



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 342 603**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04713152 .9**

(96) Fecha de presentación : **20.02.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1594960**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

(54) Título: **Ciclooxigenasa-3 humana y usos de la misma.**

(30) Prioridad: **21.02.2003 US 449230 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.07.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.07.2010

(73) Titular/es: **JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.**
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE

(72) Inventor/es: **Qin, Ning;**
Flores, Christopher;
Zhang, Sui-Po y
Codd, Ellen, E.

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

Ciclooxigenasa-3 humana y usos de la misma.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una isozima ciclooxigenasa. En particular, la presente invención se refiere a moléculas aisladas de ácidos nucleicos y polipéptidos de una nueva isozima ciclooxigenasa humana COX-3 y a usos de la misma.

10 **Antecedentes de la invención**

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se han utilizado de varias maneras durante más de 3.500 años. Esta clase de agentes antiinflamatorios ejerce acciones antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Los ejemplos de AINE incluyen, pero sin limitación, la aspirina, ibuprofeno, ketoprofeno, piroxicam, naproxeno, sulindaco, subsalicilato de colina, diflunisal, fenoprofeno, indometacina, meclofenamato, salsalato, tolmetina y salicilato de magnesio. Se cree que los AINE funcionan inhibiendo la producción de prostaglandinas (PG), un grupo de compuestos que derivan de ácidos grasos insaturados de 20 carbonos, principalmente del ácido araquidónico, mediante la ruta de la ciclooxigenasa (COX).

En sitios de inflamación, la COX convierte el ácido araquidónico en el endoperóxido PGG₂, que después se degrada a prostaglandina H₂ (PGH₂). La PGH₂ se convierte a su vez en prostanoides incluyendo PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ y tromboxano A₂ (TxA₂). La producción local de prostanoides, tales como PGE₂, puede sensibilizar las terminaciones nerviosas del dolor y aumentar el flujo sanguíneo, promoviendo sensaciones de dolor y dirigiendo la hinchazón y el enrojecimiento de los tejidos.

Los AINE inhiben selectivamente la actividad de la COX, inhibiendo por tanto la formación de PGE₂ y minimizando la inflamación (Warner *et al.*, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:13371-13373). Desafortunadamente, el uso de AINE esta limitado a menudo por efectos secundarios tales como el sangrado gastrointestinal, úlceras, fallo renal y otros. Estos efectos secundarios están causados, en general, por una indeseable reducción de prostaglandinas. Las prostaglandinas pueden funcionar como estimulantes autocrinos y paracrinos en células normales para el mantenimiento de la fisiología normal. El desarrollo de nuevos agentes que actuarán más específicamente al lograr una reducción de las prostaglandinas en las células diana sin alterar la producción de prostaglandinas en las células normales es uno de los mayores objetivos de la investigación de los AINE.

El acetaminofeno es un analgésico seguro y eficaz para calmar el dolor de leve a medio asociado con cirugía oral, episiotomía, dolores posparto, cáncer, osteoartritis, dolor de cabeza, dismenorrea y similares. A diferencia de AINE tales como la aspirina, el acetaminofeno posee potentes acciones antipiréticas y analgésicas (Botting, 2000, Clin. Infect. Diseases. 31:S202-10). Ensayos clínicos han demostrado que el acetaminofeno carece de los efectos secundarios gastrointestinales de la aspirina. Más aún, el acetaminofeno no tiene ningún efecto en el mecanismo hemostático de los niños y puede utilizarse en situaciones clínicas en las cuales la aspirina puede causar sangrados peligrosos. A pesar de su uso generalizado, el mecanismo de acción del acetaminofeno aún no se ha aclarado totalmente.

Hasta hace muy poco, sólo se habían identificado 2 isoformas de la ciclooxigenasa: COX-1, que se expresa constitutivamente, y COX-2, que es inducible. La COX-1 parece ser responsable de la producción de prostanoides fisiológicamente relevantes, tales como los PGI₂ y PGE₂ en el tracto gastrointestinal (GI), siendo éstos protectores en el estómago. La COX-1 también esta involucrada en la producción de TxA₂, un potente inductor de la agregación plaquetaria y causa vasoconstricción. Además de su papel en la antiinflamación, los inhibidores de COX-1, tales como la aspirina, inhiben la coagulación sanguínea y están asociados con la toxicidad GI. La COX-2 se regula de forma positiva rápidamente en sitios de inflamación y parece ser responsable de la formación de prostanoides proinflamatorios. Los inhibidores de COX-2 más selectivos probablemente tendrían menos toxicidad GI, pero aun calmarían el dolor y otros signos clásicos de inflamación, tales como el calor, el enrojecimiento y la hinchazón. Ni COX-1 ni COX-2 son sensibles al acetaminofeno a concentraciones terapéuticas del fármaco cuando se ensaya en células completas o en homogeneizados celulares, sugiriendo que ni COX-1 ni COX-2 son buenas dianas para la acción del acetaminofeno.

Un gen codificante de la tercera isozima ciclooxigenasa o COX-3 se ha identificado recientemente en córtex cerebral canino (Chandrasekharan *et al.*, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:13926-31). Se sugirió que la inhibición de la COX-3 representaba un mecanismo primario central para la acción del acetaminofeno. El gen de la COX-3 de perro es una variante de corte y empalme del gen de la COX-1 de perro que conserva el intrón 1. La proteína COX-3 de perro contiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la proteína COX-1 de perro en el extremo carboxilo y una inserción de 33 aminoácidos en el extremo amino. El ARNm de la COX-3 de perro se expresa en el córtex cerebral canino y en cantidades inferiores en otros tejidos analizados. Estudios funcionales han demostrado que la COX-3 de perro posee actividad ciclooxigenasa dependiente de glicosilación, y esta potentemente inhibida por algunos, pero no todos, los AINE. Una comparación de la actividad de la COX-3 de perro con la COX-1 y COX-2 murinas demuestra que la COX-3 de perro se inhibe selectivamente por fármacos analgésicos/antipiréticos tales como el acetaminofeno, fenacetina, antipirina y dipirone. Por ejemplo, a una concentración de sustrato de 5 mM, el acetaminofeno es 100 veces más selectivo para la inhibición de la COX-3 de perro frente a la COX-2 murina y 2 veces más selectivo frente a la COX-1 murina (Chandrasekharan *et al.*, 2002, anteriormente).

Aunque la COX-3 se ha identificado en córtex cerebral canino, la existencia de COX-3 humana requería más experimentación porque basándose en las secuencias genómicas humanas publicadas, el intrón-1 de la COX-1 humana esta fuera del marco con el resto de la secuencia codificante de la COX-1 humana. No se sabía si las secuencias genómicas humanas publicadas constituyen verdaderos polimorfismos o errores de secuenciación (Chandrasekharan *et al.* 2002, anteriormente). Se necesitan realizar estudios cuidadosamente diseñados para demostrar la existencia de la COX-3 humana o la ausencia de la misma. Los resultados de estudios de la COX-3 humana pueden ser útiles para dilucidar el mecanismo de analgésicos existentes, tales como el acetaminofeno, y para desarrollar analgésicos más específicos con menos efectos secundarios.

El documento WO 03/029411 describe secuencias de COX humanas.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican una nueva isozima ciclooxigenasa humana, denominada en este documento en lo sucesivo COX-3 humana, a los polipéptidos codificados por las secuencias de ácidos nucleicos aisladas, y al uso de las moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos de las mismas.

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima ciclooxigenasa-3, en la que la enzima comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:4 o la SEC ID N°:6, o la secuencia complementaria de la misma.

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima ciclooxigenasa-3, en la que la enzima comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:9 o SEC ID N°:11, o la secuencia complementaria de la misma.

La invención proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención.

La invención proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende un vector de expresión de la invención.

La invención proporciona un polipéptido sustancialmente purificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID N°:4 o SEC ID N°:6, en el que el mencionado polipéptido es capaz de convertir ácido araquidónico en prostaglandina H2.

La invención proporciona un método para expresar una proteína ciclooxigenasa-3 humana en una célula hospedadora recombinante, que comprende los pasos de:

(a) introducir un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 en una célula; y

(b) cultivar las células en condiciones que permitan la expresión de la proteína ciclooxigenasa-3 humana desde el vector de expresión.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las secuencias de ADN del exón 1, intrón 1 y exón 2 de la Cox-1 humana, como se público en la base de datos genómica humana del NCBI. La Figura 1B muestra que ninguno de los tres marcos de lectura (a, b y c) da como resultado un polipéptido que comprenda las secuencias de aminoácidos codificadas por el exón 1, intrón 1 y exón 2. Una terminación de la traducción se indica con *. Las secuencias de nucleótidos del exón 1 y el exón 2, y sus secuencias de aminoácidos codificadas como en Cox-1, están sombreadas. La Figura 1C muestra la traducción de Cox-3a tras la edición del ARN. La Figura 1D muestra la traducción de Cox-3b tras la edición del ARN. La Figura 1E muestra una comparación de secuencias peptídicas codificadas por el intrón 1 de COX-1 en COX-3 humana y canina con (humana) o sin (canina) edición de ARN. El alineamiento se realizó utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch para encontrar el alineamiento de 2 secuencias completas. El alineamiento maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de huecos. Umbrales de presentación de coincidencias para el o los alineamientos: |= IDENTIFY; : = 2; = 1.

La Figura 2 ilustra las estructuras de los genes COX-3 y COX-1 humanos.

La Figura 3 muestra que la proteína Cox-3a humana cataliza la síntesis de PGF2a a partir de ácido araquidónico.

Descripción detallada de la invención

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos o científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención.

Los términos “que incluye”, “que comprende”, “que contiene” y “que tiene” se utilizan aquí en su sentido amplio, no limitante.

ES 2 342 603 T3

A continuación se proporcionan abreviaturas que a veces se utilizan en esta memoria descriptiva:

pb = pares de bases

ADNc = ADN complementario

SNC = Sistema Nervioso Central

COX = ciclooxigenasa

kb = kilobase; 1000 pares de bases

kDa = kilodalton; 1000 dalton

AINE = fármacos antiinflamatorios no esteroideos

nt = nucleótido

PAGE = electroforesis en gel de poliacrilamida

PCR = reacción en cadena de la polimerasa

PG = prostaglandina

SDS = dodecilsulfato sódico

ARNip = ARN interferente pequeño

UTR = regiones no traducidas

Una “actividad”, una “actividad biológica” o una “actividad funcional” de un polipéptido o ácido nucleico de la invención se refiere a una actividad ejercida por una molécula de polipéptido o ácido nucleico de la invención como se determina *in vivo* o *in vitro*, de acuerdo con técnicas convencionales. Tales actividades pueden ser una actividad directa, tal como una asociación con o una actividad enzimática en una segunda proteína, o una actividad indirecta, tal como una actividad de señalización celular mediada por la interacción de la proteína con una segunda proteína. Una actividad biológica ejemplar asociada con la COX-3 humana es su actividad enzimática para convertir el ácido araquidónico en PGH₂, y esta actividad se inhibe selectivamente por fármacos analgésicos/antipiréticos, tales como el acetaminofeno.

Un “analgésico” o un “fármaco analgésico” es un agente que alivia el dolor sin causar pérdida de consciencia. Un “antipirético” o “fármaco antipirético” es un agente que alivia o reduce la fiebre. Un “antipirético” es un sinónimo de antifebril, antitérmico o febrífugo. Un “fármaco antiinflamatorio” es un agente que contrarresta o suprime la inflamación. Un “fármaco analgésico/antipirético” es un agente que tiene tanto actividad “analgésica” como “antipirética”.

Un “anticuerpo”, como se usa en este documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de una molécula de inmunoglobulina, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que específicamente se une a un antígeno, tal como un polipéptido de la invención, por ejemplo, un epítipo de un polipéptido de la invención. Una molécula que se une específicamente a un polipéptido dado de la invención es una molécula que se une al polipéptido, pero no se une sustancialmente a tipos diferentes de moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que naturalmente contenga el polipéptido. Los ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos Fab y F(ab)₂ que pueden generarse tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina.

Un “anticuerpo” puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. La expresión “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que sólo contiene una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de reaccionar inmunológicamente con un epítipo particular. La expresión “anticuerpo policlonal” se refiere a anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos de la invención capaces de reaccionar inmunológicamente con más de un epítipo. Son preparaciones de anticuerpos policlonales particularmente preferidas las que contienen sólo anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos de la invención.

Un “antígeno”, como se usa en este documento, se refiere a una molécula que contiene uno o más epítopos que estimularán el sistema inmune del hospedador para generar una respuesta humoral y/o celular antígeno-específica. El término también se usa en este documento indistintamente con “inmunógeno”. El término “epítipo”, como se usa en este documento, se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al cual se une una molécula de anticuerpo específica. El término también se usa en este documento indistintamente con “determinante antigénico” o “sitio del determinante antigénico”.

El término “muestra biológica” se refiere a una muestra obtenida de un organismo (por ejemplo, un paciente) o de componentes (por ejemplo, células) de un organismo. La muestra puede ser de cualquier tejido biológico, célula(s) o fluido. La muestra puede ser una “muestra clínica” que es una muestra derivada de un paciente. Tales muestras incluyen, pero sin limitación, esputo, sangre, células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos), líquido amniótico, plasma, semen, médula ósea y tejidos o muestras de biopsias de aguja fina, orina, líquido peritoneal y líquido pleural o células de los mismos. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones congeladas tomadas para propósitos histológicos. También puede hacerse referencia a una muestra biológica como “muestra de paciente”. Una “muestra biológica” también puede incluir una proteína sustancialmente purificada o aislada, preparación de membrana o cultivo celular.

Un “clon” es una población de células derivadas de una sola célula o de un antecesor común por mitosis. Una “línea celular” es un clon de una célula primaria que puede tener un crecimiento *in vitro* estable durante muchas generaciones.

El término “ciclooxigenasa”, “enzima ciclooxigenasa”, “COX” o “enzima COX”, también llamada “prostaglandina endoperoxido H sintasa” o “PGHS” es una enzima presente en la mayoría de los tejidos que cataliza dos pasos en la biosíntesis de prostaglandinas y produce prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. La ciclooxigenasa cataliza tanto la oxidación de ácido araquidónico a prostaglandina hidropéroxido G_2 (reacción de ciclooxigenasa) como su posterior reducción (reacción de peroxidasa) a prostaglandina H_1 (PGH₂). La PGH₂ es un intermediario común para la posterior isomerización o ciclación a prostanoídes incluyendo PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂ y tromboxano A₂ (TxA₂). Los AINE inhiben la actividad ciclooxigenasa, lo cual explica sus efectos antiinflamatorios.

Un “trastorno relacionado con la actividad de la COX-3” incluirá un trastorno o enfermedad asociada con una sobreactividad o actividad insuficiente de una enzima COX-3, y las afecciones que acompañan a este trastorno o enfermedad. “Sobreactividad de una enzima COX-3” se refiere a 1) la expresión de COX-3 en células que normalmente no expresarían COX-3; 2) el incremento de la expresión de COX-3; 3) el incremento de la actividad de la COX-3 por unidad de la enzima COX-3; o 4) mutaciones que llevan a una activación constitutiva de una o más actividades biológicas de la COX-3. “Actividad insuficiente de la enzima COX-3” se refiere a 1) la ausencia de expresión de COX-3 en células que normalmente expresan COX-3; 2) el descenso de la expresión de COX-3; 3) el descenso de la actividad de la COX-3 por unidad de la enzima COX-3; o 4) mutaciones que llevan a una inhibición constitutiva de una o más actividades biológicas de COX-3.

Un “gen” es un segmento de ADN involucrado en producir un péptido, polipéptido o proteína, que incluye la región codificante, y las regiones no codificantes anteriores (“5'UTR”) y posteriores (“3'UTR”) a la región codificante. Un “gen” también puede incluir secuencias intermedias no codificantes (“intrones”) entre segmentos codificantes individuales (“exones”). “Promotor” es una secuencia reguladora de ADN que esta involucrada en unión de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. Los promotores están a menudo aguas arriba (“5' con respecto a”) del sitio de inicio de la transcripción del gen. Una “secuencia reguladora” se refiere a la porción de un gen que puede controlar la expresión del gen. Una “secuencia reguladora” puede incluir promotores, potenciadores y elementos de control de la expresión tales como señales de poliadenilación, sitios de unión a ribosoma (para expresión bacteriana), y/o un operador. Una “región codificante” se refiere a la porción de un gen que codifica aminoácidos y las señales de inicio y parada para la traducción por medio de codones de tres bases.

“Terapia génica” significa la introducción de un gen o genes funcionales, o un fragmento de ácido nucleico de alguna procedencia por cualquier medio adecuado en una célula viva para corregir un defecto genético.

“Variante genética” o “variante” significa un alelo específico que está presente en un locus genético particular en al menos un individuo de una población y que difiere del alelo de tipo silvestre. “Alelo de tipo silvestre” significa el alelo de una secuencia de nucleótidos dada que se encuentra con más frecuencia en una población.

Una “célula hospedadora” se refiere a una célula que contiene una molécula de ADN de la invención en un vector o integrada en un cromosoma celular. Una “célula hospedadora” puede ser una célula hospedadora endógena que expresa una molécula de ADN de la invención endógenamente, o una célula hospedadora recombinante.

“Ciclooxigenasa-3 humana”, “COX-3 humana” o “hCOX-3”, como se usa en este documento, se refiere a un nuevo miembro de la enzima ciclooxigenasa que es capaz de convertir el ácido araquidónico en el precursor de prostaglandinas prostaglandina H_2 , y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia mayor de aproximadamente el 60% con la SEC ID N°:4 o SEC ID N°:6. Los ejemplos de hCOX-3 incluyen un nuevo miembro de la enzima ciclooxigenasa que es capaz de convertir el ácido araquidónico en el precursor de prostaglandinas prostaglandina H_2 , y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos superior a aproximadamente el 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% con la SEC ID N°:4 o SEC ID N°:6. En una realización, la hCOX-3 comprende la SEC ID N°:9. En otra realización, la hCOX-3 comprende la SEC ID N°:11.

Un fragmento, o asociación física de fragmentos, puede tener la actividad biológica asociada con la hCOX-3 de longitud completa, aun así, el grado de actividad de la hCOX-3 asociada con fragmentos individuales de hCOX-3 puede variar. Un “fragmento activo de ciclooxigenasa-3 humana” se refiere a un fragmento de ciclooxigenasa-3 humana que aún es capaz de convertir el ácido araquidónico en el precursor de prostaglandinas prostaglandina H_2 . Los ejemplos de “fragmento activo de ciclooxigenasa-3 humana” pueden comprender una secuencia de aminoácidos que

tiene una identidad de secuencia de aminoácidos superior a aproximadamente el 90% o 95%, con la secuencia de al menos 5 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°:4 o SEC ID N°:6, y ese fragmento activo de hCOX-3 aún es capaz de convertir el ácido araquidónico en el precursor de prostaglandinas prostaglandina H₂.

5 El término “inflamación” se refiere a una respuesta protectora localizada causada por una lesión o destrucción de los tejidos, que sirve para destruir, diluir o separar (secuestrar) tanto el agente perjudicial como el tejido dañado. La “inflamación” se caracteriza en la forma aguda por los clásicos signos de dolor, calor, enrojecimiento, hinchazón (tumor) y pérdida de función. Histológicamente, la inflamación conlleva una serie compleja de sucesos, incluyendo dilatación de las arteriolas, capilares y vénulas, con incremento de permeabilidad y del flujo sanguíneo, exudación de
10 fluidos, incluyendo proteínas plasmáticas y migración de leucocitos a los focos de inflamación.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es aquella que se ha separado del resto de moléculas de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico “aislada” puede ser, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que esta libre de al menos una de las secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en sus extremos 5' y 3' en el ADN genómico de un organismo del cual procede el ácido nucleico. Una molécula de
15 ácido nucleico aislada incluye, sin limitación, una molécula de ácido nucleico separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias, así como una molécula de ácido nucleico que se incorpora en un vector, un plásmido de replicación autónoma, un virus (por ejemplo, un retrovirus, adenovirus o virus del herpes), o dentro del ADN genómico de un procarionte o eucariote. Además, una molécula de ácido nucleico aislada puede incluir una molécula de ácido nucleico que es parte de un híbrido o molécula de ácido nucleico de fusión. Una molécula de ácido nucleico aislada puede ser
20 una secuencia de ácido nucleico que se: (i) amplifica in vitro por, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) sintetiza por, por ejemplo, síntesis química; (iii) produce recombinantemente por clonación; o (iv) purifica, tal como por escisión y separación electroforética o cromatográfica.

25 Una proteína “aislada” o “purificada” o porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de células o tejidos de la que deriva la proteína, o está sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. El lenguaje “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína esta separada de los componentes celulares de la célula de la que se ha aislado o producido recombinantemente. De esta manera,
30 una proteína sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en el presente documento “proteína contaminante”). Cuando la proteína o porción biológicamente activa de la misma se produce recombinantemente, también esta de forma preferente sustancialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína. Cuando
35 la proteína se produce por síntesis química, está de forma preferente sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos, es decir, está separada de precursores químicos u otros agentes químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En consecuencia, tales preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del polipéptido de interés. El polipéptido biológicamente activo aislado puede tener varias formas físicas distintas. El polipéptido aislado puede existir como un polipéptido naciente o sin procesar de longitud completa, o como polipéptidos parcialmente procesados o combinaciones de polipéptidos procesados.

45 Un polipéptido aislado o sustancialmente purificado puede ser un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico aislada, al igual que polipéptidos sintetizados por, por ejemplo, métodos de síntesis química, y polipéptido separados de materiales biológicos, y purificados después, utilizando procedimientos convencionales analíticos de proteína o preparatorios, en tal medida que permita que se usen de acuerdo con los métodos aquí descritos.

“Ácido nucleico”, como se usa en este documento, se refiere a una molécula que comprende uno o más nucleótidos, es decir, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o ambos. El término incluye monómeros y polímeros de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, estando los ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos unidos entre sí, en el caso de los polímeros, por medio de enlaces en sentido 5' a 3'. Los polímeros de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos pueden ser de cadena simple o doble. Sin embargo, los enlaces pueden incluir cualquiera de los enlaces conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, ácidos nucleicos que comprenden enlaces 5' a 3'. Los nucleótidos pueden ser de
55 origen natural o pueden producirse sintéticamente análogos que son capaces de formar relaciones de pares de bases con bases de origen natural. Son ejemplos de pares de bases de origen natural timidina, adenina, citosina, guanina y uracilo; abreviados T, A, C, G y U, respectivamente. Los ejemplos de pares de bases de origen natural que son capaces de formar relaciones de emparejamiento de bases incluyen, pero sin limitación, análogos de pirimidina aza y desaza, análogos de purina aza y desaza y otros análogos de bases heterocíclicas, en los cuales uno o más de los átomos de carbono y nitrógeno de los anillos de pirimidina se han sustituido por heteroátomos, por ejemplo, oxígeno, azufre, selenio, fósforo, y similares. Además, la expresión “secuencias de ácido nucleico” contempla la secuencia complementaria y específicamente incluye cualquier secuencia de ácido nucleico que sea sustancialmente homologa tanto a la secuencia de ácido nucleico como a su complementaria.

65 El término “oligonucleótido” se refiere a una secuencia de cadena simple de ADN o ARN de relativamente pequeña longitud, por ejemplo, menos de 100 restos de longitud. Para muchos métodos, son útiles oligonucleótidos de aproximadamente 16-25 nucleótidos de longitud, aunque algunas veces pueden utilizarse oligonucleótidos más largos

de más de aproximadamente 25 nucleótidos. Algunos oligonucleótidos pueden utilizarse como “cebadores” para la síntesis de cadenas complementarias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, cebadores de ADN pueden hibridar con una secuencia complementaria para iniciar la síntesis de una cadena de ADN complementaria en reacciones que usan ADN polimerasas. Los oligonucleótidos también son útiles para la hibridación para la detección de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la transferencia de Northern.

Un “polimorfismo” se refiere a un grupo de variantes genéticas en un locus genético particular entre los individuos de una población.

Un “polinucleótido” se refiere a un polímero lineal de al menos dos nucleótidos unidos entre sí por enlaces fosfodiéster y puede comprender ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos.

Un “polipéptido” o “proteína” se refiere la ordenación de restos aminoacídicos en un polímero. Un polipéptido puede estar compuesto por los 20 aminoácidos convencionales de origen natural, además de aminoácidos raros y análogos de aminoácidos sintéticos. Los polipéptidos más cortos se conocen en general como péptidos. Un “polipéptido recombinante” se refiere a un polipéptido producido por técnicas de ADN recombinante; es decir, producido por células transformadas por una construcción de ADN exógena que codifica el polipéptido deseado. Un “polipéptido sintético” se refiere al preparado por síntesis química.

“Promotor” significa una secuencia reguladora de ADN implicada en la unión de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. Los promotores están generalmente aguas arriba (“5’ con respecto a”) del sitio de iniciación de la transcripción del gen.

“Prostanoides” es un término colectivo para prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Incluye un grupo de compuestos derivados de ácidos grasos insaturados de 20 carbonos, principalmente ácido araquidónico, por medio de la ruta de la ciclooxigenasa. Son mediadores extremadamente potentes de un grupo diverso de procesos fisiológicos, incluyendo la inflamación. Los ejemplos de prostanoides incluyen, pero sin limitación, PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ y tromboxano A₂ (TxA₂).

“Recombinante” se refiere a ácido nucleico, una proteína codificada por un ácido nucleico, una célula o una partícula viral, que se ha modificado utilizando técnicas de biología molecular para dar algo distinto de su estado natural. Por ejemplo, las células recombinantes pueden contener una secuencia de nucleótidos que no se encuentra en la forma nativa (no recombinante) de la célula o puede expresar genes nativos que de otra manera se expresarían de forma anormal, estarían infraexpresados o no se expresarían. Las células recombinantes también pueden contener genes encontrados en la forma nativa de la célula, donde los genes se modifican y se reintroducen en la célula por medios artificiales. El término también abarca células que contienen un ácido nucleico endógeno para la célula que se ha modificado sin extraer el ácido nucleico de la célula; tales modificaciones incluyen las obtenidas, por ejemplo, por reemplazo de genes y mutación específica de sitio.

Una “célula hospedadora recombinante” es una célula que contiene una secuencia de ADN recombinante. La secuencia de ADN recombinante puede introducirse en las células hospedadoras usando cualquier método apropiado, por ejemplo electroporación, precipitación con fosfato cálcico, microinyección, transformación, biolística e infección viral. El ADN recombinante puede estar integrado (enlazado covalentemente) o no al ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. Por ejemplo, el ADN recombinante puede mantenerse en un elemento episomal, tal como un plásmido. Alternativamente, con respecto a una célula transformada o transfectada de manera estable, el ADN recombinante se ha integrado en el cromosoma de forma que se hereda por las células hijas mediante replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula establemente transformada o transfectada para establecer líneas celulares o clones compuestos por una población de células hijas que contienen el ADN exógeno. Las células hospedadoras recombinantes pueden ser procariotas o eucariotas, incluyendo bacterias tales como *E. coli*, células fúngicas tales como levadura, células de mamíferos tales como líneas celulares de origen humano, bovino, porcino, de mono o de roedor, y células de insecto tales como líneas celulares derivadas de *Drosophila* y gusano de seda. También se entiende que la expresión “célula hospedadora recombinante” se refiere no sólo a una célula particular, sino también a la progenie o posible progenie de tal célula. Como en las siguientes generaciones pueden aparecer ciertas modificaciones debido a mutaciones o influencias ambientales, la progenie puede no ser, de hecho, idéntica a las células parentales, pero aún se incluye dentro del alcance del término como se usa en este documento.

“Secuencia” significa el orden lineal en el cual aparecen los monómeros en un polímero, por ejemplo, el orden de los aminoácidos en un polipéptido o el orden de los nucleótidos en un polinucleótido.

“Identidad o similitud de secuencia”, como se conoce en la técnica, es la relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o entre dos o más secuencias polinucleotídicas, como se determina por comparación de las secuencias. En la técnica, identidad también es el grado de concordancia entre secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas, según sea el caso, como se determina por la correspondencia entre cadenas de tales secuencias. Para determinar el porcentaje de identidad o similitud de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Después se comparan los restos aminoacídicos o nucleotídicos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia esta ocupada por un mismo

resto aminoacídico o nucleotídico o por un resto aminoacídico o nucleotídico similar con respecto a la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas o similares en esa posición. El porcentaje de identidad o similitud entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas o similares compartidas por las secuencias (es decir, % identidad = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias son de la misma longitud.

Tanto la identidad como la similitud se pueden calcular fácilmente. Los métodos comúnmente utilizados para determinar la identidad o similitud entre secuencias incluyen, pero sin limitación, las descritas en Carrillo *et al.* (1988), SIAM J Applied Math. 48, 1073. Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para dar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos.

Un ejemplo no limitante de algoritmo matemático que se utiliza para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin *et al.*, (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin *et al.*, (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, (1990), J Mol. Biol 15:403-410. Para obtener alineamientos con huecos con propósitos comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997), Nucleic Acid Res. 25:3389-3402. Alternativamente, puede utilizarse el PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Además, también se puede utilizar el método FASTA (Atschul *et al.*, (1990)), J. Molec. Biol. 215, 403).

Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático útil para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers *et al.*, (1988), CABIOS 4:11-17. Tal algoritmo se incorpora al programa ALIGN (versión 2.0).

En una realización preferente, se determina el porcentaje de identidad entre dos secuencias utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453) (1970)) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete informático GCG (disponible en <http://www.accelrys.com>). El programa GCG GAP alinea dos secuencias completas para maximizar el número de coincidencias y minimizar el número de huecos.

En otra realización preferente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias se determina utilizando el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (J Mol Biol. 1981, 147(1):195-7), que se ha incorporado al programa BestFit en el paquete informático GCG (disponible en <http://www.accelrys.com>). El programa BestFit hace un alineamiento óptimo del mejor segmento de similitud entre dos secuencias. Se encuentran alineamientos óptimos insertando huecos para maximizar el número de coincidencias.

La hibridación también puede utilizarse como un ensayo para indicar que dos polinucleótidos son sustancialmente idénticos entre sí. Los polinucleótidos que comparten un grado de identidad suficiente hibridarán entre sí en condiciones de hibridación rigurosas. "Condiciones de hibridación rigurosas" tiene el significado conocido en la técnica, como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989). Una condición de hibridación rigurosa ejemplar comprende la hibridación en cloruro sódico/citrato sódico (SSC) 6x a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,2x y un 0,1% de SDS a 50-65°C.

"Sustancialmente similar", como se usa en este documento, incluye secuencias idénticas, así como delecciones, sustituciones o adiciones a una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que mantiene cualquier porción biológicamente activa y posee cualquiera de los motivos conservados de la misma.

Un "sujeto", como se usa en este documento, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano, que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento.

Un "marcador", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que facilita el aislamiento, purificación o detección de una proteína que contiene el marcador. Los expertos en la materia conocen una amplia diversidad de marcadores y son adecuados para usarlos en la presente invención. Los marcadores adecuados incluyen, pero sin limitación, péptido HA, péptidos de polihistidina, biotina/avidina y una diversidad de sitios de unión a epítipo de anticuerpos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en este documento, significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que induce la respuesta biológica o médica en un sistema tisular, animal o humano que está buscando un investigador, veterinario, médico, doctor u otro especialista clínico, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o afección que está siendo tratada. Se conocen métodos en la técnica para determinar dosis terapéuticamente eficaces de la presente composición farmacéutica.

Un "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que hace referencia a un bucle de ADN circular de doble cadena en el que pueden insertarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden insertar fragmentos adicionales de ADN. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en la célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, los vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero).

Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y por lo tanto se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores, los vectores de expresión, son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos de forma operativa. En general, los vectores útiles para las técnicas de ADN recombinante están habitualmente en forma de plásmidos. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores tales como vectores vi-
 5 rales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que realizan funciones equivalentes.

10 *Molécula de ácido nucleico aislada de la Invención*

La presente invención demostró por primera vez la existencia de un gen de COX-3 en humanos, que se forma por medio de uno o más eventos de edición de ARN después de la retención del intrón 1 entre el exón 1 y exón 2 del gen de la COX-1 humana. La proteína COX-3a humana (SEC ID N°:9) comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el exón 1 de la COX-1 humana, una inserción de 31 aminoácidos (SEC ID N°:4) codificada por el intrón 1 de la COX-1 humana tras la edición del ARN (SEC ID N°:3), y la secuencia de aminoácidos codificada por los exones del 2 al 11 de la COX-1 humana. La proteína COX-3b humana (SEC ID N°:11) comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el exón 1 de la COX-1 humana, una inserción de 31 aminoácidos (SEC ID N°:6) codificada por el intrón 1 de la COX-1 tras la edición del ARN en un sitio diferente (SEC ID N°:5), y la secuencia de aminoácidos codificada por los exones del 2 al 11 de la COX-1 humana. La clonación de la Cox-1 humana se describió previamente (Yokoyama *et al.*, (1989) Biochem Biophys Res Commun, 165 (2):888-94). El número de acceso del GenBank para el ADNc o proteína de la COX-1 humana es NM_000962 o NP_000953, respectivamente. En la figura 2 se ilustra una comparación de las estructuras génicas de la COX-3 y COX-1 humana.

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican la COX-3 humana o una porción biológicamente activa de la misma, así como moléculas de ácido nucleico de al menos 12 nucleótidos secuenciales de longitud para usarlas como sondas de hibridación o cebadores de PCR, para identificar o ampliar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido COX-3 humano de esta invención.

En una realización, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un miembro de la enzima ciclooxigenasa que es capaz de convertir el ácido araquidónico en el precursor de prostaglandina prostaglandina H2, y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos superior a aproximadamente el 60%, preferiblemente de aproximadamente el 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% con la SEC ID N°:4 o SEC ID N°:6, o una complementaria de las mismas. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia dada de nucleótidos es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos dada como para poder hibridar con la secuencia de nucleótidos dada, formando por lo tanto un dúplex estable bajo condiciones de hibridación rigurosas o muy rigurosas.

En otra realización, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos 12 nucleótidos secuenciales de la SEC ID N°:3 o SEC ID N°:5, o la complementaria de las mismas. Tal molécula de ácido nucleico aislada puede utilizarse como sonda de ácido nucleico para identificar y/o clonar homólogos de COX-3 en otros tipos celulares, por ejemplo, otros tejidos, así como homólogos de otros mamíferos. La sonda/cebador comprende típicamente una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas aproximadamente con al menos aproximadamente 12, 25, 50, 75 o 90 nucleótidos consecutivos de la secuencia con sentido o antisentido de las SEC ID N°:3 o SEC ID N°:5.

En una realización preferente, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°:8 o la SEC ID N°:10 o la complementaria de la misma.

En otra realización preferente, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la SEC ID N°:9 o SEC ID N°:11, o una secuencia complementaria de las mismas. Por ejemplo, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una molécula de ácido nucleico que es una sustitución conservada del ADNc de la COX-3 humana como se establece en la SEC ID N°:8 o SEC ID N°:10, o una secuencia complementaria de las mismas. Se sabe que puede usarse más de un codón genético para codificar un aminoácido en particular, y por lo tanto, que la secuencia de aminoácidos de la COX-3 humana como se representa en la SEC ID N°:9 o SEC ID N°:11 puede codificarse por cualquiera de un grupo de moléculas de ADN semejantes. Sólo un miembro del grupo será idéntico a la secuencia de ADNc como se expone en la SEC ID N°:8 o SEC ID N°:10. Sin embargo, dentro del alcance de esta invención se contemplan todas las variantes a las que se hace referencia en lo sucesivo como variantes degeneradas. En este documento, una molécula de ácido nucleico que lleva uno o más codones alternativos que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos presentada como SEC ID N°:9 o SEC ID N°:11, se define como una sustitución conservada del ADN de la COX-3 humana como se presenta en la SEC ID N°:8 o SEC ID N°:10, respectivamente.

En este sentido, se prefieren particularmente variantes alélicas naturales de moléculas de ácido nucleico de COX-3 humana. Dentro de una población (por ejemplo, la población humana) pueden existir polimorfismos en la secuencia de ADN que lleven a cambios en la secuencia de aminoácidos. Estos polimorfismos genéticos pueden existir en individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural. Un alelo es uno de un grupo de genes que aparecen alternativamente en un locus genético dado. Tales variaciones alélicas naturales pueden dar como resultado

típicamente una variación del 1-5% en la secuencia de nucleótidos de un gen dado. Los alelos alternativos se pueden identificar mediante secuenciación del gen de interés en varios individuos distintos, o mediante el uso de sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético en una variedad de individuos.

Adicionalmente, en este sentido, se prefieren de forma particular moléculas de ácido nucleico que tienen todas y cada una de las variaciones de nucleótidos que no se sabe que se produzcan de forma natural, que codifican polipéptidos que tienen propiedades que son diferentes de, pero que todavía mantienen la actividad funcional de, la proteína COX-3 humana que aparece de forma natural. Además de una variante natural tal como una variante alélica natural, una variante del polinucleótido o polipéptido también puede ser una variante que no se sabe que se produzca de manera natural. Las secuencias de ADN pueden alterarse manualmente para así codificar un péptido que tiene propiedades que son diferentes de las del péptido natural. Los métodos para alterar las secuencias de ADN incluyen, pero sin limitación, mutagénesis dirigida, sustitución química y fusión de genes. La mutagénesis dirigida se utiliza para cambiar uno o más restos de ADN que pueden dar como resultado una mutación silenciosa, una mutación conservativa o una mutación no conservativa. Los genes quiméricos se preparan mediante el intercambio de dominios de genes similares o diferentes para sustituir dominios similares en el gen de la COX-3. De forma similar, pueden prepararse genes de fusión que añaden dominios a la COX-3, tales como un marcador de afinidad para facilitar la identificación o aislamiento del gen o proteína.

Las variantes de la molécula de ácido nucleico COX-3 humana de la invención son capaces de hibridar con la SEC ID N°:3 o SEC ID N°:5 bajo condiciones de hibridación muy rigurosas.

Otra realización preferente más de la molécula de ácido nucleico de la invención son los ARNip correspondientes al gen de la COX-3 humana. Muchos organismos poseen mecanismos para silenciar la expresión de genes cuando un ARN de doble cadena (ARNdc) correspondiente al gen está presente en la célula a través de un proceso conocido como interferencia de ARN. La técnica de utilizar ARNdc para reducir la actividad de un gen específico se desarrolló por primera vez usando el gusano *C. elegans* y se ha denominado ARN de interferencia, o ARNi (Fire *et al.*, (1998), Nature 391:806-811). Se ha encontrado que el ARNi es útil en muchos organismos, y recientemente se ha extendido a células de mamíferos (véase la revisión por Moss, (2001), *Curr Biol* 11:R772-5).

Se hizo un importante avance cuando se demostró que el ARNi implicaba la generación de ARN pequeños de 21-25 nucleótidos (Hammond *et al.*, (2000), Nature 404: 293-6; Zamore *et al.*, (2000) Cell 101:25-33). Estos ARN interferentes pequeños, o los ARNip, pueden proceder inicialmente de una molécula mayor de ARNdc que comienza el proceso, y son complementarios al ARN diana que finalmente se degrada. Estos ARNip son por sí mismos de doble cadena con pequeños salientes en cada extremo. Actúan como ARN guía, dirigiendo una única escisión de la diana en la región de complementariedad (Elbashir *et al.*, (2001) Genes Dev 15: 188-200; Zamore *et al.*, (2000) Cell 101:25-33).

Preferiblemente, los ARNip de la invención comprenden aproximadamente 21-25 nucleótidos complementarios a la secuencia de nucleótidos del intrón 1 de COX-1 mostrado en la SEC ID N°:3 o la SEC ID N°:5.

En el documento WO0175164 A2 se describen métodos para producir ARNip, preferiblemente de 21-23 nucleótidos (nt) de longitud a partir de un sistema *in vitro* y el uso del ARNip para interferir con el ARNm de un gen en una célula u organismo.

El ARNip también puede obtenerse *in vivo* a partir de una célula de mamífero utilizando un sistema de expresión estable. Por ejemplo, se presentó un sistema de vector, llamado pSUPER, que dirige la síntesis de ARNip en células de mamífero (Brummelkamp *et al.*, (2002) Science 296: 550-3.).

En el presente documento se describen métodos para aislar moléculas de ácidos nucleicos de COX-3 humana. Las células o tejidos que poseen el transcrito de COX-3 humana, preferiblemente niveles altos del transcrito de hCOX-3, son adecuadas para el aislamiento del ADNc o ARNm de hCOX-3. La selección de una fuente adecuada de ADNc se puede realizar mediante la exploración con respecto a la presencia de transcritos de hCOX-3 en extractos celulares o en células completas mediante hibridación de nucleótidos o análisis de RT-PCR utilizando cebadores que hibridan específicamente con el transcrito del intrón 1 de COX-1 como se representa en la SEC ID N°:3 o SEC ID N°:5. Una fuente ejemplar para el aislamiento del ácido nucleico de COX-3 es el córtex cerebral.

Para aislar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína COX-3 humana puede usarse cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, utilizando bibliotecas de ADNc o bibliotecas de ADN, o el ARNm total de las células adecuadas identificadas anteriormente como molde y oligonucleótidos apropiados como cebadores, una molécula de ácido nucleico de la invención puede amplificarse de acuerdo con técnicas convencionales de amplificación por PCR. El ácido nucleico amplificado por PCR de esta manera puede clonarse dentro de un vector apropiado y caracterizarse por análisis de la secuencia de ADN. El experto habitual en la técnica apreciará que los oligonucleótidos que comprenden al menos 12 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°:3 o SEC ID N°:5 son particularmente útiles como cebadores. Los cebadores pueden prepararse por técnicas sintéticas convencionales, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automático. Los cebadores preferidos particularmente son los que pueden utilizarse para detectar un gen de hCOX-3 pero no se unen a otros genes de COX conocidos tales como COX-1 o COX-2.

Otro método para aislar moléculas de ácido nucleico de hCOX-3 es sondear una biblioteca genómica o biblioteca de ADNc, o alternativamente el ARNm total con una o más sondas diseñadas natural o artificialmente utilizando procedimientos reconocidos por las personas familiarizadas con la técnica. Véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel *et al.* (eds.) Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989, 1992. Los expertos habituales en la técnica podrán apreciar que los oligonucleótidos que comprenden al menos 12 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°:3 o SEC ID N°:5 son sondas particularmente útiles. Las sondas pueden tener diferente longitud, tal como al menos 20, 30, 40 ó 50 bases. También se aprecia que estas sondas pueden y preferiblemente se marcan con un reactivo detectable analíticamente para facilitar la identificación de la sonda. Los reactivos útiles incluyen, pero sin limitación, radioisótopos, colorantes fluorescentes o enzimas capaces de catalizar la formación de un producto detectable. Las sondas permiten a los expertos habituales en la materia aislar copias complementarias de polinucleótidos de ADN genómico, ADNc, o ARN que codifican proteínas COX-3 procedentes de humano, mamífero u otros animales o para seleccionar fuentes similares para secuencias relacionadas, por ejemplo, miembros adicionales de la familia, tipo o subtipo, incluyendo elementos de regulación y control de la transcripción así como otras regiones determinantes de estabilidad, procesamiento, traducción y especificidad de tejido procedentes de regiones que están en posición 5' y/o 3' con respecto a las secuencias codificantes descritas en este documento, todo sin excesiva experimentación.

Otro método para preparar moléculas de ácidos nucleicos correspondientes a toda o a una porción de una molécula de ácido nucleico de la invención es mediante técnicas sintéticas convencionales, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automático.

Otro método para aislar moléculas de ácido nucleico de hCOX-3 es mediante el uso de un método genético inverso. En este ejemplo, la COX-3 se purifica y la secuencia de aminoácidos parcial se determina mediante un secuenciador automático de aminoácidos. No es necesario determinar toda la longitud de una secuencia de aminoácidos particular, pero se necesita la secuencia lineal de dos regiones de 4 a 8 aminoácidos de la proteína para la producción de cebadores para la amplificación por PCR de un fragmento parcial del ADNc de COX-3. Una vez que se han identificado las secuencias adecuadas de aminoácidos, las secuencias de ADN capaces de codificarlas pueden sintetizarse por técnicas sintéticas convencionales, por ejemplo utilizando un sintetizador de ADN automático, o por PCR degenerada de acuerdo las técnicas de amplificación por PCR establecidas utilizando bibliotecas de ADNc o bibliotecas de ADN genómico, o ARNm total como molde y de 15 a 30 oligonucleótidos degenerados deducidos a partir de la secuencia de aminoácidos como cebadores. Como puede usarse más de un codón genético para codificar un aminoácido particular, la secuencia de aminoácidos puede codificarse por cualquiera de un grupo de oligonucleótidos de ADN similares. De esta manera, en el diseño de los cebadores degenerados de PCR basándose en la secuencia de aminoácidos conocida se tiene en cuenta la frecuencia de utilización de codones en un hospedador particular. A menudo, cada cebador contiene un conjunto de oligonucleótidos para fomentar la hibridación específica con el ADN molde. Aunque como máximo sólo un miembro del conjunto será idéntico a la secuencia de hCOX-3 y será capaz de hibridar con el ADN de hCOX-3, los cebadores ligeramente despareados también son capaces de hibridar con el ADN de hCOX-3 en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas para iniciar una reacción de amplificación por PCR.

La preparación de bibliotecas de ADNc a partir de la célula fuente identificada también puede realizarse mediante técnicas convencionales bien conocidas en este campo. Pueden encontrarse técnicas bien conocidas de construcción de bibliotecas de ADNc, por ejemplo, en Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

El aislamiento del ARNm total de la célula fuente identificada puede realizarse mediante técnicas convencionales bien conocidas en este campo. Pueden encontrarse técnicas bien conocidas del aislamiento del ARNm total, por ejemplo, en Maniatis *et al.*, anteriormente.

La construcción de bibliotecas de ADN genómico puede realizarse por técnicas convencionales bien conocidas en este campo. Pueden encontrarse técnicas de construcción de bibliotecas de ADN bien conocidas, por ejemplo, en Maniatis *et al.*, anteriormente.

Vectores de Expresión Recombinante y Células Hospedadoras

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferiblemente a vectores de expresión que contienen un ácido nucleico de la invención.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora. Los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias de regulación, seleccionadas basándose en las células hospedadoras utilizadas para la expresión. Estas secuencias reguladoras están unidas de forma operativa a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, la expresión "unidas de forma operativa" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés esta unida a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de una forma que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema *in vitro* de transcripción/traducción o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora). Será apreciado por los expertos en la materia que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, y otras consideraciones que se conocen por los expertos en

la materia de la expresión de genes. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para producir proteínas o péptidos, incluyendo proteínas de fusión o péptidos que están codificados por los ácidos nucleicos descritos en este documento.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la expresión de un polipéptido de la invención en células procariotas (por ejemplo, *E. coli*) o células eucariotas (por ejemplo, células de insecto, por ejemplo utilizando vectores de expresión de baculovirus, células levadura o células de mamíferos). Las células hospedadoras adecuadas son conocidas por los expertos en la materia. Alternativamente, los vectores de expresión recombinante se pueden transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras del promotor de T7 y la polimerasa de T7.

La expresión de proteínas en procariotas a menudo se lleva a cabo en *E. coli* con vectores que contienen promotores inducibles o constitutivos que dirigen la expresión de proteínas de fusión o proteínas que no son de fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a una proteína codificada por el vector, añadiendo normalmente aminoácidos al extremo amino terminal de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión sirven típicamente para cuatro propósitos: 1) para incrementar la expresión de la proteína recombinante; 2) para incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; 3) para ayudar a la purificación de la proteína recombinante por medio de la actuación como ligando en la purificación por afinidad; y 4) para facilitar la detección de la proteína recombinante sirviendo como marcador. A menudo, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la confluencia entre el resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el Factor Xa, trombina y enteroquinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith *et al.*, (1988), Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA), pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) o pQE (Qiagen), que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa, proteína A, o poli-His, respectivamente, a la proteína recombinante diana. Tales vectores están contemplados dentro del alcance de la invención.

Los ejemplos de vectores de *E. coli* que no son de fusión, inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann *et al.*, (1988), Gene 69:301-315) y pETIId (Studier *et al.*, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). Una estrategia para maximizar la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria hospedadora con una capacidad alterada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que se inserta en un vector de expresión para que los codones individuales de cada aminoácido sean los que se utilizan preferiblemente en *E. coli*. Tal alteración de las secuencias de ácido nucleico de la invención puede llevarse a cabo por técnicas convencionales de síntesis de ADN.

En otra realización, el vector de expresión es un vector de expresión en levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen, por ejemplo, pYepSecI (Baldari *et al.*, (1987), EMBO J 6:229-234), pMFa (KurJan *et al.*, (1982), Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, (1987), Gene 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) y pPicZ o Pichia (Invitrogen Corp, San Diego, CA).

Alternativamente, el vector de expresión es un vector de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células cultivadas de insecto incluyen, pero sin limitación, la serie pAc (Smith *et al.*, (1983), Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow *et al.*, (1989), Virology 170:31:39) y pBlueBacIII (Invitrogen).

En otra realización más, el vector de expresión es un vector de expresión de mamíferos. Cuando se utiliza en células de mamíferos, las funciones de control del vector de expresión se proporcionan habitualmente por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores que se utilizan comúnmente derivan de poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus de Simio 40. Los ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen, pero sin limitación, pCDM8, (Seed (1987) Nature 329:840) y pMT2PC (Kaufman *et al.*, (1987), EMBO J 6:187-195). Los vectores de expresión de mamíferos disponibles en el mercado que pueden ser adecuados para la expresión de COX-3 recombinante incluyen, pero sin limitación, pMAMneo (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pXTI (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCtag (ATCC 37460) y 1ZD35 (ATCC 37565).

En otra realización, el vector de expresión recombinante de mamífero es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico, preferiblemente en un tipo celular particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). En la técnica se conocen elementos reguladores específicos de tejido. Los ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert *et al.*, (1987), Genes Dev. 1:268-277), promotores específicos de tejido linfóide (Calame *et al.*, (1988), Adv. Immunol. 43:235-275), incluyendo promotores de receptores de células T (Winoto *et al.*, (1989) EMBO J 8:729-733) e inmunoglobulinas (Baneji *et al.*, (1983), Cell 33:729-740; Queen *et al.*, (1983), Cell 33:741-748).

Otros promotores incluyen promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor del neurofilamento; Byrne *et al.*, (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477), promotores específicos de páncreas (Edlund *et al.*, (1985), Science 230:912-916) y promotores específicos de glándula mamaria (por ejemplo, el promotor del suero de

la leche; Patente de Estados Unidos N° 4.873.316 y Publicación de Solicitud de Patente Europea N° 264.166). Los promotores regulados en el desarrollo también incluyen, por ejemplo, los promotores de genes *hox* murinos (Kessel *et al.*, (1990), Science 249:374-379) y el promotor de la beta-fetoproteína (Campes *et al.*, (1989), Genes Dev. 3:537-546).

La invención proporciona además un vector recombinante que comprende una molécula de ADN de la invención clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN está unida de forma operativa a una secuencia reguladora de una forma que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido con respecto al ARNm que codifica un polipéptido de la invención. Se pueden seleccionar secuencias reguladoras unidas de forma operativa a un ácido nucleico clonado en una orientación antisentido que es capaz de dirigir la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos celulares, por ejemplo promotores y/o potenciadores virales, o se pueden elegir secuencias reguladoras que dirigen la expresión constitutiva directa, específica de tejido o específica del tipo celular de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que se producen ácidos nucleicos antisentido bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, cuya actividad se puede determinar por el tipo celular en el que se introduce el vector. Para un análisis de la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido véase Weintraub *et al.*, (Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986).

La invención también proporciona un sistema de vector recombinante que dirige la síntesis de ARN interferentes pequeños (ARNip) en células de mamíferos. Un sistema de vector ejemplar que dirige la síntesis de los ARNip en células de mamífero es el pSUPER (Brummelkamp *et al.*, 2002, anteriormente). En el pSUPER, se clonó el promotor de ARN-H1 delante de la secuencia de dirección específica al gen (secuencias de 19 nt desde el transcrito diana separadas por un espaciador corto del complemento inverso de la misma secuencia) y cinco timidinas (T5) como señal de terminación. Se prevé que el transcrito resultante se pliegue sobre sí mismo para formar una estructura de tallo-bucle de 19 pares de bases, que se parece a la de Let-7 de *C. elegans*. El tamaño del bucle (el espaciador corto) es preferiblemente de 9 pb. Se produjo un pequeño transcrito de ARN al que le falta la cola de poli-adenosina, con un comienzo de la transcripción bien definido y una señal de terminación que consta de cinco timidinas en línea (T5). De forma más importante, la escisión del transcrito en el sitio de terminación es tras la segunda uridina, dando un transcrito que se asemeja a los extremos de los ARNip sintéticos, que también contienen dos nucleótidos T o U colgantes 3'. El ARNip expresado a partir de pSUPER es capaz de desactivar la expresión génica de forma tan eficaz como el ARNip sintético.

Vectores diseñados específicamente permiten el lanzamiento del ADN entre hospedadores tales como bacterias-levaduras o bacterias-células animales o bacterias-células fúngicas o bacterias-células de invertebrados. Los expertos en la materia conocen numerosos vectores de clonación y la selección de un vector de clonación apropiado es cuestión de elección. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas véanse los capítulos 16 y 17 de Maniatis *et al.*, anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere a células hospedadoras recombinantes dentro de las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención.

Las líneas celulares derivadas de especies de mamíferos que pueden ser adecuadas para la transfección y que están disponibles comercialmente incluyen, pero sin limitación, CV-1 (ATCC CCL 70), COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26), MRC-5 (ATCC CCL 171), *Drosophila* o células L murinas, y HEK-293 (ATCC CRL 1573), y células de riñón de mono.

El ADN del vector se puede introducir en células procarióticas o eucarióticas por medio de técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usan en este documento, los términos "transformación" o "transfección" se refieren al proceso por el cual las células recogen ADN ajeno y pueden integrar o no ese ADN ajeno en su cromosoma. Se puede llevar a cabo la transfección, por ejemplo, por varias técnicas incluyendo la co-precipitación con fosfato cálcico o cloruro cálcico, la transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación, o fusión de protoplastos. Se pueden encontrar métodos adecuados para la transformación o transfección de células hospedadoras en Maniatis *et al.* (anteriormente), y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, sólo una pequeña fracción de las células puede integrar el ADN ajeno en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador de selección (por ejemplo, para la resistencia a un fármaco) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores de selección preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección por fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador de selección sobrevivirán, mientras que las demás células mueren).

En otra realización, las características de expresión de un ácido nucleico de hCOX-3 endógeno dentro de una célula, línea celular o microorganismo, puede modificarse mediante la inserción de un elemento regulador de ADN heterólogo al gen endógeno de interés en el genoma de una célula, una línea celular estable o un microorganismo clonado de tal manera que el elemento regulador insertado esté unido operativamente con el gen endógeno y controle, module o active el gen endógeno.

Se puede insertar un elemento regulador heterólogo en una línea celular estable o microorganismo clonado, de tal forma que esté unido operativamente con y active la expresión de genes de hCOX-3 endógenos, utilizando técnicas tales como la recombinación homóloga dirigida, que es bien conocida por los expertos en la materia, y se describe, por ejemplo, en Chappel, Patente de Estados Unidos N° 5.272.071; publicación PCT N° WO 91/06667, publicada el 16 de Mayo de 1991.

Las células hospedadoras recombinantes de la invención también pueden utilizarse para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, en una realización, una célula hospedadora de la invención es un oocito fertilizado o una célula madre embrionaria en la que se ha introducido una secuencia que codifica un polipéptido de la invención. Tales células hospedadoras después pueden utilizarse para crear animales transgénicos no humanos en los cuales se han introducido secuencias exógenas que codifican un polipéptido de la invención en su genoma o animales recombinantes homólogos en los que se han alterado secuencias endógenas que codifican un polipéptido de la invención. Tales animales son útiles para estudiar la función y/o actividad del polipéptido y para identificar y/o evaluar moduladores de la actividad del polipéptido. Como se usa en este documento, un “animal transgénico” es un animal no humano, preferiblemente un mamífero, de forma más preferente un roedor tal como una rata o ratón, en el que una o más de las células del animal incluyen un transgén. Otros ejemplos de animales transgénicos incluyen primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, pollos, anfibios, etc. Un transgén es ADN exógeno que esta integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, dirigiendo por lo tanto la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del animal transgénico. También pueden producirse clones de animales transgénicos no humanos de acuerdo con los métodos descritos en Wilmut *et al.*, (1997), Nature 3 8 5:8 10-813 y Publicaciones PCT N° WO 97/07668 y WO 97/07669.

Polipéptidos Aislados de La Presente Invención

Otro aspecto más de la invención se refiere a polipéptidos hCOX-3 sustancialmente purificados. La invención proporciona un polipéptido sustancialmente purificado que es capaz de convertir el ácido araquidónico en el precursor de prostaglandinas prostaglandina H2, y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos mayor de aproximadamente el 60%, de forma preferente una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% con la SEC ID N°:4 o SEC ID N°:6. La identidad de secuencia entre dos polipéptidos se puede determinar utilizando el método descrito anteriormente.

En una realización preferente, los polipéptidos de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la SEC ID N°:9 o SEC ID N°:11.

El polipéptido aislado de la invención incluye proteínas quiméricas o de fusión. Como se usa en este documento, una “proteína quimérica” o “proteína de fusión” comprende todo o parte (preferiblemente la parte biológicamente activa) de un polipéptido de la invención unido operativamente a todo o parte de un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido distinto del mismo polipéptido de la invención). Dentro de la proteína de fusión, se entiende que la expresión “unido operativamente” indica que el polipéptido de la invención y el polipéptido heterólogo están fusionados en fase entre sí. El polipéptido heterólogo puede fusionarse al extremo N o al extremo C del polipéptido de la invención.

Un ejemplo de una proteína de fusión útil es una proteína de fusión HAHis el la que el polipéptido de la invención está fusionado por el extremo C a un marcador constituido por HA y poli His. Tales proteínas de fusión facilitan la detección y purificación de un polipéptido recombinante de la invención.

La invención se refiere a métodos de expresión o aislamiento de un polipéptido de la invención. En una realización, el polipéptido puede aislarse a partir de células o fuentes de tejido que expresan la proteína de forma natural mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteína convencionales. En otra realización, los polipéptidos de la invención se producen por técnicas de ADN recombinante. Alternativamente, se puede sintetizar un polipéptido de la invención en un sistema de traducción y/o transcripción *in vitro*. De forma alternativa, además, un polipéptido de la invención puede sintetizarse químicamente utilizando técnicas de síntesis de péptidos convencionales.

Los polipéptidos de la invención se pueden expresar recombinantemente mediante la clonación de moléculas de ADN de la invención en un vector de expresión descrito anteriormente, introduciendo dicho vector en células hospedadoras procariotas o eucariotas descritas en este documento, y desarrollando la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la producción de la proteína hCOX-3 recombinante. La expresión de las células que contienen el vector se propaga clonalmente y se analiza individualmente para determinar si producen la proteína hCOX-3. La identificación de clones de células hospedadoras que expresan hCOX-3 puede hacerse por varios medios, incluyendo pero sin limitación reactividad inmunológica con anticuerpos anti-hCOX-3, y la presencia de actividad hCOX-3 asociada a células hospedadoras. La selección de las condiciones de crecimiento y los métodos de recuperación adecuados está dentro de la experiencia de la técnica. Las técnicas para expresar recombinantemente un polipéptido se describen totalmente en Maniatis, T, *et al.*, anteriormente, y son bien conocidas en este campo.

También pueden producirse polipéptidos de la invención utilizando un sistema de traducción y/o transcripción *in vitro*. Tales métodos se conocen por los expertos en la materia. Por ejemplo, el ARNm de hCOX-3 sintético o el ARNm aislado a partir de las células productoras de hCOX-3 puede traducirse eficientemente en varios sistemas sin células que incluye, pero sin limitación, extractos de germen de trigo y extractos de reticulocitos. Alternativamente, la

secuencia codificante del ADNc de hCOX-3 puede clonarse bajo el control de un promotor de T7. Entonces, utilizando esta construcción como molde, se puede producir la proteína hCOX-3 en un sistema de traducción y traducción *in vitro*, por ejemplo utilizando un Sistema de Lisado de Reticulocitos acoplado a TNT T7 tal como el que está disponible en el mercado en Promega (Madison, WI).

Los polipéptidos de la invención también se pueden producir por síntesis química, tal como la síntesis de péptidos en fase sólida, en un sintetizador automático de péptidos, utilizando secuencias de aminoácidos conocidas o secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de ADN de los genes de interés. Tales métodos son conocidos por los expertos en la materia.

La proteína COX-3 humana puede purificarse por métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la hCOX-3 de células hospedadoras naturales, o hCOX-3 recombinante de células hospedadoras recombinantes, puede purificarse de lisados o extractos celulares, o de medios de cultivo acondicionados, por varias combinaciones de, o la aplicación individual de fraccionamiento salino, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción en hidroxilapatita y cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de lectina, HPLC y FPLC, y cromatografía de afinidad anticuerpo/ligando.

Por ejemplo, la proteína hCOX-3 puede separarse de otras proteínas celulares mediante el uso de una columna de inmutafinidad hecha con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para la hCOX-3 naciente o fragmentos de hCOX-3. Las columnas de afinidad de anticuerpos se realizan mediante la adición de los anticuerpos a un soporte de gel de tal forma que los anticuerpos forman enlaces covalentes con el soporte de perlas de gel. Los enlaces covalentes preferidos se realizan a través de restos amina, aldehído o sulfhidrilo contenidos en el anticuerpo. Se conocen bien en la técnica métodos para generar aldehídos o grupos sulfhidrilo libres en anticuerpos, por ejemplo, los grupos amina son reactivos con, en un ejemplo, esterés de N-hidroxisuccinimida. La resina de afinidad después se equilibra en un tampón adecuado, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (pH=7,3), y los sobrenadantes del cultivo celular o los extractos celulares que contienen hCOX-3 se pasan despacio a través de la columna. La columna después se lava con el tampón hasta que la densidad óptica (A_{280}) desciende hasta el nivel de fondo. La proteína entonces eluye al cambiar las condiciones del tampón, tal como al bajar el pH utilizando un tampón tal como glicina-HCl 0,23 M (pH 2,6). La proteína hCOX-3 purificada después se dializa frente a un tampón adecuado tal como solución salina tamponada con fosfato.

Anticuerpos para polipéptido

Se describe un anticuerpo que se une específicamente a una COX-3 humana de la invención. Particularmente, el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos mayor de aproximadamente el 60%, preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% con la SEC ID N°:4 o SEC ID N°:6. Preferiblemente, el anticuerpo descrito en este documento no reconocerá una COX-1 humana o una COX-2 humana, sino sólo la Cox-3 humana. En varios ejemplos, los anticuerpos purificados sustancialmente descritos en este documento, o fragmentos de los mismos, pueden ser anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y/o humanizados. Tales anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pueden proceder de una variedad de fuentes tales como, pero sin limitación, anticuerpos de cabra, ratón, rata, oveja, caballo, pollo o conejo. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales.

Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:4 o SEC ID N°:6, o un fragmento del mismo, puede utilizarse como un inmunógeno para generar anticuerpos utilizando técnicas convencionales para la preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales. Son composiciones preferidas particularmente de un inmunógeno aquellas que no contienen ninguna otra proteína animal, tales como, por ejemplo, un inmunógeno expresado recombinantemente a partir de una célula hospedadora no animal, es decir, una célula hospedadora bacteriana, o un oligopéptido sintetizado químicamente.

Los anticuerpos policlonales se pueden producir por inmunización de sujetos animales adecuados tales como ratones, ratas, cobayas, conejos, cabras, caballos y similares, siendo preferidos los conejos, con el inmunógeno de la invención con o sin un adyuvante inmune. Puede recogerse suero preinmune antes de la primera inmunización. Preferiblemente, cada animal recibe entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 1000 mg del inmunógeno asociado con o sin un adyuvante inmune aceptable. Tales adyuvantes aceptables incluyen, pero sin limitación, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, precipitado de alumbre, emulsión de agua en aceite que contiene *Corynebacterium parvum* y ARNt. La inmunización inicial consiste en inmunógeno en, preferiblemente, adyuvante completo de Freund en múltiples sitios por vía subcutánea (SC), intraperitoneal (IP), o ambas. Se extrae sangre de cada animal a intervalos regulares, preferiblemente de forma semanal, para determinar el título del anticuerpo. Los animales pueden o no recibir inyecciones de refuerzo después de la inmunización inicial. Los animales que reciben inyecciones de refuerzo generalmente reciben una cantidad igual de antígeno en adyuvante incompleto de Freund por la misma vía. Las inyecciones de refuerzo se administran a intervalos de aproximadamente tres semanas hasta que se obtienen títulos máximos. Aproximadamente 7 días después de cada inmunización de refuerzo o aproximadamente de forma semanal después de una sola inmunización, se extrae sangre de los animales, se recoge el suero y se almacenan alícuotas a -20°C.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) se preparan por inmunización de ratones de la misma estirpe, preferiblemente Balb/c, con el inmunógeno. Los ratones se inmunizan por vía IP o SC con de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1,0 mg, preferiblemente aproximadamente 0,1 mg del inmunógeno en aproximadamente 0,1 ml de tampón o solución salina incorporado en un volumen igual de un adyuvante aceptable, como se ha analizado anteriormente. Se prefiere el adyuvante de Freund, usándose adyuvante completo de Freund para la inmunización inicial y adyuvante incompleto de Freund posteriormente. Los ratones reciben una inmunización inicial el día 0, y se les permite descansar durante aproximadamente 2 a aproximadamente 30 semanas. A los ratones inmunizados se les administra una o más inmunizaciones de refuerzo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 mg de COX-3 humana o un fragmentos de la misma en una solución tampón tal como solución salina tamponada con fosfato por vía intravenosa (IV). Se obtienen linfocitos de los ratones positivos para el anticuerpo, preferiblemente linfocitos esplénicos, retirando los bazo de los ratones inmunizados por procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Las células de hibridoma se producen mezclando los linfocitos esplénicos con un compañero de fusión apropiado, preferiblemente células de mieloma, bajo condiciones que permitan la formación de hibridomas estables. Los compañeros de fusión pueden incluir, pero sin limitación: mielomas de ratón P3/NS1/Ag 4-1; MPC-11; S-194 y Sp2/0, siendo Sp2/0 el preferido generalmente. Las células productoras de anticuerpo y células de mieloma se fusionan en polietilenglicol, aproximadamente con un peso molecular de 1000, a concentraciones de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 50%. Las células de hibridoma fusionadas se seleccionan por crecimiento en hipoxantina, timidina y aminopterina suplementada con Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) por procedimientos conocidos en la técnica. Se recogen los fluidos sobrenadantes de los pocillos positivos para el crecimiento aproximadamente los días 14, 18 y 21 y se seleccionan para la producción de anticuerpos por un inmunoensayo tal como el radioinmunoensayo en fase sólida (SPIRA) utilizando como antígeno la COX-3 humana o un fragmento de la misma. Los fluidos de cultivo también se pueden ensayar en el ensayo de precipitación Ouchterlony para determinar el isotipo del mAb. Las células de hibridoma de los pocillos positivos para el anticuerpo se clonan por una técnica conocida tal como la técnica de agar blando de MacPherson, Soft Agar Techniques, en Tissue Culture Methods and Applications, Kruse and Paterson, Eds., Academic Press, 1973 o por la técnica de dilución limitada.

Se producen anticuerpos monoclonales *in vivo* por la inyección en ratones Balb/C estimulados con pristano, de aproximadamente 0,5 ml por ratón, con aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 6×10^6 células de hibridoma al menos aproximadamente 4 días después de la estimulación. Se recoge el líquido ascítico aproximadamente 8-12 días después de la transferencia celular y los anticuerpos monoclonales se purifican por técnicas conocidas en este campo.

También pueden producirse Ab monoclonales *in vitro* por crecimiento del hibridoma en un medio de cultivo tisular bien conocido en la técnica. Puede realizarse un cultivo celular *in vitro* de alta densidad para producir grandes cantidades de mAb utilizando técnicas de cultivo en fibra hueca, reactores "airlift", frasco rotatorio o matraces de agitación bien conocidos en la técnica. Los mAb se purifican por técnicas conocidas en la materia.

Los títulos de anticuerpo de líquido ascítico o de fluidos de cultivos de hibridomas se determinan por varios ensayos serológicos o inmunológicos que incluyen, pero sin limitación, precipitación, aglutinación pasiva, técnica de inmunoabsorción de anticuerpo ligado a enzimas (ELISA) y técnicas radioinmunoensayo (RIA). Se usan ensayos similares para detectar la presencia de COX-3 en fluidos corporales o tejidos y extractos celulares.

Las moléculas de anticuerpo se pueden aislar del mamífero (por ejemplo, de la sangre) o cultivos celulares y después purificarse por técnicas bien conocidas, tales como la cromatografía de proteína A para obtener la fracción de IgG. Alternativamente, los anticuerpos específicos para una proteína o polipéptido de esta invención se pueden seleccionar (por ejemplo, purificar parcialmente) o purificar, por ejemplo, por cromatografía de afinidad. Por ejemplo, una proteína recombinantemente expresada y purificada (o parcialmente purificada) de la invención se produce como se describe en este documento, y se acopla covalente o no covalentemente a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una columna de cromatografía. La columna puede entonces utilizarse para purificar por afinidad anticuerpos específicos para las proteínas de la invención a partir de una muestra que contiene anticuerpos dirigidos contra un gran número de diferentes epítomos, generando por lo tanto una composición sustancialmente purificada de anticuerpos, es decir, una que está sustancialmente libre de anticuerpos contaminantes. Por una composición sustancialmente purificada de anticuerpos se entiende, en este contexto, que la muestra de anticuerpo contiene a lo sumo sólo un 30% (en peso seco) de anticuerpos contaminantes dirigidos contra epítomos distintos de los de la proteína o polipéptido deseado de la invención, y preferiblemente a lo sumo el 20%, aún más preferiblemente a lo sumo el 10%, y más preferiblemente a lo sumo el 5% (en peso seco) de la muestra son anticuerpos contaminantes. Una composición purificada de anticuerpos significa que al menos el 99% de los anticuerpos en la composición están dirigidos contra la proteína o polipéptido deseado de la invención.

Se describen además anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos y monoclonales humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que se pueden preparar utilizando técnicas convencionales de ADN recombinante.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones proceden de diferentes especies animales, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Cabilly *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región flanqueante de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Queen, Patente de Estados Unidos N° 5.585.089). Tales anticuerpos monoclonales qui-

méricos y humanizados se pueden producir por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizando métodos descritos en la publicación PCT N° WO 87/02671.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para tratamientos terapéuticos de pacientes humanos. Tales anticuerpos se pueden producir, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes endógenos de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas, y que también pueden expresar genes humanos de las cadenas pesada y ligera. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una parte de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener utilizando la tecnología convencional de hibridoma. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se recolocan durante la diferenciación de las células B, y posteriormente sufren un cambio de clase y mutación somática. De esta manera, utilizando tal técnica es posible producir anticuerpos IgG, IgA e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión de conjunto de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg *et al.*, (1995), *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93).

Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado utilizando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, se utiliza un anticuerpo monoclonal no-humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers *et al.*, (1994), *Bioltechnology*, 12:899-903).

El anticuerpo descrito en este documento (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) se puede utilizar para aislar el polipéptido de la invención por técnicas convencionales, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Además, dicho anticuerpo puede utilizarse para detectar la proteína (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular, o preparación de membrana celular) con el fin de evaluar la abundancia y el patrón de expresión del polipéptido. Los anticuerpos también se pueden utilizar para monitorizar de forma diagnóstica los niveles de proteína en un tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse al emparejar el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, betagalactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen esteptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye el luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen la luciferasa, luciferina y aequorina, y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen el ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Además, un anticuerpo (o fragmento del mismo) se puede conjugar con un resto terapéutico como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen el taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantrafenodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, I-deshidrotetosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCN-LJ), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina), y doxorubicina, antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Los conjugados descritos en este documento se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, sin que el resto de fármaco se considere limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polinucleótido que posea una actividad biológica deseada. Alternativamente, un anticuerpo se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado como se describe en Segal en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

Métodos de Detección

Se describen métodos de detección de un polipéptido o un ácido nucleico de la invención en una muestra. La muestra puede ser cualquier tipo de muestra, incluyendo pero no limitándose a una muestra biológica tomada de un sujeto, una muestra sintetizada químicamente y una muestra purificada sustancialmente. Tales ensayos pueden usarse con propósitos de diagnóstico.

También se describe un método de detección de una molécula de ácido nucleico de un gen de COX-3 humana, que comprende el paso de poner en contacto una muestra con una sonda de ácido nucleico que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico con la secuencia de la SEC ID N°:3 o SEC ID N°:5 bajo condiciones rigurosas y detectar el complejo sonda-ácido nucleico. Los métodos para detectar una molécula de ácido nucleico se conocen por los expertos en la materia, incluyendo, pero no limitándose a hibridación Northern o Southern, hibridación *in situ*, y RT-PCR.

También se describe en este documento un método de detectar la proteína COX-3 humana que comprende el paso de poner en contacto una muestra con un anticuerpo que se une de forma selectiva a un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 70%, 80% o 90% con la SEC ID N°:4 o SEC ID N°:6, y detectar el complejo proteína-anticuerpo. Los métodos para detectar un polipéptido se conocen por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, ensayos de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), transferencia de Western, inmunoprecipitaciones e inmunohistoquímica.

La proteína hCOX-3 también se puede detectar por determinación de la actividad ciclooxigenasa-3 en una muestra. Un ensayo como este comprende los pasos de: a) incubar una muestra de ensayo con un agente que es más potente inhibiendo la ciclooxigenasa-3 que la ciclooxigenasa-1 o -2; b) exponer un sustrato para la ciclooxigenasa a la muestra de ensayo; y c) determinar la actividad ciclooxigenasa de la muestra de ensayo y compararla con la de un control en el cual la muestra de ensayo se expone al sustrato para la ciclooxigenasa y no se expone al agente que es más potente al inhibir la ciclooxigenasa-3 que la ciclooxigenasa-1 o -2.

El agente que es más potente inhibiendo la ciclooxigenasa-3 que la ciclooxigenasa-1 o la COX-2 se conoce en la técnica basándose en estudios de la COX-3 de perro (Chandrasekharan *et al.*, 2002, anteriormente). Un agente así se puede seleccionar del acetaminofeno, fenacetina, dipirona, Aspirina, diclofenaco, ibuprofeno o similares.

Como los agentes presentados anteriormente inhiben de forma preferencial la actividad de la COX-3, estos agentes reducirán la actividad ciclooxigenasa más en una muestra que comprende COX-3 que en una muestra que comprende COX-1 o COX-2.

Se pueden utilizar numerosos métodos para determinar la actividad ciclooxigenasa de una muestra biológica. En una alternativa, la actividad de la COX se puede medir por la cantidad de prostanoïdes producidos a partir del ácido araquidónico utilizando técnicas radiométricas (Dyer *et al.*, 1995, *Inflam. Res.* 44, S241) o de inmunoensayo (Reitz, *et al.*, 1994, *J. Med. Chem.* 37:3878-3881). Los prostanoïdes producidos a partir del ácido araquidónico incluyen, pero sin limitación, PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ y tromboxano A₂ (TxA₂). En un ejemplo, la actividad de la COX puede medirse por la cantidad de PGE₂ producida a partir de ácido araquidónico por un inmunoensayo enzimático utilizando un kit de Amersham Corp., BioTrak™ PGE₂. En otro ejemplo, la actividad de la COX se puede medir por la cantidad de PGF_{2α} producida por la reducción con SnCl₄ de PGH₂ derivada de COX mediante EIA, utilizando un kit comercialmente disponible de Cayman Chemical Company (N° Cat: 560131 o 560101). Alternativamente, la actividad de la COX se puede medir por la cantidad de otros prostanoïdes producidos a partir del ácido araquidónico utilizando métodos similares a los usados para medir la cantidad de PGE₂ o PGF_{2α}.

La actividad de la COX se puede medir mediante la determinación del consumo de oxígeno dependiente de COX en presencia de sustrato (Schewe *et al.*, 1991, *Pharmazie*, 46, 804-809; Hsuanyu *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.* 267, 17649-17657).

La actividad de la COX también se puede medir por la actividad peroxidasa asociada con la enzima COX. La actividad peroxidasa cataliza la posterior reducción del hidroperóxido PG a PGH₂. La actividad peroxidasa de COX puede medirse utilizando un cosustrato del agente reductor que es cromagénico, o fluorogénico, tal como el ácido homovanílico (Percival *et al.* 1994, *Arch. Biochem. Biophys.* 315:111-118) o N, N, N', N'-tetrametilfenilendiamina (TMPD) (Copeland *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:11202-11206).

Como alternativa, la actividad peroxidasa de la COX puede medirse por reducción de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona) en ensayos de luminiscencia a tiempo real (Fernaz *et al.*, 1998, *Anal. Biochem.* 264:216-221).

Para medir la actividad peroxidasa asociada con COX pueden usarse diversos kits disponibles en el mercado. Por ejemplo, está disponible un kit de ensayo de luminiscencia con luminol inducido por peroxidasa en Assay Designs, Inc., (N° de Catálogo: 907-003); y está disponible un kit de ensayo quimioluminiscente en Cayman Chemical Company (N° de Catálogo: 760101); y un ensayo colorimétrico en Cayman Chemical Company (N° de Catálogo: 760111).

Se describen kits para detectar la presencia de un polinucleótido o ácido nucleico de la invención en una muestra biológica (una muestra de ensayo). Dichos kits pueden usarse para determinar si un sujeto padece o tiene un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno asociado con hCOX-3. Dicho kit comprende preferiblemente un soporte compartimentalizado adecuado para sujetar al menos un recipiente. El soporte puede contener un medio para detección tal como un antígeno marcado o un sustrato enzimático o similar. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto marcado o agente capaz de detectar el polipéptido o ARNm que codifica el polipéptido y medios para determinar la cantidad del polipéptido o ARNm en una muestra (por ejemplo, un anticuerpo que se une al polipéptido o una sonda de oligonucleótido que se une al ADN o ARNm que codifica el polipéptido). Los kits también pueden incluir instrucciones para determinar si un sujeto de ensayo padece o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión aberrante del polipéptido si la cantidad del polipéptido o del ARNm que codifica el polipéptido está por encima o por debajo de un nivel normal.

Para los kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo unido a un soporte sólido), que se une selectivamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 70% con respecto a la SEC ID N°: 4 o la SEC

ID N°: 6; y, opcionalmente; (2) un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo o al polipéptido en que el primer anticuerpo se une a un epítipo diferente, y el segundo anticuerpo se conjuga con un agente detectable; y (3) una proteína hCOX-3 recombinante purificada como un control positivo. Preferiblemente, el primer anticuerpo únicamente se une a una COX-3 humana, pero no a una COX-1 humana o COX-2 humana, o a COX-3 de otra especie, tal como perros.

Para los kits basados en la actividad de hCOX-3, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un agente que es más potente inhibiendo COX-3 que COX-1 o -2; (2) un sustrato para COX-3; (3) medios que pueden usarse para detectar la actividad de COX, y (4) una proteína hCOX-3 recombinante purificada como un control positivo. El agente que es más potente inhibiendo la ciclooxigenasa-3 que la ciclooxigenasa-1 o COX-2 puede seleccionarse de acetaminofeno, fenacetina, dipirona, aspirina, diclofenaco, ibuprofeno, o similares. El sustrato para COX-3 puede ser ácido araquidónico acoplado o ácido araquidónico acoplado con un agente reductor cosustrato que es cromogénico, fluorogénico, o capaz de generar luminiscencia cuando se cataliza por la actividad peroxidasa de la COX-3. Dichos cosustratos de agente reductor incluyen, pero sin limitación, ácido homovanílico, TMPD, luminol, y similares. Los medios que pueden usarse para detectar la actividad de la COX pueden ser los medios para detectar los prostanoïdes producidos a partir del ácido araquidónico por EIA o para detectar la reacción cromagénica, fluorogénica o luminiscente resultante del cosustrato del agente reductor.

Para los kits basados en oligonucleótidos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido marcado de manera detectable, que hibrida con una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con la SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5, o (2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6. El kit puede comprender también, por ejemplo, un agente tamponante, un conservante, o un agente estabilizante de proteínas. El kit también puede comprender componentes necesarios para detectar el agente detectable (por ejemplo, una enzima o sustrato). El kit también puede contener una muestra de control o una serie de muestras de control que pueden ensayarse y compararse con la muestra de ensayo. Cada componente del kit se encierra normalmente dentro de un recipiente individual y todos los diversos recipientes se incluyen preferiblemente dentro de un envase único.

En este documento se describe un método para detectar lesiones o mutaciones genéticas en un gen de hCOX-3. En los métodos preferidos, los métodos comprenden las etapas de: (a) aislar un polinucleótido de ciclooxigenasa-3 humana de la muestra; y (b) secuenciar el polinucleótido de ciclooxigenasa-3 humana para detectar modificaciones en la secuencia génica.

Los ejemplos de mutaciones genéticas o lesiones genéticas de interés incluyen, pero sin limitación, la detección de: 1) una delección de uno o más nucleótidos del gen; 2) una adición de uno o más nucleótidos al gen; 3) una sustitución de uno o más nucleótidos del gen; 4) una transposición cromosómica del gen; 5) una modificación a nivel de un transcrito de ARN mensajero del gen; 6) una modificación aberrante del gen, tal como la del patrón de metilación del ADN genómico; 7) la presencia de un patrón de corte y empalme de tipo no silvestre de un transcrito de ARN mensajero del gen; 8) un nivel de tipo no silvestre de una proteína codificada por el gen; 9) una pérdida alélica de el gen; y 10) una modificación post-traducciona l inapropiada de la proteína codificada por el gen. En la técnica se conocen bien métodos para detectar estas lesiones o mutaciones genéticas. Existe una gran cantidad de técnicas de ensayo conocidas en este campo que se pueden usar para detectar lesiones en un gen, tales como reacciones PCR, modelos de escisión por enzimas de restricción, hibridación de una muestra y ácidos nucleicos de control, reacciones de secuenciación, alteraciones de la movilidad electroforética, hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva, y extensión selectiva de cebadores.

Método de Tratamiento Usando Terapia Génica

En este documento se describen métodos para tratar a un sujeto que está en peligro de padecer un trastorno asociado a la hCOX-3 por aumento o disminución de la expresión de la hCOX-3 usando terapia génica.

En los perros, la COX-3 se inhibe selectivamente por fármacos analgésicos/antipiréticos tales como acetaminofeno, lo que sugiere que la COX-3 puede ser la diana de este tipo de fármacos (Chandrasekharan *et al.*, 2002, anteriormente). Por lo tanto, es previsible que disminuyendo la expresión de COX-3 mediante terapia génica se conseguirán efectos terapéuticos similares a los obtenidos con los fármacos de tipo acetaminofeno, tales como reducción de la fiebre y alivio del dolor. La terapia génica se prefiere en el tratamiento del dolor crónico o fiebre cuando se necesita la administración continua de analgésicos.

Particularmente, debido a que como ocurre con todos los AINE, la acción analgésica del acetaminofeno está limitada por un efecto techo, cuando un aumento en la dosis produce únicamente un pequeño aumento en el efecto (Beaver, 1988, Am. J. Med., 84 (Suppl 5A): 3-15).

Además, se encontró una asociación inversa estadísticamente significativamente entre el uso de acetaminofeno y el riesgo de cáncer de ovario (Cramer *et al.*, 1998, The Lancet 351:104-7). Por lo tanto, la reducción de la expresión de COX-3 humana mediante terapia génica puede ser una terapia útil al reducir la tasa de muerte por cáncer de ovario basándose en resultados de un estudio prospectivo de que mujeres que tomaban acetaminofeno diariamente tenían una

tasa de muerte inferior al 45% por cáncer de ovario que las mujeres que no lo usaban (Rodriguez *et al.*, 1998, The Lancet 352:1354-5).

La terapia antisentido de COX-3 puede usarse para disminuir la expresión de hCOX-3 en una célula. La terapia antisentido de COX-3 es particularmente útil cuando es deseable una actividad de hCOX-3 disminuida.

El principio de las estrategias basadas en antisentido se basa en la hipótesis de que la supresión específica de secuencia de la expresión génica puede conseguirse por hibridación intracelular entre el ARNm y una especie antisentido complementaria. La formación de un dúplex de ARN híbrido puede después interferir con el procesamiento/transporte/traducción y/o estabilidad del ARNm de COX-3 diana. Para que se produzca el efecto antisentido se necesita hibridación. Las estrategias antisentido pueden usar una diversidad de enfoques, incluyendo el uso de oligonucleótidos antisentido, inyección de ARN antisentido y transfección de vectores de expresión de ARN antisentido. Los efectos fenotípicos inducidos por hibridación antisentido con una cadena con sentido se basan en cambios en los criterios tales como los niveles de proteína, medición de la actividad de la proteína y los niveles del ARNm diana.

Un ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena completa que codifica un gen de hCOX-3, o únicamente a una parte de la misma. Una molécula de ácido nucleico antisentido también puede ser complementaria a toda o a parte de una región no codificante de la cadena codificante de un gen de hCOX-3. Las regiones no codificantes ("5' y 3' UTR") son las secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante y no se traducen en aminoácidos. Preferiblemente, la región no codificante es una región reguladora para la transcripción o traducción del gen de hCOX-3.

Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 15, 25, 35, 45 o 65 nucleótidos o más de longitud tomados desde la secuencia complementaria de la SEC ID N°: 3 ó SEC ID N°: 5. Se prefiere que la secuencia sea al menos de 18 nucleótidos de longitud para conseguir una hibridación suficientemente fuerte con la secuencia de ARNm diana como para prevenir la traducción de la secuencia. (Izant *et al.*, 1984, Cell, 36:1007-1015; Rosenberg *et al.*, 1985, Nature, 313:703-706). Un ácido nucleico antisentido puede construirse usando síntesis química y reacciones de ligamiento enzimático usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede sinterizarse químicamente usando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de diversas maneras diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre el ácido nucleico antisentido y el ácido nucleico con sentido, por ejemplo, pueden usarse derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5 oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina. Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser una molécula de ácido nucleico CC-anomérica. Una molécula de ácido nucleico CC-anomérica forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los que, contrariamente a las unidades P habituales, las cadenas corren en paralelo entre sí (Gaultier *et al.* (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-664 1). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue *et al.* (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) o un análogo quimérico de ARN-ADN (Inoue *et al.* (1987) FEBS Lett. 215:327-330).

Como alternativa, el ácido nucleico antisentido también puede producirse biológicamente usando un vector de expresión dentro del cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido como se ha descrito anteriormente. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de un plásmido, fagémido o virus atenuado recombinante en el que los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora muy eficaz, cuya actividad puede determinarse por el tipo celular en el cual se introduce el vector. Para conseguir concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren las construcciones de los vectores en los que la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un promotor fuerte pol II o pol III. Para un análisis de la regulación de la expresión génica usando genes antisentido véase Weintraub *et al.* (1985, Trends in Genetics, vol. 1 (1), páginas 22-25).

Típicamente, un ácido nucleico antisentido se administra a un sujeto por microinyección, encapsulación liposomal o se genera *in situ* por expresión de vectores que portan la secuencia antisentido. Un ejemplo de una vía de administración de moléculas de ácido nucleico antisentido incluye la inyección directa en el sitio del tejido. El ácido nucleico antisentido puede ligarse en vectores virales que median la transferencia del ácido nucleico antisentido cuando los vectores virales se introducen en células hospedadoras. Los vectores virales adecuados incluyen retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, herpesvirus, vaccinia virus, poliovirus, y similares. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico antisentido pueden modificarse para dirigirse a células seleccionadas y después administrarse sistémicamente. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas antisentido pueden modificarse de manera que se unan específicamente a receptores o antígenos expresados en una superficie celular seleccionada, por ejemplo, por unión de las moléculas del ácido nucleico antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a receptores de la superficie celular o antígenos.

Una vez dentro de la célula, las moléculas de ácido nucleico antisentido hibridan con o se unen al ARNm celular y/o ADN genómico que codifica una proteína COX-3 inhibiendo por lo tanto la expresión, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser por complementariedad de nucleótidos convencionales para formar un dúplex estable o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a dúplex de ADN, mediante interacciones específicas en el surco principal de la doble hélice.

En un método preferido, cuando es beneficioso disminuir la actividad de la COX-3, el método para disminuir la expresión de COX-3 en un sujeto que lo necesite implica el uso de un ARN pequeño de interferencia (ARNip).

En diversos organismos, se ha aprobado que la introducción del ARN bicatenario es una herramienta poderosa para suprimir la expresión génica mediante un proceso conocido como interferencia del ARN.

El ARNip correspondiente a la hCOX-3 y los métodos de producción de ARNip se describen anteriormente. En este documento se describe un método de disminución de la expresión de hCOX-3 en una célula de un sujeto que lo necesita, que comprende las etapas de (a) introducir ARNip que se dirige al ARNm del gen de la COX-3 humana para la degradación en la célula del sujeto; y (b) mantener la célula producida en (a) en condiciones en las que se produce la interferencia del ARNip del ARNm del gen de la COX-3 humana en la célula del sujeto. El ARNip puede introducirse en la célula del sujeto usando procedimientos similares a los de los ácidos nucleicos antisentido descritos en este documento.

En una alternativa, puede usarse terapia génica para aumentar la expresión de hCOX-3 introduciendo una molécula de ácido nucleico capaz de expresar una proteína COX-3 humana en las células de un sujeto. La terapia génica de COX-3 puede ser útil particularmente para el tratamiento de enfermedades en las que es beneficioso elevar la actividad de la COX-3.

Un procedimiento para realizar terapia de genes *ex vivo* se indica en la Patente de Estados Unidos N° 5.399.346 y también en documentos presentados en la historia de archivo de esa patente, siendo todos ellos documentos disponibles para el público. En general, la terapia génica puede implicar la introducción *in vivo* de una copia funcional de un gen en una célula (o células) de un sujeto, y la devolución de la célula o células modificadas genéticamente al sujeto. La copia funcional del gen está bajo control operativo de elementos reguladores, que permiten la expresión del gen en la célula o células modificadas genéticamente. Numerosas técnicas de transfección y transducción, así como vectores de expresión apropiados, se conocen bien por los expertos en la materia, algunas de las cuales se describen en la solicitud PCT WO95/00654. La terapia génica *in vivo* usa vectores tales como adenovirus, retrovirus, vaccinia virus, papilomavirus bovino y herpes virus tales como el virus de Epstein-Barr. La transferencia de genes también puede conseguirse usando medios no virales que necesitan la infección *in vitro*. Dichos medios pueden incluir fosfato de calcio, DEAE dextrano, electroporación y fusión de protoplastos. Los liposomas dirigidos también pueden ser potencialmente beneficiosos para el suministro de ADN en una célula.

Como un ejemplo, una molécula de ADN que codifica una proteína COX-3 humana puede clonarse primero en un vector retroviral. La expresión de la proteína COX-3 del vector puede dirigirse desde su promotor endógeno o desde la repetición terminal larga retroviral o desde un promotor específico para determinadas células diana. El vector puede entonces introducirse en una célula de un sujeto para expresar satisfactoriamente las proteínas hCOX-3 en las células diana. El gen puede suministrarse preferiblemente a las células en una forma que puede ser usada por las células para codificar suficiente proteína para proporcionar una función eficaz. Los vectores retrovirales a menudo son un vector de suministro de genes preferido para la terapia génica, especialmente debido a su elevada eficacia de infección e integración estable y expresión. Como alternativa, el ADN de hCOX-3 puede transferirse a las células para terapia génica mediante técnicas no virales que incluyen la transferencia de ADN dirigida mediada por receptor usando conjugados de ADN-ligando o conjugados de ADN-ligando-adenovirus, fusión de membranas de lipofección o microinyección directa. Estos procedimientos y variaciones de los mismos son adecuados para la terapia génica de COX-3 *ex vivo* y también *in vivo*. Los protocolos para la metodología molecular de la terapia génica adecuados para usar con el gen de hCOX-3 se describen en Gene Therapy Protocols, editado por Paul D. Robbins, Human press, Totowa NJ, 1996.

Durante el tratamiento, la cantidad eficaz de moléculas de ácido nucleico de la invención administrada a los individuos puede variar de acuerdo con una diversidad de factores que incluyen el tipo, especie, edad, peso, sexo y condición médica del paciente; la gravedad de la afección a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y la molécula de ácido nucleico particular empleada. Un médico o veterinario o especializado en la materia de la terapia génica puede determinar y prescribir la cantidad eficaz requerida para impedir, contrarrestar o detener el progreso de la afección. La precisión óptima para conseguir concentraciones dentro del intervalo que produce eficacia sin toxicidad necesita un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de las moléculas de ácido nucleico en los sitios diana. Esto implica una consideración de la distribución, equilibrio y eliminación de la molécula de ácido nucleico implicada en la terapia génica.

La terapia génica descrita en este documento puede usarse en solitario a dosificaciones apropiadas definidas por ensayos rutinarios para obtener un aumento o disminución óptima de la actividad de la hCOX-3 minimizando al mismo tiempo cualquier toxicidad potencial. Además, puede ser deseable la co-administración o administración secuencial de otros agentes. Las dosificaciones de administración se ajustan cuando diversos agentes se combinan para conseguir los efectos deseados. Las dosificaciones de estos diversos agentes pueden optimizarse independientemente y combinarse

para conseguir un resultado sinérgico en el que la patología se reduce más de lo que se reduciría si se utilizase sólo un agente en solitario.

Se describe en este documento un método para evaluar el mecanismo de acción de un fármaco analgésico/antipirético en una célula, que comprende las etapas de:

- (a) administrar a la célula una cantidad eficaz de una composición que aumente o disminuya la expresión o actividad de una ciclooxigenasa-3 humana en la célula;
- (b) administrar a la célula una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco analgésico/antipirético;
- (c) medir un efecto terapéutico del fármaco analgésico/antipirético en la célula y
- (d) comparar el efecto terapéutico con el de un control.

La etapa de comparación puede comprender comparar el efecto terapéutico con el de un control en el que la expresión o actividad de la ciclooxigenasa-3 humana en la célula no se ha aumentado o disminuido antes de la administración del fármaco analgésico/antipirético.

Un fármaco analgésico/antipirético que se dirige a la COX-3 humana dentro de una célula mostrará una clara distinción de su efecto terapéutico cuando el nivel de la actividad o expresión de COX-3 se cambia dentro de la célula. El nivel de la expresión de COX-3 puede disminuirse por la técnica antisentido o de ARNip como se ha descrito anteriormente. El nivel de expresión de COX-3 puede aumentarse introduciendo una molécula de ácido nucleico capaz de codificar una proteína funcional ciclooxigenasa-3 en una célula en el sujeto. El nivel de la actividad de hCOX-3 puede aumentarse o disminuirse usando un activador o inhibidor de hCOX-3, y el activador o inhibidor de hCOX-3 puede obtenerse usando un método de identificación de compuesto descrito a continuación.

Métodos de Identificación de Moduladores de hCOX-3

“Inhibidores”, “activadores” y “moduladores” de hCOX-3 se refieren a moléculas inhibidoras o activadoras identificadas usando ensayos de unión *in vitro* e *in vivo* para la COX-3 humana. Preferiblemente midiendo la actividad ciclooxigenasa de la COX-3 humana.

En particular, “inhibidores” se refiere a compuestos que disminuyen, impiden, inactivan, desensibilizan o regulan negativamente la expresión o actividad de la COX-3. “Activadores” son compuestos que aumentan, activan, facilitan, sensibilizan o regulan positivamente la expresión o actividad de la COX-3. “Moduladores” incluyen tanto “inhibidores” como “activadores”.

Los métodos de identificación de compuestos pueden realizarse usando formatos de laboratorio convencionales o ensayos adaptados para un alto rendimiento. La expresión “alto rendimiento” se refiere a un diseño de ensayo que permite explorar con facilidad múltiples muestras simultáneamente, y puede incluir la capacidad para la manipulación robótica. Otra característica deseada de los ensayos de alto rendimiento es un diseño de ensayo que se optimiza para reducir el uso de reactivos o minimizar el número de manipulaciones para conseguir el análisis deseado. Los ejemplos de formatos de ensayo incluyen placas de 96 pocillos o de 384 pocillos, gotas en suspensión y microplacas microcanal “lab on a chip” usadas para experimentos de manipulación de líquidos. Los expertos en la materia saben bien que según avanzan la miniaturización de moldes de plástico y dispositivos de manipulación de líquidos, o según se diseñan dispositivos de ensayo mejorados, se pueden procesar mayores números de muestras usando el diseño descrito en este documento.

Los compuestos candidatos abarcan numerosas clases químicas, aunque típicamente son compuestos orgánicos. Preferiblemente, son compuestos orgánicos pequeños. Los compuestos candidatos comprenden grupos químicos funcionales necesarios para interacciones estructurales con polipéptidos y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales y más preferiblemente al menos tres de los grupos químicos funcionales. Los compuestos candidatos pueden comprender carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales identificados anteriormente. Los compuestos candidatos también pueden ser biomoléculas tales como péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, isoprenoides, purinas, pirimidinas, derivados o análogos estructurales de los anteriores, o combinaciones de los mismos y similares. Cuando el compuesto es un ácido nucleico, el compuesto es típicamente una molécula de ADN o de ARN, aunque también se contemplan ácidos nucleicos modificados que tienen enlaces o subunidades no naturales.

Los compuestos candidatos se obtienen a partir de una amplia diversidad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, se dispone de numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos y biomoléculas orgánicas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos aleatoria, bibliotecas combinatorias orgánicas sintéticas, bibliotecas de presentación de fagos de péptidos aleatorios y similares. Los compuestos candidatos también pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en

los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase sólida o en fase de solución paralelas dirigibles espacialmente; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución; el método de biblioteca “una perla - un compuesto” y métodos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145). De manera alternativa, se dispone de bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos de bacterias, hongos, plantas y animales o se producen fácilmente. Adicionalmente, las bibliotecas y compuestos producidos de manera natural y sintéticamente pueden modificarse fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

Además, agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc., para producir análogos estructurales de los agentes. Los compuestos candidatos pueden seleccionarse aleatoriamente o pueden basarse en compuestos existentes que se unen a y/o modulan la función de la actividad de la COX-1 o COX-2. Por lo tanto, una fuente de agentes candidatos es las bibliotecas de moléculas basadas en activadores o inhibidores de COX conocidos en los que la estructura del compuesto está cambiada en una o más posiciones de la molécula para contener más o menos restos químicos o restos químicos diferentes. Los cambios estructurales realizados en las moléculas en la creación de las bibliotecas de activadores/inhibidores análogos pueden ser dirigidos, aleatorios o una combinación de sustituciones y/o adiciones tanto dirigidas como aleatorias. Un experto en la materia en la preparación de bibliotecas combinatorias puede preparar fácilmente dichas bibliotecas basándose en compuestos AINE o analgésicos/antipiréticos existentes.

En la mezcla también puede incluirse una diversidad de otros reactivos. Éstos incluyen reactivos tales como sales, tampones, proteínas naturales (por ejemplo albúmina), detergentes, etc., que pueden usarse para facilitar la unión óptima proteína-proteína y/o proteína/ácido nucleico. Dicho reactivo también puede reducir interacciones no específicas o de fondo de los componentes de la reacción. También pueden usarse otros reactivos que mejoran la eficacia del ensayo tales como inhibidores de nucleasa, agentes antimicrobianos y similares.

En la técnica pueden encontrarse ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares, por ejemplo en: Zuckermann *et al.* (L994). *J Med. Chem.* 37: 2678. Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Biotechniques* 13: 412-421), o en perlas (Lam (1991) *Nature* 354: 82-84), microplacas (Fodor (1993) *Nature* 364: 555-556), bacterias (Patente de Estados Unidos N° 5.223.409), esporas (Patente N° 5.571.698), plásmidos (Cull *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) o fagos (véase, por ejemplo, Scott y Smith (1990) *Science* 249:3 86-390).

Se describe un método de identificación de un compuesto que aumente o disminuya la síntesis de prostaglandinas catalizada por una COX-3 humana que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una proteína ciclooxigenasa-3 humana o un polipéptido que comprende un fragmento activo de la proteína ciclooxigenasa-3 humana, con un compuesto de ensayo y con un sustrato para ciclooxigenasa, y (b) determinar la actividad ciclooxigenasa en (a) y compararla con la de un control en el que la proteína ciclooxigenasa-3 humana o el polipéptido que comprende un fragmento activo de la proteína ciclooxigenasa-3 humana se expone únicamente al sustrato para la ciclooxigenasa pero no al compuesto de ensayo. Los compuestos que son activadores para hCOX-3 aumentarán la velocidad de conversión del sustrato y darán como resultado más actividad de la COX en la muestra en comparación con el control como una función del tiempo. Los compuestos que son inhibidores de la COX-3 disminuirán la velocidad de conversión del sustrato y darán como resultado menor actividad de la COX en la muestra en comparación con el control como una función del tiempo.

En un método preferido, el método de identificación de un compuesto que aumenta o disminuye la síntesis de prostaglandinas catalizada por una COX-3 humana descrita anteriormente, comprende adicionalmente la etapa de ensayar si el compuesto del ensayo cambia la actividad ciclooxigenasa de otra enzima ciclooxigenasa, tal como la COX-1 humana y la COX-2 humana. Preferiblemente, el compuesto de ensayo únicamente aumenta o disminuye la actividad ciclooxigenasa de la hCOX-3, pero no la de la hCOX-1 o la hCOX-2.

Pueden usarse numerosos métodos para determinar la actividad ciclooxigenasa de una muestra biológica y se han descrito anteriormente.

En un ejemplo preferido, la proteína COX usada en los métodos de ensayo está asociada con una célula hospedadora, nativa o recombinante. El documento US5837479 reivindica un método para identificar un compuesto que inhibe la actividad de la COX-2 usando una línea celular recombinante para COX-2. Puede usarse un método similar para identificar un compuesto que inhibe la actividad de la hCOX-3 usando una célula hospedadora para hCOX-3. El término “célula” se refiere a al menos una célula, pero incluye una pluralidad de células apropiadas para la sensibilidad del método de detención. Preferiblemente, las células adecuadas para el método son eucariotas.

En una alternativa, la proteína COX usada en los ensayos es parte de una preparación de membrana aislada. Al igual que COX-1 ó 2, la COX-3 es una proteína de membrana. Las membranas que contienen COX-3 humana pueden aislarse de células hospedadoras hCOX-3 usando métodos conocidos por los expertos en la materia y pueden usarse como la fuente de hCOX-3 en el ensayo de exploración.

En otra alternativa más, la proteína COX usada en los ensayos puede purificarse o aislarse.

Los ensayos de unión descritos en este documento pueden usarse para identificar un compuesto que se une a una proteína COX-3 humana y potencialmente es capaz de aumentar o disminuir la actividad biológica de la proteína hCOX-3. Un método ejemplar comprende las etapas de: (a) incubar un compuesto de ensayo con una proteína hCOX-3 y un ligando marcado para la proteína hCOX-3; (b) separar la proteína hCOX-3 del ligando marcado no unido; y
 5 (c) identificar un compuesto que inhibe la unión del ligando a la subunidad mediante una reducción de la cantidad de ligando marcado que se une a la hCOX-3. Un ejemplo del ligando marcado para la proteína hCOX-3 es un anticuerpo específico para hCOX-3 marcado como se ha descrito anteriormente o un agente que es más potente para inhibir la hCOX-3 que la hCOX-1 o la hCOX-2, tal como acetaminofeno, fenacetina, dipirona, aspirina, diclofenaco e ibuprofeno. Preferiblemente, puede usarse para el ensayo de unión una célula hospedadora hCOX-3 (recombinante
 10 o nativa) que expresa la hCOX-3 pero no la hCOX-1 o hCOX-2. Más preferiblemente, pueden usarse para el ensayo de unión membranas celulares preparadas de la célula hospedadora hCOX-3. Adicionalmente, de manera preferida, puede usarse para el ensayo de unión una proteína hCOX-3 purificada sustancialmente.

La separación de la proteína hCOX-3 del ligando marcado no unido puede conseguirse de una variedad de formas. De manera conveniente, al menos uno de los componentes se inmoviliza en un sustrato sólido, del cual pueden separarse fácilmente los componentes no unidos. El sustrato sólido puede prepararse de una amplia variedad de materiales y en una amplia variedad de formas, por ejemplo, en una placa de microtitulación, microperla, varilla, partícula de resina, etc. Preferiblemente el sustrato se selecciona para maximizar la relación entre la señal y las interferencias, principalmente para minimizar la unión de fondo, así como para facilitar la separación y coste.
 20

La separación puede efectuarse, por ejemplo, retirando una perla o varilla de un depósito, vaciando o diluyendo un depósito tal como un pocillo de una placa de microtitulación, o aclarando una perla, partícula, columna cromatográfica o filtro con una solución o disolvente de lavado. La etapa de separación preferiblemente incluye múltiples aclarados o lavados. Por ejemplo, cuando el sustrato sólido es una placa de microtitulación, los pocillos pueden lavarse varias veces
 25 con una solución de lavado, que típicamente incluye los componentes de la mezcla de incubación que no participan en uniones específicas tales como sales, tampón, detergente, proteína no específica, etc. Cuando el sustrato sólido es una perla magnética, las perlas pueden lavarse una o más veces con una solución de lavado y aislarse usando un imán.

Para marcar el ligando para hCOX-3 puede usarse una amplia diversidad de marcadores tales como los que proporcionan detección directa (por ejemplo, radiactividad, luminiscencia, densidad óptica o de electrones, etc.) o detección indirecta (por ejemplo, un marcador de epítipo tal como el epítipo FLAG, un marcador enzimático tal como la peroxidasa de rábano picante, etc.).
 30

En más de uno de los métodos de ensayo anteriores, puede ser deseable inmovilizar la hCOX-3 o su ligando para facilitar la separación de las formas que han formado complejo de las que no han formado complejo de la proteína hCOX-3, así como facilitar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido, o la interacción de un polipéptido con una molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede conseguirse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de centrífuga. Por ejemplo, puede proporcionarse una proteína de fusión de hCOX-3 que añada un dominio que permite que uno o tanto la hCOX-3 como su ligando se unan a una matriz. Por ejemplo, una proteína de fusión de hCOX-3 con glutatión-S-transferasa puede adsorberse en perlas de glutatión-sepharose (Sigma Chemical; St. Louis, MO) o sobre placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que se combinan después con el compuesto del ensayo o con el compuesto del ensayo y el ligando marcado para hCOX-3, y la mezcla puede incubarse en condiciones que conduzcan a la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, las perlas o los pocillos de las placas de microtitulación se lavan para retirar cualquier componente no unido y la formación del complejo se mide directamente o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. De manera alternativa, los complejos pueden disociarse de la matriz y el nivel de unión o la actividad del polipéptido de la invención puede determinarse usando técnicas convencionales.
 45

En los ensayos de exploración descritos en este documento también pueden usarse otras técnicas para inmovilizar proteínas en matrices. Por ejemplo, hCOX-3 o su ligando pueden inmovilizarse utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina.
 50

Pueden prepararse polipéptidos o moléculas diana biotiniladas a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas bien conocidas en el campo (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL), e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). De manera alternativa, pueden derivatizarse en los pocillos de las placas anticuerpos reactivos con hCOX-3 pero que no interfieren con la unión de hCOX-3 con su molécula diana y la hCOX-3 puede quedar atrapada en los pocillos por conjugación con anticuerpos. Los métodos para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen inmunodetección de complejos usando anticuerpos que reaccionan con el polipéptido de la invención o la molécula diana, así como ensayos unidos a enzimas que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada con el polipéptido de la invención o la molécula diana.
 60

Se entiende que la presente invención no está limitada a la metodología, bases de datos, secuencias de genes y método de análisis de secuencia de genes particular etc. descritos en este documento, y éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento no pretende limitar el alcance de la presente invención: debe observarse que como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen las referencias en plural a menos que el contexto claramente indique otra cosa. Por lo
 65

tanto, por ejemplo, una referencia a “un gen” es una referencia a uno o más genes e incluye equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia y así sucesivamente. De hecho, un experto en la materia puede usar los métodos descritos en este documento para identificar y utilizar cualquier gen y proteína COX-3, conocida actualmente o posteriormente.

Los ejemplos que no se refieren específicamente a la invención reivindicada se incluyen únicamente para información.

Ejemplo 1

Confirmación de La Secuencia del Intrón 1 para Cox-1 Humana

La secuencia de ADNc de COX-1 humana de longitud completa (número de acceso del GenBank: NM_000962) se usó como secuencia problema para explorar la base de datos del genoma humano de NCBI. El gen de la COX-1 humana se localiza en el cromosoma 9 y comprende 11 exones y 10 intrones que abarcan aproximadamente 22 kb. Las secuencias del exón 1, intrón 1 y exón 2 de NCBI se muestran en la Figura 1A. Si, al igual que la Cox-3 canina, la Cox-3 humana conserva el intrón 1 completo de la COX-1 humana, la secuencia obtenida de la base de datos genómica humana estará traducionalmente fuera del marco. Ninguno de los tres marcos de lectura abierta posibles (a, b y c) daría como resultado un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos codificadas por el exón 1, el intrón 1 y el exón 2 de la Cox-1 humana (Figura 1B). Por lo tanto, la primera cuestión es si la secuencia genómica humana publicada es efectivamente correcta. O si la secuencia genómica publicada contiene una mutación de desplazamiento de marco que de cómo resultado la terminación temprana de la traducción.

Se diseñaron dos oligonucleótidos para amplificar la secuencia genómica del exón 1-intrón 1-exón 2 de la COX-1 humana. El cebador directo se diseñó basándose en el exón 1 y parte de la secuencia intrónica 1, SEC ID N°: 1, 5' ATGAGCCGTGAGTGCACCCCGGT 3', y el cebador inverso se basó en el exón 2, SEC ID N°: 2, 5' CTACCTGGCGTGGGCGCCCCCTGGGT 3'. La PCR se realizó con el kit para PCR Advantage®-GC Genomic adquirido en BD Bioscience Clontech (Palo Alto, CA). La mezcla de reacción contenía 1 µg de ADN genómico humano (BD Bioscience Clontech, Palo Alto, CA), 10 µl de tampón de reacción GC Genomic 5 x, GC-Melt 0,5 M, Mg(OAc)₂ 1,1 mM, dNTP 200 µM, 200 nM de cada cebador y 1 µl de mezcla de ADN polimerasa Advantage-GC 50 x. Los parámetros para el termociclador para la PCR genómica fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, 35 ciclos de 94°C/30 segundos y 68°C/2 minutos. El producto de PCR (fragmento -190 pb) se subclonó en el vector de clonación pPCRScript (Stratagene, CA) y se secuenció.

El análisis de la secuencia indicó que la secuencia del exón 1-intrón 1-exón 2 de la COX-1 humana concordaba con lo publicado en la base de datos del genoma humano. Por lo tanto, si todo el intrón 1 (94 pb) queda retenido en la hCOX-3, habría un desplazamiento en el marco de lectura, dando como resultado la ausencia de producción de una enzima COX3 activa en tejidos humanos. Al menos dos mecanismos podrían conservar un marco de lectura abierto, conduciendo a la producción de una enzima COX-3 activa: 1) la corrección del ADN, es decir, la conservación de todo el intrón 1 seguido por la retirada de algunos nucleótidos a nivel del ARNm; o 2) conservación parcial del intrón 1.

Ejemplo 2

Clonación del ADNc que Codifica El Extremo N de COX-3 Humana

Para identificar la COX-3 humana, se amplificó un fragmento de ADNc de bibliotecas de ADNc de cerebro, estómago y células mielógenas humanas, siendo el cebador directo el mismo que se usó para amplificar la secuencia de ADN genómico, SEC ID N°: 1 y el cebador inverso que se sitúa a aproximadamente 600 posiciones pb de COX-1 humana de la SEC ID N°: 7, 5'-TATGAACCTTCCTCCTGAGCAGGAA-3'. La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 5 µl de ADNc de cerebro humano Marathon-Ready™, 5 µl de tampón de reacción 10 x, dNTP 200 µM, 200 nM de cada cebador y 1 µl de mezcla de ADN polimerasa Advantage-GC2 50 x (Clontech, CA). Los parámetros de reacción PCR eran: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 2 minutos. Después de la PCR, el fragmento de PCR de 0,6 kb se purificó, se perfeccionó y se subclonó en pPCRscript. Se recogieron aproximadamente veinte clones independientes, y su ADN plasmídico se aisló y se secuenció.

El análisis de secuenciación del ADN bicatenario reveló que existían tres tipos de variantes de corte y empalme de COX-3 en tejidos humanos. El primer tipo (Tipo I) es uno en el que se retienen las 94 pb del intrón 1, conduciendo a un desplazamiento del marco de lectura, que codifica un péptido muy pequeño que es probablemente una proteína inactiva para COX. El segundo tipo (Tipo II o COS-3a, Figura 1C) conserva casi todo el intrón 1, pero ha perdido una guanidina en la posición 64, conduciendo a un desplazamiento corto y autorrectificante en el marco de lectura, que codifica una proteína activa COX y de longitud completa. La secuencia de nucleótidos amino terminal de la COX-3a se representa en la SEC ID N°: 3 y la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N°: 3 se representa en la SEC ID N°: 4. Al igual que la variante de corte y empalme de Tipo II, el tercer tipo (Tipo III o COX-3b, Figura 1D) también conserva casi todo el intrón 1, pero carece de una citosina en la posición pb 43, conduciendo a otro desplazamiento corto y autorrectificante en el marco de lectura, que codifica una proteína activa COX y de longitud completa. COX-3b

codifica una proteína que es ligeramente diferente de COX-3a en su extremo N terminal. La secuencia de aminoácidos amino terminal de la COX-3b se representa en la SEC ID N°: 5 y la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N°: 5 se representa en la SEC ID N°:6.

Estos resultados demostraron la existencia de la Cox-3 humana, sugiriendo que la COX-3 humana puede formarse mediante uno o más de un evento de edición del ARN después de la retención del intrón 1. El extremo N de hCox-3a o hCox-3b, codificado por la conservación del intrón 1 de Cox-1 humana, es significativamente diferente del de la proteína canina, mostrando aproximadamente una identidad de secuencia del 33% o 26% (Figura 1E) con respecto a la Cox-3 canina, respectivamente. La secuencia de nucleótidos del intrón 1 de COX-1 humana comparte aproximadamente una identidad de secuencia del 75% con la del intrón 1 de la COX-1 canina (Chandrasekharanetal., 2002, anteriormente).

Ejemplo 3

Estructura Genómica y Variantes de Corte y Empalme de COX-1 y COX-3 Humana

Para investigar la base de datos del genoma humano del Genbank se usó la secuencia de ADNc de longitud completa de los genes de COX-1 y COX-3 humanas. La investigación indicó que el gen que codifica la proteína COX-1/COX-3 humana es aproximadamente de 22 kb y se localiza en el cromosoma 9. Como se muestra en la Figura 2, el gen que codifica la proteína COX-1 humana está compuesto de 11 exones y 10 intrones. La COX-1 está codificada por el exón 1 hasta el exón 11, mientras que la nueva variante de corte y empalme, COX-3, se codifica por el mismo número de exones más un intrón 1 conservado entre el exón 1 y el exón 2 que, después de la edición del ARN, da como resultado una inserción de 31 restos en el extremo amino.

Ejemplo 4

Ensamblaje de COX-3 Humana de Longitud Completa

Para ensamblar la COX-3 humana de longitud completa, en primer lugar se amplificó un fragmento de ADNc carboxi terminal de una biblioteca de ADNc de cerebro humano Marathon-Ready™ (BD Bioscience Clontech, Palo Alto, CA) con dos cebadores específicos de COX-1 humana: cebador directo, SEC ID N°: 12, 5' CAT ATG AGC CGG AGT CTC TTG CTC TGG TTC, 3', y cebador inverso, que contenía un sitio de restricción enzimática Sall, SEC ID N°: 13, 5' GTC GAC TCA GAG CTC TGT GGA TGG TCG CTC CAC 3'. La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 5 µl de ADNc de cerebro humano Marathon-Ready™, 5 µl de tampón de reacción 10 x, 200 µM de dNTP, cebadores específicos 200 nM y 1 µl de mezcla de ADN polimerasa Advantage HF2 50 x (Clontech). Los parámetros de la reacción PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 2 minutos. Después de la PCR, el fragmento PCR de 1.75 kb se purificó, se realizó la digestión con EcoRI y Sall, se separó en un gel de agarosa al 1% y finalmente se escindió el fragmento carboxilo terminal de 1,55 kb.

El ADNc de COX-3a humana de longitud completa se ensambló y se subclonó en vectores pAGA4 de acuerdo con métodos de biología molecular convencionales. En resumen, el fragmento N terminal de 0,33 kb de la posición 1 pb (sitio NdeI con codón de inicio) a la posición 332 pb (sitio EcoRI) y el fragmento C-terminal de 1,55 kb (de EcoRI a Sall, véase anteriormente) se subclonaron directamente en un vector pAGA4 previamente digerido por NdeI y Sall. La construcción resultante se denominó hCOX-3/pAGA4. La construcción final se confirmó mediante secuenciación del ADN. La secuencia de nucleótidos del ADNc de COX-3a humana de longitud completa se representa en la SEC ID N°: 8 y la secuencia de aminoácidos de la COX-3a humana de longitud completa se representa en la SEC ID N°:9.

Siguiendo un procedimiento similar, también se ensambló el ADNc de COX-3b humana de longitud completa. La secuencia de nucleótidos del ADNc de COX-3b humana de longitud completa se representa en la SEC ID N°: 10 y la secuencia de aminoácidos de la COX-3b humana de longitud completa se representa en la SEC ID N°: 11.

Ejemplo 5

Análisis Traduccional In vitro de las Proteínas COX-3a y COX-1 Humanas

La traducción *in vitro* de las proteínas COX-3a y COX-1 humanas se realizó con el Sistema de Transcripción/Traducción Acoplado TnT®T7 Quick (Promega) de acuerdo con el protocolo recomendado por el vendedor. En resumen, se añadieron 1 µl de las construcciones hCOX-3/pAGA4 y hCOX-1/pAGA4 a una concentración de 0,1 µg/µl a 9 µl de mezcla maestra TNT Quick con 0,2 µl de [³⁵S] metionina (1000 Ci/mmol a 10 mCi/ml). La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 90 minutos. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de un volumen igual de tampón de carga SDS-PAGE 2x y después las muestras se sometieron a separación SDS-PAGE en gradiente al 10-20%. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con Azul de Coomassie R250, se secó y se expuso a una película de rayos X. La proteína Cox-3a humana traducida *in vitro* era ligeramente más grande que la proteína COS-1 y ambas migraron

hasta un peso molecular estimado de aproximadamente 70 kDa, como se predice por traducción de las secuencias de aminoácidos a partir de las correspondientes secuencias de ácidos nucleicos.

Las proteínas COX-3a y COX-1 humanas traducidas *in vitro* también se analizaron mediante transferencia de Western. En resumen, 2 μ l de proteínas COX-3 y COX-1 humanas traducidas *in vitro* se sometieron a SDS-PAGE en gradiente al 10-20%. Las proteínas en el gel después se transfirieron a nitrocelulosa. La mancha de transferencia se bloqueó con leche en polvo al 5% en TTBS (Tween 20 al 0,5%, Tris-HCl 100 mM y NaCl al 0,9% a pH 7,5) a temperatura ambiente durante 1 hora y después se incubó con una dilución 1:500 de anticuerpo monoclonal anti-COX-1 humana (*Sigma*) a 4°C durante una noche. Al día siguiente, la mancha de transferencia se lavó tres veces con 100 ml de TTBS y se incubó con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pierce) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con 100 ml de TTBS, la mancha de transferencia se visualizó con el reactivo luminiscente ECL-Plus (Amersham-Pharmacia Biotech). El resultado de la transferencia de Western era coherente con el análisis traduccional *in vitro*.

Ejemplo 6

Análisis de Transferencia de Northern de la Expresión de COX-3 Humana

Se usó el análisis de transferencia de Northern para evaluar la distribución tisular de la COX-3 humana. Como sonda se usó un oligonucleótido antisentido hcx1-12, correspondiente a 34-71 pb (dentro del intrón 1) de COS-3. La secuencia de nucleótidos de hcx1-12, SEC ID N°: 14, es 5'-TGGCATTCAAGGCTCCACCAGGAGGCCAA-GAAAATTCC-3'. La sonda oligonucleotídica estaba marcada en el extremo 5' por [γ -³²P] ATP. En resumen, 10 pmol del oligonucleótido hcx1-12 se incubaron a 37°C durante 30 minutos en presencia de 3,5 μ l de [γ -³²P]ATP a 6000 Ci/mmol (*Amersham Pharmacia Biotech*), 1 μ l de 10 unidades/ μ l de T4 polinucleótido quinasa (*Roche Applied Science*) y 2,5 μ l de tampón quinasa 10 X proporcionado por el vendedor en un volumen total de 25 μ l. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 μ l de EDTA 0,5 M. La sonda marcada después se purificó usando una Columna CHROMA SPIN + STE-30 (*Clontech*, CA) de acuerdo con el protocolo del vendedor.

Las transferencias MTN (Northern de múltiples tejidos) humanas se adquirieron de Clontech (Palo Alto, CA). Éstas son transferencia MTN Humana (N° de Catálogo 7760-1), transferencia MTN Humana II (N° de Catálogo 7767-1), transferencia MTN Humana III (N° de Catálogo 7767-1) y transferencia MTN de tumor humano (N° de Catálogo 7792-1). Cada transferencia se prehibridó con 5 ml de Solución ExpressHyb (*Clontech*) a 42°C durante 30 minutos y después se hibridó en presencia de 2 x 10⁶ cpm/ μ l de la sonda oligonucleotídica de COX-3 humana a 42°C durante 2 horas. Las manchas de transferencia se aclararon con SSC 2x/SDS al 0,05% y después se lavaron dos veces con 200 ml de solución SSC 0,1 x/SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, las manchas de transferencia se expusieron a una película de rayos X en un congelador a -80°C hasta 3 días.

El análisis de transferencia de Northern demuestra que el transcrito principal de COS-3 humana es aproximadamente de 4,5 kb. El transcrito de COX-3 de 4,5 kb es más abundante en el estómago humano, seguido por el músculo esquelético, corazón, placenta, hígado, páncreas, bazo, testículos, glándula suprarrenal y riñón. También se expresa a niveles relativamente bajos en el cerebro, pulmón, próstata, intestino delgado, leucocitos, tiroides, médula espinal, ganglio linfático y tráquea. No se observaron transcritos significativos en el timo, ovario, colon o médula ósea. De manera interesante, se descubrió que el nivel del transcrito de COX-3 humana de 4,5 kb aumentaba dramáticamente en todos los tejidos tumorales humanos que se ensayaron, sugiriendo que puede desempeñar una función importante en la carcinogénesis.

Ejemplo 7

Generación de Anticuerpos Policlonales Específicos contra hCox-3

Se seleccionó una secuencia oligopeptídica derivada del extremo amino de COX-3a y Cox-3b humana para inducir anticuerpos policlonales en conejos. Para un mejor acoplamiento, la cisteína interna en el péptido se cambió por serina. La secuencia de aminoácidos para el oligopéptido era la SEC ID N°: 15, Ac-MSRECDPGARWGC-amida.

El péptido se sintetizó y los anticuerpos se indujeron y se purificaron por BioSource International, Inc. Los anticuerpos resultantes se ensayaron por ELISA contra el péptido del antígeno y se purificaron por afinidad con el mismo péptido. El suero y los anticuerpos purificados por afinidad se usaron para inmunoanálisis, incluyendo transferencia de Western, inmunoprecipitación, inmuno-PCR, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.

Ejemplo 8

Análisis de Transferencia de Western de la Expresión de COX-3 Humana

Para analizar la expresión de la proteína COX-3 humana, se generó un anticuerpo policlonal anti-COX-3 humano específico y se purificó por afinidad como se describe en el Ejemplo 7. Se adquirió una transferencia de proteína total de múltiples tejidos humanos realizada previamente de Biochain (CA). En resumen, la transferencia realizada previamente se bloqueó con leche en polvo al 5% en TTBS (Tween 20 al 0,5%/NaCl 100 mM/Tris-HCl 10 mM a pH = 7,4) durante 2 horas a temperatura ambiente y después se incubó con una dilución 1:1000 de anticuerpo anti-COX-3 humana purificado por afinidad en leche en polvo al 5%/TTBS a 4°C durante una noche. Se aplicó una dilución 1:10.000 de IgG secundaria de cabra anti-conejo conjugada con HRP (Pierce) a la transferencia durante 1 hora a TA. Finalmente, las señales se visualizaron sobre una película de rayos X usando el kit ECL-plus (Amersham).

Los resultados demostraron que se identificaron dos proteínas principales inmunorreactivas, de 80 y 55 kDa, respectivamente, en los lisados de proteína total humana. La proteína de 80 kDa, que presumiblemente representa la COX-3a o 3b humana, se expresa en el corazón, cerebro, riñón, hígado, músculo esquelético, estómago e intestino delgado. La proteína de 55 kDa, que es similar a otra variante de corte y empalme de COX-1, PCOX-1a, descrita por Chandrasekharan *et al* (PNAS, 2002, Vol. 99, pp13926), se expresa más ampliamente en los tejidos humanos que se ensayaron. También se identificaron diversas proteínas más pequeñas no caracterizadas.

Ejemplo 9

Expresión Recombinante de COX-3a Humana en Células Sf9 de Insecto

Para realizar estudios estructurales y funcionales, el ADNc de COX-3a humana de longitud completa se subclonó en *pFastBac* (Invitrogen, CA), un vector donante de expresión de baculovirus. El bácmido recombinante se preparó en células *E. coli* DH10Bac después de la transposición de la construcción. El elevado título (1×10^9 ufp/ml) de baculovirus recombinantes se obtuvo después de la transfección con bácmido recombinante y posteriormente se amplificó dos veces. Se observó una banda peptídica distinguida, que migraba a aproximadamente 75 kDa, en los geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie R250, cuya identidad se confirmó posteriormente mediante análisis de Western usando el anticuerpo monoclonal anti-COX-1.

Ejemplo 10

Ensayo de Actividad de la COX

Se prepararon fracciones de proteínas microsomales a partir de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante hCOX-3a. Se incubó proteína de membrana microsomal (20 μ g) con la concentración indicada de ácido araquidónico en un volumen de 150 μ l de tampón que contenía Tris-HCl 0,1 M (pH = 8,0), EDTA 5 mM, fenol 2 mM y hematina 1,5 μ M. Después de incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, la reacción se terminó por la adición de 40 μ l de HCl 1 N con mezcla. Las muestras se neutralizaron con 40 μ l de NaOH 1 N.

La formación del producto PGF_{2 α} se determinó usando un kit de inmunoensayo PGF_{2 α} (Assay Designs, Inc.), como indica el fabricante.

Al igual que la COX-1 y la COX-2, la COX-3a humana era capaz de catalizar la síntesis de PGF_{2 α} a partir del ácido araquidónico de una manera dependiente de la concentración, con valores de K_m y V_{max} de 0,54 μ M y 3,07 pmol/mg/min, respectivamente (Figura 3).

Aunque los diversos aspectos de la invención se han ilustrado anteriormente por referencia a los ejemplos y realizaciones preferidas, deberá apreciarse que el alcance de la invención no se define por la descripción anterior, sino por las siguientes reivindicaciones adecuadamente construidas bajo los principios de la ley de patentes.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima
ciclooxigenasa-3, en la que la enzima comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6, o
su secuencia complementaria.

2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de nucleótidos de la
SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5, o su secuencia complementaria.

3. Una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima
ciclooxigenasa-3, en la que la enzima comprende la secuencias de aminoácidos de la SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 11,
o su secuencia complementaria.

4. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 3, que comprende la secuencia de nucleótidos de la
SEC ID N°: 8 o SEC ID N°: 10, o su secuencia complementaria.

5. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquier reivindicación anterior.

6. Una célula hospedadora recombinante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 5.

7. Un polipéptido sustancialmente purificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad
de secuencia de al menos el 90% con la SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6, donde dicho polipéptido es capaz de convertir
ácido araquidónico en prostaglandina H2.

8. El polipéptido sustancialmente purificado de la reivindicación 7, que comprende la secuencia de aminoácidos
de la SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6.

9. El polipéptido sustancialmente purificado de la reivindicación 7, que comprende la secuencia de aminoácidos
de la SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 11.

10. Un método para expresar una proteína ciclooxigenasa-3 humana en una célula hospedadora recombinante, que
comprende las etapas de:

(a) introducir un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 en una célula; y

(b) cultivar las células en condiciones que permitan la expresión de la proteína ciclooxigenasa-3 humana a
partir del vector de expresión.

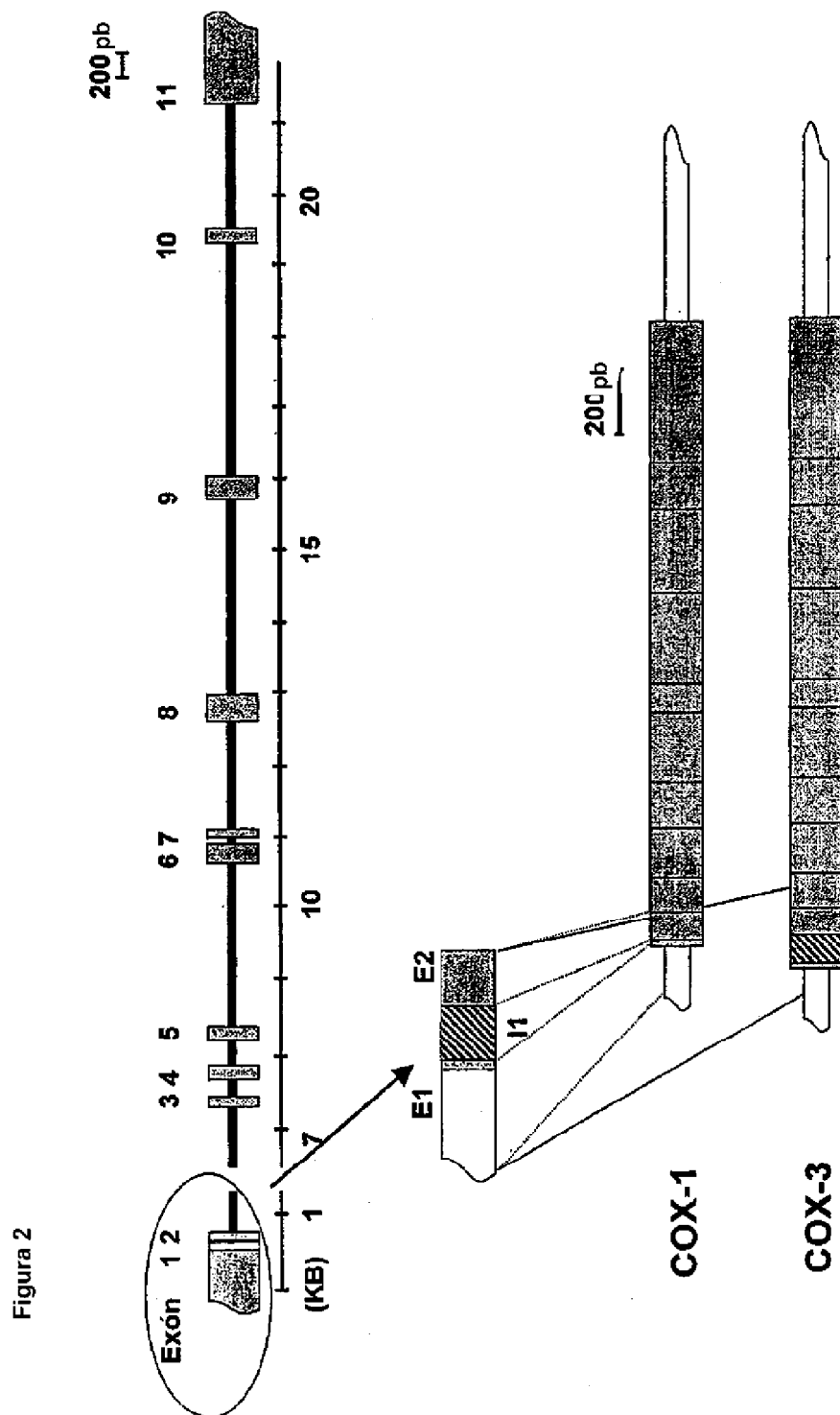
Figura 1 continuación

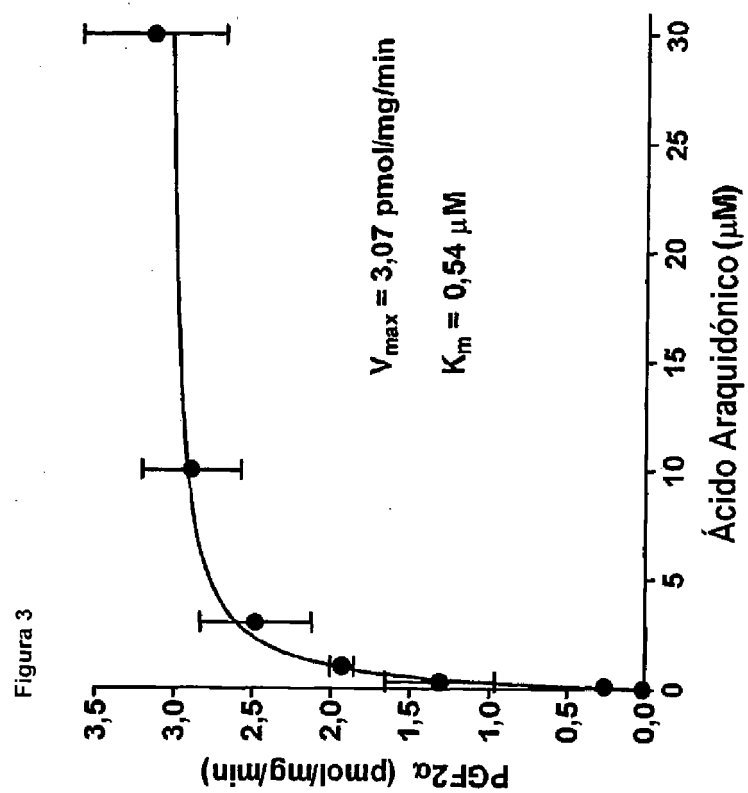
```

61  TTGAATGCCAGGCTCAGCCCTCATCTCTCTCTGCAGGGAGTCTCTTGCTCTGGTTC
    +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    AACTTACGGTCCGAGTCGGGGAGTAGAGAGAGACGTCCTCAGAGACGAGACCAAG
    L N A R L S L S S L S A G
    Exon 2
121 TTGCTGTTCCTGCTCTCCCGCCGCTCCCGTCTGCTCGCGGACCCAGGGGGGCC
    +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    AACGACAAGGACGAGGACGAGGGCGCGAGGGGCGAGGACGAGCGCCCGGGTCCCGGGG
    L L F L L L L P P L P V L L A D P G A P

```

E. Canino 4 EFDPEAPRNPLRLPGEPRMPGPALTSRSAGS 35
| | | | : |
Humano 3a 4 ECDPGA.RWGIFLASWWSLECQLSPSSLSSAG 34
Humano 3b 4 ECDPGA.RWGIFLASGGALNARLSPSSLSSAG 34





ES 2 342 603 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and development

5 <120> CICLOGENASA-3 HUMANA Y USOS DE LA MISMA

<130> PRD-

10 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.2

15 <210> 1

<211> 24

<212> ADN

20 <213> Cebador

<400> 1

atgagccgtg agtgcgaccc cggt

24

25

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

30 <213> Cebador

<400> 2

35 ctacctggcg tgggcgcccc tgggt

25

<210> 3

<211> 93

40 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

45

tgagtgcgac cccggtgccc ggtggggaat tttcttggcc tcctggtgga gccttgaatg

60

ccagctcagc cctcatctc tctcctctgc agg

93

50

<210> 4

<211> 31

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

60

Glu Cys Asp Pro Gly Ala Arg Trp Gly Ile Phe Leu Ala Ser Trp Trp
1 5 10 15

65 Ser Leu Glu Cys Gln Leu Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ser Ala Gly
20 25 30

ES 2 342 603 T3

<210> 5
<211> 93
<212> ADN
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

10 tgagtgcgac cccggtgccc ggtggggaat tttcttggcc tctggtggag ccttgaatgc 60

 caggctcagc ccctcatctc tctcctctgc agg 93
15

<210> 6
<211> 31
20 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6
25

 Glu Cys Asp Pro Gly Ala Arg Trp Gly Ile Phe Leu Ala Ser Gly Gly
 1 5 10 15
30 Ala Leu Asn Ala Arg Leu Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ser Ala Gly
 20 25 30

35 <210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Cebador
40
<400> 7

 tatgaactc ctctgagca ggaa 24
45

<210> 8
<211> 1893
<212> ADN
50 <213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 342 603 T3

<400> 8

5	atgagccgtg agtgcgaccc cggtgcccgg tggggaattt tcttggcctc ctggtggagc	60
	cttgaatgcc agctcagccc ctcatctctc tcctctgcag ggagtctctt gctctgggtc	120
	ttgctgttcc tgctcctgct cccgccgctc cccgtcctgc tcgcggaccc aggggcgccc	180
10	acgccagtga atccctgttg ttactatcca tgccagcacc agggcatctg tgtccgcttc	240
	ggccttgacc gctaccagtq tgactgcacc cgcacgggct attccggccc caactgcacc	300
	atccctggcc tgtggacctg gctccggaat tcactgcggc ccagcccctc tttcacccac	360
15	ttctgtctca ctacggggcg ctggttcttg gagtttgtca atgccacctt catccgagag	420
	atgctcatgc gcctgggtact cacagtgcgc tccaacctta tccccagtc cccacctac	480
	aactcagcac atgactacat cagctgggag tctttctcca acgtgagcta ttacactcgt	540
20	attctgccc ctgtgctaa agattgccc acacrcatgg gaaccaagg gaagaagcag	600
	ttgccagatg cccagctcct ggcccgcgc tcctgtctca ggaggaagtt catacctgac	660
	ccccaaaggc ccaacctcat gtttgccttc ttgacacaac acttcacca ccagttcttc	720
25	aaaacttctg gcaagatggg tcctggcttc accaaggcct tgggccatgg ggtagacctc	780
	ggccacattt atggagacaa tctggagcgt cagtatcaac tgcggctctt taaggatggg	840
	aaactcaagt accaggtgct ggatggagaa atgtaccgc cctcggtaga agaggcgctt	900
30		
	gtgttyatgc actacccccg aggcattccc cccagagcc agatggctgt gggccaggag	960
	gtgtttgggc tgcttctctg gctcatgctg tatgccacgc tctggctacg tgagcacaa	1020
35	cgtgtgtgtg acctgctgaa ggctgagcac cccacctggg gcgatgagca gcttttccag	1080
	acgacccgcc tcatcctcat aggggagacc atcaagattg tcatcgagga gtacgtgcag	1140
	cagctgagtg gctatttctt gcagctgaaa ttgacctcag agctgctgtt cgggtgtccag	1200
40	ttccaatacc gcaaccgcat tgccatggag ttcaaccatc tctaccactg gcacccccctc	1260
	atgcttgaat ccttcaaggt gggctcccag gagtacagct acgagcagtt ctgtttcaac	1320
	acctccatgt tgggtgacta tgggggtgag gccctggtgg atgccttctc tcgccagatt	1380
45	gctggccgga tcggtggggg caggaacatg gaccaccaca tcctgcatgt ggctgtggat	1440
	gtcatcaggg agtctcggga gatgcggctg cagcccttca atgagtaccg caagaggtrt	1500
	ggcatgaaac cctacacctc cttccaggag ctctgtaggag agaaggagat ggcagcagag	1560
50	ttggaggaat tgtatggaga cattgatgcg ttggagttct accctggact gcttcttgaa	1620
	aagtgccatc caaactctat ctttggggag agtatgatag agattggggc tcccttttcc	1680
	ctcaagggtc tcctagggaa tcccatctgt tctccggagt actggaagcc gagcacattt	1740
55	ggcggcgagg tgggctttaa cattgtcaag acggccacac tgaagaagct ggtctgcctc	1800
	aacaccaaga cctgtcccta cgtttcttcc cgtgtgccgg atgccagtcg ggatgatggg	1860
60	cctgtctgtg agcgaccatc cacagagctc tga	1893

<210> 9

<211> 630

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 342 603 T3

<400> 9

	Met Ser Arg Glu Cys Asp Pro Gly Ala Arg Trp Gly Ile Phe Leu Ala	
	1	5 10 15
5	Ser Trp Trp Ser Leu Glu Cys Gln Leu Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ser	
	20 25 30	
10	Ala Gly Ser Leu Leu Leu Trp Phe Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Pro	
	35 40 45	
	Pro Leu Pro Val Leu Leu Ala Asp Pro Gly Ala Pro Thr Pro Val Asn	
	50 55 60	
15	Pro Cys Cys Tyr Tyr Pro Cys Gln His Gln Gly Ile Cys Val Arg Phe	
	65 70 75 80	
20	Gly Leu Asp Arg Tyr Gln Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly Tyr Ser Gly	
	85 90 95	
	Pro Asn Cys Thr Ile Pro Gly Leu Trp Thr Trp Leu Arg Asn Ser Leu	
	100 105 110	
25	Arg Pro Ser Pro Ser Phe Thr His Phe Leu Leu Thr His Gly Arg Trp	
	115 120 125	
	Phe Trp Glu Phe Val Asn Ala Thr Phe Ile Arg Glu Met Leu Met Arg	
	130 135 140	
30	Leu Val Leu Thr Val Arg Ser Asn Leu Ile Pro Ser Pro Pro Thr Tyr	
	145 150 155 160	
	Asn Ser Ala His Asp Tyr Ile Ser Trp Glu Ser Phe Ser Asn Val Ser	
	165 170 175	
35	Tyr Tyr Thr Arg Ile Leu Pro Ser Val Pro Lys Asp Cys Pro Thr Pro	
	180 185 190	
40	Met Gly Thr Lys Gly Lys Lys Gln Leu Pro Asp Ala Gln Leu Leu Ala	
	195 200 205	
	Arg Arg Phe Leu Leu Arg Arg Lys Phe Ile Pro Asp Pro Gln Gly Thr	
	210 215 220	
45	Asn Leu Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr His Gln Phe Phe	
	225 230 235 240	
	Lys Thr Ser Gly Lys Met Gly Pro Gly Phe Thr Lys Ala Leu Gly His	
	245 250 255	
50	Gly Val Asp Leu Gly His Ile Tyr Gly Asp Asn Leu Glu Arg Gln Tyr	
	260 265 270	
55	Gln Leu Arg Leu Phe Lys Asp Gly Lys Leu Lys Tyr Gln Val Leu Asp	
	275 280 285	
	Gly Glu Met Tyr Pro Pro Ser Val Glu Glu Ala Pro Val Leu Met His	
	290 295 300	
60	Tyr Pro Arg Gly Ile Pro Pro Gln Ser Gln Met Ala Val Gly Gln Glu	
	305 310 315 320	
65	Val Phe Gly Leu Leu Pro Gly Leu Met Leu Tyr Ala Thr Leu Trp Leu	
	325 330 335	

ES 2 342 603 T3

Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Leu Leu Lys Ala Glu His Pro Thr
 340 345 350
 5
 Trp Gly Asp Glu Gln Leu Phe Gln Thr Thr Arg Leu Ile Leu Ile Gly
 355 360 365
 10
 Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Glu Glu Tyr Val Gln Gln Leu Ser Gly
 370 375 380
 Tyr Phe Leu Gln Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu Phe Gly Val Gln
 385 390 395 400
 15
 Phe Gln Tyr Arg Asn Arg Ile Ala Met Glu Phe Asn His Leu Tyr His
 405 410 415
 20
 Trp His Pro Leu Met Pro Asp Ser Phe Lys Val Gly Ser Gln Glu Tyr
 420 425 430
 Ser Tyr Glu Gln Phe Leu Phe Asn Thr Ser Met Leu Val Asp Tyr Gly
 435 440 445
 25
 Val Glu Ala Leu Val Asp Ala Phe Ser Arg Gln Ile Ala Gly Arg Ile
 450 455 460
 30
 Gly Gly Gly Arg Asn Met Asp His His Ile Leu His Val Ala Val Asp
 465 470 475 480
 Val Ile Arg Glu Ser Arg Glu Met Arg Leu Gln Pro Phe Asn Glu Tyr
 485 490 495
 35
 Arg Lys Arg Phe Gly Met Lys Pro Tyr Thr Ser Phe Gln Glu Leu Val
 500 505 510
 40
 Gly Glu Lys Glu Met Ala Ala Glu Leu Glu Glu Leu Tyr Gly Asp Ile
 515 520 525
 45
 Asp Ala Leu Glu Phe Tyr Pro Gly Leu Leu Leu Glu Lys Cys His Pro
 530 535 540
 Asn Ser Ile Phe Gly Glu Ser Met Ile Glu Ile Gly Ala Pro Phe Ser
 545 550 555 560
 50
 Leu Lys Gly Leu Leu Gly Asn Pro Ile Cys Ser Pro Glu Tyr Trp Lys
 565 570 575
 55
 Pro Ser Thr Phe Gly Gly Glu Val Gly Phe Asn Ile Val Lys Thr Ala
 580 585 590

60

65

ES 2 342 603 T3

Thr Leu Lys Lys Leu Val Cys Leu Asn Thr Lys Thr Cys Pro Tyr Val
595 600 605

Ser Phe Arg Val Pro Asp Ala Ser Gln Asp Asp Gly Pro Ala Val Glu
610 615 620

Arg Pro Ser Thr Glu Leu
625 630

<210> 10

<211> 1860

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

atgagccgtg agtgcgaccc cgggtgcccg tggggaattt tcttggcctc tggtagagcc 60
ttgaatgccca ggctcagccc ctcatctctc tcctctgcag ggagtctctt gctctgggtc 120
ttgctgttcc tgctcctgct cccgcgcgtc cccgtcctgc tcgcggaccc aggggcgccc 180
acgccagtga atccctgttg ttactatcca tgccagcacc agggcatctg tgtccgcttc 240
ggccttgacc gctaccagtg tgactgcacc cgcacgggct attccggccc caactgcacc 300
atccctggcc tgtggacctg gctccggaat tcactgcggc ccagcccctc ttccaccac 360
ttctgtctca ctacgggcg ctggttctgg gagtttgtca atgccacctt catccgagag 420
atgctcatgc gcctggtact cacagtgcgc tccaacctta tccccagtcc cccacctac 480
aactcagcac atgactacat cagctgggag tctttctcca acgtgagcta ttacactcgt 540
attctgcccc ctgtgcctaa agattgcccc acaccatgg gaaccaaagg gaagaagcag 600
ttgccagatg cccagctcct ggcccgcgcg ttctgtctca ggaggaagtt catactgac 660
ccccaggca ccaacctcat gtttgcttc tttgcacaac acrtcaccca ccagttcttc 720
aaaacttctg gcaagatggg tcctggcttc accaaggcct tgggccatgg ggtagacctc 780
ggccacattt atggagacaa tctggagcgt cagtatcaac tgcggctctt taaggatggg 840
aaactcaagt accaggtagc ggatggagaa atgtaccgc cctcggtaga agaggcgcct 900
gtgttgatgc actacccccg aggcattccc cccagagcc agatggctgt gggccaggag 960
gtgtttgggc tgcttcctgg gctcatgctg tatgccacgc tctggctacg tgagcacaac 1020
cgtgtgtgtg acctgctgaa ggctgagcac cccacctggg gcgatgagca gcttttccag 1080
acgaccgcgc tcactctcat aggggagacc atcaagattg tcatcgagga gtacgtgcag 1140
cagctgagtg gctatttcct gcagctgaaa ttgacccag agctgctgtt cgggtgccag 1200
ttccaatacc gcaaccgcat tgccatggag ttcaaccatc tctaccactg gcaccccctc 1260
atgcctgact ccttcaaggc gggctcccag gagiacagct acgagcagtt cttgttcaac 1320

```

ES 2 342 603 T3

5	acctccatgt	tgggtggacta	tgggggttgag	gccctgggtgg	atgccttctc	tcgccagatt	1380
	gctggccgga	tcggtggggg	caggaacatg	gaccaccaca	tcctgcatgt	ggctgtggat	1440
	gtcatcaggg	agtctcgga	gatgcggctg	cagcccttca	atgagtaccg	caagagggtt	1500
	ggcatgaaac	cctacacctc	cttcaggag	ctcgtaggag	agaaggagat	ggcagcagag	1560
10	ttggaggaat	tgtatggaga	cattgatgcg	ttggagtctc	accctggact	gcttcttgaa	1620
	aagtgccatc	caaactctat	ctttggggag	agtatgatag	agattggggc	tcccttttcc	1680
	ctcaagggtc	tcctagggaa	tcccatctgt	tctccggagt	actggaagcc	gagcacattt	1740
15	ggcggcgagg	tgggctttaa	cattgtcaag	acggccacac	tgaagaagct	ggtctgcctc	1800
	aacaccaaga	cctgtcccta	cgtttccttc	cgtgtgccgg	atgccagtca	ggatgatggg	1860

20 <210> 11
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 11

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

ES 2 342 603 T3

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

ES 2 342 603 T3

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

55 <210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 60 <213> Cebador
 <400> 12

65 caratgagcc ggagtctctt gctctggttc

ES 2 342 603 T3

	<210> 13	
	<211> 33	
	<212> ADN	
5	<213> Cebador	
	<400> 13	
10	gtcgactcag agctctgtgg atggtcgctc cac	33
	<210> 14	
	<211> 38	
15	<212> ADN	
	<213> Cebador	
	<400> 14	
20	tggcattcaa ggctccacca ggaggccaag aaaattcc	38
	<210> 15	
25	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> oligopéptido	
30	<400> 15	
	Met Ser Arg Glu Cys Asp Pro Gly Ala Arg Trp Gly Cys	
35	1 5 10	
40		
45		
50		
55		
60		
65		