



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 338**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/57** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99927888 .0**

86 Fecha de presentación : **04.06.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1084259**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2001**

54

Título: **Corina, una serina proteasa.**

30

Prioridad: **05.06.1998 US 92029**  
**20.05.1999 US 314967**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2008**

73

Titular/es:  
**Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft**  
**Mullerstrasse 178**  
**13353 Berlin, DE**

72

Inventor/es: **Morser, Michael, John;**  
**Wu, Qingyu y**  
**Yan, Wei**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 307 338 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Corina, una serina proteasa.

**5 Antecedentes de la invención**

Las serina proteasas participan en una diversidad de procesos fisiológicos y del desarrollo (Stroud R, Sci. Am. 231: 74-88, 1974; Neurath H, Science 224:350-357, 1984). Por ejemplo, las serina proteasas están implicadas en el señalamiento celular, la diferenciación celular y la conversión de prohormonas a formas biológicamente activas.  
10 Véase, por ejemplo, Hong and Hashimoto. Cell. 82:785-794, 1995; Inagami. J. Biol. Chem., 264: 3043-3046, 1989.

El documento WO 98/03665 describe secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de una calicreína humana nueva y el uso de estas secuencias en el diagnóstico, estudio, prevención y tratamiento de enfermedades. Tomita Y. y col., J. Biochem., 124:784-789, 1998, identificaron una proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad  
15 con una estructura análoga a la proteína de membrana tipo II en el corazón de ratones.

El documento WO 98/36054 describe entre otros un polipéptido, denominado ATC2, un miembro de la familia de serina proteasas que tiene similitud con hepsina, protasina y acrosina.

**20 Descripción de la invención**

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos, polipéptidos y fragmentos de los mismos, de un gen nuevo, por ejemplo, una serina proteasa, especialmente una serina proteasa de mamífero, tal como corina humana y de ratón, que contiene una o más repeticiones ricas en cisteína del receptor barredor, frizzled, LDLR y dominios catalíticos serina proteasa. La invención además se refiere a los procedimientos para usar tales ácidos nucleicos y polipéptidos en  
25 tratamientos, diagnósticos e investigación. Por ejemplo, los ácidos nucleicos y polipéptidos de corina pueden utilizarse en procedimientos para identificar moduladores de su actividad y en modelos animales para simular enfermedades humanas y en el diagnóstico de afecciones patológicas.

**30 Breve descripción de los dibujos**

SEC ID N°: 1 muestra una secuencia de nucleótidos para corina humana.

SEC ID N°: 2 muestra una secuencia deducida de aminoácidos de corina humana.

35 SEC ID N°: 3 muestra una secuencia de nucleótidos para corina de ratón.

SEC ID N°: 4 muestra una secuencia deducida de aminoácidos para corina de ratón.

40 La Fig. 1 es un esquema que ilustra el ordenamiento de dominios funcionales dentro de un polipéptido de corina humana.

La Fig. 2 muestra una alineación de aminoácidos de dominios frizzled ("Corina Crd1" y "Corina Crd2") de un polipéptido de corina humana con Frizzled, Fz-1, y lin-17.

45 La Fig. 3 muestra una alineación de secuencia de aminoácidos de repeticiones de LDLR identificadas dentro de un polipéptido de corina humana con una secuencia de consenso para LDLR humano.

Fig. 4 muestra una alineación de secuencia de aminoácidos de un dominio serina proteasa de corina humana ("Corina") con dominios serina proteasa presentes en otras tres proteínas. KAL es calicreína. ENTK es enterocinasas.  
50 TRPI es tripsina.

**Descripción detallada de la invención**

55 Se han identificado secuencias de ácido nucleico y polipéptidos que codifican corina, un gen nuevo que comprende un péptido transmembranario/señal, dominio frizzled, repeticiones del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), repeticiones ricas en cisteínas del receptor barredor (SRCR), y un dominio catalítico serina proteasa. Véase, por ejemplo, Fig. 1.

60 De acuerdo con la presente invención un polipéptido corina tiene una actividad inmunogénica que es específica para corina; o, una secuencia de aminoácidos que es obtenible de una fuente natural que se presenta en la naturaleza y que tiene una o más de las siguientes actividades o dominios: una actividad catalítica serina proteasa; un dominio de actividad catalítica serina proteasa; una actividad de sustrato de unión a serina proteasa; una actividad catalítica de enzima convertidora de factor natriurético pro-atrial (ANF); un dominio frizzled; un dominio de repetición LDLR; y  
65 repeticiones ricas en cisteína del receptor barredor (SRCR).

Se excluyen los fragmentos de polipéptidos codificados por los siguientes fragmentos de ácido nucleico de la base de datos Unigene [PubEST]: Hs.62794 (AA126468 [1686098], AA126648 [1686206], AA625395 [2537780],

## ES 2 307 338 T3

AA046682 [1524579], AA249850 [1881137] y AA046793 [1524691]), y Hs. 71798 (AA147031 [1716421]). (Los números entre paréntesis se refieren a la base de datos PubEST). Los siguientes fragmentos también pueden excluirse: Hs.121626 (AA771958), Hs.1657 (M69297) y Hs.47712 (AA203291), g1231787; g1312726; g1337948; y g942724.

5 Las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos mencionados anteriormente pueden identificarse buscando en bases de datos públicas disponibles. Sin embargo, los polipéptidos que contienen o comprenden estas secuencias no están excluidas, por ejemplo, corina de longitud total, un polipéptido que tiene dos o más de estos fragmentos mencionados o un polipéptido que tiene uno de los fragmentos mencionados y otras secuencias de aminoácidos, de corina o de otra fuente.

10 Por el término “actividad inmunogénica específica para corina”, se entiende que el polipéptido de corina provoca una respuesta inmunológica que es selectiva para corina. Tal respuesta puede ser celular o humoral. Por consiguiente, la estimulación de anticuerpos, células T, macrófagos, células B, células dendríticas, etc., por una secuencia de aminoácidos de corina seleccionada de un polipéptido de corina de mamífero, por ejemplo, corina humana como se muestra en la SEC ID N°: 2, es una actividad inmunogénica específica. Estas respuestas pueden medirse de manera rutinaria. Véase además, a continuación la discusión sobre anticuerpos específicos para corina.

15 Actividad catalítica serina proteasa significa, por ejemplo, que el polipéptido de corina posee una actividad de escisión de polipéptidos, de preferencia en el enlace peptídico, por ejemplo, donde un residuo serina de corina participa en la escisión del enlace peptídico. Véase, por ejemplo, Stroud. *Sci. Am.*, 231:74-88, 1974; Kraut, *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 331-358, 1977. La secuencia completa del polipéptido de corina que se muestra en la SEC ID N°: 2 o 4, o una parte de ella, puede tener actividad catalítica serina proteasa. La escisión tras la posición de aminoácido 801 de la SEC ID N°: 2 (que separa el enlace peptídico entre arginina y isoleucina) puede aumentar o potenciar tal actividad catalítica, dando lugar a la liberación de un fragmento catalítico que comprende, o está constituido esencialmente por, las posiciones de aminoácidos 802-1042.

20 Un “dominio de actividad catalítica serina proteasa” se refiere a una región de un polipéptido que es capaz de mostrar actividad catalítica serina proteasa, como se describió anteriormente, pero que no necesariamente posee actividad completa, si acaso alguna, en el escenario en que está presente. Por ejemplo, los miembros de la familia tripsina con frecuencia se expresan inicialmente como una proenzima que exhibe actividad completa sólo tras la escisión en un sitio específico dentro del polipéptido. La escisión da lugar a la liberación de un fragmento proteolítico. En general, el “fragmento liberado” se mantiene en el lugar por medio de enlaces disulfuro con la porción restante de la proteína. Véase, la SEC ID N°: 2, por ejemplo, para cisteínas que podrían formar los enlaces disulfuro. Un dominio catalítico serina proteasa se refiere al fragmento proteolítico previo a su liberación de la secuencia completa de corina.

25 Una “actividad catalítica de enzima convertidora del pro factor natriurético atrial (ANF)” significa, por ejemplo, una actividad catalítica en la que pro-ANF se convierte por medio de escisión proteolítica en uno o más péptidos más pequeños. Véase, por ejemplo, Inagami, *J. Biol. Chem.*, 264: 3043-3046, 1989; Rosenzweig and Seidman, *Ann. Rev. Biochem.*, 60:229-255,1991; Wilkins y col., *Lancet*, 349:1307-1310, 1997. ANF (también, conocido como ANP) es una hormona cardíaca que, por ejemplo, regula la homeostasis de los líquidos del cuerpo, la tensión arterial, el volumen plasmático y otros procesos fisiológicos involucrados en la función del corazón y del riñón. Otros sustratos para la actividad convertidora, también pueden incluir homólogos y homólogos de proteínas para ANF, tales como BNP y CNP. Véase, por ejemplo, Wilkins y col., *Lancet* 349:1307-1310, 1997; Levin y col., *New Eng. J. Med.* 339:321-328, 1998. La actividad convertidora puede medirse de forma convencional, por ejemplo, como se describe en los ejemplos en los que la escisión de pro-ANF se ensaya detectando una diferencia en el peso molecular de pro-ANF antes y después del tratamiento con corina, o con un fragmento de corina biológicamente activo. Ya que corina puede expresarse en la superficie celular, pueden usarse las células intactas para procesar sustratos, tales como pro-ANF.

30 La unión del sustrato se considera generalmente la primera etapa en la catálisis enzimática porque el sustrato, que actúa como un ligando, debe en primer lugar unirse a la superficie de la enzima para permitir a la enzima llevar a cabo sus reacciones catalíticas. Esta superficie de la enzima puede denominarse como el sitio activo de la enzima. La unión del sustrato a la superficie de la enzima puede involucrar múltiples interacciones con la enzima, por ejemplo, enlace químico con uno o más aminoácidos y/o grupos funcionales que comprenden la enzima. Una actividad de unión del sustrato a la serina proteasa como se usa en el presente documento significa que un sustrato, por ejemplo, (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl), S2444 (pyroGlu-Gly-Arg-pNA-HCl), y S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.2HCl), respectivamente, o pro-ANF, se une específicamente a una superficie de un polipéptido de corina. La unión a la enzima puede realizarse por medio de una o más de las interacciones que sostienen su sustrato presente en la naturaleza a la misma; sin embargo, un polipéptido puede tener una actividad de unión del sustrato cuando sostiene el sustrato con menos interacciones que las que se presentan en la naturaleza en cantidad y en calidad. Una actividad de unión del sustrato a serina proteasa puede opcionalmente ser eficaz: para obtener catálisis del sustrato, para unirlo de forma competitiva o no competitiva al sitio activo, para unirlo de manera irreversible a la enzima, para dar como resultado la pérdida de actividad catalítica (por ejemplo, donde existe un sustrato suicida), etc.

35 La actividad de unión del sustrato a serina proteasas puede medirse convencionalmente. Por ejemplo, pueden usarse un ensayo de competición de unión para identificar sustratos que se unen a un polipéptido, o derivado del mismo, por ejemplo, combinando bajo condiciones eficaces, un sustrato que contiene un marcador detectable, un polipéptido de corina humana, o fragmentos del mismo, y un compuesto en el que se va a probar la actividad de unión del sustrato.

## ES 2 307 338 T3

El ensayo puede realizarse en fase líquida, donde el sustrato libre y el unido están separados por una membrana, o, puede realizarse en fase sólida, según se desee. Los ensayos en fase sólida pueden realizarse usando procedimientos de alto rendimiento, por ejemplo, sobre chips, obleas, etc. La unión del sustrato y la actividad catalítica pueden disociarse una de la otra. Por consiguiente, un polipéptido de corina puede tener actividad de unión del sustrato pero no tener actividad catalítica.

Un polipéptido de corina también puede comprender un “dominio rico en cisteína análogo a frizzled” (o “dominio frizzled”, como se usa en este documento) que tiene actividad de unión Wnt. Un dominio frizzled puede tener una actividad o región de enlace de ligando, por ejemplo, como la definida y descrita en Zorn, *Current Biolog*, 7: R501-R504, 1997. Por ejemplo, un dominio frizzled puede actuar como un receptor para ligandos que tienen homología con Wnts y otras glicoproteínas secretadas involucradas en la proliferación celular, señalamiento celular, etc. Puede estar unido a membrana o ser soluble. En una forma soluble, también puede actuar como antagonista, por ejemplo, cuando el dominio frizzled libre de corina une el ligando libre y evita su interacción con su receptor relacionado en la superficie celular.

Una repetición de LDLR contiene una secuencia de consenso de LDLR humano como se muestra en la Fig. 7 y puede opcionalmente tener actividad de unión de ligando.

Un polipéptido de corina también puede comprender un dominio de repetición rico en cisteína del receptor barredor (“SRCR”). Véase, por ejemplo, Matsumoto y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9133-9137, 1990.

Una corina de mamífero es un polipéptido de mamífero que tiene una secuencia de aminoácidos que es obtenible a partir de una fuente natural y las actividades mencionadas. Puede tener longitud total (es decir, como se muestra en la SEC ID N°: 2) o puede tener longitud menor a la total y poseer una o más de las actividades mencionadas. Por lo tanto incluye secuencias que se presentan en la naturaleza normales, mutantes, polimórficas, etc. Las fuentes naturales incluyen, por ejemplo, células vivas, por ejemplo, obtenidas de tejidos o de organismos enteros, líneas celulares cultivadas, que incluyen líneas celulares primarias e inmortalizadas, tejidos biopsiados, etc.

La presente invención también describe fragmentos de una corina de mamífero de longitud total, tal como corina humana o de ratón. Los fragmentos son de preferencia “biológicamente activos”. Por “biológicamente activo”, se entiende que el fragmento de polipéptido posee una actividad en un sistema vivo o con componentes de un sistema vivo. Las actividades biológicas incluyen las mencionadas, por ejemplo, una actividad catalítica, una actividad de unión de sustrato, y/o una actividad inmunogénica. Los fragmentos pueden prepararse de acuerdo con cualquier procedimiento deseado, incluidos, síntesis química, ingeniería genética, productos de excisión, etc. Véase, a continuación.

La presente invención también se refiere a una corina humana que tiene una secuencia deducida de aminoácidos 1 hasta 1042 como se muestra en SEC ID N°: 2. El polipéptido de 1042 aminoácidos tiene un peso molecular previsto de aproximadamente 116 kilodaltons. Comprende los siguientes dominios: región hidrófoba en las posiciones de aminoácidos aproximadamente 46-66; dominios ricos en cisteína frizzled en las posiciones de aminoácidos aproximadamente 134-259 y 450-573; siete repeticiones de LDLR en las posiciones de aminoácidos aproximadamente 268-415 y 579-690; una región rica en cisteína en las posiciones de aminoácidos aproximadamente 713-801 homólogas a un motivo de receptor barredor de macrófagos; y un dominio catalítico serina proteasa en las posiciones de aminoácidos aproximadamente 802-1042. Existen diecinueve sitios de N glicosilación putativos presentes en el dominio extracelular que está en las posiciones de aminoácidos aproximadamente 67-1042.

Un polipéptido de corina de la invención, por ejemplo, que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEC ID N°: 2, puede analizarse por medio de procedimientos disponibles para identificar otros dominios estructurales y/o funcionales en el polipéptido. por ejemplo, puede analizarse un polipéptido de corina por medio de los procedimientos descritos en, por ejemplo, Kyte and Doolittle, *J. Mol. Bio.*, 157: 105, 1982; EMBL Protein Predict; Rost and Sander. *Proteins*, 19:55-72, 1994.

Los dominios hidrófobos en aproximadamente los aminoácidos 46-66 de una corina humana pueden servir como una secuencia de anclaje de membrana. Véase, también, hepsina, serina proteasa de mamífero de la familia de la tripsina que contiene un transmembranario cerca de su extremo amino terminal (Kurachi y col., *Methods in Enzymology* 244: 100-114, 1994); Stubble-stubloid, una serina proteasa de *Drosophila melanogaster* que también contiene un dominio transmembranario (Appel y co., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 90:4937-4941, 1993). Hay residuos de aminoácidos cargados positivamente inmediatamente antes del dominio hidrófobo y transmembranario putativo, que indican que la corina puede ser una proteína transmembranaria tipo II con el amino terminal en el citosol.

La corina también contiene al menos dos dominios frizzled ricos en cisteína en las posiciones de aminoácidos aproximadamente 134-259 y 450-573. La Fig. 2 muestra una comparación de los dominios frizzled de corina humana con FZ-1, Iin-17, y Frizzled. El dominio frizzled comprende, por ejemplo, un sitio de unión al ligando. Véase, por ejemplo, Zorn, *Current Biology*, 7: R501-R504, 1997; Leyns y col., *Cell*, 88:747-756, 1997. Como se describe a continuación, un aspecto de la invención es identificar ligandos que se unen a los dominios frizzled de corina, y que opcionalmente regulan la actividad de células que expresan el polipéptido de corina o células que expresan el ligando.

El análisis de la secuencia de proteína corina mostró que en la región extracelular existen dos dominios ricos en cisteína análogos a frizzled, siete repeticiones del receptor LDL, un dominio análogo al receptor de barredor de

macrófagos y un dominio serina proteasa análogo a tripsina (2A). Dos dominios ricos en cisteína análogos a frizzled están localizados en los aminoácidos 134-259 y 450-573, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de estos dos dominios comparten homología significativa con el dominio extracelular rico en cisteína de la proteína Frizzled de *Drosophila*, siete repeticiones del receptor transmembranario esencial para la determinación de la polaridad durante el desarrollo de la mosca de la fruta (Vinson y col., *Nature*, 338: 263-264, 1989). También se han encontrado los dominios ricos en cisteína análogos a frizzled en otras proteínas, tales como Dfz2 en *Drosophila* (Bhanot y col., *Nature*, 382: 225-230, 1996), Lin-17 en *C. elegans* (Sawa y col., *Genes Dev.*, 10: 2189-2197, 1996) y FZ-1 en seres humanos (Chan y col., *J. Biol. Chem.*, 267: 25202-25207, 1992).

Las secuencias de dos dominios ricos en cisteína análogos a frizzled en corina son más cercanas a las de Lin-17 y FZ-1. Los diez residuos cisteína conservados están presentes en los dominios ricos en cisteína análogos a frizzled de corina. Entre los aminoácidos 268-415 y 579-690, existen siete repeticiones ricas en cisteína homólogas a las repeticiones de clase A del receptor de LDL (Brown y col., *Nature*, 388: 629-630, 1997). Cada repetición tiene una longitud de aproximadamente 36 aminoácidos y contiene seis residuos cisteína así como un grupo altamente conservado de aminoácidos cargados negativamente. En el receptor LDL, estas repeticiones ricas en cisteína unen iones de calcio y desempeñan una función esencial en la endocitosis de los ligandos extracelulares (*Ibid*). Se han encontrado motivos similares en el dominio extracelular de otros receptores de membrana, tales como la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP 1) (Krieger and Herz, *Annu. Rev. Biochem.* 63: 601-6037, 1994), megalina (también conocida como LRP2 o gp330) (Kounnas y col., *J. Biol. Chem.*, 268: 14176-14181, 1993), proteínas del complemento (Catterall y col., *Biochem. J.* 242: 849-856, 1987), enterocinasa (Kitamoto y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, 91: 7588-7592, 1994), y proteínas yokless y nudel de *Drosophila* (Schombaum y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, 92: 1485-1489, 1995; Hong and Hashimoto, *Cell*, 82: 785-794, 1995).

Además de los dominios ricos en cisteína análogos a frizzled y las repeticiones análogas al receptor LDL, existe otra región rica en cisteína entre los aminoácidos 713 y 801 en corina. Esta región contiene 88 aminoácidos y es homóloga al motivo rico en cisteína hallado en el receptor barreador de macrófagos (Matsumoto y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, 87: 9133-9137, 1990). Este motivo también está presente en el receptor de speract de espermatozoides del erizo de mar (Thorpe and Garbers, *J. Biol. Chem.* 264: 6545-6549, 1989; Dangott y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, 86: 2128-2132, 1989) y la serina proteasa de vertebrados, enterocinasa (Kitamoto y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, 91: 7588-7592, 1994).

En el carboxilo terminal de la proteína corina entre los residuos de aminoácido 802 y 1042, se encuentra un dominio serina proteasa análogo a tripsina. Este dominio de proteasa es altamente homólogo al dominio catalítico de miembros de la superfamilia de la tripsina. Por ejemplo, la similitud de secuencia de aminoácidos entre corina y precalicreína (Chung y col., *Biochemistry*, 25: 2410-2417, 1986), factor XI (Fujikawa y col., *Biochemistry*, 25: 2417-2424, 1986) y hepsina (Leytus y col., *Biochemistry*, 27: 1067-1064, 1988) es de 40%, 40% y 38%, respectivamente. En la corina están bien conservadas todas las características esenciales de las secuencias de serina proteasa. Los residuos del sitio activo de la triada catalítica están localizados en His843, Asp892 y Ser985. Los residuos de aminoácidos que forman el bolsillo de especificidad de sustrato están localizados en Asp979, Gly1007 y Gly1018. Se prevé que estos residuos unan los residuos P1 del sustrato, lo que sugiere que la corina escindiría su sustrato tras residuos básicos, tales como lisina o arginina. Además, se ha encontrado un sitio de escisión de activación putativa en Arg801, que sugiere que la corina se sintetizaría como un zimógeno inactivo y que sería necesaria otra enzima análoga a tripsina para su activación.

En el dominio de proteasa, existen 12 residuos cisteína. El apareamiento potencial de estos residuos cisteína puede predecirse comparando con otras serina proteasas bien estudiadas, tales como tripsina y quimotripsina. Los primeros tres pares de residuos cisteína presentes esencialmente en todos los miembros de la superfamilia de la tripsina están localizados en Cys828-Cys844, Cys955-Cys970 y Cys981-Cys1010. En las posiciones Cys790-Cys912 y Cys926-Cys991 están presentes dos pares más de residuos cisteína. Estos dos pares de residuos cisteína se encuentran comúnmente en una subfamilia de serina proteasas de dos cadenas, tales como quimotripsina y precalicreína (Chung y col., *Biochemistry*, 25: 2410-2417, 1986). La presencia de Cys790 y Cys912 indicó que, tras la escisión de activación en Arg801, el dominio catalítico de corina podría permanecer unido al resto de la molécula por un enlace disulfuro. Es interesante notar que hay un par adicional de residuos cisteína, Cys817 y Cys830, presente en la corina. Los residuos cisteína en estas dos posiciones no se encontraron en ninguna otra serina proteasa en vertebrados. Una búsqueda en bases de datos mostró que una serina proteasa análoga al quimotripsinógeno del gusano, *Arenicola marina*, tenía dos residuos cisteína en las posiciones correspondientes (Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132, 1982). Se construyó un modelo de dominio proteasa de corina en la estructura del quimotripsinógeno A bovino. En base a este modelo de corina, en el que los átomos de C $\alpha$  de estos dos residuos cisteína se mantenían fijados durante la minimización de energía, la distancia entre los átomos de azufre y sus cadenas laterales es de aproximadamente 2,5 Å tras la búsqueda de rotámeros. El modelo indica que estas dos cisteínas tienen probabilidad de formar un enlace disulfuro para conectar dos láminas b en el núcleo del dominio proteasa.

Además de la secuencia de corina humana, se ha clonado e identificado una corina de otra especie de mamífero, el ratón. En las SEC ID N $^{\circ}$ : 3 y 4 se muestra la secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos de corina de ratón. Existen 1113 aminoácidos en la corina de ratón y comprende los mismos dominios que la corina humano. Hay una similitud de secuencia de aminoácidos del 89% entre la corina de ratón y la humano.

Pueden obtenerse otros homólogos de corina de mamíferos y de fuentes diferentes a los mamíferos por medio de procedimientos diversos. Por ejemplo, puede usarse la hibridación con un oligonucleótido selectivo para una corina

## ES 2 307 338 T3

de mamífero para seleccionar tales homólogos, por ejemplo, como se describe en Sambrook y col., Molecular Cloning, 1989, Capítulo 11. Tales homólogos pueden tener cantidades variables de similitud y homología de secuencia de nucleótidos y aminoácidos con corina. Los organismos no mamíferos incluyen, por ejemplo, vertebrados, invertebrados, pez cebra, pollo, *Drosophila*, *C. elegans*, *Xenopus*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, nematodos, procariontes, plantas, Arabidopsis, virus, etc.

La invención también describe secuencias de aminoácidos específicas de corina, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos definida que se encuentra en la secuencia humana particular de SEC ID N°: 2 pero no en otras secuencias de aminoácidos de polipéptidos diferentes de corina. Una secuencia de aminoácidos específica puede encontrarse rutinariamente, por ejemplo, al buscar en una base de datos de gen/proteína usando la serie de programas informáticos BLAST. Una secuencia de aminoácidos específica de corina puede ser útil para producir péptidos como antígenos para generar una respuesta inmune específica para el mismo. Los anticuerpos obtenidos por medio de tal inmunización pueden usarse como una sonda específica para una proteína corina de mamífero para fines de diagnóstico o investigación.

Como se ha mencionado, los polipéptidos de la presente invención comprenden una secuencia codificadora humana completa para una corina. Los fragmentos útiles incluye, por ejemplo, fragmentos que comprenden, o están constituidos esencialmente, por el dominio frizzled, uno o más dominios LDLR, repeticiones SRCR del dominio transmembranario, el dominio catalítico de serina o un fragmento. Un fragmento de corina humana de preferencia comprende la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 2, con la condición de que el fragmento no sea un polipéptido codificado por Hs.62794 (AA126468[1686098], AA126648 [1686206], AA625395 [2537780], AA046682 [1524579], AA249850[1881137] y AA046793 [1524691]), y Hs. 71798 (AA147031 [1716421]). Véase, a continuación.

Puede seleccionarse un fragmento de un polipéptido de corina para que tenga una actividad biológica específica, por ejemplo, una actividad serina proteasa, una actividad de enzima convertidora de pro-ANF, una actividad de unión al sustrato, una actividad inmunogénica, etc. Puede identificarse un fragmento útil rutinariamente probando tales fragmentos para una actividad deseada. La medición de estas actividades se describe a continuación en los ejemplos. Estos péptidos pueden también identificarse y prepararse como se describe en el documento EP 496 162.

Un polipéptido de la presente invención puede también tener similitud de secuencia de aminoácidos del 100% o menos con la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID N°: 2. Para los objetos de la siguiente discusión: Similitud de secuencia significa que el mismo nucleótido o aminoácido que se encuentra en la secuencia establecida en SEC ID N°: 1-2 se encuentra en la posición correspondiente de la(s) secuencia(s) comparada(s). Un polipéptido que tiene menos del 100% de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID N°: 2 puede contener diversas sustituciones de la secuencia que se presenta naturalmente, incluidas sustituciones de aminoácidos homólogos y no homólogos. Véase a continuación para ejemplos de sustitución de aminoácidos homólogos. La suma de residuos idénticos y homólogos dividida por el número total de residuos en la secuencia sobre la que se compara el polipéptido de corina es igual al porcentaje de similitud de secuencia. Para el objeto de calcular la identidad y similitud de secuencias, las secuencias comparadas pueden alinearse y calcularse según cualquier procedimiento deseado, algoritmo, programa informático, etc., incluidos, por ejemplo, FASTA, BLASTA. Un polipéptido que tiene menos del 100% de similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 70%, etc. Una cantidad de similitud de secuencia de aminoácidos de preferencia es de aproximadamente 85% o más, por ejemplo, aproximadamente 86%.

Un polipéptido, fragmento o polipéptido sustituido de corina de mamífero puede también comprender diversas modificaciones, donde tales modificaciones incluyen modificación de lípidos, metilación, fosforilación, glicosilación, modificaciones covalentes (por ejemplo, de un grupo R de un aminoácido), sustitución de aminoácidos, delección de aminoácidos o adición de aminoácidos. Las modificaciones al polipéptido pueden llevarse a cabo según diversos procedimientos, incluidos recombinantes, sintéticos, químicos, etc.

Los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, corina humana o corina de ratón, fragmentos de los mismos, mutaciones de los mismos) pueden usarse en diversas formas, por ejemplo, en ensayos, como inmunógenos para anticuerpos como se describió anteriormente, como agentes biológicamente activos (por ejemplo, con una o más de las actividades asociadas con corina).

Un polipéptido que codifica una corina, un derivado de la misma, o un fragmento de la misma, puede combinarse con uno o más dominios estructurales, dominios funcionales, dominios detectables, dominios antigénicos y/o un polipéptido deseado de interés, en una disposición que no se presenta en la naturaleza, es decir que no se presenta naturalmente, por ejemplo, como en un gen de corina humana o murina, un fragmento genómico preparado a partir del genoma de un organismo vivo, por ejemplo, un animal, de preferencia un mamífero, tal como un ser humano, ratón, o líneas celulares de los mismos. Un polipéptido que comprende tales características es un polipéptido quimérico o de fusión. Tal polipéptido quimérico puede prepararse de acuerdo con diversos procedimientos, incluidos procedimientos químicos, sintéticos, cuasi sintéticos y/o recombinantes. Un ácido nucleico quimérico que codifica un polipéptido quimérico puede contener los diversos dominios o polipéptidos deseados en un marco de lectura abierto continuo (por ejemplo, con múltiples dominios N-terminal para estabilizar o potenciar la actividad) o interrumpido, que contiene, por ejemplo, intrones, sitios de empalme, promotores, etc. El ácido nucleico quimérico puede producirse según diversos procedimientos. Véase, por ejemplo, la Patente de EEUU N° 5.439.819. Un dominio o polipéptido deseado puede tener cualquier propiedad deseada, incluida una función biológica tal como una fusión catalítica, de se-

ñalamiento, promotora del crecimiento, de marcación celular (por ejemplo, secuencia señal, secuencia de marcado, tal como para endosomas, lisosomas, RE, núcleo), etc., una función estructural tal como hidrófoba, hidrófila, que atraviesa la membrana, etc., funciones de receptor-ligando, y/o funciones detectables, por ejemplo, combinado con enzimas, polipéptidos fluorescentes, proteína fluorescente verde, (Chalfie y col., 1994, Science, 263:802; Cheng y col., 1996, Nature Biotechnology, 14:606; Levy y col., 1996, Nature Biotechnology, 14:610, etc. Además, un polipéptido o parte del mismo, puede usarse como un marcador seleccionable cuando se introduce en una célula huésped, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención puede fusionarse en el marco con una secuencia codificadora deseada para actuar como un marcador para purificación, selección o fines de marcación. La región de fusión puede codificar un sitio de escisión para facilitar la expresión, el aislamiento, la purificación, etc.

Puede producirse un polipéptido según la presente invención en un sistema de expresión, por ejemplo, *in vivo*, *in vitro*, libre de células, recombinante, de fusión celular, etc. según la presente invención. Las modificaciones al polipéptido impartidas por tales sistemas incluyen glicosilación, sustitución de aminoácidos (por ejemplo, por uso de codones diferentes), procesamiento del polipéptido tal como digestión, escisión, actividad endopeptidasa o exopeptidasa, unión de restos químicos, incluidos lípidos y fosfatos, etc.

Puede recuperarse un polipéptido según la presente invención de fuentes naturales, células huésped transformadas (medios de cultivo o células) según los procedimientos usuales, incluidos extracción con detergentes (por ejemplo, Triton-X-100 CHAPS, octilglucósido), precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácidos, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía con hidroxiapatita y cromatografía con lectina. Pueden usarse etapas de replegamiento proteico, según necesidad, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, puede usarse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación. También puede aislarse un polipéptido de corina como se describió para otras serina proteasas, por ejemplo, Wu y col., J. Biol. Chem., 267: 24408-24412, 1992; Wu y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 6775-6779, 1991.

Un ácido nucleico de corina de mamífero, o un fragmento del mismo, es un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos obtenible de una fuente natural. Véase, a continuación. Incluye por consiguientes alelos que se presentan en la naturaleza, normales, mutantes, polimorfos, secuencias degeneradas, etc. Las fuentes naturales incluyen, por ejemplo, células vivas obtenidas a partir de tejidos y organismos completos, líneas celulares cultivadas, incluidas líneas celulares primarias e inmortalizadas. De preferencia, se excluyen los siguientes fragmentos de ácido nucleico de la base de datos Unigene [PubEST]: Hs. 62794 (AA126468 [1686098], AA126648 [1686206], AA625395 [2537780], AA046682 [1524579], AA249850 [1881137], y AA046793 [1524691]), y Hs. 71798 (AA147031 [1716421]). (Los números entre paréntesis se refieren a la base de datos PubEST). De manera óptima, pueden también excluirse los siguientes fragmentos: Hs. 121626 (AA771958), Hs.1657 (M69297), y Hs.47712 (AA203291), g1231787; g1312726; g1337948; y g942724. Las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos anteriores pueden identificarse buscando en las bases de datos públicas disponibles. Sin embargo, los ácidos nucleicos que contienen o comprenden estas secuencias no están excluidos, por ejemplo, corina de longitud total, o un ácido nucleico con dos o más de estos fragmentos mencionados. Resulta también de preferencia que se excluyan los fragmentos anteriores en un vector de clonación, tal como un plásmido o un fago.

La corina humana se expresa como un ARNm de aproximadamente 5 kb. Es más abundante en el corazón. Está prácticamente ausente, o se expresa en niveles muy bajos en el cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, ovarios, intestino delgado, colon, vejiga, útero y estómago. Por consiguiente, la corina puede usarse como un marcador para la presencia de tejido cardíaco, por ejemplo, en secciones de tejidos (usando anticuerpos específicos de corina o sondas de ácidos nucleicos específicas de corina), en muestras de biopsias, etc. También se detectó corina en diversas líneas celulares humanas, incluidos tumores de útero, osteosarcoma, líneas del carcinoma de endotelio HEC-1-A, AN3 CA, y RL95-2, leiomioma SK-LM1 y osteosarcoma U2-OS. En los siguientes ejemplos se describen más detalles.

En SEC ID N°: 1 se muestra una secuencia del ácido nucleico del alelo de corina humana que tiene 4933 pares de bases. El tamaño del ADN es coherente con la longitud del ARNm de corina (-5 kb) detectada por medio de análisis Northern. En la posición 95 se encuentra un codón ATG que puede representar el sitio de iniciación de la traducción. El marco de lectura abierto (ORF) se extiende 3126 pb con una región 5' no traducida (UTR) de 94 nucleótidos antes del codón de iniciación. En el extremo 3', hay una 3' UTR de 1,7 kb después del codón de terminación en la posición 3221. 12 nucleótidos antes de la cola de poli (A)\* está presente una señal de poliadenilación de AATAAA. Un ácido nucleico de la invención puede contener la secuencia codificadora completa desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido 1042, secuencias degeneradas de la misma y fragmentos de la misma. Un ácido nucleico según la presente invención puede también comprender una secuencia de nucleótidos 100% complementaria, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos antisentido con respecto a cualquiera de las mencionadas anteriormente y a las que se presentan a continuación.

La presente invención también describe una secuencia de nucleótidos de ratón que codifica toda o una parte de una corina, por ejemplo, como se muestra en SEC ID N°: 3. Como es el caso para el alelo humano, la invención se refiere a secuencias degeneradas de la misma, y fragmentos antisentido de la misma. El análisis Northern muestra un transcrito prominente en aproximadamente 5 kb en muestras derivadas del corazón. En contraste con el análisis Northern con muestras humanas, se detectaron bajos niveles de ARNm en muestras obtenidas de testículos y riñones de ratones.

## ES 2 307 338 T3

La hibridación *in situ* con ARNm de corina de ratón también se detectó en tejido embrionario cardiaco, miocitos de auriculares y ventriculares, riñones en desarrollo y estructuras derivadas del cartílago. En los ejemplos se describen más detalles.

5 Puede obtenerse un ácido nucleico según la presente invención de una diversidad de fuentes diferentes. Puede obtenerse a partir de ADN o ARN, tal como ARNm poliadenilado, por ejemplo, aislado de tejidos, células o de un organismo completo. El ácido nucleico puede obtenerse directamente a partir de ADN o ARN, o a partir de una biblioteca de ADNc. El ácido nucleico puede obtenerse de una célula en una etapa particular del desarrollo, con el genotipo, fenotipo deseados (por ejemplo, una célula o tejido de corazón embrionario o adulto), etc.

10 Como se describió para anteriormente los polipéptidos de corina, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido según la presente invención puede incluir sólo la secuencia codificadora; una secuencia codificadora y otra secuencia codificadora (por ejemplo, secuencias que codifican péptidos líderes, secretoras, marcadores, enzimáticos, fluorescentes u otros péptidos de diagnóstico), secuencias codificadoras y no  
15 codificadoras, por ejemplo, secuencias no traducidas en el extremo 5' ó 3', o dispersas en la secuencia codificadora, por ejemplo, intrones. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica sin interrupción un polipéptido significa que la secuencia de nucleótidos contiene una secuencia que codifica aminoácidos para una corina, sin interrupción o intervención de nucleótidos no codificadores en la secuencia codificadora, por ejemplo, intrón o intrones ausentes. Tal secuencia de nucleótidos puede también describirse como contigua. Un ADN genómico  
20 que codifica una corina de un mamífero, ratón o ser humano, etc., puede obtenerse de manera rutinaria.

Un ácido nucleico según la presente invención también puede comprender una secuencia de control de expresión unida de manera operativa a un ácido nucleico como se describió anteriormente. La frase "secuencia de control de expresión" significa una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de un polipéptido codificado por un ácido  
25 nucleico al que está unido de manera operativa. La expresión puede regularse a nivel del ARNm o del polipéptido. Por consiguiente, la secuencia de control de expresión incluye elementos relacionados con el ARNm y elementos relacionados con la proteína. Tales elementos incluyen promotores, potenciadores (virales o celulares), secuencias de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, etc. Una secuencia de control de expresión está unida de manera operativa a una secuencia codificante de nucleótidos cuando la secuencia de control de expresión está localizada de  
30 tal manera que provoca o consigue la expresión de la secuencia codificadora. Por ejemplo, cuando un promotor está unido de manera operativa en posición 5' a una secuencia codificadora, la expresión de la secuencia codificadora es dirigida por el promotor. Las secuencias de control de expresión pueden ser heterólogas o endógenas al gen normal.

Puede seleccionarse un ácido nucleico según la presente invención en base a la hibridación del ácido nucleico. La  
35 capacidad de dos preparaciones de ácidos nucleicos de hebra única para hibridar juntos es una medida de la complementariedad de sus secuencias de nucleótidos, por ejemplo, el apareamiento de bases entre nucleótidos, tales como A-T, G-C, etc. La invención se refiere por consiguiente también a ácidos nucleicos que hibridan con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como la establecida en SEC ID N: 1. Una secuencia de nucleótidos que hibrida con la última secuencia tendrá una hebra de ácido nucleico complementaria, o actuará como molde para una en  
40 presencia de una polimerasa (es decir, una enzima sintetizadora de ácidos nucleicos adecuada). La presente invención incluye ambas hebras del ácido nucleico, por ejemplo, una hebra con sentido y una hebra antisentido.

Pueden elegirse las condiciones de hibridación para seleccionar ácidos nucleicos que tengan una cantidad deseada de complementariedad de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos establecida en SEC ID N: 1. Un ácido nucleico  
45 capaz de hibridar con tal secuencia, de preferencia, tiene, por ejemplo, aproximadamente 85%, de más preferencia, 90%, 92%, y de más preferencia aún, 95%, 97% o 100% de complementariedad, entre las secuencias. La presente invención se refiere en particular a secuencias de ácidos nucleicos que hibridan con la secuencia de nucleótidos establecida en SEC ID N: 1 bajo condiciones de rigurosidad baja o alta.

50 Los ácidos nucleicos que hibridan con las secuencias de corina pueden seleccionarse de diversas maneras. Por ejemplo, pueden incubarse transferencias (es decir, matrices que contienen ácidos nucleicos) en una solución de pre-hibridación (6X 100 µg SCC, SDS al 0,5%, ADN desnaturalizado de esperma de salmón 100 µg/ml, 5X solución de Denhardt y formamida al 50%) a 30EC durante la noche y a continuación hibridar con sondas radiomarcadas (corina) en una solución de hibridación (6X SSC, SDS al 0,5%, ADN desnaturalizado de esperma de salmón 100 µg/ml y  
55 formamida al 50%), a 42EC durante la noche según los procedimientos conocidos. Las transferencias pueden lavarse en condiciones muy rigurosas que permitan, por ejemplo, un emparejamiento erróneo inferior al 5% bp (por ejemplo, lavar dos veces SSC al 0,1% y SDS al 0,1% durante 30 minutos a 65EC), es decir una similitud de secuencia del 95% o mayor. Mientras que el lavado muy riguroso puede permitir un emparejamiento erróneo inferior al 5%, las condiciones con baja rigurosidad (por ejemplo, lavar dos veces en SSC al 0,2% y SDS al 0,5% durante 30 minutos a  
60 37EC) pueden dar lugar a un emparejamiento erróneo de hasta el 20%. Otro ejemplo no limitante de condiciones de baja rigurosidad incluye un lavado final a 42EC en un tampón que contiene NaCl 30 mM y SDS al 0,5%. Otro ejemplo no limitante de condiciones de alta rigurosidad incluye un lavado final a 65 EC en tampón acuoso que contiene NaCl 30 mM en SDS al 0,5%. El lavado y la hibridación pueden también realizarse como se describe en Sambrook y col., Molecular Cloning, 1989, Capítulo 9. La hibridación puede también basarse en un cálculo de la temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) del híbrido formado entre la sonda y su diana, como se describe en Sambrook y col. Tales condiciones rigurosas  
65 pueden seleccionar secuencias que tienen, por ejemplo, al menos 95%, de preferencia 97%, de complementariedad de nucleótidos entre los ácidos nucleicos, a condición de que tal ácido nucleico no sea: Hs. 62794 (AA126468 [1686098], AA126648 [1686206], AA625395 [2537780], AA046682 [1524579], AA249850 [1881137] y AA046793 [1524691]),

y Hs.71798 (AA147031 [1716421]). Véase, también anteriormente y a continuación. No se excluyen los ácidos nucleicos que contienen o comprenden estas secuencias, por ejemplo, corina de longitud total, o un ácido nucleico que tenga dos o más de estos fragmentos mencionados.

5 Según la presente invención, un ácido nucleico o polipéptido puede comprender una o más diferencias en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos establecida en SEC ID N°: 2. Los cambios o modificaciones a las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos pueden realizarse por medio de cualquier procedimiento disponible, incluidos la mutagénesis dirigida o aleatoria.

10 Un ácido nucleico que codifica una corina humana o de ratón según la invención puede comprender nucleótidos que se presentan en el gen de corina que se presenta en la naturaleza, por ejemplo, polimorfismos que se presentan naturalmente, alelos normales o mutantes (nucleótido o aminoácido), mutaciones que se descubren en una población natural de mamíferos, tales como seres humanos, monos, cerdos, ratones, ratas o conejos. Por el término que se presentan naturalmente, se entiende que el ácido nucleico es obtenible de fuentes naturales, por ejemplo, tejidos  
15 y células de animales, líquidos corporales, células de cultivos tisulares, muestras forenses. Las mutaciones que se presentan naturalmente pueden incluir deleciones (por ejemplo, extremos amino o carboxi terminales truncados), sustituciones, o adiciones de secuencias de nucleótidos. Estos genes pueden detectarse y aislarse por hibridación de ácidos nucleicos según los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de corina humana de la invención puede contener codones que se encuentran en el gen que  
20 se presenta naturalmente, transcritos, o ADNc, por ejemplo, como se establece en SEC ID N°: 1, o puede contener codones degenerados que codifican las mismas secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, puede resultar deseable cambiar los codones en la secuencia para optimizar la secuencia para la expresión en un huésped deseado.

La presente invención también se refiere a muteínas de polipéptidos de corina, es decir, cualquier polipéptido que  
25 tenga una secuencia de aminoácidos que difiera en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos obtenible de una fuente natural (un fragmento de una corina de mamífero no difiere en secuencia de aminoácidos de la corina que se presenta en la naturaleza). Por consiguiente, las muteínas de corina comprenden sustituciones, inserciones y deleciones de aminoácidos, incluidos los aminoácidos que no se presentan en la naturaleza. Véase, por ejemplo, Wu y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 7775-6779, 1991, que informa especialmente sustituciones de  
30 aminoácidos en las que se sustituye un aminoácido básico con ácido glutámico, como guía para realizar mutaciones.

Las muteínas para una secuencia de aminoácidos de corina de la invención pueden también prepararse en base a búsqueda de homologías de bancos de datos de genes, por ejemplo, Genbank, EMBL. La búsqueda de homología de  
35 secuencias puede realizarse usando diversos procedimientos, incluidos algoritmos descritos en la familia de programas informáticos BLAST, el algoritmo de Smith-Waterman, etc.

Puede introducirse una o varias muteínas en una secuencia identificando y alineando aminoácidos dentro de un dominio que sean idénticos y/u homólogos entre los polipéptidos y a continuación modificando un aminoácido en  
40 base a tal alineamiento. Por ejemplo, en las Figuras 2-4 se ilustran las comparaciones de secuencias entre corina humana y los dominios Frizzled, LDLR y de serina proteasa de otras proteínas. Estos alineamientos revelan posiciones de aminoácidos que son idénticas y también posiciones de aminoácidos donde los residuos difieren uno de otro pero son homólogos. Los aminoácidos homólogos pueden definirse basándose en el tamaño de la cadena lateral y el grado de polarización, incluidos, no polares pequeños: cisteína, prolina, alanina, treonina; polares pequeños: serina, glicina, aspartato, asparragina; polares grandes: glutamato, glutamina, lisina, arginina; de polaridad intermedia: tirosina,  
45 histidina, triptófano; no polares grandes: fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina, valina.

Los ácidos homólogos pueden también agruparse de la siguiente manera: grupos R polares no cargados, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina, glutamina; aminoácidos ácidos (cargados negativamente), ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos básicos (cargados positivamente), lisina, arginina, histidina. Los aminoácidos  
50 homólogos también incluyen los descritos por Dayhoff en el Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978), y por Argos en EMBO J., 8, 779-785 (1989).

Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen secuencias de aminoácidos en las que un residuo en la secuencia de corina humana o de ratón está reemplazado por un residuo homólogo de un dominio correspondiente.  
55

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos de corina de SEC ID N°: 2, en la que dicho ácido nucleico codifica un polipéptido y una o más posiciones de aminoácidos están sustituidas, delecionadas, o ambos, y el polipéptido codificado por el ácido nucleico tiene una actividad de dominio catalítico serina proteasa o una actividad inmunogénica específica para corina. Tal ácido nucleico puede contener una o más  
60 posiciones sustituidas de aminoácidos que están sustituidas por aminoácidos homólogos.

Además, los alineamientos de secuencias como ilustran las Figuras 2-4 también proporcionan información sobre sustituciones de aminoácidos que se espera podrían reducir, disminuir o eliminar la actividad biológica. Por ejemplo, donde el alineamiento revela aminoácidos idénticos conservados entre dos o más dominios (por ejemplo, reemplazando los residuos H, D o S conservados indicados en la Fig. 4), la eliminación o sustitución del (los) aminoácido(s) podría afectar su actividad biológica. Las mutaciones en la tríada catalítica, a saber, His910, Asp959 y Ser1052 (corina de ratón), suprimen la actividad catalítica de serina proteasas.  
65

Una mutéina del polipéptido de corina, y su correspondiente secuencia de nucleótidos codificadora, pueden tener una secuencia de aminoácidos como se establece en SEC ID N°: 1, excepto donde una o más posiciones están sustituidas por aminoácidos homólogos, por ejemplo, donde hay 1, 5, 10, 15 ó 20 sustituciones. La invención también se refiere a polipéptidos de mutéinas y ácidos nucleicos de mutéinas que codifican tales polipéptidos.

Un ácido nucleico según la presente invención puede comprender, por ejemplo, ADN, ARN, ácido nucleico sintético, ácido nucleico peptídico, nucleótidos modificados, o mezclas. Un ADN puede ser de hebra doble o simple. Los nucleótidos que comprenden un ácido nucleico pueden estar unidos por medio de diversos enlaces conocidos, por ejemplo, éster, sulfamato, sulfamida, fosforotioato, fosforoamidato, metilfosfonato, carbamato, etc., dependiendo del objeto deseado, por ejemplo, resistencia a nucleasas, tales como ARNasa H, mejor estabilidad in vivo, etc. Véase, por ejemplo, la Patente de EEUU N° 5.378.825.

Pueden realizarse diversas modificaciones a los ácidos nucleicos, tales como unir marcadores detectables (avidina, biotina, elementos radioactivos), restos que mejoran la hibridación, detección o estabilidad. Los ácidos nucleicos pueden también unirse a soportes sólidos, por ejemplo, nitrocelulosa, microesferas magnéticas o paramagnéticas (por ejemplo, como se describe en la Patente de EEUU N° 5.411.863; Patente de EEUU N° 5.543.289; por ejemplo, que comprenden microesferas ferromagnéticas, supermagnéticas, paramagnéticas, superparamagnéticas, óxido de hierro y polisacáridos), nylon, agarosa, celulosa diazotada, microesferas sólidas de látex, poliacrilamidas, etc., según un procedimiento deseado. Véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.470.967; 5.476.925; 5.478.893.

Otro aspecto se refiere a sondas de oligonucleótidos y de ácidos nucleicos. Tales sondas de oligonucleótidos o de ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, para detectar, cuantificar o aislar un ácido nucleico de corina de mamífero en una muestra de prueba. Los ácidos nucleicos pueden usarse como sondas de oligonucleótidos, por ejemplo, en PCR, en RACE, expresión diferencial, en combinaciones con bibliotecas de ADNc, bibliotecas de expresión, etc. En los ejemplos a continuación se describen oligonucleótidos útiles. La detección puede ser deseable para una diversidad de objetos diferentes, incluidos investigación, diagnóstico y forense. Para objeto de diagnóstico, puede resultar deseable identificar la presencia o cantidad de una determinada secuencia de ácido nucleico en una muestra obtenida de tejido, células, líquidos corporales, etc. La presente invención describe un procedimiento para detectar un ácido nucleico que comprende, poner un ácido nucleico diana en una muestra de prueba en contacto con un oligonucleótido bajo condiciones eficaces para alcanzar la hibridación entre la diana y el oligonucleótido; y detectar la hibridación. También puede usarse un oligonucleótido según se describe en la invención en la amplificación sintética de ácidos nucleicos tal como PCR (por ejemplo, Saiki y col., 1988. Science 241: 53; Patente de EEUU N° 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis y col., eds., Academic Press, Nueva York, 1990) o expresión diferencial (Véase, por ejemplo, Liang y col., Nucl. Acid. Res., 21: 3269-3275, 1993; Patente de EEUU N° 5.599.672; Documento WO97/18454) o RACE. Tal detección puede realizarse en combinación con oligonucleótidos para otros genes, por ejemplo, genes involucrados en el desarrollo o en la función del tejido cardíaco o del hueso.

Otro aspecto de la invención es una secuencia de nucleótidos que es única de corina humana. Por secuencia única para una corina, se entiende un orden definido de nucleótidos que se presenta en la corina, por ejemplo, en la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1, pero rara vez o con muy poca frecuencia en otros ácidos nucleicos, especialmente no se presenta en un ácido nucleico de animal, de preferencia mamífero, tal como ser humano, rata, ratón, etc. Están incluidas ambas secuencias de nucleótidos, sentido y antisentido. Un ácido nucleico único según la presente invención puede determinarse de manera rutinaria. Un ácido nucleico que comprende tal secuencia única puede usarse como una sonda de hibridación para identificar la presencia de, por ejemplo, corina humana o de ratón, en una muestra que comprende una mezcla de ácidos nucleicos, por ejemplo, en una transferencia Northern. La hibridación puede realizarse bajo condiciones rigurosas (véase, anteriormente) para seleccionar ácidos nucleicos que tengan al menos 95% de similitud (es decir, complementariedad) con la sonda, pero pueden usarse también condiciones menos rigurosas. Una secuencia de nucleótidos única de corina puede también fusionarse en el marco, ya sea en el extremo 5' o en el extremo 3', a diversas secuencias de nucleótidos como se ha mencionado en la patente, incluidas secuencias de otras partes de corina, enzimas, GFP, etc., secuencias de control de expresión, etc.

La hibridación puede llevarse a cabo bajo diferentes condiciones, según la selectividad deseada, por ejemplo, como se describe en Sambrook y col., Molecular Cloning, 1989. Por ejemplo, para detectar específicamente corina humana o de ratón, puede hibridarse un oligonucleótido a un ácido nucleico diana bajo condiciones en las que el oligonucleótido sólo hibrida con él, por ejemplo, donde el oligonucleótido es 100% complementario con la diana. Pueden usarse diferentes condiciones si se desea seleccionar ácidos nucleicos que tienen menos del 100% de complementariedad de nucleótidos, al menos aproximadamente, por ejemplo, 99%, 97%, 95%, 90%, 70%, 67%.

Se describen oligonucleótidos que pueden comprender cualquier secuencia de nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 1. Estos oligonucleótidos (ácido nucleico) según la presente invención pueden ser de cualquier tamaño deseado, por ejemplo, aproximadamente 10-200 nucleótidos, 12-100, de preferencia 12-50, 12-25, 14-16, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, etc. Los oligonucleótidos pueden tener nucleótidos que no se presentan en la naturaleza, por ejemplo, inosina. Los oligonucleótidos pueden tener 100% de similitud o complementariedad con una secuencia de SEC ID N°: 1, o pueden tener errores de apareamiento o sustituciones de nucleótidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones. De acuerdo con la presente invención, el oligonucleótido puede comprender un kit, donde el kit incluye un tampón deseado (por ejemplo, fosfato, tris, etc.), composiciones de detección, etc. El oligonucleótido puede estar marcado o no marcado, con marcadores radioactivos o no radioactivos según se conoce en la técnica.

También puede prepararse ácido nucleico complementario a partir de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, de preferencia un complementario a la secuencia codificadora de SEC ID N°: 1. El ácido nucleico complementario puede usarse de diversas maneras, tales como para regular o modular la expresión de corina, por ejemplo, para inhibirla, para detectar su expresión, o para la hibridación *in situ*. Estos oligonucleótidos pueden usarse de manera análoga a la Patente de EEUU N° 5.576.208. Para el objeto de regular o modular la expresión de corina, puede unirse un oligonucleótido complementario de manera operativa a una secuencia de control de expresión.

El ácido nucleico según la presente invención puede marcarse de acuerdo con cualquier procedimiento deseado. El ácido nucleico puede marcarse usando trazadores radioactivos tales como <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H ó <sup>14</sup>C, para mencionar algunos trazadores comúnmente usados. La marcación radioactiva puede llevarse a cabo según cualquier procedimiento conocido tal como, por ejemplo, marcación terminal en el extremo 3' ó 5' usando un nucleótido radiomarcado, polinucleótido cinasa (con o sin desfosforilación con una fosfatasa) o una ligasa (según el extremo a marcar). Puede usarse también una marcación no radioactiva, combinando un ácido nucleico de la presente invención con residuos que tengan propiedades inmunológicas (antígenos, haptenos), una afinidad específica por ciertos reagentes (ligandos), propiedades que permiten que tengan lugar reacciones enzimáticas detectables (enzimas o coenzimas, sustratos de enzimas, u otras sustancias implicadas en una reacción enzimática), o propiedades físicas características, tales como fluorescencia o emisión o absorción de luz a una longitud de onda deseada, etc.

Un ácido nucleico según la presente invención puede usarse para detectar la expresión de corina en órganos completos, tejidos, células, etc., por medio de diversas técnicas, incluidas la transferencia Northern, PCR, RACE, hibridación *in situ*, etc. Tales ácidos nucleicos pueden ser particularmente útiles para detectar la expresión alterada, por ejemplo, alteraciones específicas celulares y/o subcelulares, de corina. Los niveles de corina pueden determinarse solos o en combinación con otros productos genéticos, especialmente productos de genes cardiacos específicos.

Un ácido nucleico según la presente invención puede expresarse en una diversidad de sistemas diferentes, *in vitro* e *in vivo*, según el objeto deseado. Por ejemplo, puede insertarse un ácido nucleico en un vector de expresión, introducirse en un huésped deseado, y cultivarse bajo condiciones eficaces para alcanzar la expresión de un polipéptido codificado por el ácido nucleico. Las condiciones eficaces incluyen cualquier condición de cultivo adecuada para conseguir la producción del polipéptido por medio de la célula huésped, incluidas temperaturas, pH, medios eficaces, aditivos para los medios en los que se cultiva la célula huésped (por ejemplo, aditivos que amplifican o inducen la expresión tales como butirato, o metotrexato si el ácido nucleico codificante está adyacente a un gen dhfr), cicloheximida, densidades celulares, placas de cultivo, etc. Puede introducirse un ácido nucleico en la célula por medio de cualquier procedimiento eficaz incluidos, por ejemplo, ADN desnudo, precipitación con fosfato de calcio, electroporación, inyección, transfección mediada por DEAE-Dextran, fusión con liposomas, asociación con agentes que potencian su captación por las células, transfección viral. Una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico de la presente invención es una célula huésped transformada. El ácido nucleico puede ser extracromosómico o estar integrado en uno o varios cromosomas de la célula huésped. Puede ser estable o transitorio. Un vector de expresión se selecciona por su compatibilidad con la célula huésped. Las células huésped incluyen, células de mamíferos, por ejemplo, COS-7, CV1, BHK, CHO, HeLa, LTK, NIH 3T3, levaduras, células de insectos, tales como Sf9 (*S. frugipeda*) y *Drosophila*, bacterias, tales como *E. coli*, *Streptococcus*, bacillus, levaduras, células de hongos, células de plantas, células madre embrionarias (por ejemplo, de mamíferos, tales como ratón o ser humano), células óseas (tales como, osteoclastos o condrocitos), células cardiacas (por ejemplo, de un cultivo primario), células musculares, células neuronales, etc. Las secuencias de control de expresión se seleccionan de manera similar por su compatibilidad con el huésped y el objeto deseado, por ejemplo, gran número de copias, grandes cantidades, inducción, amplificación, expresión controlada. Otras secuencias que pueden usarse incluyen promotores tales como promotores de SV40, CMV, RSV, promotores inducibles, elementos específicos de tipos celulares, o secuencias que permiten la expresión selectiva o específica de células. Los promotores que pueden usarse para dirigir su expresión incluyen, por ejemplo, el promotor endógeno, MMTV, SV40; promotores trp, lac, tac o T7 para huéspedes bacterianos; o factor alfa, alcohol oxidasa, o promotores PGH para levaduras.

Puede introducirse otro gen de interés en el mismo huésped para el objeto de, por ejemplo, modular la función de corina. Tales genes pueden ser el gen normal, o una variación, por ejemplo, una mutación, quimera, polimorfismo, etc.

Puede usarse un ácido nucleico o un polipéptido de la presente invención como marcador de tamaño en la electroforesis de proteínas o ácidos nucleicos, cromatografía, etc. Los fragmentos de restricción definidos pueden determinarse por barrido de la secuencia en búsqueda de sitios de restricción, calculando el tamaño y llevando a cabo la digestión de restricción correspondiente. Puede usarse un ADNc de corina como se muestra en SEC ID N°: 1 como marcador de peso molecular 4,8 kb en la electroforesis de ácidos nucleicos.

El ADNc de corina humana según se muestra en la SEC ID N°: 1 se localiza en la posición cromosómica 4p12-13 en el ser humano. Puede usarse por consiguiente como un marcador en el mapeo de parentesco. Por ejemplo, esta región cromosómica parece segregarse con el retorno venoso pulmonar total anómalo (TAPVR) y por consiguiente podría usarse para mapear la enfermedad en combinación con otros marcadores genéticos. Véase, por ejemplo, Bleyl y col., Am. J. Hum. Genet., 56: 408-415, 1995.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la regulación de las rutas biológicas en las que está involucrado un gen de corina, o un producto del gen de corina, particularmente afecciones patológicas y del desarrollo, y para el diagnóstico de tales afecciones al detectar ya sea el polipéptido o el ácido nucleico de corina. Por ejemplo, el FNA está

involucrado en una diversidad de procesos fisiológicos relacionados con los sistemas cardiovascular y renal, incluidos, por ejemplo, la homeostasis de los líquidos corporales, la tensión arterial, vasodilatación, natriuresis, inhibición de la absorción de sodio en el conducto glomerular, aumento de la filtración glomerular, inhibición de la producción y secreción de aldosterona, mitogénesis, etc. La regulación de la actividad convertidora del pro-FNA de corina puede por consiguiente tener efectos profundos en la fisiología de un organismo. Por ejemplo, los niveles ventriculares de FNA son normalmente bajos en los miocitos ventriculares pero aumentan dramáticamente con las enfermedades cardiovasculares. En pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, los niveles plasmáticos de FNA son elevados. Las altas concentraciones se correlacionan con la gravedad de la disfunción ventricular. De manera similar, las concentraciones elevadas de FNA se asocian con arritmias cardíacas y compromiso hemodinámico. Véase, por ejemplo, Levin y col., *New Engl. J. Med.*, 339: 321-328, 1998. Los niveles anormalmente elevados pueden reducirse inhibiendo la actividad de corina, por ejemplo, transcripcionalmente al inhibir la expresión genética o al administrar inhibidores enzimáticos, que actúen directamente en la actividad catalítica.

Como la corina se expresa extensamente en las células derivadas del cartílago y en células cardíacas, puede estar involucrada en enfermedades asociadas con estos tejidos, tales como la cardiomiopatía hipertrófica familiar, la osteopetrosis, y el síndrome de osteoporosis-pseudoglioma, osteoporosis, enfermedad de Paget, osteítis deformante, y el retorno venoso pulmonar total anómalo. Como se ha mencionado, los oligonucleótidos de corina pueden utilizarse en el mapeo de parentesco para estudiar la herencia familiar de estas enfermedades, en analogía al TAPVR, y para objeto diagnóstico (por ejemplo, prenatal) si la corina está asociada (ligado al gen o causante) con tal enfermedad. La corina puede también estar involucrada en el desarrollo cardíaco, en rutas del desarrollo que implican señalamiento con proteínas Wnt y otros factores de crecimiento, diferenciación celular (por ejemplo, diferenciación de condrocitos), y procesos relacionados. Además, la corina puede estar involucrada en las señales célula-célula, en la diferenciación (ósea y/o cardíaca) y otras rutas del desarrollo. Esta función puede estar mediada por actividad catalítica de serina proteasa, dominios frizzled, y/o dominios LDRL. La corina puede también estar involucrada en el procesamiento (por ejemplo, por escisión catalítica de un factor procrecimiento) de factores de crecimiento, tales como BMP o TGF- $\beta$ .

A lo largo de este documento la invención puede usarse para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y renales, tales como la hipertensión, la enfermedad cardíaca congestiva o la insuficiencia renal (así como afecciones patológicas relacionadas con cualquier otra ruta en al que participa la corina), que comprende la administración, a un huésped que necesita del mismo, de una cantidad eficaz de un agente que modula la actividad de una corina de mamífero. Por el término "modula" se entiende: aumentar, extinguir, promover, estabilizar, disminuir, reducir, antagonizar, bloquear, inhibir, etc. La naturaleza del efecto modulador deseado puede determinarse de manera rutinaria, por ejemplo, si el efecto patológico se produce por cantidades elevadas o disminuidas del FNA. La actividad puede inhibirse por medio de la administración de un agente que bloquee directamente la actividad catalítica de corina (por ejemplo, un inhibidor enzimático, tal como leupeptina o fluorofosfato de diisopropilo) o por un agente, tal como un complementario, que bloquee la transcripción o traducción del gen correspondiente. La actividad de corina puede aumentarse, por ejemplo, por medio de la administración de un gen de corina eficaz en la producción del polipéptido de corina. El gen de corina puede administrarse de manera análoga a otras terapias genéticas. Véase, por ejemplo, Magovern y col., *Hum. Gen. Ther.*, 8: 215-227, 1997; Springer y col., *Mol. Cell.*, 2: 549-558, 1998.

La presente invención también se refiere a procedimientos para modular la actividad de corina *in vitro*, ya sea por modulación directa de su actividad, o por medio de la modulación de la expresión del gen que la codifica. La actividad enzimática puede medirse de manera convencional, por ejemplo, como se describe en Wu y col., *J. Biol. Chem.*, 267: 24408-24412, 1992; Wu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 6775-6779, 1991. La conversión de la actividad puede medirse como se describe en los ejemplo, o, por ejemplo, como describe Inagami, *J. Biol. Chem.*, 264: 3043-3046, 1989. La invención se refiere por consiguiente a un procedimiento para identificar moduladores de la actividad mencionada anteriormente de un polipéptido de corina, un fragmento o muteína del mismo, que comprende: hacer reaccionar, en presencia de un compuesto de prueba, un polipéptido de corina y un sustrato para serina proteasa o la enzima convertidora, bajo condiciones eficaces para que dicho polipéptido escinda dicho sustrato; detectar dicha escisión; e identificar si el compuesto de prueba modula dicha actividad serina proteasa al comparar la cantidad de escisión en presencia y en ausencia del compuesto de prueba.

Cualquier sustrato es adecuado, y, puede utilizarse cualquier medio de detección, tal como uno cromogénico, fluorogénico, radioactivo, electroforético, etc. Por ejemplo, pueden detectarse los productos de escisión usando sustratos marcados en combinación con electroforesis en gel. En un ejemplo de preferencia, el sustrato es un sustrato cromogénico, es decir, un péptido que reacciona con la serina proteasa y que está diseñado para tener una selectividad similar a la del sustrato natural de la enzima. Unido a la parte peptídica del sustrato cromogénico hay un grupo químico que cuando se libera tras la escisión enzimática da lugar a un color detectable. El cambio de color puede seguirse por medio de espectrofotometría y es proporcional a la actividad proteolítica del dominio catalítico de serina proteasa. Estos sustratos pueden sintetizarse de manera rutinaria. La hidrólisis del sustrato (por ejemplo, que contiene 4-nitroanilina, pNA, como cromóforo) puede medirse a temperatura ambiente siguiendo la absorbancia a 405 nm. Los sustratos que pueden usarse para medir la actividad amidolítica de serina proteasas incluyen, S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl), S2444 (pyroGlu-Gly-Arg-pNA.HCl), y S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.2HCl), respectivamente. Otros cromóforos que pueden incorporarse en el sustrato incluyen, por ejemplo, ANBA, ADMP, derivados de tioléster, etc. Véase, por ejemplo, los catálogos de Chromogenix y sus páginas web para más información. Los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  pueden calcularse por medio de la ecuación de Michaelis-Menton.

## ES 2 307 338 T3

La invención también se refiere a un procedimiento para identificar compuestos que se unen específicamente a un polipéptido de corina, que comprende: poner un polipéptido de corina en contacto con un compuesto de prueba bajo condiciones eficaces para que dicho compuesto se una específicamente a dicho polipéptido de corina; y detectar la unión a dicho polipéptido de corina. Los ensayos de unión pueden realizarse de manera convencional. El polipéptido de corina comprende la secuencia codificadora completa.

El componente corina puede añadirse a la mezcla de reacción en una diversidad de formas, por ejemplo, sustancialmente purificado, como un componente de una célula, como un extracto soluble, o como un lisado. En cada caso, el polipéptido de corina puede obtenerse de una fuente natural, una fuente recombinante (es decir, un polipéptido “recombinante” es uno producido por ingeniería genética, por ejemplo, introducido en una línea celular en un plásmido, vector, ADN desnudo, etc., y expresado en la célula), o puede producirse sintéticamente (producido químicamente o enzimáticamente). El polipéptido de corina puede expresarse en una célula de mamífero, una línea celular de insecto, o en bacterias, por ejemplo, como una proteína de fusión o no fusión.

De preferencia, la corina se expresa en una línea celular transformada con una secuencia codificadora de corina (por ejemplo, un ADNc, un gen, un fragmento genómico, etc.). En el último caso, la corina está presente como un componente heterólogo de la célula; por heterólogo, se entiende que la corina está codificada por una secuencia codificadora que se ha introducido en la célula por la mano de una persona, por ejemplo, por transfección, transformación, etc. De preferencia, la corina se expresa en niveles altos en la célula (bacteriana, levadura, insecto, mamífero, etc.). Una corina humana es una secuencia codificadora de preferencia. Véase, por ejemplo, SEC ID N°: 1 y 2.

En un aspecto de preferencia de la invención, la corina se proporciona como un lisado celular, por ejemplo, se lisan células transformadas con corina humana y el lisado resultante se usa directamente en el ensayo, es decir, un lisado bruto. El lisado bruto que comprende la corina recombinante humana puede opcionalmente refinarse o enriquecerse para corina humana. Por ejemplo, pueden aislarse fracciones de membrana de manera convencional.

La corina puede también modularse en etapas más tempranas en su ruta de expresión, por ejemplo, al modular su transcripción, estabilidad del ARNm, traducción, modificaciones post traduccionales, procesamiento (tal como escisión en el sitio interno de escisión), etc. La expresión puede regularse usando diferentes agentes, por ejemplo, un ácido nucleico complementario, una ribozima, un aptámero, un compuesto sintético, o un compuesto que se presenta en la naturaleza.

Los compuestos identificados de esta u otras maneras pueden ser útiles para modular la actividad de la corina en una célula, un tejido, un organismo completo, *in situ*, *in vitro* (tubo de ensayos, un soporte sólido, etc.), *in vivo*, o en cualquier ambiente deseado. En general, un compuesto que tiene tal actividad *in vitro* será útil *in vivo* para modular una ruta biológica asociada con corina, por ejemplo, para tratar una afección patológica asociada con las actividades biológicas y celulares mencionadas anteriormente, incluidas enfermedades óseas y cardíacas y trastornos del desarrollo de los mismos, maduración de factor de crecimiento y proteínas por medio de actividad serina proteasa, etc.

Para tratar una enfermedad, el compuesto, o mezcla, puede formularse en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y otros excipientes evidentes para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Eighteenth Edition, Mack Publishing Company, 1990. Tal composición puede contener adicionalmente cantidades eficaces de otros compuestos.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para modular, de preferencia inhibir, la expresión de un gen que codifica una corina de mamífero, que comprende: poner una célula que expresa una corina de mamífero de la presente invención, tal como una corina humana, en contacto con una cantidad de agente, tal como un oligonucleótido antisentido o un ARN antisentido de un gen de corina humana, que sea eficaz para inhibir específicamente la secuencia de dicho gen. La inhibición de la expresión de un gen de corina puede inhibir la maduración del FNA, y tener el consiguiente impacto en las rutas en las que está involucrado el FNA, incluidas las mencionadas anteriormente.

La inhibición específica de secuencia de un gen puede llevarse a cabo de manera convencional usando un ácido nucleico antisentido, tal como oligonucleótidos o ARN antisentido. Por ejemplo, pueden diseñarse oligonucleótidos antisentido, tales como fosfodiéster o fosforotioato desoxi oligonucleótidos para regiones específicas de un ARN de corina, tales como el sitio de iniciación de la traducción, y pueden administrarse a las células que expresan tales genes en cantidades eficaces para inhibir su expresión. En general, un ácido nucleico antisentido es complementario con la hebra codificadora con sentido de un gen dado, y como resultado también son complementarios y hacen posible de esta manera hibridar específicamente con transcritos de ARNm del gen.

Para mejorar la estabilidad, puede modificarse el ácido nucleico modificado, por ejemplo, para hacerlo más resistente a las enzimas celulares, a la oxidación, reducción, nucleasas, etc. o para mejorar su captación en las células. Puede usarse cualquier modificación adecuada, incluidas, por ejemplo, fosforotioatos, metilfosfonatos, fosfodiéster oligonucleótidos unidos a un agente que intercala acridina y/o una cola hidrófoba, derivados de psoraleno, modificaciones de 2'-ribosa, derivados de azúcares pentosa, derivados de bases nitrogenadas, etc. Véase, por ejemplo la Patente de EEUU N° 5.576.208 y la Patente de EEUU N° 5.744.362. Véase, a continuación, para otros derivados, modificaciones, etc. que pueden ser útiles en la invención. En general, un ácido nucleico antisentido de la presente invención puede comprender monómeros de nucleótidos que se presentan en la naturaleza, nucleótidos que no se presentan en la naturaleza, y combinaciones de los mismos para mejorar la captación celular y/o la estabilidad.

El ácido nucleico antisentido puede administrarse como ácido nucleico desnudo, complejo o encapsulado con y por otros agentes que facilitan su captación en la célula, inyectado en las células, o cualquier medio de administración adecuado en asociación con vectores, tales como vectores virales y adenovectores. La terapia génica antisentido puede llevarse a cabo por medio de cualquier procedimiento adecuado. Véase, por ejemplo, Phillips, Am. J. Cardiol, 82: 605-625, 1998; Haller y col., Kidney Int., 53: 1550-1558, 1998.

La presente invención se refiere también a anticuerpos que reconocen específicamente la corina de longitud completa. Un anticuerpo específico para corina significa que el anticuerpo reconoce una secuencia definida de aminoácidos dentro de o que incluyen una corina, por ejemplo, la secuencia humana de SEC ID N°: 2. Por consiguiente, un anticuerpo específico se unirá generalmente con mayor afinidad a una secuencia de aminoácidos, es decir, un epítipo, que se encuentra en SEC ID N°: 2 que a uno o varios diferentes epítipos, por ejemplo, como se detectan y/o miden por un ensayo de inmunotransferencia u otro inmunoensayo convencional. Por consiguiente, un anticuerpo que es específico para un epítipo de corina humana es útil para detectar la presencia de un epítipo en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido que contiene el producto del gen de corina humana, distinguiéndolo de otras muestras en las que el epítipo está ausente. Tales anticuerpos son útiles como se describe en Santa Cruz Biotechnology, Inc. Research Product Catalog, y por consiguiente puede formularse, por ejemplo, 100 µg/ml.

Los anticuerpos, por ejemplo, policlonales, monoclonales, recombinantes, quiméricos, humanizados, pueden prepararse según cualquier procedimiento deseado. Véase también, bibliotecas de selección de inmunoglobulinas recombinantes (Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 3833-3837, 1989; Huse y col., Science, 256: 1275-1281, 1989); estimulación *in vitro* de poblaciones de linfocitos; Winter and Milstein, Nature, 349: 293-299, 1991. Por ejemplo, para la producción de anticuerpos monoclonales, puede administrarse un polipéptido según la Fig. 2 ó Fig. 3 a ratones, cabras o conejos por vía subcutánea y/o intraperitoneal, con o sin adyuvante, en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmune. Los anticuerpos pueden también ser de cadena única o fragmentos Fab. Los anticuerpos pueden ser IgG, subtipos, IgG2a, IgG1, etc. Los anticuerpos y las respuestas inmunes pueden también generarse por la administración de ADN desnudo. Véase, por ejemplo las Patentes de EEUU N° 5.703.055; 5.589.466; 5.580.859.

La corina, o fragmentos de la misma, para uso en la inducción de anticuerpos no necesitan tener actividad biológica; sin embargo, deben tener actividad inmunogénica. Los péptidos para uso en la inducción de anticuerpos específicos para corina pueden tener una secuencia de aminoácidos constituida por al menos cinco aminoácidos, de preferencia al menos 10 aminoácidos. Las extensiones cortas de aminoácidos de corina, por ejemplo, de cinco aminoácidos, pueden fusionarse con las de otra proteína tal como la hemocianina de lapa, u otro vehículo útil, y la molécula quimérica usada para la producción de anticuerpos.

Pueden usarse varios enfoques diferentes, como se mencionó, para preparar anticuerpos específicos para corina. Por ejemplo, en un enfoque, se obtiene corina desnaturalizada a partir de corina purificada (por ejemplo, purificada por separación por HPLC en fase inversa) en cantidades de hasta 75 mg. La proteína desnaturalizada puede usarse para inmunizar ratones o conejos usando protocolos convencionales; aproximadamente 100 microgramos resultan adecuados para la inmunización de un ratón, mientras que debe usarse hasta 1 mg para inmunizar a un conejo. Para identificar hibridomas de ratón, la proteína desnaturalizada puede radioyodinarse y usarse para seleccionar potenciales hibridomas murinos de células B para aquellos que producen anticuerpos. Este procedimiento necesita sólo pequeñas cantidades de proteína, tal que 20 mg podrían ser suficientes para marcar y seleccionar varios miles de clones.

En otro enfoque, se analiza una secuencia de aminoácidos de corina, deducida del ADNc, para determinar regiones de alta inmunogenicidad. Los polipéptidos que comprenden estas regiones se sintetizan y usan en protocolos de inmunización adecuados para elevar los niveles de anticuerpos. Los análisis para seleccionar epítipos adecuados están descritos por Ausubel FM y col. (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol 2. John Wiley & Sons). Las secuencias de aminoácidos óptimas para la inmunización están usualmente en los extremos C-terminal, N-terminal y aquellos que intervienen, regiones hidrófilas de los polipéptidos que tienen probabilidad de estar expuestos al ambiente externo cuando la proteína está en su conformación natural. Típicamente, los péptidos seleccionados, con una longitud de aproximadamente 15 residuos, se sintetizan usando un Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems Modelo 431A usando química fmoc y acoplado a hemocianina de lapa (KLF, Sigma) por reacción con éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS; cf. Ausubel FM y col., *supra*). Si es necesario, puede introducirse una cisteína en el extremo N-terminal del péptido para permitir el acoplamiento a la KLH. Los conejos se inmunizan con un complejo péptido-KLH en adyuvante completo de Freund. Los antiseros resultantes se prueban para analizar la actividad antipéptido por medio de unión del péptido a plástico, bloqueo con SAB al 1%, y reacción con el antisuero, lavado y reacción con IgG de cabra anti-conejo específica, marcada (radioactiva o fluorescente), purificada por afinidad.

También pueden generarse anticuerpos contra cualquier región deseada, o subregión de la misma, por ejemplo, aproximadamente, o que comprenda, los aminoácidos 46-66; 134-259; 450-573; 268-415; 579-690; 713-801; 802-1402.

También pueden prepararse y seleccionarse hibridomas usando técnicas convencionales. Los hibridomas de interés se detectan por selección con corina marcada para identificar aquellas fusiones que producen el anticuerpo monoclonal con la especificidad deseada. En un protocolo típico, se recubren pocillos de placas (FAST, Becton Dickinson, Palo Alto, California) con anticuerpos específicos de conejo anti-ratón (o Ig anti-especie adecuada), purificados por afinidad, en una concentración de 10 mg/ml. Los pocillos recubiertos se bloquean con SAB al 1%, se lavan y exponen

## ES 2 307 338 T3

a sobrenadantes de hibridomas. Tras la incubación se exponen los pocillos a corina marcada, 1 mg/ml. Los clones que producen anticuerpos unirán una cantidad de corina marcada que es detectable por encima del fondo. Tales clones se expanden y se someten a 2 ciclos de clonación en dilución limitada (1 célula/3 pocillos). Los hibridomas clonados se inyectan en ratones prístinos para producir ascitis, y los anticuerpos monoclonales se purifican del líquido ascítico del ratón por cromatografía de afinidad sobre Proteína A. Por medio de procedimientos convencionales se obtendrán típicamente anticuerpos monoclonales con afinidades de al menos  $10^8$  M, de preferencia  $10^9$  ó  $10^{10}$ , o mayor, como se describe en Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, o en Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2º Ed. Academic Press N. Y.

Los anticuerpos particulares para corina son útiles para el diagnóstico de afecciones prepatológicas y enfermedades crónicas o agudas que se caracterizan por diferencias en la cantidad o distribución de corina. Las pruebas de diagnóstico para corina incluyen procedimientos que utilizan el anticuerpo y un marcador para detectar corina en líquidos corporales, tejidos o extractos de tales tejidos (tales como tejidos del corazón y cartílagos) humanos (o de ratón, etc., si se utilizan ratones, etc.).

Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden usarse con o sin modificaciones. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se marcarán uniéndolos, ya sea de manera covalente o no covalente, con una sustancia que proporcione una señal detectable. Se conoce una gran diversidad de técnicas de marcación y conjugación y se han informado extensamente tanto en la bibliografía científica como en patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de tales marcadores incluyen las Patentes de EEUU N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4,277,437; 4,275,149 y 4.366.241. También pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes como se muestra en la Patente de EEUU N° 4.816.567, que se incorpora en este documento por referencia.

En la técnica se conocen una diversidad de protocolos para medir corina soluble o unida a membrana, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para corina. Los ejemplos incluyen ensayos de inmutabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA) y separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Resulta de preferencia un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales para dos sitios que utilice anticuerpos monoclonales reactivos para dos epítomos que no interfieran en EC, pero puede emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos ensayos se describen, entre otros, en Maddox, Del. y col. (1983) *J. Exp. Med.* 158: 1211.

Pueden usarse anticuerpos u otros ligandos que se unen a corina en diversos ensayos, incluidos como herramientas terapéuticas, de diagnóstico y de investigación comercial, por ejemplo, para cuantificar los niveles de polipéptido de corina en animales, tejidos, células, etc., para identificar la localización celular y/o distribución de la misma, para purificarla, o un polipéptido que comprenda parte de la misma, para modular su función, en transferencias Western, ELISA, inmunoprecipitación, RIA, etc. La presente invención se refiere a tales ensayos, composiciones y kits para llevarlos a cabo, etc. Usando estos y otros procedimientos, puede usarse un anticuerpo según la presente invención para detectar un polipéptido de corina o fragmentos del mismo en diversas muestras, incluidos tejidos, células, líquidos corporales, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo. Un procedimiento de la presente invención comprende: a) poner en contacto un ligando que se une a un péptido de SEC ID N°: 2 bajo condiciones eficaces, según se conoce en la técnica, para conseguir la unión, y b) detectar la unión específica entre el ligando y el péptido. Por unión específica, se entiende que el ligando se une a una secuencia definida de aminoácidos, por ejemplo, dentro o que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o derivados de la misma.

La corina nativa o recombinante puede purificarse por cromatografía de inmutafinidad usando anticuerpos específicos para corina. En general, se construye una columna de inmutafinidad por acoplamiento covalente del anticuerpo anticorina con una resina cromatográfica activada.

Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de suero inmune por medio de precipitación con sulfato de amonio o por purificación sobre Proteína A inmutalizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N. J.). De la misma manera, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de líquido de ascitis de ratón por medio de precipitación con sulfato de amonio o cromatografía sobre Proteína A inmutalizada. La Ig parcialmente purificada se une covalentemente a una resina de cromatografía tal como Sepharose activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N. J.). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea, y se lava la resina derivada según las instrucciones del fabricante.

En la purificación de corina se utiliza una columna de inmutafinidad preparando una fracción a partir de células que contienen corina. Esta preparación puede derivar de la solubilización de la célula completa o de una fracción subcelular obtenida por medio de centrifugación diferencial por medio de la adición de detergente o por medio de otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, la corina soluble que contiene la secuencia señal puede secretarse en una cantidad útil en el medio en el que se cultivan las células.

Una preparación que contiene corina se hace pasar por la columna de inmutafinidad, y se lava la columna bajo condiciones, por ejemplo, tampones con fuerza iónica elevada en presencia de detergente, que permiten la absorbancia de preferencia de corina. Posteriormente, se eluye la columna bajo condiciones que rompan la unión anticuerpo/corina (por ejemplo, un tampón de pH 2-3 o una alta concentración de un agente caotropro tal como urea o ión tiocianato), y se recoge la corina.

## ES 2 307 338 T3

Además, los ligandos que se unen a un polipéptido de corina según la presente invención, o un derivado del mismo, pueden también prepararse, por ejemplo, usando bibliotecas de péptidos sintéticos o aptámetos (por ejemplo, Pitrungr y col., Patente de EEUU N° 5.143.854; Geysen y col., 1987, J. Immunol. Methods, 102: 259-274; Scott y col., 1990, Science, 249:386; Blackwell y col., 1990. Science, 250:1104; Tuerk y col., 1990, Science, 249:505.)

Los anticuerpos o derivados de los mismos pueden también usarse para inhibir la expresión de corina o de un fragmento de la misma. Los niveles del péptido de corina pueden determinarse solos o en combinación con otros productos genéticos. En particular, puede compararse la cantidad (por ejemplo, su nivel de expresión) de polipéptido de corina (por ejemplo, como una proporción) con respecto a las cantidades de otros polipéptidos en la misma muestra o en muestras diferentes, por ejemplo, actina. En general, los reagentes que son específicos para corina pueden usarse en estudios de diagnóstico y/o forenses según cualquier procedimiento deseado, por ejemplo, como las Patentes de EEUU N° 5.397.712; 5.434.050; 5.429.947.

La presente invención también se refiere a un polipéptido de corina, preparado según un procedimiento deseado, por ejemplo, como se describe en la Patente de EEUU N° 5.434.050. Puede usarse un polipéptido marcado, por ejemplo, en ensayos de unión, para identificar sustancias que unen o se unen a la corina, para hacer un seguimiento del movimiento de la corina en una célula, en un sistema *in vitro*, *in vivo*, o *in situ*.

Puede aislarse un ácido nucleico, un anticuerpo, ligando de corina, etc., según la presente invención. El término "aislado" significa que el material está en una forma en la que no se encuentra en su ambiente original, por ejemplo, más concentrado, más purificado, separado de componentes, etc. Un ácido nucleico aislado incluye, por ejemplo, un ácido nucleico que tiene la secuencia de corina separada del ADN cromosómico que se encuentra en un animal vivo. Este ácido nucleico puede ser parte de un vector o puede estar insertado en un cromosoma (por marcación específica de genes o por integración aleatoria en una posición diferente de su posición normal) y aún puede aislarse en una forma diferente a la que se encuentra en su ambiente natural. Un ácido nucleico o polipéptido de la presente invención puede también purificarse sustancialmente. Por sustancialmente purificado, se entiende que el ácido nucleico o polipéptido está separado y esencialmente libre de otros ácidos nucleicos y polipéptidos, es decir, el ácido nucleico o polipéptido es el constituyente principal y activo.

La presente invención también describe un animal transgénico no humano, por ejemplo un mamífero no humano, tal como un ratón, que comprende una corina o uno knock-out (desprovisto) de corina. Pueden prepararse animales transgénicos según los procedimientos conocidos, incluidos, por ejemplo, por inyección pronuclear de genes recombinantes en pronúcleos de embriones de 1 célula, incorporando un cromosoma artificial de levadura en células madre embrionarias, por procedimientos de marcación genética, por procedimientos embrionarios con células madre. Véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 4.736.866; 4.873.191; 4.873.316; 5.082.779; 5,304.489; 5.174.986; 5.175.384; 5.175.385; 5.221.778; Gordon y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 7380-7384 (1980); Palmiter y col., Cell, 41: 343-345 (1985); Palmiter y col., Ann. Rev. Genet., 20: 465-499 (1986); Askew y col., Mol. Cell. Bio., 13: 4115-4124, 1993; Games y col. Nature, 373: 523-527, 1995; Valancius y Smithies, Mol. Cell. Bio., 11: 1402-1408, 1991; Stacey y col., Mol. Cell. Bio., 14: 1009-1016, 1994; Hasty y col., Nature, 350: 243-246, 1995; Rubinstein y col., Nucl. Acid Res., 21: 2613-2617, 1993. Puede introducirse un ácido nucleico según la presente invención en un mamífero no humano, incluido un ratón (Hogan y col., 1986, en Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York), cerdo (Hammer y col. Nature, 315 : 343-345, 1985), oveja (Hammer y col., Nature, 315: 343-345, 1985), vaca, rata, o primate. Véase también, por ejemplo, Church, 1987, Trends in Biotech. 5: 13-19; Clark y col., 1987, Trends in Biotech. 5: 20-24; y DePamphilis y col., 1988, BioTechniques. 6: 662-680. Además, por ejemplo, la producción de ratas y ratones transgénicos a medida está disponible comercialmente. Estos animales transgénicos son modelos de animales útiles para probar la función de corina, como alimento para una serpiente, como marcadores genéticos para detectar el origen de cepas, etc. Tales animales transgénicos pueden además comprender otros transgenes o carecer de los mismos (por ejemplo, en otras serina proteasas, péptidos natriuréticos, etc.).

Los animales transgénicos que comprenden múltiples copias del gen de corina, el gen de corina dirigido por potentes promotores, o knock-out de corina, pueden ser útiles como modelos animales para hipertensión, enfermedad renal y enfermedad cardíaca. Véase, por ejemplo, Steinhilber y col., Hypertension, 16: 301-307, 1990; John y col., Am. J. Physiol., 271: R109-R114, 1996.

La presente invención describe por consiguiente un animal transgénico, tal como un roedor, un ratón, o una rata, que comprende células que contienen un gen recombinante de corina integrado en un cromosoma de dicha célula en el locus del gen de corina nativo, dicho gen de corina recombinante comprende una secuencia de nucleótidos codificadora que codifica un polipéptido de corina recombinante que comprende al menos un aminoácido cuya identidad y/o posición no se presenta naturalmente en dicho gen de corina nativo. Tal gen recombinante puede producirse por recombinación homóloga, por ejemplo, entre un gen de corina humana y el de corina de un animal huésped en su locus nativo.

La presente invención también describe un animal transgénico, tal como un ratón o una rata, que comprende células que contienen al menos un gen de corina recombinante interrumpido funcionalmente en un locus del gen cromosómico de corina, en el que dicha interrupción evita la expresión funcional del polipéptido de corina codificado por el gen de corina. La inactivación o interrupción funcional se refiere, por ejemplo, a una reducción completa o parcial de la expresión de al menos una porción de un polipéptido codificado por un gen endógeno de serina proteasa

de una única célula, células seleccionadas, o todas las células de un mamífero. Tal reducción puede dar lugar a la reducción concomitante de la actividad de la enzima convertidora de pro FNA, y causar una disminución en el FNA fisiológicamente activo. El término “knock-out” es un sinónimo para inactivación funcional del gen.

5 Se describe una estrategia de marcación de genes que facilita la introducción de una secuencia de nucleótidos deseada en un gen de corina. La estrategia de marcación de genes utiliza de preferencia recombinación recíproca doble y un marcador positivo seleccionable para ayudar en la inserción de la secuencia de nucleótidos en el ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana es de preferencia un gen, de más preferencia un gen en su locus cromosómico particular. La secuencia de nucleótidos deseada se inserta en el gen de tal manera que se interrumpa funcionalmente  
10 el gen, es decir, su expresión se reduce parcial o completamente.

La modificación del gen de corina en su locus cromosómico puede realizarse según cualquier procedimiento adecuado, tal como la recombinación homóloga. La última puede usarse para interrumpir el gen de corina, introducir una mutación genética en el gen de corina, insertar o delecionar ADN, etc. La selección y uso de secuencias eficaces  
15 para recombinación homóloga se describe, por ejemplo, en Deng and Capecchi, *Mol. Cell. Bio.*, 12: 3365-3371, 1992; Bollag y col., *Annu. Rev. Genet.*, 23: 199-225, 1989; Waldman and Liskay, *Mol. Cell. Bio.*, 8: 5350-5357, 1988; Rubinstein y col., *Nucl. Acid Res.*, 21: 2613-2617, 1993; Documentos WO94/23049; WO95/14377.

El gen de corina puede interrumpirse funcionalmente por completo, por ejemplo, delecionando regiones 5' del gen.  
20 Como alternativa, pueden modificarse regiones específicas de corina. Por ejemplo, el dominio catalítico aproximadamente en las posiciones de los aminoácidos 802-1042 en el gen de corina humana, o las posiciones correspondientes en el gen del ratón, pueden alterarse genéticamente por recombinación para producir una corina con actividad modificada, incluida actividad nula, actividad aumentada, actividad reducida.

25 En general, los ácidos nucleicos, polipéptidos, anticuerpos, etc. de la presente invención pueden prepararse y usarse como se describe en las Patentes de EEUU N° 5.501.969, 5.506.133, 5.441.870; en los Documentos WO 90/00607 y WO 91/15582.

Para otros aspectos de los ácidos nucleicos, polipéptidos, anticuerpos, etc., se hace referencia a libros de texto  
30 convencionales de biología molecular, ciencias de las proteínas e inmunología. Véase, por ejemplo, Davis y col. (1986), *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Sciences Publishing, Inc., Nueva York; Hames y col. (1985), *Nucleic Acid Hybridization*, IL Press, Molecular Cloning, Sambrook y col.; *Current Protocols in Molecular Biology*, Editado por F. M. Ausubel y col., John Wiley & Sons, Inc.; *Current Protocols in Human Genetics*, Editado por Nicholas C. Dracopoli y col., John Wiley & Sons, Inc.; *Current Protocols in Protein Science*; Editado por John E. Coligan y col., John Wiley & Sons, Inc.; *Current Protocols in Immunology*; Editado por John E. Coligan y col., John Wiley & Sons, Inc.  
35

### Ejemplos

40 *Aislamiento de clones de ADNc de corina humana*

Se identificó una secuencia parcial EST basándose en análisis de la base de datos Incyte EST para ADNc de serina proteasas nuevas. El clon (307474) fue solicitado por Incyte. Se usó un fragmento EcoR1-XhoI de 2,1 kb del clon para  
45 seleccionar una biblioteca de ADNc de corazón humano (Clontech). Se obtuvo phagemid 14b2, que contiene un inserto de 3,8 kb de un clon de fagos positivo por escisión *in vivo*. Se usaron los oligocebadores derivados de phagemid 14b2 para clonar más el extremo 5' de la secuencia de ADNc por 5' RACE, usando ADNc de corazón humano preparado según Marathon (Clontech) como molde. Los productos de PCR se clonaron en el vector pCRII (Invitrogen) y se secuenció. Se obtuvo la secuencia de ADNc de corina humana de longitud total (es decir, con un codón de iniciación y un codón de terminación) compilando las secuencias obtenidas a partir del 5' RACE y phagemid usando el paquete  
50 de análisis de secuencias de ADN GCG.

#### *Oligocebadores usados en 5' RACE*

55 PrWY109: 5'-CAGTTGGTTTGAACAAGTGCAGGG-3'  
PrWY110: 5'-TGCAAGGAGGGATACGCTCGCCTG-3'  
60 PRWY111: 5'-AATCCCAAGAACAGACTCACAGCG-3'  
PRWY118: 5'-CGGGTCACAGAGAGACTACCACC-3'  
PRWY119: 5'-GGTCTCCTTCTTGACATGAATCTG-3'  
65 5'-AACAAAACGATCCTTGGAGGTCGGACGAGT-3'

## ES 2 307 338 T3

### Análisis Northern

Se marcó el fragmento EcoRI-XhoI de 2,1 kb del clon Incyte 307474 con <sup>32</sup>P dCTP usando un kit de marcación de cebadores aleatorio (Boehringer). Se hibridaron filtros Human Multiple Tissue Northern Blot I, Human Multiple Tissue Northern Blot II, Human Muscle Northern Blot (Clontech) con una sonda de ADNc de corina humana marcada. La hibridación Northern se llevó a cabo durante la noche a 42 EC con formamida al 40%, 5X solución de Denhardt, 6X SSC, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml, SDS al 0,1%. Se lavaron los filtros con 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 60 EC y se expusieron a placas para imágenes Fuji.

10

### Clonación de ADNc de corina de ratón

Se aislaron clones de ADNc de corina de ratón por medio de una estrategia basada en PCR. Se obtuvo una biblioteca de ADNc de corazón de ratón de Clontech y se usó como molde para amplificación por PCR (30 ciclos de 1,5 minutos de alineamiento a 55 EC, 1,5 minutos de extensión a 72 EC, y 1 minuto de desnaturalización a 94 EC). Las secuencias de los cebadores de PCR están basadas en las secuencias de ADNc de corina humana. Los cebadores usados para la amplificación del ADNc de ratón incluyen:

20

Cor09: 5'-TCTTCTGTGTACTAAACAAGACTG-3'

Cor12: 5'-AGGCCCCAGGACTTTGGAAAAGCA-3'

25

Cor02: 5'-ACAGTGGCCTGAAGACACAGATTG-3'

Prwy128: 5'-ACAGAGCATCGCTGCGGGGACGGG-3'

30

Se clonaron fragmentos de ADN de las reacciones de PCR in el vector pCRII. Se usaron vectores de plásmidos derivados de reacciones independientes de PCR para otra secuenciación. Los ADNc de corina humana y de ratón comparten más del 85% de similitud de secuencia.

### 35 Hibridación *in situ*

Se aislaron muestras de ARNm de RT-PCR de células Hec-1-A, U2-OS, SK-LMS-1, y AN3-CA usando un kit comercial de preparación de ARN (Oligotex Direct mRNA Mini Kits, QIAGEN). En primer lugar se sintetizaron hebras de ADNc usando transcriptasa inversa SuperScript II RNase (Life Technologies). Se usaron cebadores de oligonucleótidos específicos de corina humana (cebador con sentido: 5'-AACAAAAGGATCCTTGGAGGTCGGACGAGT-3' y cebador antisentido: 5'-CGGAGCCCCATGA AGTTAATCCA-3') para amplificar un fragmento de ADNc de corina de 630 pb entre los nucleótidos 1475 y 3105. Se usaron los cebadores de oligonucleótidos TFR1 (5'-GTCAATGTCC CAAACGTCACCAGA-3') y TFR2 (5'-ATTTCGGAATGCTGAGAAAACAGACAGA-3'), derivados del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH) como control interno de cuantificación. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con un termociclador (Perkin-Elmer, modelo 480). Los productos de PCR se separaron en genes de agarosa al 1% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

50

Hibridación *in situ* - Se desparafinizaron secciones de tejidos embrionarios y de corazón de ratón adulto en xileno, se rehidrataron y fijaron en paraformaldehído al 4%. Se digirieron los tejidos con proteinasa K (20 mg/ml), a continuación se trataron con trietanolamina/anhídrido acético y se deshidrataron. Se clonó un fragmento de ADNc de corina de ratón de 800 pb de la región codificadora en pCRII (Invitrogen) en dos orientaciones para dar plásmidos pM11 y pM41. Se linearizaron los plásmidos por digestión con HindIII. Se sintetizaron sondas con sentido y antisentido usando polimerasa de ARN T7 (kit de transcripción T7/SP6, Boehringer Mannheim) y se marcaron con [<sup>33</sup>P]UTP (Amersham). La hibridación se realizó según se describe (Jen y col., Dev. Dyn., 208: 92-106, 1997). Se deshidrataron los portaobjetos y se sumergieron en emulsión NTB-2 Kodak y se expusieron durante 4 semana en cajas herméticas con luz a 4°C. El revelado fotográfico se llevó a cabo en un revelador D-19 Kodak. Se tiñeron los portaobjetos con hematoxilina y eosina y se analizaron con microscopía óptica y en campo oscuro con un microscopio Zeiss.

60

Análisis de hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH) - Se aislaron clones de fago P1 que contenían el gen de corina humana por hibridación con filtros usando ADNc de corina humana como sonda. Se confirmó un clon por secuenciación del ADN usando un cebador de ADNc de corina humana. Se marcó el fragmento de ADN de este fago P1 con digoxigenin-dUTP. La sonda marcada se combinó con ADN humano cortado y se hibridó con cromosomas en metafase derivados de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA en una solución con formamida al 50%, sulfato de dextrán al 10% y 2x SSC. Se detectaron señales de hibridación por medio de anticuerpos antidigoxigenina marcados fluorescentes y contratinción con DAPI (4,6-diaminoindino-2-fenilindol). Se analizaron un total de 80 células en metafase de las cuales 74 exhibieron marcación específica.

65

## ES 2 307 338 T3

Modelo de similitud del dominio proteasa de corina - Se construyó un modelo de dominio proteasa de corina (aminoácidos 802-1042) basándose en la estructura del quimotripsinógeno A bovino a una resolución de 1,8 Å (Wang y col., J. Mol. Biol., 185: 595-624, 1985; Ponder and Richards, J. Mol. Biol., 1987), usando el programa Homology (Insight II, 1995, MSI, San Diego, CA). Se usaron rotámeros para reemplazos de cadenas laterales no idénticas (Ponder y Richards, J. Mol. Biol., 1987). Se extrajeron coordinados para las inserciones de bucles del banco de datos de proteínas Brookhaven (Bernstein y col., Mol. Biol., 112: 535-542, 1977). Se mejoró el modelo por minimización de energía usando el campo de fuerzas de AMBER (Discover 95.0), con una constante dieléctrica dependiente de la distancia. La minimización usó los procedimientos de dirección del máximo gradiente de gradiente conjugado: primero para los bucles sólo donde se presentaban inserciones y deleciones, posteriormente cadenas laterales, y una ronda final de minimización manteniendo los átomos de Ca fijados. También se mantuvieron fijados los residuos de corina (His843, Asp892 y Ser985) correspondientes a la tríada catalítica de la estructura molde.

### *Actividad biológica de corina*

Se produjeron varias líneas celulares diferentes por medio de procedimientos convencionales para ensayar la actividad biológica de la corina. Se cotransfectaron 293 células con pro-FNA y plásmidos que expresaban corina. Se crearon otras dos líneas celulares cotransfectando 293 células con un plásmido que expresaba pro-FNA y un plásmido que expresaba hepsina o protrombina. Sólo las células que expresaron corina convirtieron pro-FNA en FNA según se demostró por transferencia Western usando anticuerpos para FNA.

Se realizó otro experimento en el que el medio acondicionado que contenía pro-FNA se puso en contacto con células que expresaban polipéptido de corina recombinante. Una vez más, el pro-FNA se convirtió en FNA. Las células de control que expresaban hepsina o protrombina no tuvieron efecto sobre el pro-FNA.

Los fragmentos de ácidos nucleicos, citados anteriormente y en las figuras, pueden encontrarse en las bases de datos Unigene, PubEST y GeneBank de la siguiente manera: Hs.62794 (AA126468 [1686098], AA126648 [1686206], AA625395 [2537780], AA046682 [1524579], AA249850 [1881137], y AA046793 [1524691]), y Hs.71798 (AA147031 [1716421]); Hs.121626 (AA771958), Hs.1657 (M69297), y Hs.47712 (AA203291), g1231787; g1312726; g1337948; y g942724.

## ES 2 307 338 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido de corina humana de longitud completa aislado que comprende desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido 1042 según se establece en SEC ID N°: 2.
2. El polipéptido de corina humana de longitud completa aislado según la reivindicación 1, codificado por la secuencia de ADN establecida en SEC ID N°: 1.
- 10 3. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de corina de longitud completa que comprende desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido 1042 según se establece en SEC ID N°: 2.
- 15 4. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 3, que tiene la secuencia de nucleótidos establecida en SEC ID N°: 1.
5. Un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 3.
- 20 6. Un procedimiento para expresar en células huésped transformadas, una corina humana de longitud completa establecida en SEC ID N°: 2, codificado por un ácido nucleico establecido en SEC ID N°: 1 que comprende: cultivar células huésped transformadas que contienen un ácido nucleico de SEC ID N°: 1 bajo condiciones eficaces para expresar el polipéptido de SEC ID N°: 2; y aislar la fracción de membrana de dichas células huésped que comprenden dicho polipéptido.
- 25 7. Un procedimiento para identificar moduladores de la actividad catalítica serina proteasa de una actividad del polipéptido de corina humana que comprende:
- hacer reaccionar, en presencia de un compuesto de prueba, un polipéptido de corina humana de las reivindicaciones 1 ó 2, y un sustrato cromogénico para serina proteasa, bajo condiciones eficaces para que dicho polipéptido escinda dicho sustrato, que da como resultado la aparición de un color detectable;
- 30 detectar dicha escisión; e
- identificar si el compuesto de prueba modula dicha actividad serina proteasa comparando la cantidad de escisión en presencia y en ausencia del compuesto de prueba.
- 35 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho polipéptido de corina humana tiene la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido 1042 según se establece en SEC ID N°: 2.
- 40 9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho polipéptido de corina humana está codificado por la secuencia del ácido nucleico establecida en SEC ID N°: 1.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el sustrato es pro-FNA.
- 50
- 55
- 60
- 65

# ES 2 307 338 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Morser, John  
Wu, Qingyu  
Yan, Wei
- <120> ÁCIDOS NUCLEICOS Y POLIPÉPTIDOS DE SERINA PROTEASAS NUEVAS
- 10 <130> SCHERING AG
- <140>  
<141>
- 15 <150> 09/092.029  
<151> 05-06-1998
- 20 <160> 18
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- 25 <210> 1  
<211> 4933  
<212> ADN  
<213> Corina de *Homo sapiens*
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

# ES 2 307 338 T3

<400> 1

5	aatcatccg tagtgcctcc ccgggggaca cgtagaggag agaaaagcga ccaagataaa 60 agtggacaga agaataagcg agacttttta tccatgaaac agtctcctgc cctcgctccg 120 gaagagcgct accgcagagc cgggtcccca aagccggctt tgagagctga tgacaataac 180 atgggcaatg gctgctctca gaagctggcg actgctaacc tcctccggtt cctattgctg 240 gtectgattc catgtatctg tgetctcgtt ctcttgctgg tgatcctgct tcctatggtt 300 ggaacattac aaaaggtcta ttttaaatca aatgggagtg aaccttgggt cactgatggt 360 gaaatccaag ggtccgatgt tattcttaca aatacaattt ataaccagag cactgtggtg 420 tctactgcac atcccgacca acacgttcca gcctgacta cggatgcttc tctcccaggg 480 gaccaaaagt acaggaatac aagtgcctgt atgaacatca cccacagcca ctgtcagatg 540 ctgcccacc accgcaagct gacacctctc ctctcagttg tcagaaacat ggaatggaa 600 aagttccca agtttttca atattcccat cgctcagtt gctatcaaca tatcatgctg 660 tttggctgta cctcgcctt cctgagtg ctcattgatg gcgatgacag tcatggactc 720 ctgcccgtgta ggtcctctctg tgaggctgca aaagaaggct gtgaatcagt cctggggatg 780 gtgaattact cctggccgga tttcctcaga tgctccagtt ttagaaacca aactgaaagc 840 agcaatgtca gcagaatttg cttctcacct cagcaggaaa acggaaagca attgctctgt 900 ggaaggggtg agaactttct gtgtgccagt ggaatctgca tccccgggaa actgcaatgt 960 aatggctaca acgactgtga cgactggagt gacgaggctc attgcaactg cagcgagaat 1020 ctgtttcact gtcacacagc caagtgcctt aattacagcc ttgtgtgtga tggatatgat 1080 gactgtgggg atttgagtga tgagcaaaac tgtgattgca atcccacaac agagcatcgc 1140 tgccgggacg ggcgctgcat cgccatggag tgggtgtgtg atggtgacca cgactgtgtg 1200 gataagtcag acgaggtcaa ctgctcctgt cacagccagg gctctggtgga atgcagaaat 1260 ggacaatgta tccccagcac gtttcaatgt gatggtgacg aggactgcaa ggatgggagt 1320 gatgagggaga actgcagcgt cattcagact tcatgtcaag aaggagacca aagatgcctc 1380 tacaatccct gccttgattc atgtgggtgg agctctctct gtgaccgaa caacagtctg 1440 aataactgta gtcfaatgtga accaattaca ttggaactct gcatgaattt gccctacaac 1500 agtacaagtt atccaaatta ttttggccac aggaactcaa aggaagcacc catcagctgg 1560 gactctctc ttttccctgc acttgttcaa accaactgtt ataaatacct catgttcttt 1620 tcttgacca ttttgggtacc aaaatgtgat gtgaatacag gcgagcgtat cctccttgc 1680 agggcattgt gtgaacactc taaagaacgc tgtgagtctg ttcttgggat tctgggacct 1740 cagtggcctg aagacacaga ttgcagtcaa ttccagagg aaaattcaga caatcaaacc 1800 tgccatgatc ctgatgaata tgtggaagaa tgctcaccta gtcatttcaa gtgcccctca 1860 ggacagtgtg tcttggcttc cagaagatgt gatggccagg ccgactgtga cgatgacagt 1920 gatgagggaa actgtggttg taaagagaga gatctttggg aatgtccatc caataaaca 1980 tgtttgaagc acacagtgat ctgcatggg tccccagact gccctgatta catggacgag 2040
---	--

45

50

55

60

65

ES 2 307 338 T3

5 aaaaactgct cactttgcca agatgatgag ctggaatgtg caaacccatgc gtgtgtgtca 2100  
 cgtgacctgt ggtgtgatgg tgaagccgac tgctcagaca gttcagatga atgggactgt 2160  
 gtgacctctt ctataaatgt gaactcctct tcccttctga tggttcacag agctgccaca 2220  
 gaacaccatg tctgtgcaga tggctggcag gagatattga gtcagctggc ctgcaagcag 2280  
 atgggtttag gagaaccatc tgtgaccaa ttgatacagg aacaggagaa agagccgagg 2340  
 tggctgacat tacactccaa ctgggagagc ctcaatggga ccactttaca tgaacttcta 2400  
 gtaaatgggc agtcttgtga gagcagaagt aaaatttctc ttctgtgtac taaacaagac 2460  
 tgtgggcgcc gccctgctgc ccgaatgaac aaaaggatcc ttggaggctg gacgagtcc 2520  
 10 cctggaaggc ggccatggca gtgttctctg cagagtgaac ccagtggaca tctctgtggc 2580  
 tgtgtcctca ttgccaagaa gtgggttctg acagttgccc actgcttoga ggggagagag 2640  
 aatgctgcag ttgggaaagt ggtgcttggc atcaacaatc tagaccatcc atcagtgttc 2700  
 atgcagacac gctttgtgaa gaccatcacc ctgcatcccc gctacagctg agcagtgggt 2760  
 gactatgaca tcagcatcgt tgagctgagt gaagacatca gtgagactgg ctacgtccgg 2820  
 15 cctgtctgct tgcccaacct ggagcagtgg ctagagcctg acacgtactg ctatatcaca 2880  
 ggtgggggcc acatgggcaa taaaatgcca tttaaagtgc aagagggaga ggtccgcat 2940  
 atttctctgg aacattgtca gtcctacttt gacatgaaga ccaccaccac tcggatgata 3000  
 tgtgctggct atgagtctgg cacagttgat tcatgcatgg gtgacagcgg tgggctcttc 3060  
 20 gtttgtgaga aacctggagg acgggtggaca ttatttggat taacttcatg gggctccgct 3120  
 tgcttttcca aagtcctggg gccctggcgt ttatagtaatg tgcctatttc cgtcgaatgg 3180  
 attaaaagac agatttacc ccagaccttc tccctaaact aattataagg atyatcagag 3240  
 acttttggca gctacactaa aagaaaatgg ccttcttgac tgtgaagagc tgccctgcaga 3300  
 25 gagctgtaca gaagcacttt tcatggacag aaatgctcaa tegtgcactg caaatttgca 3360  
 tgtttgtttt ggactaattt ttttcaattt atttttcac ctccattttt ctcttatttc 3420  
 aagtccaatg aaagacttta caaaagcaaa caaagcagac ttgttctttt tgccaggcct 3480  
 aaccatgact gcagcacaaa attatcgact ctggcgagat ttaaaatcag gtgctacagt 3540  
 aacaggttat ggaatggctt cttttatcct atcacaaaaa aagacataga tatttaggct 3600  
 30 gattaattat ctctaccagt ttttgtttct caagctcagt gcatagtggg aaatttcagt 3660  
 gttaacattg gagacttgc tttctttttc tttttttata ccccacaatt cttttttatt 3720  
 acacttcgaa ttttagggta cacgagcaca acgtgcaggt tagttacata tgtatacatg 3780  
 tgccatgttg gtgtgctgaa ccagtaact cgtcatttga tttattaaaa gccaaagataa 3840  
 35 ttacatggtt taaagtattt actattaccc ccttctaatt ttgcataat tctgagaact 3900  
 gataaaaagac agcaataaaa gaccagtgtc atccatttag gttagcaagac atattgaaatg 3960  
 caaagtctt tagatatcaa tattaacact tgacattatt ggacccccca ttctggatgt 4020  
 atatcaagat cacaatttta tagaagagtc tctatagaac tgcctcataa gctgggtttg 4080  
 ttcaggatat atgagttggc tgattgagac tgcaacaact acatctatat ttatgggcaa 4140  
 40 tattttgttt tacttatgtg gcaaagaact ggatattaaa ctttgcaaaa gagaatttag 4200  
 atgagagatg caatttttta aaaagaaaat taatttgcac cctcgttta attaaattta 4260  
 tttttcagtt tcttgcgtt catccatacc aacaaagtca taaagagcat attttagagc 4320  
 acagtaagac ttgcatgga gtaaaacatt ttgtaatttt cctcaaaaqa tgtttaatat 4380  
 45 ctggtttctt ctcatggta attaaaattt tagaaatgat ttttagctct aggccacttt 4440  
 acgcaactca atttctgaag caattagtgg taaaaagtat ttttccccac taaaaaactt 4500  
 taaaacacaa atcttcatat atacttaatt taattagtca ggcattcatt ttgcctttta 4560  
 aacaactagg atccctact aacctccacc agcaacctgg actgcctcag cattccaaat 4620  
 agatactacc tgcaatttta tacatgtatt tttgtatctt ttctgtgtgt aaacatagtt 4680  
 50 gaaattcaaa aagttgtagc aatttctata ctattcatct cctgtccttc agtttgtata 4740  
 aacctaaagg gagtgtgaaa tccagcaact gaattgtggc cacgattgta tgaaagtcca 4800  
 agaacatatg tcagttttgt tacagttgta gctacatact caatgtatca acttttagcc 4860  
 tgctcaactt aggctcagtg aaatatatat attatactta ttttaataaa ttcttaatac 4920  
 55 aaataaaatg gta 4933

<210> 2

<211> 1042

60

<212> PRT

<213> Corina de *Homo sapiens*

65

# ES 2 307 338 T3

<400> 2

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

ES 2 307 338 T3

				340						345					350				
5	Gly	Arg	Cys	Ile	Ala	Met	Glu	Trp	Val	Cys	Asp	Gly	Asp	His	Asp	Cys			
			355						360				365						
	Val	Asp	Lys	Ser	Asp	Glu	Val	Asn	Cys	Ser	Cys	His	Ser	Gln	Gly	Leu			
		370					375					380							
10	Val	Glu	Cys	Arg	Asn	Gly	Gln	Cys	Ile	Pro	Ser	Thr	Phe	Gln	Cys	Asp			
		385				390					395					400			
	Gly	Asp	Glu	Asp	Cys	Lys	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Glu	Asn	Cys	Ser	Val			
15					405					410					415				
	Ile	Gln	Thr	Ser	Cys	Gln	Glu	Gly	Asp	Gln	Arg	Cys	Leu	Tyr	Asn	Pro			
				420					425					430					
20	Cys	Leu	Asp	Ser	Cys	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Cys	Asp	Pro	Asn	Asn	Ser			
			435					440					445						
	Leu	Asn	Asn	Cys	Ser	Gln	Cys	Glu	Pro	Ile	Thr	Leu	Glu	Leu	Cys	Met			
25		450					455					460							
	Asn	Leu	Pro	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asn	Tyr	Phe	Gly	His	Arg			
		465				470					475					480			
	Thr	Gln	Lys	Glu	Ala	Ser	Ile	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Leu	Phe	Pro	Ala			
30					485					490					495				
	Leu	Val	Gln	Thr	Asn	Cys	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Met	Phe	Phe	Ser	Cys	Thr			
				500					505					510					
35	Ile	Leu	Val	Pro	Lys	Cys	Asp	Val	Asn	Thr	Gly	Glu	Arg	Ile	Pro	Pro			
			515					520					525						
	Cys	Arg	Ala	Leu	Cys	Glu	His	Ser	Lys	Glu	Arg	Cys	Glu	Ser	Val	Leu			
40		530					535					540							
	Gly	Ile	Val	Gly	Leu	Gln	Trp	Pro	Glu	Asp	Thr	Asp	Cys	Ser	Gln	Phe			
		545				550					555					560			
	Pro	Glu	Glu	Asn	Ser	Asp	Asn	Gln	Thr	Cys	Leu	Met	Pro	Asp	Glu	Tyr			
45					565					570					575				
	Val	Glu	Glu	Cys	Ser	Pro	Ser	His	Phe	Lys	Cys	Arg	Ser	Gly	Gln	Cys			
				580					585					590					
50	Val	Leu	Ala	Ser	Arg	Arg	Cys	Asp	Gly	Gln	Ala	Asp	Cys	Asp	Asp	Asp			
			595					600					605						
	Ser	Asp	Glu	Glu	Asn	Cys	Gly	Cys	Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Trp	Glu	Cys			
55		610					615					620							
	Pro	Ser	Asn	Lys	Gln	Cys	Leu	Lys	His	Thr	Val	Ile	Cys	Asp	Gly	Phe			
		625				630					635				640				
60	Pro	Asp	Cys	Pro	Asp	Tyr	Met	Asp	Glu	Lys	Asn	Cys	Ser	Phe	Cys	Gln			
					645					650					655				
	Asp	Asp	Glu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asn	His	Ala	Cys	Val	Ser	Arg	Asp	Leu			
65																			

# ES 2 307 338 T3

	660		665		670		
5	Trp Cys Asp 675	Gly Glu Ala Asp 680	Cys Ser Asp 685	Ser Ser Ser	Asp Glu Trp Asp 685		
	Cys Val Thr 690	Leu Ser Ile 695	Val Asn Ser 700	Ser Ser Ser	Phe Leu Met Val		
10	His Arg Ala 705	Ala Thr Glu 710	His His Val 715	Cys Ala Asp 715	Gly Trp Gln Glu 720		
	Ile Leu Ser 725	Gln Leu Ala Cys 730	Lys Gln Met 730	Gly Leu Gly	Glu Pro Ser 735		
15	Val Thr Lys 740	Leu Ile Gln 745	Glu Gln Lys 745	Glu Pro Arg	Trp Leu Thr 750		
20	Leu His Ser 755	Asn Trp Glu 760	Ser Leu Asn 760	Gly Thr Thr	Leu His Glu Leu 765		
	Leu Val Asn 770	Gly Gln Ser 775	Cys Glu Ser 780	Arg Ser Lys	Ile Ser Leu Leu 780		
25	Cys Thr Lys 785	Gln Asp Cys 790	Gly Arg Arg 795	Pro Ala Ala 795	Arg Met Asn Lys 800		
	Arg Ile Leu 805	Gly Gly Arg 810	Thr Ser Arg 810	Pro Gly Arg	Trp Pro Trp Gln 815		
30	Cys Ser Leu 820	Gln Ser Glu 825	Pro Ser Gly 825	His Ile Cys	Gly Cys Val Leu 830		
35	Ile Ala Lys 835	Lys Trp Val 840	Leu Thr Val 840	Ala Ala His 845	Cys Phe Glu Gly 845	Arg	
	Glu Asn Ala 850	Ala Val Trp 855	Lys Val Val 860	Leu Gly Ile	Asn Asn Leu Asp 860		
40	His Pro Ser 865	Val Phe Met 870	Gln Thr Arg 875	Phe Val Lys 875	Thr Ile Ile Leu 880		
	His Pro Arg 885	Tyr Ser Arg 890	Ala Val Val 895	Asp Tyr Asp 900	Ile Ser Ile Val 895		
45	Glu Leu Ser 900	Glu Asp Ile 905	Ser Glu Thr 905	Gly Tyr Val	Arg Pro Val Cys 910		
50	Leu Pro Asn 915	Pro Glu Gln 920	Trp Leu Glu 920	Pro Asp Thr	Tyr Cys Tyr Ile 925		
	Thr Gly Trp 930	Gly His Met 935	Gly Asn Lys 940	Met Pro Phe	Lys Leu Gln Glu 940		
55	Gly Glu Val 945	Arg Ile Ile 950	Ser Leu Glu 955	His Cys Gln	Ser Tyr Phe Asp 960		
60	Met Lys Thr 965	Ile Thr Thr 970	Arg Met Ile 975	Cys Ala Gly	Tyr Glu Ser Gly 975		
	Thr Val Asp 980	Ser Cys Met 985	Gly Asp Ser 990	Gly Gly Pro	Leu Val Cys Glu		

ES 2 307 338 T3

		980		985		990	
5	Lys Pro Gly Gly Arg Trp Thr Leu Phe Gly Leu Thr Ser Trp Gly Ser	995		1000		1005	
	Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly Pro Gly Val Tyr Ser Asn Val Ser	1010		1015		1020	
10	Tyr Phe Val Glu Trp Ile Lys Arg Gln Ile Tyr Ile Gln Thr Phe Leu	1025		1030		1035	1040
	Leu Asn						
15	<210> 3						
	<211> 3547						
	<212> ADN						
20	<213> Corina murina						
	<400> 3						
25	gtggcagacg gtcscctcact cctgtggcct ggcgtcggag acgctggcag tcatgggcag 60						
	ggttcccttc agcgttcggg tcagctccgt gccggagagcc cgtctctctt gtcctgggcg 120						
	atgctacctc tcctgcagag tcctcccaac caccgccctc cgtgcaactga acggctcttg 180						
	ctgcgcgggg gttccggggg agactgcagg tggagccgtc ggaccggcc ccttggggac 240						
30	ccgtggcttc ctctccgggt ccaagtcca ggctcccggc agctggaagg attgctttgg 300						
	agccccgct gctccagacg tcttgagagc agacaggagc gtgggcgagg gctgtcctca 360						
	gaagctgggt actgctaact tcttgcgctt cctcctgctg gtgctcatcc cctgcatctg 420						
	cgccctcatc gtgctgctgg ccatcctgct gtcctttgtg ggaacattaa aaagggttta 480						
	tttcaaatca aatgacagtg aacctttggt cactgatggg gaagctcgag tgcctgggtg 540						
35	tattcctgta aatacagttt attatgagaa cacaggggcg cctctctgct cccccagcca 600						
	gtccactcca gectggacac cgagagctcc ttctccagag gaccagagtc acagaaacac 660						
	aagcacctgc atgaacatca ctcacagcca gtgtcaaatt ctgccctacc acagcacgtt 720						
	ggcacctctc ttgccaatg tcaaaaacat ggacatggag aagttcctca agttcttcac 780						
	gtacctccat cgctcagtt gctatcaaca tatcctgctc ttggctgta gcctcgctt 840						
40	ccctgagtg cttgttgatg gcgatgacag gcaaggctct ctacctgta gatctttctg 900						
	tgaggctgct aaagaaggat gcgaatctgt cctgggaatg gtgaactcct cctggccgga 960						
	ttccctcaga tgetctcagt ttagggacca cactgagact aacagcagtg tcagaaagag 1020						
	ctgcttctca ctgcagcagg aacatggaaa gcaatcactc tgtggagggg gcgagagctt 1080						
	cctgtgtacc agcgggctct gcgtcccaa gaagctgcag tgaacggct ataatgactg 1140						
45	tgatgactgg agcgcagagg cgcattgcaa ctgcagcaag gatctgtttc actgtggcac 1200						
	aggcaagtgc ctccattaca gcctcttggt tgaatgggtac gatgactgtg gggacctgag 1260						
	tgacgagcaa aactgtgatt gtaatctcac aaaagagcat cgctgtggag atgggcgctg 1320						
	cattgcggct gagtgggtgt gcgatgggga ccatgactgt gtggacaagt ctgatgaggt 1380						
	caactgctct tgtcacagcc agggcctggt ggaatgcaga agtggacagt gcatccctag 1440						
50	caccttccag tgtgatgggg acgaagactg taaggatggg agtgacgagg agaactgcag 1500						
	tgacagtcag acgccatgtc cagaaggaga acagggatgc cttggcagtt cctgcgtcga 1560						
	atcctgtgct ggtagctctc tgtgtgactc agacagcagc ctgagtaact gcagtcaatg 1620						
	tgagcccacc actttggaac tctgcatgaa tttgccctac aaccatacac attatccaaa 1680						
55	ttaccttggc cacagaactc aaaaggaaag gtccatcagc tgggagtcac ccttttccc 1740						
	tgccttgtta caaaccaact gttacaaata cctcatgttt ttcgcttgca ccattttggt 1800						
	tccaaagtgt gatgtgaata caggacaacg catcccgcct tgcagactcc tgtgtgagca 1860						
	ctccaaagag cgtgttgagt ctgttctggg aatcgttggc ctgcagtggc ctgaaagacac 1920						
	cgactgcaat caatttccag aggaaagtcc agacaatcaa acttgcctcc tgcccaatga 1980						
60	agatgggaa gaatgctctc ctagtcaact caaatgccgc tcgggacgat gcgttctggg 2040						
	ctccaggaga tgtgacggcc aggctgactg tgacgacgac agtgacgagg agaactgtgg 2100						
	ttgtaaagag agagctcttc gggaatgtcc atttaataag caatgtctga agcatacatt 2160						
	aatctgcgat gggttcccag attgtccaga cagtatggat gaaaaaaact gctcattctg 2220						
	ccaagacaat gagctggaat gtgccaaacca tgagtgtgtg ccgcgtgacc tttgggtgcga 2280						
65	cggatgggtc gactgctcag acaqtctctga tgaatggggc tqtgtgacct tctctaaaaa 2340						

ES 2 307 338 T3

```

tgggaactct tcttcattgc tgactgttca caaatctgca aaggaacacc acgtgtgtgc 2400
tgacggctgg cgggagacgt tgagtcagct ggccctgcaag cagatgggtt taggagaacc 2460
gtctgtgacc aagctgatcc caggacagga aggccagcag tggctgaggt tgtaccccaa 2520
ctgggagaat ctcaatggga gcaccttga ggagctgctg gtatacaggc actcctgccc 2580
5 aagcagaagt gagatttccc ttctgtgctc caagcaagac tgtggccgcc gccctgctgc 2640
ccgaatgaac aagaggatcc ttgggggtcg gactagtcgt cctgggaggt ggccgtggca 2700
gtgctctctg cagagtgaac ccagtggaca tatctgtggc tgtgtcctca ttgccaagaa 2760
gtgggtcctg acagttgccc attgctttga agggagagaa gacgctgatg tttggaaagt 2820
10 ggtatttggc ataaacaacc tggaccatcc atcaggttc atgcagacc gcccttgtga 2880
gacctcctg ctacatcccc gttacagtcg agcagtggta gactatgata tcagcgtggt 2940
ggagctgagc gatgatatea atgagacaag ctacgtcaga cctgtctgcc taccagctcc 3000
ggaggagtat ctagaaccag atacgtactg ctacatcaca ggctggggcc acatgggcaa 3060
taaaatgcc tttaaagtgc agggaggaga ggtccgcatt atccctctgg agcagtgcc 3120
15 gtcctatatt gacatgaaga ccatcaccaa tcggatgatc tgtgtctggc atgagctctg 3180
caccgtggac tcttgcattg gagacagcgg tgggcctctg gtttgtgaac gacccggagg 3240
acagtggaca ttatttgggt taacttcatg gggctccgtc tgcttttcca aagttctggg 3300
acctggagtg tacagcaatg tgtcttactt tgtgggctgg attgaaagac aaatatatat 3360
20 ccagaccttt ctccaaaaga aatcccaagg ataatcagag actttgtggg gaaacctaca 3420
tggagaatga cctctgaaa cagaagcttg tcttgccaag agctgtacga acaggcgttt 3480
cacggacagg acgctcaaca tgcaccgcaa gatctctcct gtttgtgcta gatgagtttt 3540
actcagg 3547

```

25 <210> 4  
 <211> 1113  
 <212> PRT  
 <213> Corina murina

```

30 <400> 4
Met Gly Arg Val Ser Phe Ser Val Arg Val Ser Ser Val Arg Arg Ala
1 5 10 15
35 Arg Cys Ser Cys Pro Gly Arg Cys Tyr Leu Ser Cys Arg Val Pro Pro
20 25 30
40 Thr Thr Ala Leu Arg Ala Leu Asn Gly Leu Gly Cys Ala Gly Val Pro
35 40 45
Gly Glu Thr Ala Gly Gly Ala Val Gly Pro Gly Pro Leu Gly Thr Arg
50 55 60
45 Gly Phe Leu Ser Gly Ser Lys Phe Gln Ala Pro Gly Ser Trp Lys Asp
65 70 75 80
50 Cys Phe Gly Ala Pro Pro Ala Pro Asp Val Leu Arg Ala Asp Arg Ser
85 90 95
Val Gly Glu Gly Cys Pro Gln Lys Leu Val Thr Ala Asn Leu Leu Arg
100 105 110
55 Phe Leu Leu Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Ile Val Leu
115 120 125
60 Leu Ala Ile Leu Leu Ser Phe Val Gly Thr Leu Lys Arg Val Tyr Phe
130 135 140
Lys Ser Asn Asp Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Ala Arg Val
145 150 155 160
65 Pro Gly Val Ile Pro Val Asn Thr Val Tyr Tyr Glu Asn Thr Gly Ala
165 170 175

```

ES 2 307 338 T3

Pro Ser Leu Pro Pro Ser Gln Ser Thr Pro Ala Trp Thr Pro Arg Ala  
 180 185 190  
 5 Pro Ser Pro Glu Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Thr Cys Met Asn  
 195 200 205  
 10 Ile Thr His Ser Gln Cys Gln Ile Leu Pro Tyr His Ser Thr Leu Ala  
 210 215 220  
 Pro Leu Leu Pro Ile Val Lys Asn Met Asp Met Glu Lys Phe Leu Lys  
 225 230 235 240  
 15 Phe Phe Thr Tyr Leu His Arg Leu Ser Cys Tyr Gln His Ile Leu Leu  
 245 250 255  
 Phe Gly Cys Ser Leu Ala Phe Pro Glu Cys Val Val Asp Gly Asp Asp  
 260 265 270  
 20 Arg Gln Gly Leu Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Glu  
 275 280 285  
 25 Gly Cys Glu Ser Val Leu Gly Met Val Asn Ser Ser Trp Pro Asp Ser  
 290 295 300  
 Leu Arg Cys Ser Gln Phe Arg Asp His Thr Glu Thr Asn Ser Ser Val  
 305 310 315 320  
 30 Arg Lys Ser Cys Phe Ser Leu Gln Gln Glu His Gly Lys Gln Ser Leu  
 325 330 335  
 35 Cys Gly Gly Gly Glu Ser Phe Leu Cys Thr Ser Gly Leu Cys Val Pro  
 340 345 350  
 Lys Lys Leu Gln Cys Asn Gly Tyr Asn Asp Cys Asp Asp Trp Ser Asp  
 355 360 365  
 40 Glu Ala His Cys Asn Cys Ser Lys Asp Leu Phe His Cys Gly Thr Gly  
 370 375 380  
 45 Lys Cys Leu His Tyr Ser Leu Leu Cys Asp Gly Tyr Asp Asp Cys Gly  
 385 390 395 400  
 Asp Leu Ser Asp Glu Gln Asn Cys Asp Cys Asn Leu Thr Lys Glu His  
 405 410 415  
 50 Arg Cys Gly Asp Gly Arg Cys Ile Ala Ala Glu Trp Val Cys Asp Gly  
 420 425 430  
 Asp His Asp Cys Val Asp Lys Ser Asp Glu Val Asn Cys Ser Cys His  
 435 440 445  
 55 Ser Gln Gly Leu Val Glu Cys Arg Ser Gly Gln Cys Ile Pro Ser Thr  
 450 455 460  
 60 Phe Gln Cys Asp Gly Asp Glu Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Asn Cys Ser Asp Ser Gln Thr Pro Cys Pro Glu Gly Glu Gln Gly Cys  
 485 490 495  
 65

ES 2 307 338 T3

Leu Gly Ser Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Gly Ser Ser Leu Cys Asp  
 500 505 510  
 5 Ser Asp Ser Ser Leu Ser Asn Cys Ser Gln Cys Glu Pro Ile Thr Leu  
 515 520 525  
 10 Glu Leu Cys Met Asn Leu Pro Tyr Asn His Thr His Tyr Pro Asn Tyr  
 530 535 540  
 15 Leu Gly His Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Ser Trp Glu Ser Ser  
 545 550 555 560  
 20 Leu Phe Pro Ala Leu Val Gln Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr Leu Met Phe  
 565 570 575  
 25 Phe Ala Cys Thr Ile Leu Val Pro Lys Cys Asp Val Asn Thr Gly Gln  
 580 585 590  
 30 Arg Ile Pro Pro Cys Arg Leu Leu Cys Glu His Ser Lys Glu Arg Cys  
 595 600 605  
 35 Glu Ser Val Leu Gly Ile Val Gly Leu Gln Trp Pro Glu Asp Thr Asp  
 610 615 620  
 40 Cys Asn Gln Phe Pro Glu Glu Ser Ser Asp Asn Gln Thr Cys Leu Leu  
 625 630 635 640  
 45 Pro Asn Glu Asp Val Glu Glu Cys Ser Pro Ser His Phe Lys Cys Arg  
 645 650 655  
 50 Ser Gly Arg Cys Val Leu Gly Ser Arg Arg Cys Asp Gly Gln Ala Asp  
 660 665 670  
 55 Cys Asp Asp Asp Ser Asp Glu Glu Asn Cys Gly Cys Lys Glu Arg Ala  
 675 680 685  
 60 Leu Trp Glu Cys Pro Phe Asn Lys Gln Cys Leu Lys His Thr Leu Ile  
 690 695 700  
 65 Cys Asp Gly Phe Pro Asp Cys Pro Asp Ser Met Asp Glu Lys Asn Cys  
 705 710 715 720  
 70 Ser Phe Cys Gln Asp Asn Glu Leu Glu Cys Ala Asn His Glu Cys Val  
 725 730 735  
 75 Pro Arg Asp Leu Trp Cys Asp Gly Trp Val Asp Cys Ser Asp Ser Ser  
 740 745 750  
 80 Asp Glu Trp Gly Cys Val Thr Leu Ser Lys Asn Gly Asn Ser Ser Ser  
 755 760 765  
 85 Leu Leu Thr Val His Lys Ser Ala Lys Glu His His Val Cys Ala Asp  
 770 775 780  
 90 Gly Trp Arg Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Cys Lys Gln Met Gly Leu  
 785 790 795 800  
 95 Gly Glu Pro Ser Val Thr Lys Leu Ile Pro Gly Gln Glu Gly Gln Gln  
 805 810 815

ES 2 307 338 T3

Trp Leu Arg Leu Tyr Pro Asn Trp Glu Asn Leu Asn Gly Ser Thr Leu  
 320 825 830

5 Gln Glu Leu Leu Val Tyr Arg His Ser Cys Pro Ser Arg Ser Glu Ile  
 835 840 845

10 Ser Leu Leu Cys Ser Lys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Pro Ala Ala Arg  
 850 855 860

15 Met Asn Lys Arg Ile Leu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Pro Gly Arg Trp  
 865 870 875 880

20 Pro Trp Gln Cys Ser Leu Gln Ser Glu Pro Ser Gly His Ile Cys Gly  
 885 890 895

25 Cys Val Leu Ile Ala Lys Lys Trp Val Leu Thr Val Ala His Cys Phe  
 900 905 910

30 Glu Gly Arg Glu Asp Ala Asp Val Trp Lys Val Val Phe Gly Ile Asn  
 915 920 925

35 Asn Leu Asp His Pro Ser Gly Phe Met Gln Thr Arg Phe Val Lys Thr  
 930 935 940

40 Ile Leu Leu His Pro Arg Tyr Ser Arg Ala Val Val Asp Tyr Asp Ile  
 945 950 955 960

45 Ser Val Val Glu Leu Ser Asp Asp Ile Asn Glu Thr Ser Tyr Val Arg  
 965 970 975

50 Pro Val Cys Leu Pro Ser Pro Glu Glu Tyr Leu Glu Pro Asp Thr Tyr  
 980 985 990

55 Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly His Met Gly Asn Lys Met Pro Phe Lys  
 995 1000 1005

60 Leu Gln Glu Gly Glu Val Arg Ile Ile Pro Leu Glu Gln Cys Gln Ser  
 1010 1015 1020

65 Tyr Phe Asp Met Lys Thr Ile Thr Asn Arg Met Ile Cys Ala Gly Tyr  
 1025 1030 1035 1040

70 Glu Ser Gly Thr Val Asp Ser Cys Met Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu  
 1045 1050 1055

75 Val Cys Glu Arg Pro Gly Gly Gln Trp Thr Leu Phe Gly Leu Thr Ser  
 1060 1065 1070

80 Trp Gly Ser Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly Pro Gly Val Tyr Ser  
 1075 1080 1085

85 Asn Val Ser Tyr Phe Val Gly Trp Ile Glu Arg Gln Ile Tyr Ile Gln  
 1090 1095 1100

90 Thr Phe Leu Gln Lys Lys Ser Gln Gly  
 1105 1110

65

## ES 2 307 338 T3

	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Corina humana	
	<400> 5	
10	<b>cagttggttt gaacaagtgc aggg</b>	<b>24</b>
	<210> 6	
15	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Corina humana	
20	<400> 6	
	<b>tgcaaggagg gatacgctcg cctg</b>	<b>24</b>
25	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
30	<213> Corina humana	
	<400> 7	
35	<b>aatcccaaga acagactcac agcg</b>	<b>24</b>
	<210> 8	
40	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Corina humana	
45	<400> 8	
	<b>cgggtcacag agagagctac cacc</b>	<b>24</b>
50	<210> 9	
	<211> 24	
	<212> ADN	
55	<213> Corina humana	
	<400> 9	
60	<b>ggtctccttc ttgacatgaa tctg</b>	<b>24</b>
	<210> 10	
	<211> 30	
65	<212> ADN	
	<213> Corina humana	



