la caída de las células formadoras de colonias en 3) y en 4) indicó que en 3) se observaron solamente colonias de granulocitos; sin embargo, en 4) también se observaron eritroblastos. En consecuencia, la diferencia en el número de células formadoras de colonias se debió a la diferencia en el número de colonias de eritroblastos.

Como resultado, las células Balb/HD2FLAG tienen una acción formadora de colonias, especialmente una acción sobre el crecimiento de las colonias de eritroblastos, así como una acción de mantenimiento de las CI-CLP. El resultado indica que, utilizando el vector de expresión del Delta-2 humano de la presente invención, se pueden producir células que tienen una actividad de mantenimiento de células hematopoyéticas.

Ejemplo 11

Preparación de material inmovilizado con el nuevo Delta-2 humano y su efecto

Se preparó gel de Sepharose inmovilizada con la HD2EXIg preparada en el ejemplo 5. El gel de Sepharose fue gel de Sepharose activado con CNBr (Pharmacia Inc., Suecia). Se inmovilizó la HD2EXIg de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto.

El gel preparado así y los linfocitos CD34+ mononucleares de sangre de cordón umbilical aislados mediante el método del ejemplo 7 se cultivaron durante 24 horas. Se realizó el cultivo en el mismo medio, tal como en el ejemplo 10. En el grupo de control, se preparó gel de Sepharose inmovilizado con BSA. Después del cultivo, se midió el número de células formadoras de colonias de acuerdo con el método del ejemplo 8. Como resultado, en el gel inmovilizado con la HD2EXIg, el número de células formadoras de colonias disminuyó un 40%.

En consecuencia, el material, en el que se inmovilizó el Delta-2 humano de la presente invención, actúa contra las células hematopoyéticas.

Ejemplo 12

Efecto del nuevo Delta-2 humano sobre las células del endotelio vascular

5 Se utilizó el cuarto subcultivo de células del endotelio vascular, es decir, células normales del endotelio de la aorta humana y células normales del endotelio de la arteria pulmonar humana (Kurabo Co., Japón). Las células se sembraron a 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos para cultivo de células (Falcon Inc., EE. UU.) en el cultivo del tercer subcultivo y se cultivaron en el medio bajo en suero para el crecimiento de las células endoteliales (HuMedia-EG2, Kurabo Co., Japón) que contiene 10 ng/ml del FCE recombinante humano (Kurabo Co., Japón) y 5 ng/ml del FCF-B recombinante humano. Al mismo tiempo, se añadió la proteína quimérica extracelular del nuevo Delta-2 humano (HD2EXIg) para obtener una concentración final de 1 μ g/ml. Al grupo comparativo del experimento se le añadió la misma concentración de IgG1 humana (Athens Research and Technology Corp., EE. UU.) para observar el efecto de la región IgGFc. En el grupo de control, se realizó el cultivo sin añadir ninguna proteína salvo para HuMedia-EG2. Se realizó el cultivo a 37°C, en dióxido de carbono gaseoso al 5% y humedad al 100% durante 3 días, y se contó el número de células.

El recuento del número de células del endotelio vascular se realizó utilizando un conjunto de reactivos NR (Kurabo Co., Japón), cuyo principio fue desarrollado por Borenfreund y Purermer (*Journal of Tissue Culture Methods* 9 (1) 7-9, 1984), a saber, el método del rojo neutro, que aplica el fenómeno de que el pigmento de tinción vital rojo neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) sólo puede penetrar a través de la membrana celular de las células vivas para acumularse en el lisosoma. La absorción a 540 nm se midió mediante el Immunoreader (NJ-2000, Nippon Intermed Co., Japón). Como resultado, en el caso de las células del endotelio de la aorta, la densidad óptica (DO) en el grupo de control fue de $0,18 \pm 0,02$ y la DO en el grupo al que se le añadió IgG1 humana fue casi del mismo valor, $0,17 \pm 0,02$; sin embargo, la DO en el grupo al que se le añadió HD2EXIg fue de un valor significativamente más bajo, $0,11 \pm 0,01$. En el caso de las células del endotelio de la arteria pulmonar, la densidad óptica (DO) en el grupo de control fue de $0,16 \pm 0,02$ y la DO en el grupo al que se le añadió IgG1 humana fue casi del mismo valor, $0,16 \pm 0,02$; sin embargo, la DO en el grupo al que se le añadió HD2EXIg fue de un valor significativamente más bajo, $0,08 \pm 0,01$. Estos resultados indican que la HD2EXIg suprime el crecimiento de las células del endotelio vascular.

Ejemplo 13

Preparación de la forma farmacéutica

Para cada polipéptido mostrado en el ejemplo 5, se disolvieron 1 mg de polipéptido y 5 mg de seroalbúmina humana (Midori Juji Co.) en 1 ml de agua destilada. La disolución se pasó asépticamente a través de un filtro de 0,22 μ m para la esterilización, se dispensó en un vial y se liofilizó para preparar la formulación farmacéutica.

Efecto de la invención

40 La molécula del nuevo Delta-2 humano de la presente invención se puede utilizar como producto químico eficaz para la supresión del crecimiento y la diferenciación de células indiferenciadas como las células de la sangre indiferenciadas, y se pueden utilizar como fármacos y materiales de cuidados médicos.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido, que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 2.

2. Polipéptido, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3.

3. Polipéptido, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que tiene acción supresora de la diferenciación frente a las células de la sangre indiferenciadas.

4. Polipéptido, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que suprime el crecimiento de las células vasculares.

5. Composición farmacéutica, que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 ó 2.

6. Composición farmacéutica, de acuerdo con la reivindicación 5, que tiene acción supresora de la diferenciación frente a las células de la sangre indiferenciadas.

7. Composición farmacéutica, de acuerdo con la reivindicación 5, que suprime el crecimiento de las células vasculares.

8. Medio de cultivo de células, que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 ó 2.

9. Medio de cultivo de células, de acuerdo con la reivindicación 8, en el que las células son células de la sangre indiferenciadas.

10. Material, sobre el que está inmovilizado el polipéptido de la reivindicación 1 ó 2.

11. Método para cultivar células, utilizando el medio de cultivo de células de la reivindicación 8 o el material de la reivindicación 10.

12. Método, de acuerdo con la reivindicación 11, en el que las células son células de la sangre indiferenciadas.

13. ADN, que codifica al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 2.

14. ADN, de acuerdo con la reivindicación 13, que codifica al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3.

15. ADN, de acuerdo con la reivindicación 13, que tiene una secuencia de bases que va desde el n.º 355 hasta el 1854 de la SEQ ID n.º 4.

16. ADN, de acuerdo con la reivindicación 14, que tiene una secuencia de bases que va desde el n.º 255 hasta el 2331 de la SEQ ID n.º 4.

17. ADN recombinante, que comprende un ADN seleccionado entre los ADN de la reivindicación 13 ó 14, que tiene ligado a éste un ADN de vector que puede expresar dicho ADN en la célula hospedadora.

18. Célula, transformada por el ADN recombinante de la reivindicación 17.

19. Método para cultivar células humanas con las células de la reivindicación 18.

20. Procedimiento, para la producción del polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, que comprende cultivar las células de la reivindicación 18 y aislar el compuesto producido en la masa cultivada.

21. Anticuerpo, que reconoce específicamente un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3.

FIG. 1

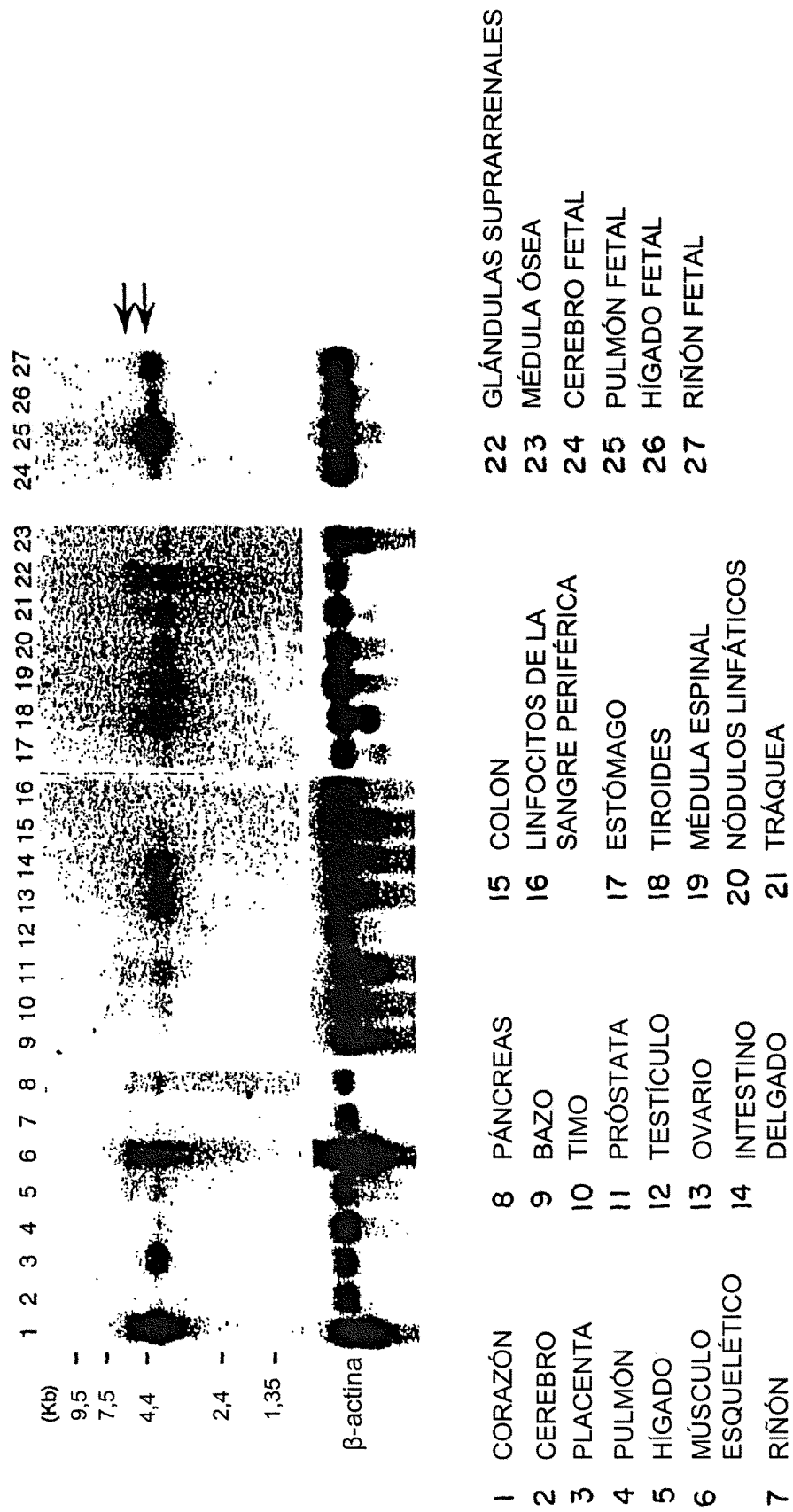


FIG. 2

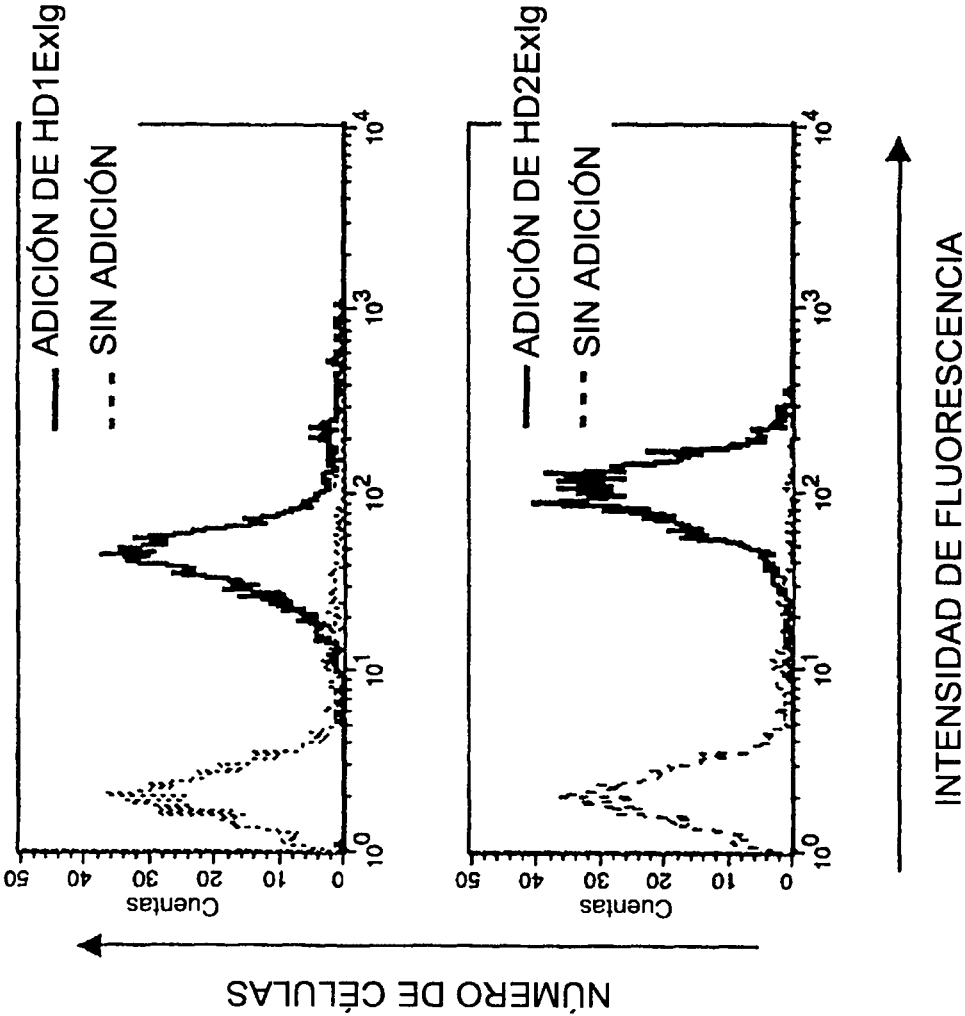
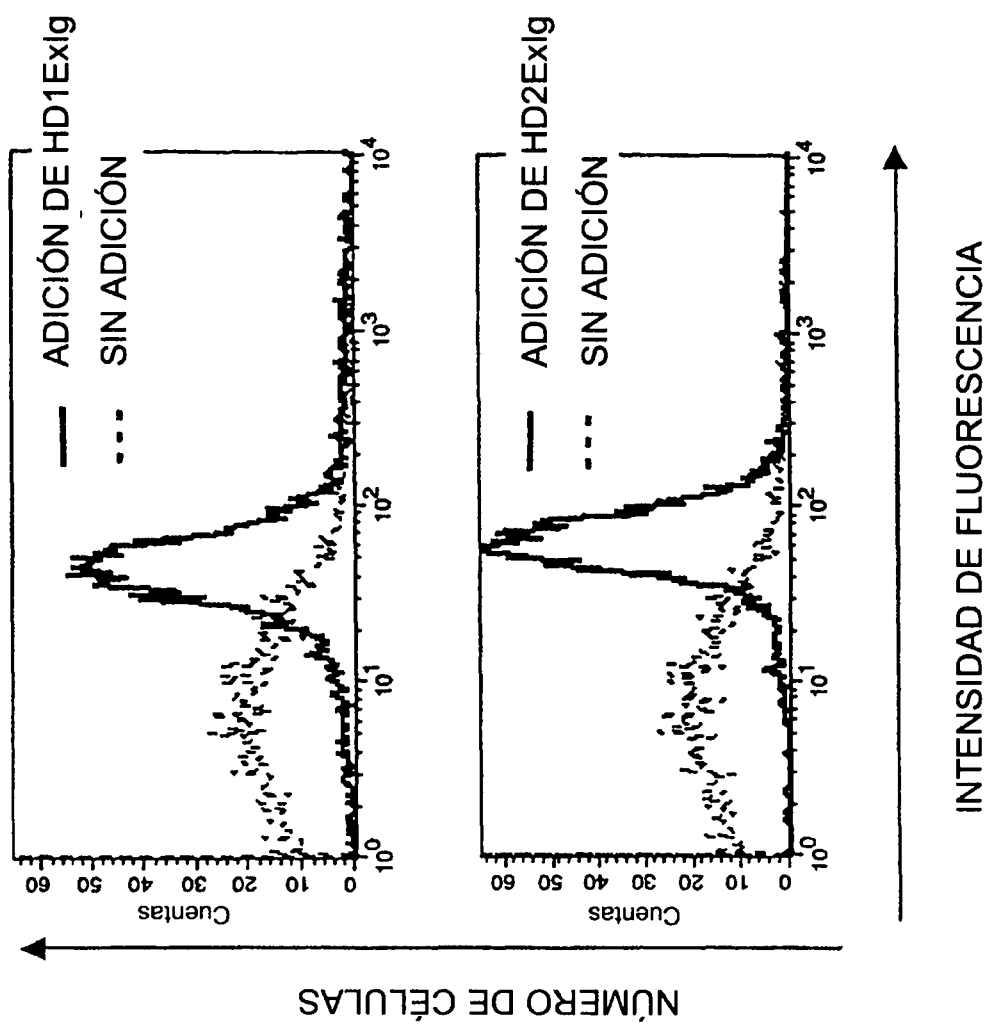


FIG. 3



ES 2 284 205 T3

LISTA DE SECUENCIAS

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 1

LONGITUD: 191

TIPO: aminoácido

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: péptido

FUENTE ORIGINAL

ORGANISMO: humano

SECUENCIA

```

15      Ser Gly Val Phe Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly
        1           5           10           15
20      Val Leu Ala Ser Gly Arg Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe
        20           25           30
25      Arg Val Cys Leu Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys
        35           40           45
30      Thr Phe Gly Thr Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala
        50           55           60
35      Val Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro
        65           70           75           80
40      Phe Asn Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp
        85           90           95
45      His Ala Pro Gly Asp Asp Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala
        100          105          110
50      Leu Ile Ser Lys Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn
        115          120          125
55      Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser
        130          135          140
60      Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg
        145          150          155          160
65      Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro
        165          170          175
70      Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys
        180          185          190 191

```

ES 2 284 205 T3

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 2

LONGITUD: 500

TIPO: aminoácido

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: péptido

FUENTE ORIGINAL

ORGANISMO: humano

SECUENCIA

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

ES 2 284 205 T3

	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Cys	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Gln
				180					185					190		
5	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Ser	Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser
			195					200					205			
10	Lys	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys
		210					215					220				
	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	His	Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr
15	225					230				235					240	
	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Cys	Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp
				245					250				255			
20	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys	Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala
			260					265					270			
25	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser	Gly	Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro
		275						280				285				
	Gly	Tyr	Thr	Gly	Val	Asp	Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Cys	Asp	Ser
30		290					295					300				
	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Gly	Tyr
	305					310				315					320	
35	His	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Leu	His	Cys	Glu	His	Ser
				325					330				335			
40	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Asp	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg
			340						345				350			
	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe
45			355					360				365				
	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu	Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro
		370					375					380				
50	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln	Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys
	385					390				395					400	
	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser
55				405					410				415			
	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro	Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu
60				420					425				430			

ES 2 284 205 T3

Glu Asn Gly Leu Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg
 435 440 445
 5 Cys Glu Val Arg Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe
 450 455 460
 10 Asn Arg Ala Thr Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys
 465 470 475 480
 15 Asn Cys Pro Tyr Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly
 485 490 495
 Leu Pro Pro Ser
 20 500

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 3

LONGITUD: 659

TIPO: aminoácido

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: péptido

FUENTE ORIGINAL

ORGANISMO: humano

SECUENCIA

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

65

ES 2 284 205 T3

	100	105	110
5	Leu Ile Ser Lys Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn		
	115	120	125
	Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser		
10	130	135	140
	Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg		
	145	150	155
15	Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro		
	165	170	175
	Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln		
20	180	185	190
	Gln Pro Ile Cys Leu Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser		
25	195	200	205
	Lys Pro Ala Glu Cys Leu Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys		
	210	215	220
30	Asn Glu Cys Ile Pro His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr		
	225	230	235
	Pro Trp Gln Cys Thr Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp		
35	245	250	255
	Gln Asp Leu Asn Tyr Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala		
40	260	265	270
	Thr Cys Ser Asn Ser Gly Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro		
	275	280	285
45	Gly Tyr Thr Gly Val Asp Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser		
	290	295	300
	Asn Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr		
50	305	310	315
	His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser		
	325	330	335
55	Thr Leu Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg		
	340	345	350
60	Glu Arg Asn Gln Gly Ala Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe		

ES 2 284 205 T3

		355		360		365												
5	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu	Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro		
		370					375					380						
	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln	Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys		
10	385					390				395						400		
	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser		
					405				410					415				
15	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro	Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu		
				420				425					430					
	Glu	Asn	Gly	Leu	Met	Cys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg		
20			435					440					445					
	Cys	Glu	Val	Arg	Thr	Ser	Ile	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Phe		
25		450					455					460						
	Asn	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr	Thr	Asp	Leu	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Val	Cys		
	465					470					475					480		
30	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly	Phe	Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly		
					485				490					495				
	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe	Pro	Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu		
35				500				505					510					
	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Gln		
40			515					520					525					
	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro	Asp	Asp	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn		
		530					535					540						
45	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln	Lys	Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys		
	545					550					555					560		
	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys	Lys	Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys		
50				565					570					575				
	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys	Gln	Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala		
				580				585					590					
55	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Arg	Gly	Thr	Met	Pro	Gly	Lys	Phe	Pro	His	Ser		
			595					600					605					
60	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	Lys	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Glu	Lys		

65

ES 2 284 205 T3

	610	615	620	
	Pro Glu Cys Arg Ile Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr			
5	625	630	635	640
	Gln Ser Val Cys Leu Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala			
10		645	650	655
	Thr Glu Val			
	659			

15

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 4

LONGITUD: 3339

20 TIPO: ácido nucleico

NÚMERO DE CADENAS: bicatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADNc de ARNm

25 FUENTE ORIGINAL

ORGANISMO: humano

SECUENCIA

30

		GCCGCC TTGGTGCAGC	16
35	GTACACCGGC ACTAGCCCGC TTGCAGCCCC AGGATTAGAC AGAAGACGCG TCCTCGGCGC	76	
	GGTCGCCGCC CAGCCGTAGT CACCTGGATT ACCTACAGCG GCAGCTGCAG CGGAGCCAGC	136	
	GAGAAGGCCA AAGGGGAGCA GCGTCCCGAG AGGAGCGCCT CTTTTCAGGG ACCCCGCCCG	196	
40	CTGGCGGACG CGCGGGAAG CGGCGTCGCG AACAGAGCCA GATTGAGGGC CCGCGGGTGG	256	
	AGAGAGCGAC GCCCCAGGGG ATG GCG GCA GCG TCC CGG AGC GCC TCT GGC	306	
	Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly		
45	-26 -25 -20		
	TGG GCG CTA CTG CTG CTG GTG GCA CTT TGG CAG CAG CGC GCG GCC GGC	354	
	Trp Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly		
50	-15 -10 -5 -1		
	TCC GGC GTC TTC CAG CTG CAG CTG CAG GAG TTC ATC AAC GAG CGC GGC	402	
	Ser Gly Val Phe Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly		
55	1 5 10 15		
	GTA CTG GCC AGT GGC CGG CCT TGC GAG CCC GGC TGC CGG ACT TTC TTC	450	

60

65

ES 2 284 205 T3

	Val Leu Ala Ser Gly Arg Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe	
	20 25 30	
5	CGC GTC TGC CTT AAG CAC TTC CAG GCG GTC GTC TCG CCC GGA CCC TGC	498
	Arg Val Cys Leu Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys	
10	35 40 45	
	ACC TTC GGG ACC GTC TCC ACG CCG GTA TTG GGC ACC AAC TCC TTC GCT	546
	Thr Phe Gly Thr Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala	
15	50 55 60	
	GTC CGG GAC GAC AGT AGC GGC GGG GGG CGC AAC CCT CTC CAA CTG CCC	594
	Val Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro	
20	65 70 75 80	
	TTC AAT TTC ACC TGG CCG GGT ACC TTC TCG CTC ATC ATC GAA GCT TGG	642
	Phe Asn Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp	
25	85 90 95	
	CAC GCG CCA GGA GAC GAC CTG CGG CCA GAG GCC TTG CCA CCA GAT GCA	690
	His Ala Pro Gly Asp Asp Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala	
30	100 105 110	
	CTC ATC AGC AAG ATC GCC ATC CAG GGC TCC CTA GCT GTG GGT CAG AAC	738
	Leu Ile Ser Lys Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn	
35	115 120 125	
	TGG TTA TTG GAT GAG CAA ACC AGC ACC CTC ACA AGG CTG CGC TAC TCT	786
	Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser	
40	130 135 140	
	TAC CGG GTC ATC TGC AGT GAC AAC TAC TAT GGA GAC AAC TGC TCC CGC	834
	Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg	
45	145 150 155 160	
	CTG TGC AAG AAG CGC AAT GAC CAC TTC GGC CAC TAT GTG TGC CAG CCA	882
	Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro	
50	165 170 175	
	GAT GGC AAC TTG TCC TGC CTG CCC GGT TGG ACT GGG GAA TAT TGC CAA	930
	Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln	
55	180 185 190	
60		
65		

ES 2 284 205 T3

	CAG CCT ATC TGT CTT TCG GGC TGT CAT GAA CAG AAT GGC TAC TGC AGC	978
5	Gln Pro Ile Cys Leu Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser	
	195 200 205	
	AAG CCA GCA GAG TGC CTC TGC CGC CCA GGC TGG CAG GGC CGG CTG TGT	1026
10	Lys Pro Ala Glu Cys Leu Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys	
	210 215 220	
	AAC GAA TGC ATC CCC CAC AAT GGC TGT CGC CAC GGC ACC TGC AGC ACT	1074
15	Asn Glu Cys Ile Pro His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr	
	225 230 235 240	
	CCC TGG CAA TGT ACT TGT GAT GAG GGC TGG GGA GGC CTG TTT TGT GAC	1122
20	Pro Trp Gln Cys Thr Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp	
	245 250 255	
	CAA GAT CTC AAC TAC TGC ACC CAC CAC TCC CCA TGC AAG AAT GGG GCA	1170
25	Gln Asp Leu Asn Tyr Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala	
	260 265 270	
	ACG TGC TCC AAC AGT GGG CAG CGA AGC TAC ACC TGC ACC TGT CGC CCA	1218
30	Thr Cys Ser Asn Ser Gly Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro	
	275 280 285	
	GGC TAC ACT GGT GTG GAC TGT GAG CTG GAG CTC AGC GAG TGT GAC AGC	1266
35	Gly Tyr Thr Gly Val Asp Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser	
	290 295 300	
	AAC CCC TGT CGC AAT GGA GGC AGC TGT AAG GAC CAG GAG GAT GGC TAC	1314
40	Asn Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr	
	305 310 315 320	
	CAC TGC CTG TGT CCT CCG GGC TAC TAT GGC CTG CAT TGT GAA CAC AGC	1362
45	His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser	
	325 330 335	
	ACC TTG AGC TGC GCC GAC TCC CCC TGC TTC AAT GGG GGC TCC TGC CGG	1410
50	Thr Leu Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg	
	340 345 350	
	GAG CGC AAC CAG GGG GCC AAC TAT GCT TGT GAA TGT CCC CCC AAC TTC	1458
55	Glu Arg Asn Gln Gly Ala Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe	
60		
65		

ES 2 284 205 T3

	355	360	365	
5	ACC GGC TCC AAC TGC GAG AAG AAA GTG GAC AGG TGC ACC AGC AAC CCC	1506		
	Thr Gly Ser Asn Cys Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro			
	370	375	380	
10	TGT GCC AAC GGG GGA CAG TGC CTG AAC CGA GGT CCA AGC CGC ATG TGC	1554		
	Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys			
	385	390	395	400
15	CGC TGC CGT CCT GGA TTC ACG GGC ACC TAC TGT GAA CTC CAC GTC AGC	1602		
	Arg Cys Arg Pro Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser			
	405	410	415	
20	GAC TGT GCC CGT AAC CCT TGC GCC CAC GGT GGC ACT TGC CAT GAC CTG	1650		
	Asp Cys Ala Arg Asn Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu			
	420	425	430	
25	GAG AAT GGG CTC ATG TGC ACC TGC CCT GCC GGC TTC TCT GGC CGA CGC	1698		
	Glu Asn Gly Leu Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg			
	435	440	445	
30	TGT GAG GTG CGG ACA TCC ATC GAT GCC TGT GCC TCG AGT CCC TGC TTC	1746		
	Cys Glu Val Arg Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe			
	450	455	460	
35	AAC AGG GCC ACC TGC TAC ACC GAC CTC TCC ACA GAC ACC TTT GTG TGC	1794		
	Asn Arg Ala Thr Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys			
	465	470	475	480
40	AAC TGC CCT TAT GGC TTT GTG GGC AGC CGC TGC GAG TTC CCC GTG GGC	1842		
	Asn Cys Pro Tyr Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly			
	485	490	495	
45	TTG CCG CCC AGC TTC CCC TGG GTG GCC GTC TCG CTG GGT GTG GGG CTG	1890		
	Leu Pro Pro Ser Phe Pro Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu			
	500	505	510	
50	GCA GTG CTG CTG GTA CTG CTG GGC ATG GTG GCA GTG GCT GTG CGG CAG	1938		
	Ala Val Leu Leu Val Leu Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln			
	515	520	525	
55	CTG CGG CTT CGA CGG CCG GAC GAC GGC AGC AGG GAA GCC ATG AAC AAC	1986		
60				
65				

ES 2 284 205 T3

Leu Arg Leu Arg Arg Pro Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn
 530 535 540
 5 TTG TCG GAC TTC CAG AAG GAC AAC CTG ATT CCT GCC GCC CAG CTT AAA 2034
 Leu Ser Asp Phe Gln Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys
 545 550 555 560
 10 AAC ACA AAC CAG AAG AAG GAG CTG GAA GTG GAC TGT GGC CTG GAC AAG 2082
 Asn Thr Asn Gln Lys Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys
 15 565 570 575
 TCC AAC TGT GGC AAA CAG CAA AAC CAC ACA TTG GAC TAT AAT CTG GCC 2130
 Ser Asn Cys Gly Lys Gln Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala
 20 580 585 590
 CCA GGG CCC CTG GGG CGG GGG ACC ATG CCA GGA AAG TTT CCC CAC AGT 2178
 Pro Gly Pro Leu Gly Arg Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser
 25 595 600 605
 GAC AAG AGC TTA GGA GAG AAG GCG CCA CTG CGG TTA CAC AGT GAA AAG 2226
 Asp Lys Ser Leu Gly Glu Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys
 30 610 615 620
 CCA GAG TGT CGG ATA TCA GCG ATA TGC TCC CCC AGG GAC TCC ATG TAC 2274
 Pro Glu Cys Arg Ile Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr
 35 625 630 635 640
 CAG TCT GTG TGT TTG ATA TCA GAG GAG AGG AAT GAA TGT GTC ATT GCC 2322
 40 Gln Ser Val Cys Leu Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala
 645 650 655
 ACG GAG GTA 2331
 45 Thr Glu Val
 659
 50 TAAGGCAGGA GCCTACCTGG ACATCCCTGC TCAGCCCCGC GGCTGGACCT TCCTTCTGCA 2391
 TTGTTTACAT TGCATCCTGG ATGGGACGTT TTTCATATGC AACGTGCTGC TCTCAGGAGG 2451
 AGGAGGGAAT GGCAGGAACC GGACAGACTG TGAACCTGCC AAGAGATGCA ATACCTTCC 2511
 55 ACACCTTTGG GTGTCTGTCT GGCATCAGAT TGGCAGCTGC ACCAACCAGA GGAACAGAAG 2571
 AGAAGAGAGA TGCCACTGGG CACTGCCCTG CCAGTAGTGG CCTTCAGGGG GCTCCTTCCG 2631
 GGGCTCCGGC CTGTTTTCCA GAGAGAGTGG CAGTAGCCCC ATGGGGCCCG GAGCTGCTGT 2691
 60
 65

ES 2 284 205 T3

5 GGCCTCCACT GGCATCCGTG TTTCCAAAAG TGCCTTTGGC CCAGGCTCCA CGGCGACAGT 2751
 TGGGCCCCAA TCAGAAAGGA GAGAGGGGGC CAATGAGGGC AGGGCCTCCT GTGGGCTGGA 2811
 AAACCACTGG GTGCGTCTCT TGCTGGGGTT TGCCCTGGAG GTGAGGTGAG TGCTCGAGGG 2871
 AGGGGAGTGC TTTCTGCCCC ATGCCTCCAA CTACTGTATG CAGGCCTGGC TCTCTGGTCT 2931
 10 AGGCCCTTTG GGCAAGAATG TCCGTCTACC CGGCTTCCAC CACCCTCTGG CCCTGGGCTT 2991
 CTGTAAGCAG ACAGGCAGAG GGCCTGCCCC TCCCACCAGC CAAGGGTGCC AGGCCTAACT 3051
 GGGGCACTCA GGGCAGTGTG TTGGAATTC CACTGAGGGG GAAATCAGGT GCTGCGGGCCG 3111
 15 CCTGGGCCCT TTCCTCCCTC AAGCCCATCT CCACAACCTC GAGCCTGGGC TCTGGTCCAC 3171
 TACTGCCCCA GACCACCCTC AAAGCTGGTC TTCAGAAATC AATAATATGA GTTTTATTT 3231
 TGTTTTTTTT TTTTTTTT TAGTTTATTT TGGAGTCTAG TATTCAATA ATTTAAGAAT 3291
 20 CAGAAGCACT GACCTTTCTA CATTTTATAA CATTATTTTG TATATAAT 3339

25 INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 5
 LONGITUD: 27
 TIPO: ácido nucleico
 NÚMERO DE CADENAS: monocatenario
 TOPOLOGÍA: lineal
 30 TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

SECUENCIA

35 GAT TAT AAA GAT GAT GAT GAT AAA TGA 27

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 40 1 5 8

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 6
 LONGITUD: 20
 45 TIPO: ácido nucleico
 NÚMERO DE CADENAS: monocatenario
 TOPOLOGÍA: lineal
 TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)
 50

SECUENCIA

55 TGGCARTGYA AYTGYCARGA 20

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 7
 LONGITUD: 20
 60 TIPO: ácido nucleico
 NÚMERO DE CADENAS: monocatenario
 TOPOLOGÍA: lineal
 TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

SECUENCIA

65 ATYTTYTTYT CRCARTTRAA 20

ES 2 284 205 T3

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 8

LONGITUD: 2663

TIPO: ácido nucleico

5 NÚMERO DE CADENAS: bicatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADNc de ARNm

FUENTE ORIGINAL

10 ORGANISMO: humano

SECUENCIA

15 CTTGGGAA GAGGCGGAGA CCGGCTTTTA AAGAAAGAAG TCCTGGGTCC TCGGTCTGG 58
GGCGAGGCAA GGGCGCTTTT CTGCCACGC TCCCCGTGGC CCATCGATCC CCCGCGCGTC 118
20 CGCCGCTGTT CTAAGGAGAG AAGTGGGGC CCCCAGGCT CGCGCGTGA GCGAAGCAGC 178
ATG GGC AGT CGG TGC GCG CTG GCC CTG GCG GTG CTC TCG GCC TTG CTG 226
Met Gly Ser Arg Cys Ala Leu Ala Leu Ala Val Leu Ser Ala Leu Leu
25 -20 -15 -10
TGT CAG GTC TGG AGC TCT GGG GTG TTC GAA CTG AAG CTG CAG GAG TTC 274
Cys Gln Val Trp Ser Ser Gly Val Phe Glu Leu Lys Leu Gln Glu Phe
30 -5 -1 1 5 10
GTC AAC AAG AAG GGG CTG CTG GGG AAC CGC AAC TGC TGC CGC GGG GGC 322
Val Asn Lys Lys Gly Leu Leu Gly Asn Arg Asn Cys Cys Arg Gly Gly
35 15 20 25
GCG GGG CCA CCG CCG TGC GCC TGC CGG ACC TTC TTC CGC GTG TGC CTC 370
40 Ala Gly Pro Pro Pro Cys Ala Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu

45

50

55

60

65

ES 2 284 205 T3

	30	35	40	
5	AAG CAC TAC CAG GCC AGC GTG TCC CCC GAG CCG CCC TGC ACC TAC GGC	418		
	Lys His Tyr Gln Ala Ser Val Ser Pro Glu Pro Pro Cys Thr Tyr Gly			
	45	50	55	
10	AGC GCC GTC ACC CCC GTG CTG GGC GTC GAC TCC TTC AGT CTG CCC GAC	466		
	Ser Ala Val Thr Pro Val Leu Gly Val Asp Ser Phe Ser Leu Pro Asp			
	60	65	70	75
15	GGC GGC GGC GCC GAC TCC GCG TTC AGC AAC CCC ATC CGC TTC CCC TTC	514		
	Gly Gly Gly Ala Asp Ser Ala Phe Ser Asn Pro Ile Arg Phe Pro Phe			
	80	85	90	
20	GGC TTC ACC TGG CCG GGC ACC TTC TCT CTG ATT ATT GAA GCT CTC CAC	562		
	Gly Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Leu His			
	95	100	105	
25	ACA GAT TCT CCT GAT GAC CTC GCA ACA GAA AAC CCA GAA AGA CTC ATC	610		
	Thr Asp Ser Pro Asp Asp Leu Ala Thr Glu Asn Pro Glu Arg Leu Ile			
	110	115	120	
30	AGC CGC CTG GCC ACC CAG AGG CAC CTG ACG GTG GGC GAG GAG TGG TCC	658		
	Ser Arg Leu Ala Thr Gln Arg His Leu Thr Val Gly Glu Glu Trp Ser			
	125	130	135	
35	CAG GAC CTG CAC AGC AGC GGC CGC ACG GAC CTC AAG TAC TCC TAC CGC	706		
	Gln Asp Leu His Ser Ser Gly Arg Thr Asp Leu Lys Tyr Ser Tyr Arg			
	140	145	150	155
40	TTC GTG TGT GAC GAA CAC TAC TAC GGA GAG GGC TGC TCC GTT TTC TGC	754		
	Phe Val Cys Asp Glu His Tyr Tyr Gly Glu Gly Cys Ser Val Phe Cys			
	160	165	170	
45	CGT CCC CGG GAC GAT GCC TTC GGC CAC TTC ACC TGT GGG GAG CGT GGC	802		
	Arg Pro Arg Asp Asp Ala Phe Gly His Phe Thr Cys Gly Glu Arg Gly			
	175	180	185	
50	GAG AAA GTG TGC AAC CCT GGC TGG AAA GGG CCC TAC TGC ACA GAG CCG	850		
	Glu Lys Val Cys Asn Pro Gly Trp Lys Gly Pro Tyr Cys Thr Glu Pro			
	190	195	200	
55	ATC TGC CTG CCT GGA TGT GAT GAG CAG CAT GGA TTT TGT GAC AAA CCA	898		
60				
65				

ES 2 284 205 T3

	Ile Cys Leu Pro Gly Cys Asp Glu Gln His Gly Phe Cys Asp Lys Pro	
	205 210 215	
5	GGG GAA TGC AAG TGC AGA GTG GGC TGG CAG GGC CGG TAC TGT GAC GAG	946
	Gly Glu Cys Lys Cys Arg Val Gly Trp Gln Gly Arg Tyr Cys Asp Glu	
10	220 225 230 235	
	TGT ATC CGC TAT CCA GGC TGT CTC CAT GGC ACC TGC CAG CAG CCC TGG	994
	Cys Ile Arg Tyr Pro Gly Cys Leu His Gly Thr Cys Gln Gln Pro Trp	
15	240 245 250	
	CAG TGC AAC TGC CAG GAA GGC TGG GGC GGC CTT TTC TGC AAC CAG GAC	1042
	Gln Cys Asn Cys Gln Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asn Gln Asp	
20	255 260 265	
	CTG AAC TAC TGC ACA CAC CAT AAG CCC TGC AAG AAT GGA GCC ACC TGC	1090
	Leu Asn Tyr Cys Thr His His Lys Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys	
25	270 275 280	
	ACC AAC ACG GGC CAG GGC AGC TAC ACT TGC TCT TGC CGG CCT GGC TAC	1138
30	Thr Asn Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr	
	285 290 295	
	ACA GGT GCC ACC TGC GAG CTG GGC ATT GAC GAG TGT GAC CCC AGC CCT	1186
35	Thr Gly Ala Thr Cys Glu Leu Gly Ile Asp Glu Cys Asp Pro Ser Pro	
	300 305 310 315	
	TGT AAG AAC GGA GGC AGC TGC ACG GAT CTC GAG AAC AGC TAC TCC TGT	1234
40	Cys Lys Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Ser Cys	
	320 325 330	
	ACC TGC CCA CCC GGC TTC TAC GGC AAA ATC TGT GAA TTG AGT GCC ATG	1282
45	Thr Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Lys Ile Cys Glu Leu Ser Ala Met	
	335 340 345	
50	ACC TGT GCG GAC GGC CCT TGC TTT AAC GGC GGT CGG TGC TCA GAC AGC	1330
	Thr Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Arg Cys Ser Asp Ser	
	350 355 360	
55	CCC GAT GGA GGC TAC AGC TGC CGC TGC CCC GTG GGC TAC TCC GGC TTC	1378
	Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Cys Arg Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Phe	
60	365 370 375	

ES 2 284 205 T3

	AAC TGT GAG AAG AAA ATT GAC TAC TGC AGC TCT TCA CCC TGT TCT AAT	1426
5	Asn Cys Glu Lys Lys Ile Asp Tyr Cys Ser Ser Ser Pro Cys Ser Asn	
	380 385 390 395	
	GGT GCC AAG TGT GTG GAC CTC GGT GAT GCC TAC CTG TGC CGC TGC CAG	1474
10	Gly Ala Lys Cys Val Asp Leu Gly Asp Ala Tyr Leu Cys Arg Cys Gln	
	400 405 410	
	GCC GCC TTC TCG GGG AGG CAC TGT GAC GAC AAC GTG GAC GAC TGC GCC	1522
15	Ala Gly Phe Ser Gly Arg His Cys Asp Asp Asn Val Asp Asp Cys Ala	
	415 420 425	
	TCC TCC CCG TGC GCC AAC GGG GGC ACC TGC CGG GAT GGC GTG AAC GAC	1570
20	Ser Ser Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Arg Asp Gly Val Asn Asp	
	430 435 440	
	TTC TCC TGC ACC TGC CCG CCT GGC TAC ACG GGC AGG AAC TGC AGT GCC	1618
25	Phe Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Ser Ala	
	445 450 455	
	CCC GTC AGC AGG TGC GAG CAC GCA CCC TGC CAC AAT GGC GCC ACC TGC	1666
30	Pro Val Ser Arg Cys Glu His Ala Pro Cys His Asn Gly Ala Thr Cys	
	460 465 470 475	
	CAC GAG AGG GGC CAC CGC TAT GTG TGC GAG TGT GCC CGA GGC TAC GGG	1714
35	His Glu Arg Gly His Arg Tyr Val Cys Glu Cys Ala Arg Gly Tyr Gly	
	480 485 490	
	GGT CCC AAC TGC CAG TTC CTG CTC CCC GAG CTG CCC CCG GGC CCA GCG	1762
40	Gly Pro Asn Cys Gln Phe Leu Leu Pro Glu Leu Pro Pro Gly Pro Ala	
	495 500 505	
	GTG GTG GAC CTC ACT GAG AAG CTA GAG GGC CAG GGC GGC CCA TTC CCC	1810
45	Val Val Asp Leu Thr Glu Lys Leu Glu Gly Gln Gly Gly Pro Phe Pro	
	510 515 520	
	TGG GTG GCC GTG TGC GCC GGG GTC ATC CTT GTC CTC ATG CTG CTG CTG	1858
50	Trp Val Ala Val Cys Ala Gly Val Ile Leu Val Leu Met Leu Leu Leu	
	525 530 535	
	GGC TGT GCC GCT GTG GTG GTC TGC GTC CGG CTG AGG CTG CAG AAG CAC	1906
55	Gly Cys Ala Ala Val Val Val Cys Val Arg Leu Arg Leu Gln Lys His	
60		
65		

ES 2 284 205 T3

540	545	550	555	
CGG CCC CCA GCC GAC CCC TGC CGG GGG GAG ACG GAG ACC ATG AAC AAC	1954			
Arg Pro Pro Ala Asp Pro Cys Arg Gly Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn				
560	565	570		
CTG GCC AAC TGC CAG CGT GAG AAG GAC ATC TCA GTC AGC ATC ATC GGG	2002			
Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys Asp Ile Ser Val Ser Ile Ile Gly				
575	580	585		
GCC ACG CAG ATC AAG AAC ACC AAC AAG AAG GCG GAC TTC CAC GGG GAC	2050			
Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr Asn Lys Lys Ala Asp Phe His Gly Asp				
590	595	600		
CAC AGC GCC GAC AAG AAT GGC TTC AAG GCC CGC TAC CCA GCG GTG GAC	2098			
His Ser Ala Asp Lys Asn Gly Phe Lys Ala Arg Tyr Pro Ala Val Asp				
605	610	615		
TAT AAC CTC GTG CAG GAC CTC AAG GGT GAC GAC ACC GCC GTC AGG GAC	2146			
Tyr Asn Leu Val Gln Asp Leu Lys Gly Asp Asp Thr Ala Val Arg Asp				
620	625	630	635	
GCG CAC AGC AAG CGT GAC ACC AAG TGC CAG CCC CAG GGC TCC TCA GGG	2194			
Ala His Ser Lys Arg Asp Thr Lys Cys Gln Pro Gln Gly Ser Ser Gly				
640	645	650		
GAG GAG AAG GGG ACC CCG ACC ACA CTC AGG GGT GGA GAA GCA TCT GAA	2242			
Glu Glu Lys Gly Thr Pro Thr Thr Leu Arg Gly Gly Glu Ala Ser Glu				
655	660	665		
AGA AAA AGG CCG GAC TCG GGC TGT TCA ACT TCA AAA GAC ACC AAG TAC	2290			
Arg Lys Arg Pro Asp Ser Gly Cys Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr				
670	675	680		
CAG TCG GTG TAC GTC ATA TCC GAG GAG AAG GAT GAG TGC GTC ATA GCA	2338			
Gln Ser Val Tyr Val Ile Ser Glu Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala				
685	690	695		
ACT GAG GTG	2347			
Thr Glu Val				
700				
TAAATGGAA GTGAGATGGC AAGACTCCCG TTTCTCTTAA AATAAGTAAA ATTCCAACGA	2407			

ES 2 284 205 T3

5 TATATGCCCC AACGAATGCT GCTGAAGAGG AGGGAGGCCT CGTGGACTGC TGCTGAGAAA 2467
 CCGAGTTCAG ACCGAGCAGG TTCTCCTCCT GAGGTCCTCG ACGCCTGCCG ACAGCCTGTC 2527
 GCGGCCCCGC CGCCTGCGGC ACTGCCCTTCC GTGACGTCGC CGTTGCACTA TGGACAGTTG 2587
 CTCTTAAGAG AATATATATT TAAATGGGTG AACTGAATTA CGCATAAGAA GCATGCACTG 2647
 10 CCTGAGTGTA TATTTT 2663

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 9

LONGITUD: 20

TIPO: ácido nucleico

NÚMERO DE CADENAS: monocatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

SECUENCIA

TGACGGTGGG CGAGGAGTGG

20

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 10

LONGITUD: 20

TIPO: ácido nucleico

NÚMERO DE CADENAS: monocatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

SECUENCIA

GCAGCTGTAC CCTCCATCGG

20

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 11

LONGITUD: 716

TIPO: ácido nucleico

NÚMERO DE CADENAS: bicatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADNc de ARNm

FUENTE ORIGINAL

ORGANISMO: humano

ES 2 284 205 T3

SECUENCIA

5	TGACGGTGGG CGAGGAGTGG TCCCAGGACC TGCACAGCAG CGGCCGCACG GACCTCAAGT	60
	ACTCCTACCG CTTCTGTGTG GACGAACACT ACTACGGAGA GGGCTGCTCC GTTTTCTGCC	120
	GTCCCCGGGA CGATGCCTTC GGCCACTTCA CCTGTGGGGA GCCTGGGGAG AAAGTGTGCA	180
10	ACCCTGGCTG GAAAGGGCCC TACTGCACAG AGCCGATCTG CCTGCCTGGA TGTGATGAGC	240
	AGCATGGATT TTGTGACAAA CCAGGGGAAT GCAAGTGCAG AGTGGGCTGG CAGGGCCGGT	300
	ACTGTGACGA GTGTATCCGC TATCCAGGCT GTCTCCATGG CACCTGCCAG CAGCCCTGGC	360
15	AGTGCAACTG CCAGGAAGGC TGGGGGGGCC TTTTCTGCAA CCAGGACCTG AACTACTGCA	420
	CACACCATAA GCCCTGCAAG AATGGAGCCA CCTGCACCAA CACGGGCCAG GGGAGCTACA	480
	CTTGCTCTTG CCGGCCTGGG TACACAGGTG CCACCTGCCA GCTGGGGATT GACGAGTGTG	540
20	ACCCAGCCCC TTGTAAGAAC GGAGGGAGCT GCACGGATCT CGAGAACAGC TACTCCTGTA	600
	CCTGCCCACC CGGCTTCTAC GGCAAAATCT GTGAATTGAG TGCCATGACC TGTGCGGACG	660
25	GCCCTTGCTT TAACGGGGCT CGGTGCTCAG ACAGCCCCGA TGGAGGGTAC AGCTGC	716

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 12

LONGITUD: 20

30 TIPO: ácido nucleico

NÚMERO DE CADENAS: monocatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

35

SECUENCIA

TTGGGCACCA ACTCCTTCGC

20

40

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 13

LONGITUD: 20

TIPO: ácido nucleico

45 NÚMERO DE CADENAS: monocatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

50

SECUENCIA

TAGGCTGTTG GCAATATTCC

20

55

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 14

LONGITUD: 412

TIPO: ácido nucleico

60 NÚMERO DE CADENAS: bicatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADNc de ARNm

FUENTE ORIGINAL

65 ORGANISMO: humano

ES 2 284 205 T3

SECUENCIA

5 TTGGGCACCA ACTCCTTCGC TGTCCGGGAC GACAGTAGCG GCGGGGGGCG CAACCCTCTC 60
 CAACTGCCCT TCAATTTTAC CTGGCCGGGT ACCTTCTCGC TCATCATCGA AGCTTGGCAC 120
 GCGCCAGGAG ACGACCTGCC GCCAGAGGCC TTGCCACCAG ATGCACTCAT CAGCAAGATC 180
 10 GCCATCCAGG GCTCCCTAGC TGTGGGTCAG AACTGGTTAT TGGATGAGCA AACCAGCACC 240
 CTCACAAGGC TGGCTACTC TTACCGGGTC ATCTGCAGTG ACAACTACTA TGGAGACAAC 300
 TGCTCCCGCC TGTGCAAGAA GCGCAATGAC CACTTCGGCC ACTATGTGTG CCAGCCAGAT 360
 15 GGCAACTTGT CCTGCCTGCC CGGTTGGACT GGGGAATATT GCCAACAGCC TA 412

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 15

20 LONGITUD: 28
 TIPO: ácido nucleico
 NÚMERO DE CADENAS: monocatenario
 TOPOLOGÍA: lineal
 25 TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

SECUENCIA

30 CGGCGACGCC CGAGGGGATG GCGGCAGC 28

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 16

35 LONGITUD: 30
 TIPO: ácido nucleico
 NÚMERO DE CADENAS: monocatenario
 TOPOLOGÍA: lineal
 40 TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

SECUENCIA

45 GAATTCCACC GCGGTGGAGC TCCAATTCGC 30

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 17

50 LONGITUD: 28
 TIPO: ácido nucleico
 NÚMERO DE CADENAS: monocatenario
 TOPOLOGÍA: lineal
 55 TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

SECUENCIA

60 TCAGCTGGGC GGCAAGCCCA CGGGGAAC 28

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 18

65 LONGITUD: 33
 TIPO: ácido nucleico
 NÚMERO DE CADENAS: monocatenario
 TOPOLOGÍA: lineal
 TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

ES 2 284 205 T3

SECUENCIA

GCGGCCGCTT ATCGATACCG TCGACCTCGA GGG

33

5

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 19

LONGITUD: 52

TIPO: ácido nucleico

10

NÚMERO DE CADENAS: monocatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

15

SECUENCIA

TCATTATCA TCATCATCTT TATAATCGCT GGGCGGCAAG CCCACGGGGA AC

52

20

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 20

LONGITUD: 36

TIPO: ácido nucleico

25

NÚMERO DE CADENAS: monocatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

30

SECUENCIA

AAAGGATCCG AGGGCGGCAA GCCCACGGGG AACTCG

36

35

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 21

LONGITUD: 25

TIPO: ácido nucleico

NÚMERO DE CADENAS: monocatenario

40

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

SECUENCIA

45

TTATACCTCC GTGGCAATGA CACAT

25

50

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 22

LONGITUD: 52

TIPO: ácido nucleico

NÚMERO DE CADENAS: monocatenario

55

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

SECUENCIA

60

TCATTATCA TCATCATCTT TATAATCTAC CTCCGTGGCA ATGACACATT CA

52

65

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 23

LONGITUD: 36

TIPO: ácido nucleico

NÚMERO DE CADENAS: monocatenario

ES 2 284 205 T3

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

5 SECUENCIA

AAGGATCCCG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCA

36

10 INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID n.º 24

LONGITUD: 33

TIPO: ácido nucleico

NÚMERO DE CADENAS: monocatenario

15 TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (ADN de síntesis química)

20 SECUENCIA

CCTCTAGAGT CGCGGCCGTC GCACTCATTT ACC

33

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA

<120> NUEVO INHIBIDOR DE DIFERENCIACIÓN

30 <130> 992348ep/JH/ml

<140> 98919575.5

<141> 1998-05-13

35 <160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 191

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

50

55

60

65

ES 2 284 205 T3

<400> 1

```

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

```

<210> 2

45 <211> 500

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

55

60

65

ES 2 284 205 T3

<400> 2

5	Ser	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	Arg	Gly	1	5	10	15
	Val	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg	Pro	Cys	Glu	Pro	Gly	Cys	Arg	Thr	Phe	Phe	20	25	30	
10	Arg	Val	Cys	Leu	Lys	His	Phe	Gln	Ala	Val	Val	Ser	Pro	Gly	Pro	Cys	35	40	45	
	Thr	Phe	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Ser	Phe	Ala	50	55	60	
15	Val	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Asn	Pro	Leu	Gln	Leu	Pro	65	70	75	80
	Phe	Asn	Phe	Thr	Trp	Pro	Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Trp	85	90	95	
20	His	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	100	105	110	
25	Leu	Ile	Ser	Lys	Ile	Ala	Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Gln	Asn	115	120	125	
	Trp	Leu	Leu	Asp	Glu	Gln	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ser	130	135	140	
30	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys	Ser	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Asn	Cys	Ser	Arg	145	150	155	160
	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Asn	Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Val	Cys	Gln	Pro	165	170	175	
35	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Cys	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Gln	180	185	190	
40	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Ser	Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	195	200	205	
	Lys	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	210	215	220	
45	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	His	Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	225	230	235	240
	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Cys	Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	245	250	255	
50	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys	Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	260	265	270	
55	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser	Gly	Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	275	280	285	
	Gly	Tyr	Thr	Gly	Val	Asp	Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Cys	Asp	Ser	290	295	300	
60	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Gly	Tyr	305	310	315	320

65

ES 2 284 205 T3

His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser
 325 330 335
 5 Thr Leu Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg
 340 345 350
 Glu Arg Asn Gln Gly Ala Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe
 355 360 365
 10 Thr Gly Ser Asn Cys Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro
 370 375 380
 Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys
 385 390 395 400
 Arg Cys Arg Pro Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser
 405 410 415
 20 Asp Cys Ala Arg Asn Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu
 420 425 430
 Glu Asn Gly Leu Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg
 435 440 445
 Cys Glu Val Arg Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe
 450 455 460
 30 Asn Arg Ala Thr Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys
 465 470 475 480
 Asn Cys Pro Tyr Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly
 485 490 495
 35 Leu Pro Pro Ser
 500
 <210> 3
 <211> 659
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 3
 Ser Gly Val Phe Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly
 1 5 10 15
 50 Val Leu Ala Ser Gly Arg Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe
 20 25 30
 Arg Val Cys Leu Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys
 35 40 45
 Thr Phe Gly Thr Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala
 50 55 60
 Val Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro
 65 70 75 80
 Phe Asn Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp
 85 90 95
 65

ES 2 284 205 T3

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

65

ES 2 284 205 T3

Asp Cys Ala Arg Asn Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu
 420 425 430
 5 Glu Asn Gly Leu Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg
 435 440 445
 Cys Glu Val Arg Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe
 450 455 460
 10 Asn Arg Ala Thr Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys
 465 470 475 480
 15 Asn Cys Pro Tyr Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly
 485 490 495
 Leu Pro Pro Ser Phe Pro Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu
 500 505 510
 20 Ala Val Leu Leu Val Leu Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln
 515 520 525
 Leu Arg Leu Arg Arg Pro Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn
 530 535 540
 25 Leu Ser Asp Phe Gln Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys
 545 550 555 560
 30 Asn Thr Asn Gln Lys Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys
 565 570 575
 Ser Asn Cys Gly Lys Gln Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala
 580 585 590
 35 Pro Gly Pro Leu Gly Arg Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser
 595 600 605
 Asp Lys Ser Leu Gly Glu Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys
 610 615 620
 40 Pro Glu Cys Arg Ile Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr
 625 630 635 640
 45 Gln Ser Val Cys Leu Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala
 645 650 655
 Thr Glu Val

50 <210> 4
 <211> 3339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <220>
 <221> CDS
 <222> (277)..(2331)
 60 <220>
 <221> péptido maduro
 <222> (355)..(2331)

65

ES 2 284 205 T3

<400> 4

```

gccgccttgg tgcagcgtac accggcacta gcccgccttgc agccccagga ttagacagaa 60
5   gacgcgtcct cggcgcggtc gccgcccagc cgtagtcacc tggattacct acagcggcag 120
    ctgcagcgga gccagcgaga aggccaaagg ggagcagcgt cccgagagga gcgcctcttt 180
    tcaggggaccc cgccggctgg cggacgcgcg ggaaagcggc gtcgcgaaca gagccagatt 240
10  gagggcccgc ggggtggagag agcgacgccc gagggg atg gcg gca gcg tcc cgg 294
        Met Ala Ala Ala Ser Arg
        -25

15  agc gcc tct ggc tgg gcg cta ctg ctg ctg gtg gca ctt tgg cag cag 342
    Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu Trp Gln Gln
    -20 -15 -10 -5

    cgc gcg gcc ggc tcc ggc gtc ttc cag ctg cag ctg cag gag ttc atc 390
    Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Ile
        -1 1 5 10

20  aac gag cgc ggc gta ctg gcc agt ggg cgg cct tgc gag ccc ggc tgc 438
    Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg Pro Cys Glu Pro Gly Cys
        15 20 25

25  cgg act ttc ttc cgc gtc tgc ctt aag cac ttc cag gcg gtc gtc tcg 486
    Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser
        30 35 40

30  ccc gga ccc tgc acc ttc ggg acc gtc tcc acg ccg gta ttg ggc acc 534
    Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr
        45 50 55 60

35  aac tcc ttc gct gtc cgg gac gac agt agc ggc ggg ggg cgc aac cct 582
    Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro
        65 70 75

    ctc caa ctg ccc ttc aat ttc acc tgg ccg ggt acc ttc tcg ctc atc 630
    Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile
        80 85 90

40  atc gaa gct tgg cac gcg cca gga gac gac ctg cgg cca gag gcc ttg 678
    Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp Leu Arg Pro Glu Ala Leu
        95 100 105

45  cca cca gat gca ctc atc agc aag atc gcc atc cag ggc tcc cta gct 726
    Pro Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala
        110 115 120

50  gtg ggt cag aac tgg tta ttg gat gag caa acc agc acc ctc aca agg 774
    Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg
    125 130 135 140

    ctg cgc tac tct tac cgg gtc atc tgc agt gac aac tac tat gga gac 822
    Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp
    145 150 155

55  aac tgc tcc cgc ctg tgc aag aag cgc aat gac cac ttc ggc cac tat 870
    Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr
        160 165 170

```

ES 2 284 205 T3

5	gtg tgc cag cca gat ggc aac ttg tcc tgc ctg ccc ggt tgg act ggg 918 Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly 175 180 185
10	gaa tat tgc caa cag cct atc tgt ctt tcg ggc tgt cat gaa cag aat 966 Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser Gly Cys His Glu Gln Asn 190 195 200
15	ggc tac tgc agc aag cca gca gag tgc ctc tgc cgc cca ggc tgg cag 1014 Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu Cys Arg Pro Gly Trp Gln 205 210 215 220
20	ggc cgg ctg tgt aac gaa tgc atc ccc cac aat ggc tgt cgc cac ggc 1062 Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His Asn Gly Cys Arg His Gly 225 230 235
25	acc tgc agc act ccc tgg caa tgt act tgt gat gag ggc tgg gga ggc 1110 Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly 240 245 250
30	ctg ttt tgt gac caa gat ctc aac tac tgc acc cac cac tcc cca tgc 1158 Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys Thr His His Ser Pro Cys 255 260 265
35	aag aat ggg gca acg tgc tcc aac agt ggg cag cga agc tac acc tgc 1206 Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly Gln Arg Ser Tyr Thr Cys 270 275 280
40	acc tgt cgc cca ggc tac act ggt gtg gac tgt gag ctg gag ctc agc 1254 Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp Cys Glu Leu Glu Leu Ser 285 290 295 300
45	gag tgt gac agc aac ccc tgt cgc aat gga ggc agc tgt aag gac cag 1302 Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln 305 310 315
50	gag gat ggc tac cac tgc ctg tgt cct ccg ggc tac tat ggc ctg cat 1350 Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Leu His 320 325 330
55	tgt gaa cac agc acc ttg agc tgc gcc gac tcc ccc tgc ttc aat ggg 1398 Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly 335 340 345
60	ggc tcc tgc cgg gag cgc aac cag ggg gcc aac tat gct tgt gaa tgt 1446 Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala Asn Tyr Ala Cys Glu Cys 350 355 360
65	ccc ccc aac ttc acc ggc tcc aac tgc gag aag aaa gtg gac agg tgc 1494 Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys 365 370 375 380
	acc agc aac ccc tgt gcc aac ggg gga cag tgc ctg aac cga ggt cca 1542 Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Asn Arg Gly Pro 385 390 395
	agc cgc atg tgc cgc tgc cgt cct gga ttc acg ggc acc tac tgt gaa 1590 Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Cys Glu 400 405 410

ES 2 284 205 T3

5	ctc cac gtc agc gac tgt gcc cgt aac cct tgc gcc cac ggt ggc act Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro Cys Ala His Gly Gly Thr 415 420 425	1638
10	tgc cat gac ctg gag aat ggg ctc atg tgc acc tgc cct gcc ggc ttc Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe 430 435 440	1686
15	tct ggc cga cgc tgt gag gtg cgg aca tcc atc gat gcc tgt gcc tcg Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser 445 450 455 460	1734
20	agt ccc tgc ttc aac agg gcc acc tgc tac acc gac ctc tcc aca gac Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp 465 470 475	1782
25	acc ttt gtg tgc aac tgc cct tat ggc ttt gtg ggc agc cgc tgc gag Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu 480 485 490	1830
30	ttc ccc gtg ggc ttg ccg ccc agc ttc ccc tgg gtg gcc gtc tcg ctg Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro Trp Val Ala Val Ser Leu 495 500 505	1878
35	ggg gtg ggc ctg gca gtg ctg ctg gta ctg ctg ggc atg gtg gca gtg Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu Leu Gly Met Val Ala Val 510 515 520	1926
40	gct gtg cgg cag ctg cgg ctt cga cgg ccg gac gac ggc agc agg gaa Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro Asp Asp Gly Ser Arg Glu 525 530 535 540	1974
45	gcc atg aac aac ttg tgc gac ttc cag aag gac aac ctg att cct gcc Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala 545 550 555	2022
50	gcc cag ctt aaa aac aca aac cag aag aag gag ctg gaa gtg gac tgt Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys 560 565 570	2070
55	ggc ctg gac aag tcc aac tgt ggc aaa cag caa aac cac aca ttg gac Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln Gln Asn His Thr Leu Asp 575 580 585	2118
60	tat aat ctg gcc cca ggg ccc ctg ggg cgg ggg acc atg cca gga aag Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg Gly Thr Met Pro Gly Lys 590 595 600	2166
65	ttt ccc cac agt gac aag agc tta gga gag aag gcg cca ctg cgg tta Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu Lys Ala Pro Leu Arg Leu 605 610 615 620	2214
70	cac agt gaa aag cca gag tgt cgg ata tca gcg ata tgc tcc ccc agg His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg 625 630 635	2262
75	gac tcc atg tac cag tct gtg tgt ttg ata tca gag gag agg aat gaa Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu 640 645 650	2310

ES 2 284 205 T3

tgt gtc att gcc acg gag gta taaggcagga gcctacctgg acatccctgc 2361
Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
655

5 tcagccccgc ggctggacct tccttctgca ttgtttacat tgcctcctgg atgggacgtt 2421
tttcatatgc aacgtgctgc tctcaggagg aggaggggaat ggcaggaacc ggacagactg 2481
10 tgaacttgcc aagagatgca atacccttcc acaccttttg gtgtctgtct ggcatcagat 2541
tggcagctgc accaaccaga ggaacagaag agaagagaga tgccactggg cactgccctg 2601
ccagtagtgg ccttcagggg gctccttccg gggctccggc ctgttttcca gagagagtgg 2661
15 cagtagcccc atggggcccg gagctgctgt ggcctccact ggcatccgtg tttccaaaag 2721
tgcctttggc ccaggctcca cggcgacagt tgggccc aaa tcagaaagga gagagggggc 2781
caatgagggc agggcctcct gtgggctgga aaaccactgg gtgcgtctct tgctgggggtt 2841
20 tgccttgag gtgaggtgag tgctcgaggg aggggagtgc tttctgcccc atgcctccaa 2901
ctactgtatg caggcctggc tctctggtct agggcctttg ggcaagaatg tccgtctacc 2961
25 cggcttccac caccctctgg ccctgggctt ctgtaagcag acaggcagag ggctgcccc 3021
tcccaccagc caaggggtgc aggcctaact ggggcaactca gggcagtgtg ttggaaattc 3081
cactgagggg gaaatcaggt gctgcggccg cctgggcccct ttcctccctc aagcccctc 3141
30 ccacaacctc gagcctgggc tctgggtccac tactgcccc aaccacctc aaagctggtc 3201
ttcagaaatc aataatatga gtttttattt tgtttttttt tttttttttg tagttttattt 3261
35 tggagtctag tatttcaata atttaagaat cagaagcact gacctttcta cattttataa 3321
cattattttg tatataat 3339

40 <210> 5
<211> 685
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
45 <400> 5

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

ES 2 284 205 T3

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

ES 2 284 205 T3

	Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	
					395					400					405		
5	Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro	
				410					415					420			
	Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Met	Cys	
			425					430					435				
10	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Thr	Ser	
		440					445					450					
15	Ile	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr	
	455					460					465					470	
	Thr	Asp	Leu	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly	Phe	
					475					480					485		
20	Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe	Pro	
				490					495					500			
25	Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Leu	
			505					510					515				
	Leu	Gly	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro	
		520					525					530					
30	Asp	Asp	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln	Lys	
	535					540					545					550	
	Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys	Lys	
					555					560					565		
35	Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys	Gln	
				570					575					580			
40	Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Arg	
			585					590					595				
	Gly	Thr	Met	Pro	Gly	Lys	Phe	Pro	His	Ser	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	
		600					605					610					
45	Lys	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Pro	Glu	Cys	Arg	Ile	Ser	
	615					620					625					630	
	Ala	Ile	Cys	Ser	Pro	Arg	Asp	Ser	Met	Tyr	Gln	Ser	Val	Cys	Leu	Ile	
					635					640					645		
50	Ser	Glu	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Val	Ile	Ala	Thr	Glu	Val				
				650					655								

55 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <220>
 65 <221> CDS
 <222> (1)..(24)

ES 2 284 205 T3

<400> 6

gat tat aaa gat gat gat gat aaa tga 27
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 7

10 $\langle 211 \rangle$ 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 7

20 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 8

25 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 8

35 tggcartgya aytgycarga 20

<210> 9

 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 9

50 atytttyyt crcarttraa 20

 $\langle 210 \rangle$ 10

<211> 2663

55 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

60 $\langle 222 \rangle$ (179)..(2347)

 $\langle 220 \rangle$

<221> péptido maduro

65 $\langle 222 \rangle$ (242)..(2347)

ES 2 284 205 T3

<400> 10

```

cttgggaaga ggcggagacc ggctttttaa gaaagaagtc ctgggtcctg cggctctgggg 60
5  cgaggcaagg gcgcttttct gcccacgctc cccgtggccc atcgatcccc cgcgcgtccg 120
    ccgctgttct aaggagagaa gtggggggccc ccaggctcg cgcgtggagc gaagcagc 178

10  atg ggc agt cgg tgc gcg ctg gcc ctg gcg gtg ctc tgc gcc ttg ctg 226
    Met Gly Ser Arg Cys Ala Leu Ala Leu Ala Val Leu Ser Ala Leu Leu
    -20 -15 -10

15  tgt cag gtc tgg agc tct ggg gtg ttc gaa ctg aag ctg cag gag ttc 274
    Cys Gln Val Trp Ser Ser Gly Val Phe Glu Leu Lys Leu Gln Glu Phe
    -5 -1 1 5 10

20  gtc aac aag aag ggg ctg ctg ggg aac cgc aac tgc tgc cgc ggg ggc 322
    Val Asn Lys Lys Gly Leu Leu Gly Asn Arg Asn Cys Cys Arg Gly Gly
    15 20 25

25  gcg ggg cca ccg ccg tgc gcc tgc cgg acc ttc ttc cgc gtg tgc ctc 370
    Ala Gly Pro Pro Pro Cys Ala Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu
    30 35 40

30  aag cac tac cag gcc agc gtg tcc ccc gag ccg ccc tgc acc tac ggc 418
    Lys His Tyr Gln Ala Ser Val Ser Pro Glu Pro Pro Cys Thr Tyr Gly
    45 50 55

35  agc gcc gtc acc ccc gtg ctg ggc gtc gac tcc ttc agt ctg ccc gac 466
    Ser Ala Val Thr Pro Val Leu Gly Val Asp Ser Phe Ser Leu Pro Asp
    60 65 70 75

40  ggc ggg ggc gcc gac tcc gcg ttc agc aac ccc atc cgc ttc ccc ttc 514
    Gly Gly Gly Ala Asp Ser Ala Phe Ser Asn Pro Ile Arg Phe Pro Phe
    80 85 90

45  ggc ttc acc tgg ccg ggc acc ttc tct ctg att att gaa gct ctc cac 562
    Gly Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Leu His
    95 100 105

50  aca gat tct cct gat gac ctc gca aca gaa aac cca gaa aga ctc atc 610
    Thr Asp Ser Pro Asp Asp Leu Ala Thr Glu Asn Pro Glu Arg Leu Ile
    110 115 120

55  agc cgc ctg gcc acc cag agg cac ctg acg gtg ggc gag gag tgg tcc 658
    Ser Arg Leu Ala Thr Gln Arg His Leu Thr Val Gly Glu Glu Trp Ser
    125 130 135

60  cag gac ctg cac agc agc ggc cgc acg gac ctc aag tac tcc tac cgc 706
    Gln Asp Leu His Ser Ser Gly Arg Thr Asp Leu Lys Tyr Ser Tyr Arg
    140 145 150 155

65  ttc gtg tgt gac gaa cac tac tac gga gag ggc tgc tcc gtt ttc tgc 754
    Phe Val Cys Asp Glu His Tyr Tyr Gly Glu Gly Cys Ser Val Phe Cys
    160 165 170

70  cgt ccc cgg gac gat gcc ttc ggc cac ttc acc tgt ggg gag cgt ggg 802
    Arg Pro Arg Asp Asp Ala Phe Gly His Phe Thr Cys Gly Glu Arg Gly
    175 180 185

75  gag aaa gtg tgc aac cct ggc tgg aaa ggg ccc tac tgc aca gag ccg 850
    Glu Lys Val Cys Asn Pro Gly Trp Lys Gly Pro Tyr Cys Thr Glu Pro
    190 195 200

80  atc tgc ctg cct gga tgt gat gag cag cat gga ttt tgt gac aaa cca 898
    Ile Cys Leu Pro Gly Cys Asp Glu Gln His Gly Phe Cys Asp Lys Pro
    205 210 215

```

ES 2 284 205 T3

5	ggg gaa tgc aag tgc aga gtg ggc tgg cag ggc cgg tac tgt gac gag Gly Glu Cys Lys Cys Arg Val Gly Trp Gln Gly Arg Tyr Cys Asp Glu 220 225 230 235	946
10	tgt atc cgc tat cca ggc tgt ctc cat ggc acc tgc cag cag ccc tgg Cys Ile Arg Tyr Pro Gly Cys Leu His Gly Thr Cys Gln Gln Pro Trp 240 245 250	994
15	cag tgc aac tgc cag gaa ggc tgg ggc ctt ttc tgc aac cag gac Gln Cys Asn Cys Gln Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asn Gln Asp 255 260 265	1042
20	ctg aac tac tgc aca cac cat aag ccc tgc aag aat gga gcc acc tgc Leu Asn Tyr Cys Thr His His Lys Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys 270 275 280	1090
25	acc aac acg ggc cag ggg agc tac act tgc tct tgc cgg cct ggg tac Thr Asn Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr 285 290 295	1138
30	aca ggt gcc acc tgc gag ctg ggg att gac gag tgt gac ccc agc cct Thr Gly Ala Thr Cys Glu Leu Gly Ile Asp Glu Cys Asp Pro Ser Pro 300 305 310 315	1186
35	tgt aag aac gga ggg agc tgc acg gat ctc gag aac agc tac tcc tgt Cys Lys Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Ser Cys 320 325 330	1234
40	acc tgc cca ccc ggc ttc tac ggc aaa atc tgt gaa ttg agt gcc atg Thr Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Lys Ile Cys Glu Leu Ser Ala Met 335 340 345	1282
45	acc tgt gcg gac ggc cct tgc ttt aac ggg ggt cgg tgc tca gac agc Thr Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Arg Cys Ser Asp Ser 350 355 360	1330
50	ccc gat gga ggg tac agc tgc cgc tgc ccc gtg ggc tac tcc ggc ttc Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Cys Arg Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Phe 365 370 375	1378
55	aac tgt gag aag aaa att gac tac tgc agc tct tca ccc tgt tct aat Asn Cys Glu Lys Lys Ile Asp Tyr Cys Ser Ser Ser Pro Cys Ser Asn 380 385 390 395	1426
60	ggg gcc aag tgt gtg gac ctc ggt gat gcc tac ctg tgc cgc tgc cag Gly Ala Lys Cys Val Asp Leu Gly Asp Ala Tyr Leu Cys Arg Cys Gln 400 405 410	1474
65	gcc ggc ttc tcg ggg agg cac tgt gac gac aac gtg gac gac tgc gcc Ala Gly Phe Ser Gly Arg His Cys Asp Asp Asn Val Asp Asp Cys Ala 415 420 425	1522
70	tcc tcc ccg tgc gcc aac ggg ggc acc tgc cgg gat ggc gtg aac gac Ser Ser Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Arg Asp Gly Val Asn Asp 430 435 440	1570
75	ttc tcc tgc acc tgc ccg cct ggc tac acg ggc agg aac tgc agt gcc Phe Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Ser Ala 445 450 455	1618

ES 2 284 205 T3

5	ccc gtc agc agg tgc gag cac gca ccc tgc cac aat ggg gcc acc tgc Pro Val Ser Arg Cys Glu His Ala Pro Cys His Asn Gly Ala Thr Cys 460 465 470 475	1666
10	cac gag agg ggc cac cgc tat gtg tgc gag tgt gcc cga ggc tac ggg His Glu Arg Gly His Arg Tyr Val Cys Glu Cys Ala Arg Gly Tyr Gly 480 485 490	1714
15	ggc ccc aac tgc cag ttc ctg ctc ccc gag ctg ccc ccg ggc cca gcg Gly Pro Asn Cys Gln Phe Leu Leu Pro Glu Leu Pro Pro Gly Pro Ala 495 500 505	1762
20	gtg gtg gac ctc act gag aag cta gag ggc cag ggc ggg cca ttc ccc Val Val Asp Leu Thr Glu Lys Leu Glu Gly Gln Gly Gly Pro Phe Pro 510 515 520	1810
25	tgg gtg gcc gtg tgc gcc ggg gtc atc ctt gtc ctc atg ctg ctg ctg Trp Val Ala Val Cys Ala Gly Val Ile Leu Val Leu Met Leu Leu Leu 525 530 535	1858
30	ggc tgt gcc gct gtg gtg gtc tgc gtc cgg ctg agg ctg cag aag cac Gly Cys Ala Ala Val Val Val Cys Val Arg Leu Arg Leu Gln Lys His 540 545 550 555	1906
35	cgg ccc cca gcc gac ccc tgc cgg ggg gag acg gag acc atg aac aac Arg Pro Pro Ala Asp Pro Cys Arg Gly Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn 560 565 570	1954
40	ctg gcc aac tgc cag cgt gag aag gac atc tca gtc agc atc atc ggg Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys Asp Ile Ser Val Ser Ile Ile Gly 575 580 585	2002
45	gcc acg cag atc aag aac acc aac aag aag gcg gac ttc cac ggg gac Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr Asn Lys Lys Ala Asp Phe His Gly Asp 590 595 600	2050
50	cac agc gcc gac aag aat ggc ttc aag gcc cgc tac cca gcg gtg gac His Ser Ala Asp Lys Asn Gly Phe Lys Ala Arg Tyr Pro Ala Val Asp 605 610 615	2098
55	tat aac ctc gtg cag gac ctc aag ggt gac gac acc gcc gtc agg gac Tyr Asn Leu Val Gln Asp Leu Lys Gly Asp Asp Thr Ala Val Arg Asp 620 625 630 635	2146
60	gcg cac agc aag cgt gac acc aag tgc cag ccc cag ggc tcc tca ggg Ala His Ser Lys Arg Asp Thr Lys Cys Gln Pro Gln Gly Ser Ser Gly 640 645 650	2194
65	gag gag aag ggg acc ccg acc aca ctc agg ggt gga gaa gca tct gaa Glu Glu Lys Gly Thr Pro Thr Thr Leu Arg Gly Gly Glu Ala Ser Glu 655 660 665	2242
70	aga aaa agg ccg gac tcg ggc tgt tca act tca aaa gac acc aag tac Arg Lys Arg Pro Asp Ser Gly Cys Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr 670 675 680	2290
75	cag tcg gtg tac gtc ata tcc gag gag aag gat gag tgc gtc ata gca Gln Ser Val Tyr Val Ile Ser Glu Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala 685 690 695	2338

ES 2 284 205 T3

act gag gtg taaaatggaa gtgagatggc aagactcccg tttctcttaa 2387
Thr Glu Val
700

5 aataagtaaa attccaagga tatatgcccc aacgaatgct gctgaagagg agggaggcct 2447
cgtggactgc tgctgagaaa ccgagttcag accgagcagg ttctcctcct gaggtcctcg 2507
10 acgcctgccg acagcctgtc gcggcccgcc cgcctgcggc actgccttcc gtgacgtcgc 2567
cgttgcacta tggacagttg ctcttaagag aatatatatt taaatgggtg aactgaatta 2627
cgcataagaa gcattgactg cctgagtgtg tattttt 2663

15 <210> 11
<211> 723
<212> PRT
20 <213> *Homo sapiens*
<400> 11

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

ES 2 284 205 T3

	Ile Cys Leu Pro Gly Cys Asp Glu Gln His Gly Phe Cys Asp Lys Pro	205	210	215
5	Gly Glu Cys Lys Cys Arg Val Gly Trp Gln Gly Arg Tyr Cys Asp Glu	220	225	230 235
	Cys Ile Arg Tyr Pro Gly Cys Leu His Gly Thr Cys Gln Gln Pro Trp	240	245	250
10	Gln Cys Asn Cys Gln Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asn Gln Asp	255	260	265
	Leu Asn Tyr Cys Thr His His Lys Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys	270	275	280
15	Thr Asn Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr	285	290	295
	Thr Gly Ala Thr Cys Glu Leu Gly Ile Asp Glu Cys Asp Pro Ser Pro	300	305	310 315
	Cys Lys Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Ser Cys	320	325	330
25	Thr Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Lys Ile Cys Glu Leu Ser Ala Met	335	340	345
	Thr Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Arg Cys Ser Asp Ser	350	355	360
30	Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Cys Arg Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Phe	365	370	375
	Asn Cys Glu Lys Lys Ile Asp Tyr Cys Ser Ser Ser Pro Cys Ser Asn	380	385	390 395
	Gly Ala Lys Cys Val Asp Leu Gly Asp Ala Tyr Leu Cys Arg Cys Gln	400	405	410
40	Ala Gly Phe Ser Gly Arg His Cys Asp Asp Asn Val Asp Asp Cys Ala	415	420	425
	Ser Ser Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Arg Asp Gly Val Asn Asp	430	435	440
45	Phe Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Ser Ala	445	450	455
	Pro Val Ser Arg Cys Glu His Ala Pro Cys His Asn Gly Ala Thr Cys	460	465	470 475
50	His Glu Arg Gly His Arg Tyr Val Cys Glu Cys Ala Arg Gly Tyr Gly	480	485	490
	Gly Pro Asn Cys Gln Phe Leu Leu Pro Glu Leu Pro Pro Gly Pro Ala	495	500	505
55	Val Val Asp Leu Thr Glu Lys Leu Glu Gly Gln Gly Gly Pro Phe Pro	510	515	520

ES 2 284 205 T3

Trp Val Ala Val Cys Ala Gly Val Ile Leu Val Leu Met Leu Leu Leu
 525 530 535
 5 Gly Cys Ala Ala Val Val Val Cys Val Arg Leu Arg Leu Gln Lys His
 540 545 550 555
 Arg Pro Pro Ala Asp Pro Cys Arg Gly Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn
 560 565 570
 10 Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys Asp Ile Ser Val Ser Ile Ile Gly
 575 580 585
 15 Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr Asn Lys Lys Ala Asp Phe His Gly Asp
 590 595 600
 His Ser Ala Asp Lys Asn Gly Phe Lys Ala Arg Tyr Pro Ala Val Asp
 605 610 615
 20 Tyr Asn Leu Val Gln Asp Leu Lys Gly Asp Asp Thr Ala Val Arg Asp
 620 625 630 635
 25 Ala His Ser Lys Arg Asp Thr Lys Cys Gln Pro Gln Gly Ser Ser Gly
 640 645 650
 Glu Glu Lys Gly Thr Pro Thr Thr Leu Arg Gly Gly Glu Ala Ser Glu
 655 660 665
 30 Arg Lys Arg Pro Asp Ser Gly Cys Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr
 670 675 680
 35 Gln Ser Val Tyr Val Ile Ser Glu Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala
 685 690 695
 Thr Glu Val
 700

40 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN 40
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

50 <400> 12

tgacggtggg cgaggagtgg

20

55 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

65 <400> 13

gcagctgtac cctccatcgg

20

ES 2 284 205 T3

<210> 14
 <211> 716
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14
 10 tgacgggtggg cgaggagtgg tcccaggacc tgcacagcag cggccgcacg gacctcaagt 60
 actcctaccg cttcgtgtgt gacgaacact actacggaga gggctgctcc gttttctgcc 120
 gtccccggga cgatgccttc ggccacttca cctgtgggga gcgtggggag aaagtgtgca 180
 accctggctg gaaagggccc tactgcacag agccgatctg cctgcctgga tgtgatgagc 240
 agcatggatt ttgtgacaaa ccaggggaat gcaagtgcag agtgggctgg cagggccggg 300
 15 actgtgacga gtgtatccgc tatccagget gtctccatgg cacctgccag cagccctggc 360
 agtgcaactg ccaggaaggc tggggggggc ttttctgcaa ccaggacctg aactactgca 420
 cacaccataa gccctgcaag aatggagcca cctgcaccaa cacgggccag gggagctaca 480
 cttgctcttg ccggcctggg tacacaggtg ccacctgcga gctggggatt gacgagtgcg 540
 accccagccc ttgtaagaac ggaggagct gcacggatct cgagaacagc tactcctgta 600
 cctgcccacc cggcttctac ggcaaaatct gtgaattgag tgccatgacc tgtgcggacg 660
 20 gcccttgctt taacgggggt cggtgctcag acagccccga tggagggtac agctgc 716
 <210> 15
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 15
 35 ttgggcacca actccttcgc
 <210> 16
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 45 <400> 16
 taggctgttg gcaatattcc
 50 <210> 17
 <211> 412
 <212> ADN
 55 <213> *Homo sapiens*
 <400> 17
 60 ttgggcacca actccttcgc tgtccgggac gacagtagcg gcggggggcg caaccctctc 60
 caactgccct tcaatttcac ctggccgggt accttctcgc tcatcatcga agcttggcac 120
 gcgccaggag acgacctgcg gccagaggcc ttgccaccag atgcactcat cagcaagatc 180
 gccatccagg gctccctagc tgtgggtcag aactggttat tggatgagca aaccagcacc 240
 ctcacaaggc tgcgctactc ttaccgggtc atctgcagtg acaactacta tggagacaac 300
 65 tgctcccgcc tgtgcaagaa gcgcaatgac cacttcggcc actatgtgtg ccagccagat 360
 ggcaacttgt cctgcctgcc cggttggact ggggaatatt gccaacagcc ta 412

ES 2 284 205 T3

	<210> 18	
	<211> 28	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
10	<400> 18	
	cggcgacgcc cgaggggatg gcggcagc	28
15	<210> 19	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
25	<400> 19	
	gaattccacc gcggtggagc tccaattcgc	30
30	<210> 20	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 20	
40	tcagctgggc ggcaagccca cggggaac	28
	<210> 21	
45	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 21	
55	gcggccgctt atcgataccg tcgacctga ggg	33
	<210> 22	
	<211> 52	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético 52	

ES 2 284 205 T3

<400> 22
 tcattttatca tcatcatctt tataatcgct gggcggcaag cccacgggga
 ac 52
 5 <210> 23
 <211> 36
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 15 <400> 23
 aaaggatccg agggcggcaa gcccacgggg aactcg 36
 20 <210> 24
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 30 <400> 24
 ttatacctcc gtggcaatga cacat 25
 35 <210> 25
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 25
 45 tcattttatca tcatcatctt tataatctac ctccgtggca atgacacatt
 ca 52
 <210> 26
 50 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 26
 60 aaggatcccg aggggtgtctg ctggaagcca ggctca 36
 <210> 27
 <211> 33
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 284 205 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

5 <400> 27

cctctagagt cgcggccgtc gcactcattt acc

33

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65