



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 515**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/12** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**A61K 38/45** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00917899 .7**

96 Fecha de presentación : **14.03.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1144600**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2001**

54 Título: **Ácidos nucleicos Akt3, polipéptidos y usos de los mismos.**

30 Prioridad: **19.03.1999 US 125108 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.01.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.01.2009**

73 Titular/es: **Aventis Pharmaceuticals Inc.**  
**300 Somerset Corporate Boulevard**  
**Bridgewater, New Jersey 08807, US**

72 Inventor/es: **Guo, Kun;**  
**Pagnoni, Marco, F.;**  
**Clark, Kenneth, L. y**  
**Ivashchenko, Yuri, D.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Ácidos nucleicos Akt3, polipéptidos y usos de los mismos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos aislados, a vectores que los contienen y a sus usos terapéuticos, en particular, en la terapia génica. Más especialmente, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican una isoforma de Akt, denominada Akt3, y a su uso en la terapia génica. La expresión de Akt3 activada evita la muerte celular apoptótica inducida por la quinasa 1 estimuladora de la apoptosis (ASK1).

**Antecedentes de la invención***Akt y Apoptosis*

La apoptosis (muerte celular programada) tiene un papel esencial en el desarrollo embrionario y en la patogénesis de diversas enfermedades, tales como las enfermedades neuronales degenerativas y las enfermedades cardiovasculares (MacLellan y col. 1998, Barinaga 1997a, Barinaga 1997b). Por ello, un reciente trabajo ha conducido a la identificación de diversos productos génicos pro-apoptóticos y anti-apoptóticos que están implicados en la regulación o en la ejecución de la muerte celular programada. La expresión de genes anti-apoptóticos, tales como Bcl2 o Bcl-x, inhibe la muerte celular apoptótica inducida a través de diversos estímulos. Por otro lado, la expresión de genes pro-apoptóticos, tales como Bax o Bad, conduce a la muerte celular programada (Aams y col. 1998). La ejecución de la muerte celular programada está medida por proteinasas relacionadas con la caspasa-1, que incluyen la caspasa-1, la caspasa-3, la caspasa-7, la caspasa-8 y la caspasa-9, etc. (Thorneberry y col. 1998).

Últimamente, se han estudiado dos vías de señalización intracelular implicadas en la regulación de la supervivencia/muerte celular. La activación de la quinasa I estimuladora de la apoptosis (ASK1) conduce a la apoptosis en diversos tipos celulares (Ichijo y col. 1997), mientras que una vía que implica la quinasa 3 de fosfoinositida (PI3K) y Akt conduce a la citoprotección. Se ha observado que la actividad de ASK1 se induce con un tratamiento con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) o con la ligación de Fas (Ichijo y col. 1997, Chang y col. 1998). La hiperexpresión de mutantes negativos dominantes de ASK1, inhibe la apoptosis inducida con TNF $\alpha$  o con ligación de Fas, indicando que ASK1 tiene un papel importante durante la muerte celular apoptótica inducida con TNF $\alpha$  o con la ligación de Fas. El mecanismo molecular por el cual ASK1 induce la apoptosis no está claro. Se ha observado que la expresión ectópica de ASK1 conduce a la activación de diversas vías de señalización activadas por el estrés, tales como las vías MKK4/JNK y MKK6/p38, que pueden mediar en la apoptosis inducida con ASK1 (Ichijo y col. 1997).

La vía PI3K/Akt también parece ser importante para la regulación de la supervivencia celular/muerte celular (Kulik y col. Franke y col. 1997, Kauffmann-Zeh y col. Hemmings 1997, Dudek y col. 1997). Los factores de supervivencia, tales como el factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1), favorecen la supervivencia celular bajo diversas condiciones, induciendo la actividad de PI3K (Kulik y col. 1997, Hemmings 1997). La PI3K activada conduce a la producción de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PtdIns(3,4,5)-P<sub>3</sub>), que a su vez se une e induce la actividad de un dominio AH/PH que contiene la quinasa de serina/treonina. Akt (Franke y col. 1995, Hemmings 1997b, Downward 1998, Alessi y col. 1996). Los inhibidores específicos de PI3K o los mutantes negativos dominantes de Akt inhiben la actividad favorecedora de la supervivencia de estos factores de crecimiento o citocinas. Además, la introducción de mutantes de PI3K o Akt que sean activos de forma constitutiva, favorece la supervivencia celular bajo condiciones en las que las células padecen generalmente muerte celular apoptótica (Kulik y col. 1997, Dudek y col. 1997). Estas observaciones muestran que la vía PI3K/Akt tiene unas funciones importantes en la regulación de la supervivencia celular o de la apoptosis.

Se han identificado dos isoformas de quinasas de la proteína Akt humana, Akt1 y Akt2 (Staal. 1987). Una secuencia de Akt de rata también se ha identificado (Konishi y col. 1995). Se ha observado que la serina-473 en el extremo C-terminal de la Akt1 humana, es decisiva para su regulación (Stokeo y col. 1997; Stephens y col. 1998). Después de estimular con el factor de crecimiento, la PI3K se activa. El producto de PI3K, PtdIns(3,4,5)-P, se une a Akt1 y produce la translocación de Akt1 desde el citoplasma hasta la proximidad de la membrana citoplásmica interna, en donde se fosforila en los residuos Thr308 y Ser473 (Downward, 1998). La fosforilación de estos residuos es decisiva para la activación de Akt1. Una quinasa proteica identificada recientemente, PDK1, se ha observado que es responsable de la fosforilación de Thr308, mientras que la(s) quinasa(s) que fosforila la Ser473, aún no se ha identificado (Stokeo y col. 1997, Stephens y col. 1998).

*Terapia Génica*

La terapia génica implica la corrección de una deficiencia o anomalía (mutación, expresión aberrante y similares) a través de la introducción de información genética en un paciente, tal como en una célula o en un órgano afectado del paciente. Esta información genética se puede introducir tanto *in vitro* dentro de una célula, reintroduciéndose a continuación la célula modificada en el cuerpo, como directamente *in vivo* en un sitio adecuado. A este respecto, se han descrito en la bibliografía diferentes técnicas de transfección y de transferencia génica (véase Roemer y Fried-

man, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211), que incluyen la transfección de “ADN desnudo” y diferentes técnicas que implican complejos de ADN y de DEAE-dextrano (Pagano y col., J. Virol. 1 (1967) 891), de ADN y de proteínas nucleares (Kaneda y col., Science 243 (1989) 375), de ADN y lípidos (Feigner y col., PNAS 84 (1987) 7413), el uso de liposomas (Fraley y col., J. Biol. Chem. 255 (1980) 10431) y similares. Últimamente, el uso de virus como vectores para la transferencia de genes, parece una alternativa prometedora a las técnicas de transfección física. Para ello, se han sometido a ensayo diferentes virus para examinar su capacidad para infectar ciertas poblaciones celulares, que incluyen los retrovirus, los virus herpes, los virus asociados a adenovirus y los adenovirus.

La cita de cualquier referencia en este documento no debe considerarse como un reconocimiento de que dicha referencia se encuentra disponible como “técnica anterior” de la presente solicitud.

### Compendio de la invención

Un primer objeto de la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica una nueva proteína Akt o un polipéptido. Más específicamente, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica una proteína Akt3 humana, que comprende la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia, en donde el ácido nucleico tiene una característica seleccionada entre las siguientes:

- A. se puede amplificar con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando una pareja de cebadores de oligonucleótidos, obtenidos a partir de SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6;
- B. se hibrida bajo unas condiciones desde moderadamente restrictivas hasta muy restrictivas con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos tal y como se describe en SEQ ID NO:1;
- C. codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- D. codifica un polipéptido que se une específicamente a un anticuerpo generado contra un epítipo dentro de un péptido que tiene la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia.

Preferentemente, el ácido nucleico codifica una proteína Akt3 humana que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se describe en la SEQ ID NO:2. Más preferentemente, el ácido nucleico comprende la secuencia descrita en SEQ ID NO:1. El ácido nucleico puede comprender opcionalmente una secuencia que codifica una señal polipeptídica, codificando para ello una proteína Akt3 quimérica marcada. En otro aspecto, el ácido nucleico puede comprender opcionalmente una secuencia que codifica una secuencia de miristilación. En una realización preferida, el ácido nucleico comprende una región que permite la expresión de la proteína Akt3 en células de mamífero.

La invención también se refiere a vectores que contienen un ácido nucleico tal y como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, el ácido nucleico que codifica una proteína Akt3 humana está ligado funcionalmente con una secuencia de control de la expresión, que permite la expresión de la Akt3 humana en una célula hospedadora competente para la expresión. La secuencia de control de la expresión puede comprender un promotor que es funcional en células de mamífero. El vector puede ser una molécula de ADN plasmídico o un vector vírico. Los vectores víricos preferidos incluyen retrovirus, adenovirus, virus asociados a adenovirus, virus herpes y virus vaccinia. Por tanto, la invención se refiere adicionalmente a un virus recombinante defectuoso para la replicación, que comprende en su genoma el ácido nucleico que codifica Akt3, tal y como se ha descrito anteriormente.

En otra realización, la invención se refiere a una célula hospedadora transfectada con el vector tal y como se ha descrito anteriormente. La célula hospedadora puede ser una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula de mamífero. En aún otra realización, la invención se refiere a un método para producir una proteína Akt3 humana, cultivando la célula hospedadora tal y como se ha descrito anteriormente, en un medio de cultivo bajo condiciones que permitan la expresión de Akt3 humana, y aislando la proteína Akt3 humana del cultivo.

La invención se refiere adicionalmente a una proteína Akt3 humana aislada que comprende la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia, y que tienen una característica seleccionada entre las siguientes:

- A. está codificada por el ácido nucleico tal y como se ha descrito anteriormente;
- B. comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se describe en la SEQ ID NO:2; y
- C. se une específicamente a un anticuerpo generado contra un epítipo dentro de un péptido que tiene la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia.

Preferentemente, la proteína comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se describe en SEQ ID NO:2. La proteína puede comprender opcionalmente una secuencia marcadora. En aún otra realización, la proteína puede comprender opcionalmente una secuencia de miristilación.

La presente invención también se refiere a péptidos antigénicos y a anticuerpos para los mismos. Más particularmente, la invención se refiere a péptidos antigénicos que comprenden la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o a una secuencia en la que más del 60% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia y que es un fragmento de la proteína Akt3 humana, en donde la proteína Akt3 humana tiene una característica seleccionada entre las siguientes:

- A. está codificada por el ácido nucleico tal y como se ha descrito anteriormente;
- B. comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se describe en SEQ ID NO:2, sus variantes por corte y empalme o sus variantes alélicas; y
- C. se une específicamente a un anticuerpo generado contra un epítipo dentro de un péptido que tiene la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 60% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia.

Preferentemente, el péptido antigénico consiste en la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos, son idénticos a los de dicha secuencia. En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a una proteína Akt3 humana, tal y como se ha descrito anteriormente. En una realización preferida, el anticuerpo reconoce específicamente un epítipo dentro de un péptido que tiene la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal.

En aún otra realización, la presente invención se refiere a métodos para escrutar moléculas que estimulan o inhiben la actividad de Akt3 en una célula, poniendo en contacto una proteína Akt3 con una molécula candidata y detectando la actividad de Akt3 en presencia de la molécula. Las moléculas candidatas pueden ser tanto agonistas como antagonistas de Akt3. En una realización preferida, la Akt3 se expresa a partir de un ácido nucleico en la célula y la actividad de Akt3 medida es la inhibición de la apoptosis. La inhibición de la apoptosis se puede medir por la presencia de un gen marcador.

El ácido nucleico puede estar en forma de plásmido en un vector vírico. Los vectores víricos preferidos incluyen los retrovirus, los adenovirus, los virus asociados a adenovirus, el virus vaccinia y el virus VSH.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Alineación de las secuencias de Akt3.

Figura 1A: Alineación de las secuencias de aminoácidos de Akt1 humana (SEQ ID NO:14), Akt2 humana (SEQ ID NO:13) y Akt3 humana (SEQ ID NO: 2) .

Figura 1B: Alineación de las secuencias de aminoácidos de Akt de rata (SEQ ID NO: 17) y de Akt3 humana (SEQ ID NO: 2).

Figura 2: Patrón de distribución tisular del ARNm de Akt3.

Se preparó una sonda específica de Akt3 tal y como se describe en los Ejemplos. La transferencia del ARNm de tejido humano múltiple (Clontech) se hibridó con una sonda específica de Akt3 (para más detalles, véanse los Ejemplos).

Figura 3: Construcción de un mutante activado de Akt3.

Figura 3A: Presentación esquemática de Akt3 activada: La secuencia codificadora de longitud completa de Akt3 humana se fusionó manteniendo el marco de lectura, con la señal de miristilación procedente del gen Src humano (Myr) en el extremo N-terminal, y se fusionó manteniendo el marco de lectura con la señal HA en el extremo C-terminal (HA). (véanse los Ejemplos)

Figura 3B: Expresión ectópica de Akt3 activada en células HEK293. Las células HEK293 se transfectaron con CMV6-MyrAkt3HA o sólo con el plásmido de expresión (CMV6). 24 horas después de las transfecciones, los lisados celulares se prepararon y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos anti-HA.

Figura 3C: La Akt3 activada posee actividad de Akt. Las células HEK293 se transfectaron con el plásmido de expresión de Akt3 activada (MyrAkt3HA) o sólo el vector de expresión (CMV6). 24 horas después de las transfecciones, los lisados celulares se prepararon y se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA. Se midieron las actividades de la quinasa Akt3 de los inmunoprecipitados, empleando un péptido sustrato obtenido a partir de GSK3. Bkgd: nivel de fondo de las células no transfectadas; CMV6: células transfectadas con CMV6; Akt3cak: células transfectadas con plásmido de expresión para Akt3 activada de forma constitutiva (CMV6-MyrAkt3HA). (véanse los Ejemplos).

Figura 4: La Akt3 activa inhibe la muerte celular inducida con ASK1 en las células HEK293.

Las células HEK293 se transfectaron con el plásmido CMV- $\beta$ -gal (0,1 mg) con la combinación de plásmidos indicada. La cantidad de ADN para cada transfección se mantuvo constante añadiendo el vector de CMV6. Akt3cak: CMV6-MyrAkt3HA (0,4 mg); ASK1: pCDNA3HA-ASK1-fl (0,4 mg). Dos días después de las transfecciones, las células se fijaron y se tiñeron con tinción de X-gal. Se contó el número de células positivas para  $\beta$ -gal (células azules) se contaron en cinco campos diferentes con un microscopio óptico. (Véanse los Ejemplos).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona ventajosamente un ácido nucleico aislado que codifica una nueva proteína o polipéptido Akt, denominada Akt3. Por tanto, un primer objeto de la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica una nueva proteína o polipéptido Akt3, bajo el control de regiones que permiten su expresión en células de mamífero. La invención también se refiere a vectores que contienen el ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido Akt. También se refiere a un vector vírico y a un ácido nucleico, tal y como se ha definido anteriormente.

Los diversos aspectos de la invención se describen con más detalle en las secciones siguientes, dirigidas a los ácidos nucleicos, los vectores, los virus, las composiciones y los métodos de tratamiento de la invención. Se pretende que esta organización en distintas secciones facilite la comprensión de la invención, y no se pretende de ningún modo que la limite.

### Definiciones

Los términos siguientes definidos se utilizan a lo largo de la presente memoria descriptiva, y deben ser de utilidad para entender el alcance y la práctica de la presente invención.

En una realización específica, el término “alrededor” o “aproximadamente” significa en el intervalo de un 20%, preferiblemente un 10%, y más preferiblemente un 5% de un determinado valor o intervalo.

Un “ácido nucleico” es un compuesto polimérico que comprende subunidades unidas covalentemente denominadas nucleótidos. El ácido nucleico incluye ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN), pudiendo ser ambos monocatenarios o bicatenarios. El ADN incluye ADNc, ADN genómico, ADN sintético, y ADN semi-sintético.

Un “gen” se refiere a un conjunto de nucleótidos que codifican un polipéptido e incluye los ácidos nucleicos del ADNc y del ADN genómico.

Una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que se ha sometido a una manipulación por tecnologías de biología molecular.

Un “vector” es cualquier medio para transferir un ácido nucleico en una célula hospedadora. Un vector puede ser un replicón al que se puede fijar otro segmento de ADN, de modo que tenga lugar la replicación del segmento fijado. Un “replicón” es cualquier elemento genético (p. ej., plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, es capaz de replicarse bajo su propio control. El término “vector” incluye medios víricos y no víricos para introducir el ácido nucleico en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Los vectores víricos incluyen retrovirus, virus asociados a adenovirus, pox virus, baculovirus, virus vaccinia, virus de herpes simplex, virus de Epstein-Barr y vectores de adenovirus, tal y como se explica con más detalle a continuación. Los vectores no víricos incluyen plásmidos, liposomas, lípidos cargados eléctricamente (citofectinas), complejos de ADN-proteína y biopolímeros. Además de un ácido nucleico, un vector también puede contener una o varias regiones reguladoras y/o marcadores seleccionables, útiles para seleccionar, medir y vigilar los resultados de la transferencia de ácidos nucleicos (transferencia a tales tejidos, duración de la expresión, etc.).

Un “vector de clonación” es un replicón, tal como un plásmido, un fago o un cósmido, al que se puede fijar otro segmento de ADN para conseguir la replicación del segmento fijado. Los vectores de clonación pueden tener capacidad de replicación en un tipo celular y de expresión en otro (“vector lanzadera”).

Una “casete” se refiere a un segmento de ADN que puede insertarse en un vector en sitios de restricción específicos. El segmento de ADN codifica un polipéptido de interés y la casete y los sitios de restricción están diseñados para asegurar la inserción de la casete en el marco de lectura apropiado para la transcripción y la traducción.

Una célula se ha “transfectado” con ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN se ha introducido dentro de la célula. Una célula se ha “transformado” con ADN exógeno o heterólogo cuando el ADN utilizado para transfectar la célula, ocasiona un cambio fenotípico. El ADN transformante puede integrarse (unido covalentemente) en el ADN cromosómico, constituyendo el genoma de la célula.

Una “molécula de ácido nucleico” se refiere a la forma polimérica del éster fosfato de los ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; “moléculas de ARN”) o de los desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina; “moléculas de ADN”) o a cualquiera de los análogos fosfoéster de

éste, tales como los fosforotioatos y tioésteres, ya sea en forma de una cadena única o de una hélice bicatenaria. Son posibles las hélices de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN bicatenarias. La expresión molécula de ácido nucleico y, en particular, molécula de ADN o ARN, se refiere únicamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a ninguna forma terciaria concreta. Por lo tanto, esta expresión comprende el ADN bicatenario encontrado, entre otras, en moléculas de ADN lineales o circulares (por ejemplo, fragmentos de restricción), plásmidos y cromosomas. En la exposición de la estructura de determinadas moléculas de ADN bicatenario, las secuencias pueden describirse en la presente memoria según el acuerdo habitual de proporcionar únicamente la secuencia en la dirección 5' a 3', a lo largo de la cadena de ADN no transcrita (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga a la del ARNm). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que se ha sometido a una manipulación según técnicas de biología molecular.

Una molécula de ácido nucleico se "puede hibridar" con otra molécula de ácido nucleico, tal como ADNc, ADN genómico o ARN, cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridarse con la otra molécula de ácido nucleico, en las condiciones apropiadas de temperatura y de intensidad iónica (véase Sambrook y col., mencionado anteriormente). Las condiciones de temperatura e intensidad iónica determinan la "restricción" de la hibridación. Para un escrutinio preliminar de los ácidos nucleicos homólogos, pueden usarse condiciones de hibridación poco restrictivas que se corresponden con una  $T_m$  de 55°, por ejemplo, 5x SSC, SDS al 0,1%, leche al 0,25%, y sin formamida; o formamida al 30%, 5x SSC, SDS al 0,5%. Las condiciones de hibridación moderadamente restrictivas se corresponden con una  $T_m$  mayor, por ejemplo, formamida al 40%, con 5x ó 6x SCC. Las condiciones muy restrictivas de la hibridación se corresponden con la  $T_m$  más alta, por ejemplo, formamida al 50%, 5x ó 6x SCC. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la restricción de la hibridación, son posibles uniones erróneas entre las bases. La restricción apropiada para la hibridación de ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables muy conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de  $T_m$  para los híbridos de los ácidos nucleicos que tienen esas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a la mayor  $T_m$ ) de las hibridaciones de ácidos nucleicos, disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. En el caso de híbridos con una longitud superior a 100 nucleótidos, se han obtenido ecuaciones para calcular la  $T_m$  (véase Sambrook y col., mencionado anteriormente, 9.50-0.51). Para hibridar con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, es más importante la posición de los desacoplamientos, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook y col., mencionado anteriormente, 11.7-11.8). Preferiblemente, una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es al menos de aproximadamente 10 nucleótidos; preferentemente al menos aproximadamente 15 nucleótidos y más preferentemente la longitud es al menos aproximadamente 20 nucleótidos.

En una realización específica, la expresión "condiciones de hibridación convencionales" se refiere a una  $T_m$  de 55°C, y se emplean las condiciones tal y como se han descrito anteriormente. En una realización preferida, la  $T_m$  es 60°C; en una realización más preferida, la  $T_m$  es 65°C.

Tal y como se emplea en esta memoria, el término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico, generalmente de al menos 18 nucleótidos, que se puede hibridar con una molécula de ADN genómico, una molécula de ADNc o una molécula de ARNm que codifica Akt3. Los oligonucleótidos se pueden marcar, p. ej., con  $^{32}\text{P}$ -nucleótidos o con nucleótidos a los que se ha conjugado covalentemente un marcador, tal como biotina. En una realización, un oligonucleótido marcado puede usarse como una sonda para detectar la presencia de un ácido nucleico que codifica Akt3. En otra realización, pueden usarse oligonucleótidos (pudiendo estar marcados uno o los dos) como cebadores para la PCR, para la clonación de toda la longitud o de un fragmento de Akt3, o para detectar la presencia de ácidos nucleicos que codifican Akt3. En otra realización, un oligonucleótido de la invención puede formar una hélice triple con una molécula de ADN de Akt3. Generalmente, los oligonucleótidos se preparan de manera sintética, preferiblemente en un sintetizador de ácidos nucleicos. De acuerdo con ésto, los oligonucleótidos pueden prepararse con enlaces fosfoéster análogos que no están presentes en la naturaleza, tales como enlaces tioéster, etc.

Una "secuencia codificante" de ADN es una secuencia de ADN bicatenaria que se transcribe y se traduce en un polipéptido en una célula *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificadora puede incluir, pero sin limitación, secuencias procarióticas, ADNc procedente de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico procedentes de ADN eucariótico (por ejemplo, de mamífero) e incluso secuencias de ADN sintéticas. Si la secuencia codificante se va a usar para la expresión en una célula eucariota, normalmente se localizará una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción en la posición 3', con respecto a la secuencia codificante.

Las secuencias de control de la transcripción y la traducción son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotoras, potenciadoras, terminadoras y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificadora en una célula hospedadora. En las células eucariotas, las señales de poliadenilación son secuencias de control.

Una "secuencia promotora" es una región reguladora del ADN, capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (en dirección 3'). Para definir la presente invención, la secuencia promotora se une a su extremo 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende aguas arriba (en dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción con niveles detectables por encima de los niveles basales. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la

## ES 2 310 515 T3

transcripción (definido convenientemente, por ejemplo, por cartografiado con la nucleasa S1), así como dominios de unión de proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa.

Una secuencia codificante está “bajo el control” de secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula, cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en ARNm, que después se corta y empalma (si la secuencia codificante contiene intrones) y se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

Tal y como se emplea en esta memoria, el término “homólogo”, en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre las proteínas que poseen un “origen evolutivo común”, incluyendo proteínas procedentes de superfamilias (por ejemplo, la superfamilia de las inmunoglobulinas) y proteínas homólogas procedentes de diferentes especies (por ejemplo, la cadena ligera de la miosina, etc.) (Reeck y col., 1987, Cell 50:667). Estas proteínas (y sus genes codificantes) tienen homología de la secuencia, como se refleja por su alto grado de similitud de la secuencia.

Por consiguiente, la expresión “similitud de secuencia”, en todas sus formas gramaticales, se refiere al grado de identidad o a la correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos de proteínas que pueden o no compartir un origen evolutivo común (véase Reeck y col., mencionado anteriormente). Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término “homólogo”, cuando se modifica con un adverbio tal como “muy”, puede hacer referencia a la similitud de la secuencia y no a un origen evolutivo común.

En una realización específica, dos secuencias de ADN son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando al menos aproximadamente 50% (preferiblemente al menos aproximadamente 75%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 90 ó 95%) de los nucleótidos se corresponden entre sí a lo largo de la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas, pueden identificarse comparando las secuencias usando el programa informático convencional disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de tipo Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas como las definidas para ese sistema particular. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas, está dentro del alcance de la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis y col., mencionado anteriormente; DNA Cloning, Vol. I y II, mencionado anteriormente; Nucleic Acid Hybridization, mencionado anteriormente.

Un “ácido nucleico complementario” es una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia transcrita. Los ácidos nucleicos complementarios se pueden emplear para reducir o bloquear la expresión del polipéptido codificado por la hebra transcrita.

Las secuencias de control de la transcripción y la traducción son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotoras, potenciadoras, terminadoras y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificadora en una célula hospedadora. En las células eucarióticas, las señales de poliadenilación son tipos adicionales de secuencias de control.

Una “secuencia señal” se incluye al principio de la secuencia codificadora de una proteína que se va a expresar en la superficie de una célula. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal del polipéptido maduro que dirige la célula hospedadora para translocar el polipéptido. La expresión “secuencia señal de translocación” se emplea en esta memoria refiriéndose a este tipo de secuencia señal. Las secuencias señal de translocación se pueden encontrar asociadas a una variedad de proteínas naturales en eucariotas y procariotas y son funcionales frecuentemente en ambos tipos de organismos.

“Región reguladora” significa una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de una segunda secuencia de ácido nucleico. Una región reguladora puede incluir secuencias que son responsables en la naturaleza de la expresión de un ácido nucleico particular (una región homóloga) o puede incluir secuencias con un origen diferente que son responsables de la expresión de proteínas diferentes o incluso de proteínas sintéticas (una región heteróloga). En particular, las secuencias pueden ser secuencias de genes eucarióticos o víricos o secuencias derivadas que estimulan o evitan la transcripción de un gen en una forma específica o no específica y de una forma inducible o no inducible. Las regiones reguladoras incluyen orígenes de replicación, sitios de corte y empalme del ARN, promotores, potenciadores, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias señal que dirigen el polipéptido a las rutas secretoras de la célula diana y promotores.

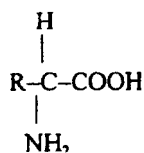
Una región reguladora procedente de una “fuente heteróloga” es una región reguladora que no está asociada de forma natural con el ácido nucleico expresado. Entre las regiones reguladoras heterólogas se incluyen regiones reguladoras procedentes de diferentes especies, regiones reguladoras procedentes de un gen diferente, secuencias reguladoras híbridas y secuencias reguladoras que no están presentes en la naturaleza pero que son diseñadas por una persona experta en la técnica.

Un ADN “heterólogo” se refiere a ADN que no se encuentra de forma natural en la célula o en un sitio cromosómico de la célula. Preferentemente, el ADN heterólogo incluye un gen ajeno a la célula.

Una “recombinación homóloga” se refiere a la inserción de una secuencia de ADN ajeno en otra molécula de ADN, p. ej., la inserción de un vector en un cromosoma. Preferentemente, el vector señala como diana un sitio cromosómico específico para la recombinación homóloga. Para la recombinación homóloga específica, el vector contendrá regio-

nes suficientemente largas de homología con secuencias del cromosoma, para permitir la unión complementaria y la incorporación del vector en el cromosoma. Regiones de homología más largas y grados superiores de similitud de la secuencia, pueden incrementar la eficacia de la recombinación homóloga.

- 5 Un “polipéptido” es un compuesto polímero compuesto de residuos de aminoácidos covalentemente enlazados. Los aminoácidos tienen la siguiente estructura general:



- 15 Los aminoácidos se clasifican en siete grupos basándose en la cadena lateral R: (1) cadenas laterales alifáticas, (2) cadenas laterales que contienen un grupo hidroxilo (OH), (3) cadenas laterales que contienen átomos de azufre, (4) cadenas laterales que contienen un grupo ácido o amida, (5) cadenas laterales que contienen un grupo básico, (6) cadenas laterales que contienen un anillo aromático, y (7) prolina, un iminoácido en el que la cadena lateral está fusionada con el grupo amino. Un polipéptido de la invención comprende preferentemente al menos aproximadamente 14 aminoácidos.

Una “proteína” es un polipéptido que tiene un papel estructural o funcional en una célula viva.

- 25 Una “variante” de un polipéptido o de una proteína es cualquier análogo, fragmento, derivado o mutante que se obtiene a partir de un polipéptido o proteína y que conserva al menos una característica biológica del polipéptido o de la proteína. En la naturaleza pueden existir diferentes variantes del polipéptido o de la proteína. Estas variantes pueden ser variaciones alélicas caracterizadas por diferencias en las secuencias de nucleótidos del gen estructural que codifica la proteína o pueden implicar una modificación diferencial por corte y empalme o post-traducciona. El experto en la técnica puede producir variantes que tienen una o varias sustituciones, deleciones, adiciones o cambios de aminoácidos. Estas variantes pueden incluir, entre otras: (a) variantes en las que uno o varios residuos de aminoácidos se sustituyen por aminoácidos conservadores o no conservadores (de la función de la proteína), (b) variantes en las que se añaden uno o varios aminoácidos al polipéptido o a la proteína, (c) variantes en las que uno o varios de los aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, y (d) variantes en las que el polipéptido o la proteína se fusionan con otro polipéptido, tal como seroalbúmina. Las técnicas para obtener estas variantes que incluyen las técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas, son conocidas por los expertos en la técnica. Una variante de la invención comprende preferentemente al menos aproximadamente 14 aminoácidos.

- 40 Si tales variaciones alélicas, análogos, fragmentos, derivados, mutantes y modificaciones que incluyen formas alternativas del ARNm por corte y empalme y formas alternativas de modificaciones post-traduccionales, dan como resultado derivados del polipéptido que conservan cualquiera de las características biológicas del polipéptido, se pretenden incluir en el alcance de esta invención.

Una “proteína heteróloga” se refiere a una proteína que no se produce de forma natural en la célula.

- 45 Dos secuencias de aminoácidos son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando más de aproximadamente el 40% de los aminoácidos son idénticos o más del 60% son similares (funcionalmente idénticos). Preferentemente, las secuencias similares u homólogas se identifican mediante la alineación, empleando por ejemplo, el programa de apilación de GCG (Genetics Computer Group, “Program Manual for the GCG Package”, Versión 7, Madison. Wisconsin).

- 55 La expresión “correspondiente a” se usa en esta memoria para hacer referencia a secuencias similares u homólogas, si la posición exacta de la de la molécula con la que se mide la homología o la similitud es tanto idéntica como diferente. Una alineación de las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos puede incluir espacios. De esta manera, la expresión “correspondiente a” se refiere a la similitud de la secuencia y no a la numeración de los residuos aminoacídicos o de las bases nucleotídicas.

#### *Genes que codifican proteínas Akt3*

- 60 La presente invención contempla el aislamiento de un gen que codifica una proteína o un polipéptido de Akt3 humana de la invención, que incluye una forma de Akt3 de longitud completa o presente en la naturaleza y cualquier fragmento antigénico específico de Akt3 humana de la misma. Tal y como se emplea en esta memoria, “Akt3” se refiere al polipéptido Akt3 y “akt3” se refiere al gen que codifica el polipéptido Akt3. Para los fines de la presente invención, el término Akt3 significa cualquier proteína o polipéptido capaz de inhibir la apoptosis y que comprende la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia sustancialmente similar. Preferentemente, la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia sustancialmente similar, se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína Akt3.



Preferentemente, la nueva Akt3 de acuerdo con la invención, comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2. Un ácido nucleico preferido de acuerdo con la invención codifica una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2. Más preferentemente, el ácido nucleico comprende una secuencia tal y como se describe en SEQ ID NO: 1.

Un primer objeto de la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica una nueva proteína o polipéptido Akt3 opcional bajo el control de regiones que permiten su expresión en células de mamífero. La invención también se refiere a vectores que contienen el ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido Akt3 y al uso de estos ácidos nucleicos o vectores para la preparación de composiciones farmacéuticas, destinadas al tratamiento quirúrgico y/o terapéutico del cuerpo humano o animal. También se refiere a cualquier composición farmacéutica que comprende un vector, tal y como un vector vírico y un ácido nucleico, tal y como se ha definido anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro del alcance de la técnica. Dichas técnicas están explicadas con detalle en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York (en esta memoria, "Sambrook y col., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II (D.N. Glover compilador, 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait compilador, 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames y S.J. Higgins compiladores (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, compiladores (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, compilador (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL press, (1986)]; B. Perbal. *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel y col. (compiladores), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Un gen que codifica Akt3, tanto ADN genómico como ADNc, se puede aislar a partir de cualquier fuente, particularmente a partir de un ADNc humano o de una genoteca genómica. Los métodos generales para obtener un gen *akt3* son bien conocidos en la técnica, tal y como se han descrito anteriormente (véase, p. ej., Sambrook y col., 1989, mencionado anteriormente).

Por tanto, cualquier célula animal puede servir potencialmente como fuente de ácidos nucleicos para la clonación molecular de un gen *akt3*. El ADN se puede obtener mediante procedimientos convencionales, conocidos en la técnica a partir de ADN clonado (p. ej., una "genoteca" de ADN), y preferentemente se obtiene a partir de una genoteca de ADNc preparada a partir de tejidos con alto nivel de expresión de la proteína (p. ej., corazón, páncreas y ADNc de músculo esquelético, puesto que estas son las células que indican altos niveles de expresión de Akt3), mediante síntesis química, mediante clonación de ADNc o mediante clonación de ADN genómico o fragmentos de los mismos, purificados a partir de la célula deseada (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, mencionado anteriormente; Glover, D.M. (compilador), 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach*. MRL Press. Ltd., Oxford. GB. Vol. I, II). Los clones obtenidos a partir de ADN genómico pueden contener regiones de ADN reguladoras e intrones, además de las regiones codificantes; los clones obtenidos a partir de ADNc no contendrán secuencias de intrones. Sea cual sea la fuente, el gen debe clonarse molecularmente en un vector apropiado para la propagación del gen.

Una vez que se han generado los fragmentos de ADN, se puede realizar de distintas formas la identificación del fragmento de ADN específico que contiene el gen *akt3* deseado. Por ejemplo, los fragmentos de ADN se pueden escrutar mediante hibridación de los ácidos nucleicos con una sonda marcada (Benton y Davis, 1977, *Science* 196: 80; Grunstein y Hogness, 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:3961). Los fragmentos de ADN que tienen una homología sustancial con la sonda, se hibridarán. Tal y como se ha indicado anteriormente, se puede emplear el mayor grado de homología y las condiciones de hibridación más restrictivas. En una realización específica, se emplean condiciones de hibridación de tipo Northern para identificar variantes por corte y empalme del ARNm de un gen *akt3*.

Una selección adicional se puede realizar basándose en las propiedades del gen, p. ej., si el gen codifica un producto proteico que tiene la composición de aminoácidos isoelectrica y electroforética o una secuencia parcial de los aminoácidos de la proteína Akt3, tal y como se ha descrito anteriormente. Por tanto, la presencia del gen se puede detectar mediante ensayos basados en las características físicas, químicas o inmunológicas de su producto expresado. Por ejemplo, se pueden seleccionar clones de ADNc o clones de ADN seleccionados por hibridación con los ARNm adecuados, que producen una proteína que, p. ej., tiene una migración electroforética similar o idéntica un comportamiento electroforético en gel con enfoque isoelectrico o sin pH de equilibrio, mapas de digestión proteolítica o propiedades antigénicas como las conocidas para Akt3. En una realización específica, la proteína expresada es reconocida por un anticuerpo policlonal que es generado contra un epítipo específico de la Akt3 humana, tal como dentro de la secuencia de aminoácidos Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys.

La presente invención también se refiere a genes (p. ej., ADNc) que tienen la misma actividad funcional que Akt3 u homóloga a Akt3 y sus homólogos procedentes de otras especies. La producción y el uso de derivados y análogos relacionados con Akt3 están dentro del alcance de la presente invención. Tales variantes, análogos, derivados y homólogos deben conservar la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia. En una realización específica, el derivado o el análogo está funcionalmente activo, es decir, es capaz de mostrar una o varias actividades funcionales asociadas con una Akt3 de tipo silvestre de longitud completa de la invención.

Los derivados de Akt3 pueden obtenerse alterando secuencias de ácido nucleico codificantes mediante sustituciones, adiciones o deleciones que proporcionan moléculas funcionalmente equivalentes. Preferiblemente, se obtienen derivados que tienen una actividad funcional potenciada o aumentada con respecto a la Akt3 natural.

Debido a la degeneración de las secuencias nucleotídicas codificantes, en la práctica de la presente invención pueden usarse otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que un gen *akt3*, incluyendo una secuencia de aminoácidos que contiene una variante de un solo aminoácido. Éstas incluyen, pero sin limitación, genes alélicos, genes homólogos procedentes de otras especies y secuencias de nucleótidos que comprenden todo o partes de los genes *akt3*, los cuales se han alterado por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo residuo de aminoácido dentro de la secuencia, produciendo de esta manera un cambio silencioso. De manera similar, los derivados de Akt3 de la invención incluyen, pero sin estar limitados a los mismos, los que contienen, como secuencia de aminoácidos primaria, toda o parte de la secuencia de aminoácidos de una proteína Akt3, incluyendo secuencias alteradas en las que residuos dentro de la secuencia se sustituyen por residuos de aminoácidos funcionalmente equivalentes, dando como resultado una sustitución de aminoácidos conservadora. Por ejemplo, uno o más residuos aminoácidos dentro de la secuencia pueden sustituirse por otro aminoácido de polaridad similar, que actúa como equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa. Los sustituyentes para un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos que contienen estructuras de anillo aromático son fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No es de esperar que estas alteraciones afecten al peso molecular aparente determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida o al punto isoelectrónico.

Son sustituciones particularmente preferidas:

- Arg por Lys y viceversa, de tal manera que pueda mantenerse la carga positiva;
- Asp por Glu y viceversa de tal manera que pueda mantenerse la carga negativa;
- Thr por Ser, de tal manera que pueda mantenerse un -OH libre; y
- Asn por Gln, de modo que se pueda mantener un CONH<sub>2</sub> libre.

También pueden introducirse sustituciones de aminoácido para sustituir un aminoácido por otro con una característica particularmente preferida. Por ejemplo, una Cys puede introducir un sitio potencial para puentes disulfuro con otra Cys. Una His puede introducirse como un sitio particularmente "catalítico" (es decir, His puede actuar como un ácido o base y es el aminoácido más común en la catálisis bioquímica). Pro puede introducirse debido a su estructura particularmente plana, que induce giros  $\beta$  en la estructura de la proteína.

Los genes que codifican derivados de Akt3 y los análogos de la invención, se pueden producir mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las manipulaciones que tienen como resultado su producción, pueden realizarse a nivel génico o a nivel proteico. Por ejemplo, la secuencia clonada del gen de Akt3 se puede modificar con cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica (Sambrook y col. 1989, mencionado anteriormente). La secuencia puede escindirse en sitios apropiados con una o más endonucleasas de restricción, seguido de una modificación enzimática adicional, y si se desea aislarse y ligarse *in vitro*. En la producción del gen que codifica un derivado o un análogo de Akt3, debe tenerse cuidado de asegurar que el gen modificado permanece dentro del mismo marco de lectura de la traducción que el gen de Akt3, sin interrumpirse por señales de parada de la traducción, en la región del gen en la que se codifica la actividad deseada.

Adicionalmente, la secuencia de ácido nucleico que codifica Akt3 se puede mutar *in vitro* o *in vivo*, para crear y/o destruir secuencias de la traducción, iniciación y/o terminación, o para crear variaciones en las regiones codificadoras y/o formar nuevos sitios para las endonucleasas de restricción o destruir los ya existentes, para facilitar una modificación adicional *in vitro*. Preferentemente, tales mutaciones potencian la actividad funcional del producto génico mutado de Akt3. Puede usarse cualquier técnica para mutagénesis conocida en la técnica, incluyendo pero sin limitación, la mutagénesis dirigida *in vitro* (Hutchinson, C., y col., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551; Zoller y Smith, 1984, DNA 3:479-488; Oliphant y col., 1986, Gene 44:177; Hutchinson y col., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:710), y el uso de enlazadores TAB<sup>®</sup> (Pharmacia), etc. Para la mutagénesis dirigida al sitio, se prefieren técnicas de PCR (véase Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", en PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, compilador, Stockton Press, Capítulo 6, páginas, 61-70).

El gen identificado y aislado puede insertarse después en un vector de clonación apropiado. Puede usarse un gran número de sistemas de vector-hospedador conocidos en la técnica. Los posibles vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos o virus modificados, pero el sistema del vector debe ser compatible con la célula hospedadora usada. Ejemplos de vectores incluyen, sin estar limitados a los mismos, *E. coli*, bacteriófagos tales como el derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados de pBR322 o derivados del plásmido pUC, p. ej., vectores pGEX, pmal-c, pFLAG, etc. La inserción en un vector de clonación se puede realizar, p. ej., ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tenga extremos cohesivos complementarios. Sin embargo, si los sitios de restricción complementarios

usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Como alternativa, puede producirse cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) a los extremos del ADN: estos enlazadores ligados pueden comprender oligonucleótidos específicos sintetizados químicamente que codifican secuencias de reconocimiento de las endonucleasas de restricción. Las moléculas recombinantes pueden introducirse en las células hospedadoras por transformación, transfección, infección, electroporación, etc. de manera que se generen muchas copias de la secuencia del gen. Preferiblemente, el gen clonado está contenido en un plásmido de vector lanzadera que proporciona expansión en una célula de clonación, por ejemplo, *E. coli*, y facilita la purificación para una inserción posterior en una línea celular de expresión apropiada, si se desea. Por ejemplo, un vector lanzadera, que es un vector que puede replicarse en más de un tipo de organismo, puede prepararse para la replicación, tanto en *E. coli* como en *Saccharomyces cerevisiae* por medio de la unión de secuencias de un plásmido de *E. coli* a secuencias del plásmido 2  $\mu$  de la levadura.

#### *Expresión de polipéptidos de Akt3*

La secuencia de nucleótidos que codifica Akt3 o un fragmento antigénico, un derivado o un análogo de la misma, o un derivado funcionalmente activo que incluye una proteína quimérica de la misma, se puede insertar en un vector de expresión adecuado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia insertada codificadora de la proteína. Estos elementos se denominan en este documento un “promotor”. Por tanto, el ácido nucleico de la invención está funcionalmente asociado a un promotor en un vector de expresión de la invención. Tanto las secuencias de ADNc como las secuencias genómicas pueden clonarse y expresarse bajo el control de estas secuencias reguladoras. Un vector de expresión preferiblemente también incluye un origen de replicación.

Las señales necesarias para la transcripción y la traducción pueden proporcionarse en un vector de expresión recombinante, o pueden suministrarse a través del gen natural que codifica Akt3 y/o sus regiones flanqueantes.

Los posibles sistemas de hospedador-vector incluyen, pero sin limitación, sistemas de células de mamífero infectadas con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de células de insecto infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Los elementos de expresión de los vectores varían en sus intensidades y especificidades. Dependiendo del sistema hospedador-vector utilizado, puede usarse cualquiera entre varios elementos de la transcripción y la traducción adecuados.

Una proteína de Akt3 recombinante de la invención o un fragmento funcional, un derivado, una estructura artificial quimérica o un análogo de la misma, se puede expresar en el cromosoma, después de integrar la secuencia codificante por recombinación. A este respecto, para conseguir altos niveles de expresión génica estable, puede usarse cualquiera entre varios sistemas de amplificación (véase Sambrook y col., 1989, mencionado anteriormente).

La célula en la que está el vector recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica Akt3, se cultiva en un medio de cultivo celular apropiado en condiciones que permiten la expresión de Akt3 en la célula. Para construir vectores de expresión que contienen un gen que consta de las señales de control de la transcripción/traducción apropiadas y las secuencias codificantes de la proteína, puede usarse cualquiera de los métodos descritos previamente para la inserción de fragmentos de ADN en un vector de clonación. Estos métodos pueden incluir técnicas sintéticas y técnicas de ADN recombinante *in vitro* y la recombinación *in vivo* (recombinación genética).

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de Akt3 se puede ligar funcionalmente y controlar a través de cualquier región reguladora, es decir, un elemento promotor/potenciador conocido en la técnica, pero estos elementos reguladores deben ser funcionales en el tumor diana del hospedador seleccionado para la expresión. Las regiones reguladoras pueden comprender una región promotora para la transcripción funcional en la célula hospedadora, así como una región situada en 3' del gen de interés y que especifica una señal para la terminación de la transcripción y un sitio de poliadenilación. Todos estos elementos constituyen una casete de expresión.

Los promotores que pueden utilizarse en la presente invención incluyen promotores constitutivos y promotores regulados (inducibles). El promotor puede ser responsable de forma natural de la expresión del ácido nucleico. También puede proceder de una fuente heteróloga. En particular, pueden ser secuencias promotoras de genes eucarióticos o víricos. Por ejemplo, pueden ser secuencias promotoras obtenidas a partir del genoma de la célula que se desea infectar. De forma similar, pueden ser secuencias promotoras obtenidas a partir del genoma de un virus, tal como un adenovirus (E1A y MLP), citomegalovirus o el virus del sarcoma de Rous. Además, el promotor se puede modificar añadiendo secuencias activadoras o reguladoras o secuencias que permiten una expresión específica del tejido o de tipo predominante (promotores de la enolasa y de GFAP, y similares). Además, cuando el ácido nucleico no contiene secuencias promotoras, se puede insertar.

Algunos promotores útiles en la práctica de esta invención son promotores activados permanentemente (p. ej., HPRT, vimentina, actina, tubulina), promotores de filamentos intermedios (p. ej., desmina, neurofilamentos, queratina, GFAP), promotores de genes terapéuticos (p. ej., de tipo MDR, CFTR, factor VIII), promotores específicos del tejido (p. ej., promotor de la actina en células del músculo liso), promotores que se activan preferentemente en células en división, promotores que responden a un estímulo (p. ej., el receptor de la hormona esteroide, el receptor del ácido retinoico), moduladores de la transcripción regulados con tetraciclina, el promotor temprano inmediato de citomega-

lovirus (CMV), el promotor de LTR retroviral, el promotor de la metalotioneína, promotor de SV-40, el promotor de adenovirus E1a, y el promotor tardío principal de adenovirus (MLP). Los moduladores transcripcionales regulados con tetraciclina y los promotores de CMV, se describen en los documentos WO 96/01313, US 5.168.062 y 5.385.839.

Más específicamente, la expresión de la proteína Akt3 se puede controlar con cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la técnica, pero estos elementos reguladores deben ser funcionales en el hospedador seleccionado para la expresión. Los promotores que pueden usarse para controlar la expresión génica incluyen, pero sin limitación, la región promotora temprana de SV40 (Benoist y Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del Sarcoma de Rous (Yamamoto, y col., 1980, *Cell* 22:787-797), el promotor de la timidina quinasa del virus herpes (Wagner y col., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster y col., 1982, *Nature* 296:39-42); los vectores de expresión procarióticos, tales como el promotor de la  $\beta$ -lactamasa (Villa-Kamaroff y col., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731), o el promotor *tac* (DeBoer y col., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25); véase también "Useful proteins from recombinant bacteria" en *Scientific American*, 1980, 242:74-94; elementos promotores de la levadura u otros hongos tales como el promotor de Gal 4, el promotor de ADC (alcohol deshidrogenasa), el promotor de PGK (fosfoglicerol quinasa), el promotor de la fosfatasa alcalina; y regiones de control de la transcripción de animales, que presentan especificidad del tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen I de la elastasa que es activo en las células acinares pancreáticas (Swift y col., 1984, *Cell*, 38:639-646; Ornitz y col., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que está activo en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature*, 315:115-122), la región de control del gen de inmunoglobulina que está activo en las células linfoides (Grosschedl y col., 1984, *Cell*, 38:647-658; Adames y col., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander y col., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444), la región de control del virus de tumor mamario de ratón que está activo en los testículos, la mama, las células linfoides y los mastocitos (Leder y col., 1986, *Cell* 45:485-495), la región de control del gen de la albúmina que está activo en el hígado (Pinkert y col., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276), la región de control del gen de la alfa-fetoproteína que está activo en el hígado (Krumlauf y col., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer y col., 1987, *Science* 235:53-58), la región de control del gen de alfa 1-antitripsina que está activo en el hígado (Kelsey y col., 1987, *Genes y Devel.* 1:161-171), la región de control del gen de la beta-globina que está activo en las células mieloides (Mogam y col., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias y col., 1986, *Cell*, 46:89-94), la región de control del gen de la proteína básica de mielina que está activo en las células oligodendroglíticas del cerebro (Readhead y col., 1987, *Cell*, 48:703-712), la región de control del gen de la cadena ligera-2 de miosina que está activo en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature*, 314:283-286) y la región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrópica que está activo en el hipotálamo (Mason y col., 1986, *Science*, 234:1372-1378).

Los vectores de expresión que contienen ácido nucleico que codifica una Akt3 de la invención, se pueden identificar por cinco estrategias generales: (a) amplificación con PCR del ADN plasmídico deseado o del ARNm específico, (b) hibridación del ácido nucleico, (c) presencia o ausencia de funciones de selección del gen marcador, (d) análisis con endonucleasas de restricción adecuadas, y (e) expresión de secuencias insertadas. En la primera estrategia, los ácidos nucleicos se pueden amplificar con PCR para proporcionar la detección del producto amplificado. En la segunda estrategia, la presencia de un gen ajeno insertado en un vector de expresión, se puede detectar con la hibridación del ácido nucleico, empleando sondas que comprenden secuencias que son homólogas a un gen marcador insertado. En la tercera estrategia, el sistema recombinante vector/hospedador se puede identificar y seleccionar basándose en la presencia o la ausencia de ciertas funciones "marcadoras para la selección" del gen (p. ej., actividad  $\beta$ -galactosidasa, actividad timidina-quinasa, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.) debidas a la inserción de genes ajenos en el vector. En otro ejemplo, si el ácido nucleico que codifica Akt3 se inserta dentro de la secuencia del gen "marcador para la selección" del vector, los recombinantes que contengan el inserto de Akt3, se pueden identificar por la ausencia de la función génica. En la cuarta estrategia, los vectores de expresión recombinantes se identifican por la digestión con enzimas de restricción adecuadas. En la quinta estrategia, los vectores de expresión recombinantes se pueden identificar sometiendo a ensayo la actividad, las características bioquímicas o inmunológicas del producto génico expresado por el recombinante, con la condición de que la proteína expresada asuma una conformación funcionalmente activa.

En la expresión de las secuencias de ADN de esta invención puede emplearse una amplia diversidad de combinaciones de hospedador/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, los plásmidos de *E. coli* col E1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith y col., 1988, *Gene* 67:31-40), pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fago, por ejemplo, los numerosos derivados del fago 1, por ejemplo, NM989, y otros ADN de fago, por ejemplo, ADN monocatenario de fago M13 y filamentosos; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2m o derivados del mismo; vectores útiles en células eucariotas tales como vectores útiles en células de insecto o de mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADNs de fago, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de la expresión; y similares.

Por ejemplo, en un sistema de expresión de baculovirus, pueden usarse tanto vectores de transferencia sin fusión, tales como pero sin limitación, pVL941 (sitio de clonación *Bam*HI; Summers), pVL1393 (*Bam*HI, *Sma*I, *Xba*I, *Eco*RI, *Not*I, *Xma*III, *Bgl*II, y el sitio de clonación de *Pst*I: Invitrogen), pVL1392 (los sitios de clonación de *Bgl*II, *Pst*I, *Not*I, *Xma*III, *Eco*RI, *Xba*I, *Sma*I y *Bam*HI; Summers e Invitrogen) y pBlueBacIII (sitios de clonación de *Bam*HI, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I y *Hind*III, siendo posible un escrutinio recombinante de color azul/blanco; Invitrogen), y vectores de

transferencia de fusión tales como, pero sin limitación, pAc700 (sitio de clonación *Bam*HI y *Kpn*I, en donde el sitio de reconocimiento de *Bam*HI empieza con el codón de iniciación; Summers), pAc701 y pAc702 (igual que pAc700, con diferentes marcos de lectura), pAc360 (sitio de clonación de *Bam*HI, 36 pares de bases aguas abajo de un codón de iniciación de polihedrina; Invitrogen (195)), y pBlueBacHisA, B, C (tres marcos de lectura diferentes, con sitio de clonación de *Bam*HI, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I y *Hind*III, un péptido N-terminal para la purificación con ProBond, y un escrutinio de las placas recombinantes por el color azul/blanco; Invitrogen (220)).

Los vectores de expresión de mamífero contemplados para uso en la invención incluyen vectores con promotores inducibles tales como el promotor de la dihidrofolato reductasa (DHFR), por ejemplo, cualquier vector de expresión con un vector de expresión de *DHFR*, o un vector de co-amplificación de *DHFR*/metotrexato, tal como pED (sitio de clonación *Pst*I, *Sal*I, *Sba*I, *Sma*I, y *Eco*RI, expresando el vector tanto el gen clonado como *DHFR*; véase Kaufman. Current Protocols in Molecular Biology, 16.12 (1991)). Como alternativa, puede usarse un vector de co-amplificación de glutamina sintetasa/metionina sulfoximina, tal como pEE14 (sitio de clonación de *Hind*III, *Xba*I, *Sma*I, *Sba*I, *Eco*RI, y *Bcl*I, en el que el vector expresa la glutamina sintasa y el gen clonado; Celltech). En otra realización, puede usarse un vector que dirige la expresión episomal bajo el control del Virus de Epstein Barr (EBV), tal como pREP4 (sitio de clonación de *Bam*HI, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II, y *Kpn*I, Repetición Terminal Larga del Virus del Sarcoma de Rous constitutivo (RSV-LTR) el marcador de selección de higromicina; Invitrogen), pCEP4 (sitio de clonación de *Bam*HI, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II y *Kpn*I, el gen temprano inmediato de citomegalovirus humano constitutivo (hCMV), el marcador de selección de higromicina; Invitrogen), pMEP4 (sitio de clonación de *Kpn*I, *Pvu*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, *Bam*HI, el promotor inducible del gen IIa de la metalotioneína, marcador de selección de higromicina; Invitrogen), pREP8 (sitio de clonación de *Bam*HI, *Xho*I, *Not*I, *Hind*III, *Nhe*I, y *Kpn*I, el promotor de RSV-LTR, el marcador de selección de histidinol; Invitrogen), pREP9 (sitio de clonación de *Kpn*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I y *Bam*HI, el promotor de RSV-LTR, el marcador de selección de G418; Invitrogen), y pEBVHis (promotor de RSV-LTR, marcador de selección de la higromicina, péptido N-terminal purificable por medio de una resina ProBond y escindido por enteroquinasa; Invitrogen). Los vectores de expresión en mamífero que pueden seleccionarse para uso en la invención incluyen pRc/CMV (sitio de clonación de *Hind*III, *Bst*XI, *Not*I, *Sba*I, y *Apa*I, selección con G418; Invitrogen), pRc/RSV (sitio de clonación de *Hind*III, *Spe*I, *Bst*XI, *Not*I, *Xba*I, selección con G418; Invitrogen), y otros. Los vectores de expresión en mamífero del virus vaccinia (véase, Kaufman, 1991, mencionado anteriormente) para uso de acuerdo con la invención, incluyen pero no están limitados a pSC11 (sitio de clonación de *Sma*I, selección con TK y  $\beta$ -gal), pMJ601 (sitio de clonación de *Sal*I, *Sma*I, *Afl*I, *Nar*I, *Bsp*MI, *Bam*HI, *Apa*I, *Nhe*I, *Sac*II, *Kpn*I y *Hind*III; selección con TK y  $\beta$ -gal), y pTKgptFIS (sitio de clonación de *Eco*RI, *Pst*I, *Sal*I, *Acc*I, *Hind*II, *Sba*I, *Bam*HI y *Hpa*I, selección con TK o XPRT).

De acuerdo con la invención, también pueden usarse sistemas de expresión en levadura para expresar Akt3. Por ejemplo, de acuerdo con la invención puede emplearse el vector pYES2 sin fusión (sitio de clonación de *Xba*I, *Sph*I, *Sho*I, *Not*I, *Gst*XI, *Eco*RI, *Bst*XI, *Bam*HI, *Sac*I, *Kpn*I y *Hind*III; Invitrogen) o la fusión pYESHisA, B, C (sitio de clonación de *Xba*I, *Sph*I, *Sho*I, *Not*I, *Bst*XI, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sac*I, *Kpn*I, y *Hind*III, péptido N-terminal purificado con resina ProBond y escindido con enteroquinasa; Invitrogen), por mencionar sólo dos.

Una vez que se ha identificado y aislado una molécula de ADN recombinante particular, pueden usarse diversos métodos conocidos en la técnica para propagarla. Una vez establecido un sistema hospedador y las condiciones de crecimiento adecuadas, pueden propagarse y prepararse grandes cantidades de vectores de expresión recombinante. Como se ha explicado previamente, los vectores de expresión que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, los siguientes vectores o sus derivados: virus humanos o animales tales como virus vaccinia o adenovirus; virus de insectos tales como baculovirus; vectores de levadura; vectores de bacteriófago (por ejemplo, lambda), y vectores de ADN plasmídico y cósmico, por nombrar algunos.

Además, puede elegirse una cepa de células hospedadoras que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Las diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento traduccional y post-traduccional y la modificación de proteínas. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento deseados de la proteína extraña expresada. La expresión en levaduras puede producir un producto biológicamente activo. La expresión en células eucariotas puede aumentar la probabilidad de plegamiento "natural". Además, la expresión en células de mamífero puede proporcionar una herramienta para reconstituir o constituir la actividad de Akt3. Además, diferentes sistemas de expresión de vector/hospedador pueden afectar a las reacciones de procesamiento, tales como escisiones proteolíticas, en una medida diferente.

Los vectores introducidos en las células hospedadoras deseadas, por métodos conocidos en la técnica, p. ej., transfección, electroporación, transducción por microinyección, fusión celular. DEAE dextrano, precipitación con fosfato cálcico, lipofección (fusión de lisosomas), uso de una pistola génica o un transportador de vectores de ADN (véase, p. ej., Wu y col., 1992, J. Biol. Chem. 267:963-967; Wu y Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263:14621-14624; Hartmut y col., documento de Solicitud de Patente Canadiense N° 2.012.311, presentada el 15 de marzo de 1990).

Pueden obtenerse formas solubles de la proteína recogiendo el fluido del cultivo o solubilizando cuerpos de inclusión, por ejemplo, por tratamiento con detergente, y si se desea someter a ultrasonidos u a otros procesos mecánicos, tales como los que se han descrito anteriormente. La proteína solubilizada o soluble se puede aislar empleando diversas técnicas, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), enfoque isoeléctrico, electroforesis en gel bidimensional, cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, de afinidad, de inmunoafinidad, y cromatografía en columna

por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, inmunoprecipitación o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas.

#### Anticuerpos para Akt3

De acuerdo con la invención, un polipéptido de Akt3 producido por síntesis recombinante o química, y sus fragmentos u otros derivados o análogos del mismo, que incluyen proteínas de fusión, se pueden emplear como antígeno o inmunógeno para generar anticuerpos. Preferentemente, los anticuerpos se unen de forma específica a Akt3 humana, pero no se unen a otras formas de Akt. Más preferentemente, los anticuerpos reconocen un epítipo dentro de un péptido que tiene la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia sustancialmente similar.

Una molécula es “antigénica” cuando puede interaccionar de forma específica con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmune, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o un receptor de antígenos de linfocitos T. Un polipéptido antigénico contiene al menos aproximadamente 5 y preferiblemente al menos aproximadamente 10 aminoácidos. Una parte antigénica de una molécula puede ser la parte que es inmunodominante para el reconocimiento del anticuerpo o del receptor de linfocitos T, o puede ser una parte usada para generar un anticuerpo contra la molécula, por conjugación de la parte antigénica con una molécula de soporte para la inmunización. Una molécula que es antigénica no necesita ser inmunógena, es decir, capaz de inducir una respuesta inmune sin un soporte.

Tales anticuerpos incluyen, sin estar limitados a los mismos, los policlonales, monoclonales, quiméricos y monocatenarios. Los fragmentos Fab y una genoteca de expresión de Fab. Los anticuerpos anti-Akt3 de la invención pueden reaccionar de forma cruzada, p. ej., pueden reconocer Akt3 procedente de diferentes especies. Los anticuerpos policlonales tienen mayor probabilidad de presentar reacción cruzada. Alternativamente, un anticuerpo de la invención puede ser específico de una forma única de Akt3, tal como la Akt3 humana. Preferentemente, un anticuerpo tal es específico para la Akt3 humana.

Se pueden utilizar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales. Para la producción de anticuerpos, se pueden inmunizar diversos animales hospedadores mediante inyección del polipéptido Akt3 o un derivado (p. ej., un fragmento o una proteína de fusión) del mismo, incluyendo sin estar limitado a los mismos, conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. En una realización, el polipéptido de Akt3 o un fragmento del mismo, se puede conjugar con un vehículo inmunógeno, p. ej., seroalbúmina bovina (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH). Para aumentar la respuesta inmunológica pueden usarse diversos adyuvantes, dependiendo de la especie del hospedador, que incluyen pero sin limitación, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo *Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos al polipéptido Akt3 o a un fragmento, un análogo o un derivado del mismo, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo a través de líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, pero sin limitación, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein [Nature 256:495-497 (1975)], así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos [Kozbor y col., Immunology Today 4:72 (1983); Cote y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030 (1983)], y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole y col., en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96 (1985)]. En una realización adicional de la invención, pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales exentos de patógenos [documento de Publicación de la Patente Internacional N° WO 89/12690, publicada el 28 de diciembre de 1989]. De hecho, de acuerdo con la invención, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos” [Morrison y col., J. Bacteriol. 159:870 (1984); Neuberger y col., Nature 312:604-608 (1984); Takeda y col., Nature 314:452-454 (1985)] por corte y empalme de los genes procedentes de una molécula de anticuerpo de ratón, específica para un polipéptido de Akt3, junto con genes procedentes de una molécula de anticuerpo humana con la actividad biológica apropiada; estos anticuerpos están dentro del alcance de esta invención. Estos anticuerpos quiméricos humanos o humanizados se prefieren para uso en la terapia de enfermedades o trastornos humanos (descritos más adelante), ya que los anticuerpos humanos o humanizados tienen mucha menos probabilidad de inducir una respuesta inmune, que los anticuerpos xenogénicos en particular una respuesta alérgica, por sí mismos.

De acuerdo con la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos Fv monocatenarios (scFv) [documentos de Patentes de Estados Unidos N° 5.476.786 y 5.132.405 de Huston; documento de Patente de Estados Unidos 4.946.778] pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios específicos para el polipéptido Akt3. Una realización adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de genotecas de expresión de Fab [Huse y col., Science 246:1275-1281 (1989)] para permitir una identificación rápida y fácil de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada hacia un polipéptido de Akt3, o sus derivados o análogos.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo de la molécula del anticuerpo por técnicas conocidas. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen, pero sin limitación: el fragmento F(ab')<sub>2</sub> que puede producirse por digestión con pepsina de la molécula del anticuerpo; los fragmentos Fab' que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab')<sub>2</sub> y los fragmentos Fab que pueden generarse tratando la molécula del anticuerpo con papaína y un agente reductor.

En la producción de anticuerpos, el escrutinio del anticuerpo deseado puede realizarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos de tipo “sándwich”, radioinmunoensayos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisotópicos, por ejemplo), transferencias de tipo Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel y ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. En una realización, la unión del anticuerpo se detecta detectando un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo al anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen muchos métodos en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo y están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un epítipo específico de un polipéptido de Akt3, se pueden someter a ensayo hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de polipéptido de Akt3 que contiene tal epítipo. Un fragmento preferido comprende la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys. Para la selección de un anticuerpo específico contra un polipéptido de Akt3 procedente de una especie particular de animal, se puede seleccionar basándose en la unión positiva con el polipéptido de Akt3 expresado o aislado a partir de células de esa especie de animal.

Los anticuerpos anteriores pueden usarse en métodos conocidos en la técnica, relacionados con la localización y la actividad del polipéptido de Akt3, por ejemplo, para la transferencia de tipo Western, la formación de imágenes del polipéptido de Akt3 *in situ*, medición de sus niveles en muestras fisiológicas apropiadas, etc., usando cualquiera de las técnicas de detección mencionadas anteriormente o conocidas en la técnica.

En una realización específica, pueden generarse anticuerpos que sean agonistas o antagonistas de la actividad del polipéptido de Akt3. Estos anticuerpos pueden someterse a ensayo con los ensayos descritos más adelante para identificar ligandos. En particular, estos anticuerpos pueden ser anticuerpos scFv expresados intracelularmente.

#### *Terapia Génica y Vectores Transgénicos*

La destrucción de los miocitos cardíacos por apoptosis y necrosis contribuye al infarto agudo de miocardio y a la insuficiencia cardíaca. La Akt3 humana inhibe la apoptosis inducida con ASK1 y por hipoxia y la muerte celular. Por tanto, la presente invención incluye una terapia génica mediante la administración de un ácido nucleico que codifica una proteína Akt3 humana a un paciente. En caso de infarto agudo de miocardio, de la terapia génica que emplea Akt3 se espera una reducción de la cantidad de muerte celular y del tamaño final del infarto, dando de este modo como resultado una función mejorada posterior al infarto una calidad de vida mejorada y una mortalidad reducida. Además, un tamaño reducido del infarto se espera que disminuya el número de pacientes que desarrollan insuficiencia cardíaca después del infarto. En los pacientes que tienen insuficiencia cardíaca, la reducción de la pérdida de miocitos mediante terapia génica con Akt3, se espera que retarde el proceso de dilatación ventricular, ralentice el desarrollo de la enfermedad, mejore la calidad de vida y reduzca la necesidad de hospitalización.

Durante el infarto agudo de miocardio, el proceso de lesión por isquemia-reperfusión produce la muerte celular. Akt-3 inhibe la muerte celular. Por ello, se espera que la terapia génica con Akt3 sea un tratamiento eficaz para otros estados de la enfermedad que implican lesión por isquemia-reperfusión, incluyendo sin estar limitados a los mismos, la lesión miocárdica por isquemia y reperfusión, el ictus, el daño hepático, la insuficiencia renal, el trasplante de órganos (especialmente cardíaco) y los injertos de derivación coronarios. Además, la terapia génica con Akt3 se espera que sea un tratamiento eficaz para otros estados de enfermedad que implican la muerte celular mediante apoptosis, incluyendo pero sin estar limitado a los mismos, la enfermedad de Alzheimer, la degeneración hepática y la osteoartritis.

Los ácidos nucleicos de la invención, cuando se incorporan de forma adecuada en los vectores, y las composiciones farmacéuticas que los contienen, se pueden emplear para el tratamiento de muchas patologías. Se pueden emplear para la transferencia y la expresión de genes *in vivo* en cualquier tipo de tejido, especialmente el corazón. Además, el tratamiento se puede dirigir de acuerdo con la patología que se va a tratar (la transferencia a un tejido particular se puede determinar por la elección de un vector y la expresión por la elección de un promotor particular). Los ácidos nucleicos o los vectores de la invención se emplean de forma ventajosa para la producción de proteínas capaces de actuar específicamente sobre diversas funciones celulares, tales como la protección de la muerte celular inducida por hipoxia, la apoptosis, el infarto de miocardio, la necrosis, la proliferación celular, la síntesis de metabolitos, la síntesis de proteínas, la replicación del ADN y/o la transcripción y similares, en seres humanos o en animales, *in vivo* e intracelularmente. La presente invención posibilita el tratamiento específico, local y eficaz de disfunciones celulares al inicio de las patologías o como resultado de las mismas, y específicamente la apoptosis implicada.

Como se ha descrito anteriormente, un “vector” es cualquier medio para la transferencia de un ácido nucleico de acuerdo con la invención, en una célula hospedadora. Los vectores preferidos son vectores víricos, tales como retrovirus, virus del herpes, adenovirus y virus asociados a adenovirus. Por tanto, un gen que codifica una proteína Akt3 o un fragmento de un dominio del polipéptido de la misma, se introduce *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro* empleando un vector vírico o mediante la introducción directa del ADN. La expresión en tejidos diana puede realizarse dirigiendo el vector transgénico a células específicas, tal como con un vector vírico o un ligando de receptor, o usando un promotor con especificidad de tejido, o ambas cosas.

Los vectores de expresión de la invención se pueden emplear, tal y como se ha indicado anteriormente, para transfectar células para escrutar o someter a ensayo biológico los moduladores de la actividad de Akt3, o para entregar un gen *akt3* o un gen complementario de *akt3*, *in vivo* o *ex vivo* para terapia génica, p. ej., para incrementar o disminuir el nivel de la actividad de Akt3. Un vector que expresa un scFv anti-Akt3 también puede introducirse usando las técnicas descritas más adelante.

Los vectores víricos habitualmente usados para dirigir hacia una diana *in vivo* o *ex vivo* y los procedimientos de terapia son vectores a base de ADN y vectores retrovíricos. Se conocen en la técnica métodos para construir y usar vectores víricos [véase, por ejemplo, Miller y Rosman, *BioTechniques* 7:980-990 (1992)]. Preferiblemente, los vectores víricos son defectuosos para la replicación, es decir, no son capaces de replicarse autónomamente en la célula diana. En general, el genoma de los vectores víricos defectuosos para la replicación que se usan en el alcance de la presente invención carecen al menos de una región que es necesaria para la replicación del virus en la célula infectada. Estas regiones pueden eliminarse (por completo o en parte), o volverse no funcionales por cualquier técnica conocida por un especialista en la técnica. Estas técnicas incluyen la retirada total, la sustitución (por otras secuencias, en particular por el ácido nucleico insertado), la delección o la adición parcial de una o más bases en una región esencial (para la replicación). Dichas técnicas pueden realizarse *in vitro* (sobre el ADN aislado) o *in situ*, usando las técnicas de manipulación genética o por tratamiento con agentes mutagénicos. Preferiblemente, el virus defectuoso para la replicación conserva las secuencias de su genoma que son necesarias para encapsular las partículas víricas.

Los vectores víricos de ADN incluyen un virus de ADN atenuado o defectuoso, tal como, pero sin limitación, el virus del herpes simple (VHS), el papilomavirus, el virus de Epstein Barr (EBV), el adenovirus, el virus asociado a adenovirus (AAV), el virus vaccinia y similares. Los virus defectuosos, que carecen completamente o casi completamente de los genes víricos, son preferidos. Un virus defectuoso no es competente para la replicación después de la introducción en una célula, y por lo tanto no conduce a una infección vírica productiva. El uso de vectores víricos defectuosos permite la administración a células en un área específica y localizada, sin problemas de que el vector pueda infectar a otras células. Por lo tanto, puede fijarse como objetivo específicamente un tejido específico. Los ejemplos de vectores particulares incluyen, pero sin limitación, un vector del virus del herpes 1 (VHS1) defectuoso [Kaplitt y col., *Molec. Cell. Neurosci.* 2:320-330 (1991)], un vector del virus del herpes defectuoso que carece de un gen de la glicoproteína L [Publicación de Patente RD 371005 A], u otros vectores del virus del herpes defectuosos [Publicación de Patente Internacional N° WO 94/21807, publicada el 29 de septiembre de 1994; Publicación de Patente Internacional N° WO 92/05263, publicada el 2 de abril de 1994]; un vector de adenovirus atenuado tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet y col. [*J. Clin. Invest.* 90:626-630 (1992); véase también La Salle y col., *Science* 259:988-990 (1993)]; y un vector del virus asociado a adenovirus defectuoso [Samulski y col., *J. Virol.* 61:3096-3101 (1987); Samulski y col., *J. Virol.* 63:3822-3828 (1989); Lebkowski y col., *Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3996 (1988)].

Preferiblemente, para la administración *in vivo*, se emplea un tratamiento inmunosupresor apropiado junto con el vector vírico, por ejemplo, un vector de adenovirus, para evitar la inmunodesactivación del vector vírico y las células transfectadas. Por ejemplo, pueden administrarse citocinas inmunosupresoras, tales como interleucina-12 (IL-12), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), o anticuerpo anti-CD4, para bloquear las respuestas inmunes humorales o celulares contra los vectores víricos [véase, por ejemplo, Wilson, *Nature Medicine* (1995)]. Además, es ventajoso emplear un vector vírico que esté modificado genéticamente para expresar una cantidad mínima de antígenos.

Naturalmente, la invención contempla el suministro de un vector que expresará una cantidad terapéuticamente eficaz de Akt3 para aplicaciones en la terapia génica. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en este documento para indicar una cantidad suficiente para reducir en al menos aproximadamente 15%, preferiblemente en al menos 50%, más preferiblemente en al menos 90%, y más preferiblemente prevenir un déficit clínicamente significativo en la actividad, la función y la respuesta del hospedador. Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para causar una mejora en un estado clínicamente significativo en el hospedador.

#### 50 Vectores adenovíricos

En una realización preferida, el vector es un vector adenovírico. Los adenovirus son virus de ADN eucarióticos que pueden modificarse para suministrar de forma eficaz un ácido nucleico de la invención a una diversidad de tipos celulares. Existen diversos serotipos de adenovirus. De estos serotipos, se da preferencia, dentro del alcance de la presente invención, al uso de adenovirus humanos de tipo 2 o de tipo 5 (Ad 2 o Ad 5) o adenovirus de origen animal (véase el documento WO94/26914). Los adenovirus de origen animal que pueden usarse dentro del alcance de la presente invención, incluyen adenovirus de origen canino, bovino, murino (ejemplo: Mav1, Beard y col., *Virology* 75 (1990) 81), ovino, porcino, aviar, y de simio (ejemplo: SAV). Preferiblemente, el adenovirus de origen animal es un adenovirus canino, más preferiblemente un adenovirus CAV2 (por ejemplo, la cepa Manhattan o A26/61 (ATCC VR-800), por ejemplo).

Preferiblemente, los vectores adenovíricos defectuosos para la replicación de la invención comprenden las ITRs, una secuencia de encapsidación y el ácido nucleico de interés. Aún más preferiblemente, al menos la región E1 del vector adenovírico no es funcional. La delección en la región E1 se extiende preferiblemente desde los nucleótidos 455 a 3329 en la secuencia del adenovirus Ad5 (fragmento PvuII-BglIII) o 382 a 3446 (fragmento HinfII-Sau3A). También pueden modificarse otras regiones, en particular la región E3 (documento WO95/02697), la región E2 (documento WO94/28938), la región E4 (documentos WO94/28152, WO94/12649 y WO95/02697), o en cualquiera de los genes tardíos L1-L5.



## ES 2 310 515 T3

En una realización preferida, el vector adenovírico tiene una delección en la región E1 (Ad 1.0). Ejemplos de adenovirus con delección de E1, se describen en el documento de patente EP 185.573. En otra realización preferida, el vector adenovírico tiene una delección en las regiones E1 y E4 (Ad 3.0). Ejemplos de adenovirus con delección de E1/E4, se describen en los documentos de patente WO95/02697 y WO96/22378. En aún otra realización preferida, el vector adenovírico tiene una delección en la región E1 dentro de la cual se inserta la región E4 y la secuencia de ácido nucleico (véase el documento FR94 13355).

Los adenovirus recombinantes defectuosos en la replicación de acuerdo con la invención pueden prepararse por cualquier método conocido por los especialistas en la técnica (Levrero y col., Gene 101 (1991) 195, documento EP 185.573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particular, pueden prepararse por recombinación homóloga entre un adenovirus y un plásmido que es portador, entre otros, de la secuencia de ADN de interés. La recombinación homóloga se efectúa después de la cotransfección del adenovirus y el plásmido en una línea celular apropiada. La línea celular que se emplea debe preferiblemente (i) ser transformable por dichos elementos, y (ii) contener las secuencias que son capaces de complementar la parte del genoma del adenovirus de replicación defectuosa, preferiblemente de forma integrada, para evitar los riesgos de recombinación. Ejemplos de líneas celulares que se pueden emplear son la línea 293 de células renales embrionarias humanas (Graham y col., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) que contiene la porción izquierda del genoma de un adenovirus Ad5 (12%) integrada en su genoma y las líneas celulares que son capaces de complementar las funciones E1 y E4, tal y como se describe en los documentos de solicitud de patente WO94/26914 y WO95/02697. Los adenovirus recombinantes se recuperan y purifican usando técnicas de biología molecular convencionales, que son bien conocidas para los especialistas en la técnica.

### *Vectores víricos asociados a adenovirus*

Los virus asociados a adenovirus (AAV) son virus de ADN de tamaño relativamente pequeño que pueden integrarse, de un modo estable y con especificidad del sitio, en el genoma de las células que infectan. Son capaces de infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento, la morfología o la diferenciación celular, y no parecen estar implicados en patologías humanas. El genoma de AAV se ha clonado, secuenciado y caracterizado. Incluye aproximadamente 4700 bases y contiene una región repetida terminal invertida (ITR) de aproximadamente 145 bases en cada extremo, que actúa como origen de la replicación para el virus. El resto del genoma está dividido en dos regiones esenciales que son portadoras de las funciones de encapsulación: la parte izquierda del genoma, que contiene el gen rep implicado en la replicación vírica y la expresión de los genes víricos; y la parte derecha del genoma, que contiene el gen cap que codifica las proteínas de la cápsida del virus.

Se ha descrito el uso de vectores obtenidos a partir de los AAV para transferir genes *in vitro* e *in vivo* (véanse los documentos WO 91/18088; WO 93/09239; US 4.797.368, US 5.139.941, EP 488 528). Estas publicaciones describen diversas estructuras artificiales obtenidas a partir de AAV en las que los genes rep y/o cap están delecionados y reemplazados por un gen de interés, y el uso de estas estructuras artificiales para transferir dicho gen de interés *in vitro* (en células cultivadas) o *in vivo*, (directamente en un organismo). Los AAV recombinantes defectuosos para la replicación de acuerdo con la invención, pueden prepararse cotransfectando un plásmido que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés, flanqueada por dos regiones repetidas terminales invertidas (ITR) de AAV, y un plásmido portador de los genes de encapsulación de AAV (genes rep y cap), en una línea celular que está infectada con un virus auxiliar humano (por ejemplo un adenovirus). Los AAV recombinantes que se producen después se purifican mediante técnicas convencionales.

La invención también se refiere por tanto, a un virus recombinante obtenido a partir de AAV cuyo genoma comprende una secuencia que codifica un ácido nucleico que codifica una Akt3 flanqueada por las ITRs de AAV. La invención también se refiere a un plásmido que comprende una secuencia que codifica un ácido nucleico que codifica una Akt3 flanqueada por dos ITRs procedentes de un AAV. Dicho plásmido puede usarse como tal para transferir la secuencia de ácido nucleico, con el plásmido, cuando sea apropiado, incorporándola en un vector liposomal (pseudovirus).

### *Vectores retrovíricos*

En otra realización, el gen se puede introducir en un vector retrovírico, p. ej., tal y como se describe en el documento de Anderson y col., Patente de EE.UU. N° 5.399.346; Mann y col., 1983. Cell 33:153; Temin y col., Patente de Estados Unidos N° 4.650.764; Temin y col., Patente de Estados Unidos N° 4.980.289; Markowitz y col., 1988, J. Virol. 62:1120; Temin y col., Patente de Estados Unidos N° 5.124.263; documentos EP 453242, EP178220; Bernstein y col. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689; Publicación de Patente Internacional N° WO 95/07358, publicada el 16 de marzo de 1995, por Dougherty y col.; y Kuo y col., 1993, Blood 82:845. Los retrovirus son virus integrantes que infectan a las células en división. El genoma retrovírico incluye dos LTRs, una secuencia de encapsulación y tres regiones codificantes (gag, pol y env). En vectores retrovíricos recombinantes, los genes *gag*, *pol* y *env* están generalmente delecionados, por completo o en parte, y reemplazados por una secuencia de ácido nucleico heteróloga de interés. Estos vectores se pueden construir a partir de diferentes tipos de retrovirus, tales como, VIH, MoMuLV ("virus de la leucemia de Moloney de muridos") MSV ("virus del sarcoma de Moloney de muridos"), HaSV ("virus del sarcoma de Harvey"); SNV ("virus de la necrosis del bazo"); RSV ("virus del sarcoma de Rous") y el virus Friend. Se describen vectores retrovíricos defectuosos en el documento WO95/02697.

En general, para construir retrovirus recombinantes que contienen una secuencia de ácido nucleico se construye un plásmido, que contiene las LTRs, la secuencia de encapsulación y la secuencia codificante. Esta estructura artificial se usa para transfectar una línea celular de empaquetamiento, siendo capaz dicha línea celular de suministrar en trans las funciones retrovíricas que están defectuosas en el plásmido. En general, las líneas celulares de encapsulación son, por lo tanto, capaces de expresar los genes gag, pol y env. Dichas líneas celulares de encapsulación se han descrito en la técnica anterior, en particular la línea celular PA317 (documento US 4.861.719); la línea celular PsiCRIP (documento WO90/02806) y la línea celular GP<sup>-</sup>envAm<sup>-</sup>12 (documento WO89/07150). Además, los vectores retrovíricos recombinantes pueden contener modificaciones en las LTRs para suprimir la actividad transcripcional así como secuencias de encapsulación extensivas que pueden incluir una parte del gen gag (Bender y col., J. Virol. 61 (1987) 1639). Los vectores retrovíricos recombinantes se purifican mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

Pueden construirse vectores retrovíricos que actúen como partículas infecciosas o para experimentar una única ronda de transfección. En el primer caso, el virus se modifica para conservar todos sus genes, excepto los responsables de las propiedades de transformación oncogénicas y para expresar el gen heterólogo. Se preparan vectores víricos no infecciosos para destruir la señal vírica de empaquetamiento, pero que conserven los genes estructurales necesarios para empaquetar el virus co-introducido modificado genéticamente para que contenga el gen heterólogo y las señales de empaquetamiento. Por tanto, las partículas víricas que se producen no son capaces de producir virus adicionales.

Se describe el suministro de genes dirigidos en el documento de Publicación de Patente Internacional WO 95/28494, publicado en octubre de 1995.

#### *Vectores no víricos*

Alternativamente, el vector se puede introducir *in vivo* mediante lipofección. Durante la pasada década, ha estado aumentando el uso de liposomas para la encapsulación y transfección de ácidos nucleicos *in vitro*. Pueden usarse lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y riesgos encontrados con la transfección mediada por liposomas, para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador [Felgner, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413-7417 (1987); véase Mackey, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8027-8031 (1988); Ulmer y col., Science 259:1745-1748 (1993)]. El uso de lípidos catiónicos puede favorecer la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente, y también puede favorecer la fusión con membranas celulares cargadas negativamente [Felgner y Ringold, Science 337:387-388 (1989)]. Se describen compuestos y composiciones lipídicas particularmente útiles para transferir ácidos nucleicos en los documentos de las Publicaciones de Patente Internacional WO95/18863 y WO96/17823, y en la Patente de Estados Unidos N° 5.459.127. El uso de lipofección para introducir genes exógenos en organismos específicos *in vivo* tiene ciertas ventajas prácticas. El transporte molecular dirigido de liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Queda claro que dirigir la transfección a tipos celulares particulares sería particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el páncreas, el hígado, el riñón, y el cerebro. Los lípidos pueden unirse químicamente a otras moléculas para el propósito de dirigirlos [véase Mackey, y col., mencionado anteriormente]. Los péptidos dirigidos, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos o las moléculas no peptídicas, podrían unirse químicamente a liposomas.

También son útiles otras moléculas para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tal como un oligopéptido catiónico (por ejemplo, documento de Publicación de Patente Internacional WO95/21931), péptidos obtenidos a partir de proteínas que se unen al ADN (por ejemplo, documento de Publicación de Patente Internacional WO96/25508), o un polímero catiónico (por ejemplo, documento de Publicación de Patente Internacional WO95/21931).

También es posible introducir el vector *in vivo* como un plásmido desnudo (véanse los documentos de patentes de EE.UU. 5.693.622, 5.589.466 y 5.580.859). Los vectores de ADN desnudos para terapia génica pueden introducirse en las células hospedadoras deseadas por método conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato cálcico, el uso de una pistola génica, o el uso de un transportador de vectores de ADN [véase, por ejemplo, Wu y col., J. Biol. Chem., 267:963-967 (1992); Wu y Wu, J. Biol. Chem., 263:14621-14624 (1988); Hartmut y col., Solicitud de Patente Canadiense N° 2.012.311, presentada el 15 de marzo de 1990. Williams y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730 (1991)]. También pueden usarse estrategias de transporte de ADN mediados por receptores Curiel y col., Hum. Gene Ther., 3:147-154 (1992); Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)]. Los vectores de ADN desnudo preferidos incluyen los plásmidos pCOR que tienen un origen de replicación condicional (véase el documento WO97/10343), y los plásmidos minicírculo que carecen de un origen de replicación y un gen marcador (véase el documento WO96/26270).

#### *Ensayos de Escrutinio*

La identificación y el aislamiento de un gen que codifica una proteína Akt3 de la invención proporcionan una expresión de Akt3 en cantidades superiores a las que se pueden aislar a partir de fuentes naturales, o en células indicadoras que se manipulan por ingeniería genética, especialmente para indicar la actividad de Akt3 expresada después de la transfección o la transformación de las células. Por consiguiente, además del diseño racional de agonistas y antagonistas basándose en la estructura del polipéptido Akt3, la presente invención contempla un método alternativo para identificar ligandos específicos de Akt3 usando diversos ensayos de escrutinio conocidos en la técnica.

Akt3 protege las células frente a la apoptosis. Por tanto, de los agonistas de Akt3 que mejoran su capacidad para inhibir la apoptosis, se espera que mejoren su actividad durante el tratamiento de pacientes que padecen infarto de miocardio o lesión por isquemia-reperfusión. Por otro lado, una supervivencia celular incrementada es un factor para el desarrollo tumoral y, por tanto, puede contribuir a la formación de tumores y/o a su desarrollo. Por ello, de los inhibidores de la actividad de Akt3 se espera que disminuyan la supervivencia de las células tumorales y por ello una regresión del tumor.

Cualquier técnica de escrutinio conocida se puede emplear para escrutar antagonistas o agonistas de Akt3. Por ejemplo, una línea celular adecuada que expresa Akt3 humana y ASK1, tal como las células HEK293 renales embrionales humanas, se pueden transfectar con un ácido nucleico que codifica un gen marcador, tal como el de la  $\beta$ -galactosidasa. Las células se exponen a continuación a una solución del ensayo que comprende un agonista o un antagonista y posteriormente se tiñen para observar actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. La presencia de más células positivas para  $\beta$ -gal en relación con las células testigo no expuestas a la solución del ensayo, es un indicador de la presencia de un agonista de Akt3 en la solución del ensayo. En cambio, la presencia de menos células positivas para  $\beta$ -gal en relación con las células testigo, no expuestas a la solución del ensayo, es un indicador de la presencia de un antagonista de Akt3 en la solución del ensayo.

La presente invención contempla escrutinios para ligandos de molécula pequeña o análogos de ligando y miméticos, así como escrutinios para ligandos naturales que se unen y son antagonistas o agonistas de Akt3 *in vivo*. Por ejemplo, pueden escrutar genotecas de productos naturales usando ensayos de la invención para buscar moléculas que sean agonistas o antagonistas de la actividad de Akt3.

Un conocimiento de la secuencia primaria de Akt3 y la similitud de esta secuencia con proteínas de función conocida, puede proporcionar una pista inicial sobre los inhibidores o los antagonistas de la proteína. La identificación y el escrutinio de antagonistas se facilita adicionalmente, determinando las características estructurales de la proteína, por ejemplo, usando cristalografía de rayos X, difracción de neutrones, espectrometría con resonancia magnética nuclear y otras técnicas para la determinación de la estructura. Estas técnicas proporcionan el diseño racional o la identificación de agonistas y antagonistas.

Otra estrategia usa un bacteriófago recombinante para producir genotecas grandes. Empleando el "método del fago" [Scott y Smith. 1990. Science 249:386-390 (1990); Cwirla, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:6378-6382 (1990); Devlin y col., Science. 249:404-406 (1990)], se pueden construir genotecas muy grandes ( $10^6$ - $10^8$  sustancias químicas). Una segunda estrategia usa métodos principalmente químicos, de los que son ejemplos el método de Geysen [Geysen y col., Molecular Immunology 23:709-715 (1986); Geysen y col., J. Immunologic Method 102:259-274 (1987)] y el método de Fodor y col. [Science 251:767-773 (1991)]. Furka y col. [XIV Congreso Internacional de Bioquímica, Volumen 5, Artículo FR:013 (1988); Furka, Int. J. Peptide Protein Res. 37:487-493 (1991)], Houghton [documento de Patente de Estados Unidos N° 4.631.211, expedida en diciembre de 1986] y Rutter y col. [documento de Patente de Estados Unidos N° 5.010.175, expedida el 23 de abril de 1991] describen métodos para producir una mezcla de péptidos que se pueden someter a ensayo como agonistas o antagonistas.

En otro aspecto, pueden usarse genotecas sintéticas [Needels y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10700-4 (1993); Ohlmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926 (1993); Lam y col., documento de Publicación de Patente Internacional N° WO 92/00252; Kocis y col., documento de Publicación de Patente Internacional N° WO 9428028], y similares, se pueden utilizar para escrutar ligandos de Akt3, de acuerdo con la presente invención.

El escrutinio se puede realizar con células recombinantes que expresan Akt3, o alternativamente, empleando una proteína purificada, p. ej., una producida por vía recombinante, tal y como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, la Akt3 soluble marcada se puede emplear para escrutar genotecas, tal y como se describe en las referencias anteriores.

En una realización, se puede marcar directamente Akt3. En otra realización, un reactivo secundario marcado se puede emplear para detectar la unión de una Akt3 a una molécula de interés, p. ej., una molécula fijada a un soporte en fase sólida. La unión puede detectarse por la formación *in situ* de un cromóforo, a través de un marcador enzimático. Las enzimas adecuadas incluyen, pero sin limitación, la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante. En otra realización, puede usarse un ensayo de dos colores, usando dos sustratos cromógenos con dos marcadores enzimáticos, en diferentes moléculasceptoras de interés. Los ligandos con reacción cruzada y con una sola reacción, pueden identificarse con un ensayo de dos colores.

Otros marcadores para uso en la invención incluyen perlas de látex coloreadas, perlas magnéticas, marcadores fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceno (FITC), ficoeritrina (PE), rojo Texas (TR), rodamina, sales de la serie de los lantánidos libres o quelados, especialmente  $\text{Eu}^{3+}$ , por nombrar algunos fluoróforos), moléculas quimioluminiscentes, radio-isótopos o marcadores de formación de imágenes de resonancia magnética. Pueden realizarse ensayos de dos colores con dos o más perlas de látex coloreadas o fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda. El compuesto marcado puede detectarse visualmente o por medios mecánicos/ópticos. Los medios mecánicos/ópticos incluyen la clasificación activada por fluorescencia, es decir, un método análogo a FACS, y los medios de eliminación con micromanipulador.

Tal y como se ejemplifica en esta memoria, el nivel de la proteína Akt3 se puede evaluar mediante marcación metabólica de las proteínas. Como la marcación metabólica se produce durante la incubación *in vitro* de la biopsia de

tejido, en presencia de medio de cultivo suplementado con [<sup>35</sup>S]-metionina, el nivel de cada uno de los marcadores detectados puede verse afectado por las condiciones *in vitro*. Además de la marcación metabólica (o biosintética) con [<sup>35</sup>S]-metionina, la invención además contempla la marcación con [<sup>14</sup>C]-aminoácidos y [<sup>3</sup>H]-aminoácidos (con el tritio sustituido en las posiciones no lábiles). De esta manera, una muestra o una genoteca de los compuestos puede analizarse directamente después de marcar las proteínas de la misma, por ejemplo, con tinción colorimétrica usando plata, oro, azul de coomassie, o amido-schwartz, por mencionar algunas técnicas; marcación isotópica, por ejemplo, con [<sup>32</sup>P]-ortofosfato, [<sup>125</sup>I], [<sup>131</sup>I]; señales fluorescentes o quimioluminiscentes; y detección inmunológica con un anticuerpo marcado o una molécula de unión específica de un marcador.

La presente invención puede entenderse mejor por referencia a los Ejemplos siguientes no limitantes, que se proporcionan a modo de ejemplo de la invención.

## Ejemplos

### 15 Técnicas generales de biología molecular

Los métodos utilizados tradicionalmente en biología molecular, tales como extracciones preparativas de ADN plasmídico, centrifugación de ADN plasmídico en un gradiente de cloruro de cesio, electroforesis en geles de agarosa o acrilamida, purificación de fragmentos de ADN mediante electroelución, extracción de proteínas con fenol o fenol/cloroformo, precipitación del ADN con etanol o isopropanol en un medio salino, transformación en *Escherichia coli*, y semejantes, son muy conocidos para un experto en la técnica y están descritos ampliamente en la bibliografía [Maniatis T. y col., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; (2ª ed. 1989); Ausubel F.M. y col. (compiladores), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Nueva York, 1987].

Los vehículos de clonación convencionales incluyen plásmidos del tipo pBR322 y pUC y fagos de la serie M13. Estos se pueden obtener comercialmente (Bethesda Research Laboratories).

Para la ligación, los fragmentos de ADN pueden separarse según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida, extraerse con fenol o con una mezcla de fenol/cloroformo, precipitarse con etanol y después incubarse en presencia de la ligasa de ADN del fago T4 (Biolabs) según las recomendaciones del distribuidor.

El relleno de los extremos 5' protuberantes puede llevarse a cabo con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Biolabs) según las instrucciones del fabricante. La destrucción de los extremos 3' protuberantes se lleva a cabo en presencia de la ADN polimerasa del fago T4 (Biolabs), utilizada según las recomendaciones del fabricante. La destrucción de los extremos 5' protuberantes se realiza mediante un tratamiento controlado con la nucleasa S I.

La mutagénesis dirigida *in vitro* puede llevarse a cabo mediante oligodesoxinucleótidos sintéticos, según el método desarrollado por Taylor y col. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] utilizando el equipo de reactivos distribuido por Amersham.

La amplificación enzimática de los fragmentos de ADN mediante la técnica de la PCR [Polymerase-catalyzed Chain Reaction. Saiki R.K. y col., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. y Faloona F.A. Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] se puede realizar empleando un "ciclador térmico de ADN" (Perkin Elmer Cetus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La verificación de las secuencias de nucleótidos puede llevarse a cabo mediante el método desarrollado por Sanger y col. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] utilizando el equipo de reactivos distribuido por Amersham.

Los ADNs plasmídicos pueden purificarse mediante el Sistema de Purificación de Plásmidos de Qiagen, según las instrucciones del fabricante.

## Ejemplo 1

### 55 Clonación de Akt3 humana

Este ejemplo describe la clonación de un ácido nucleico que codifica la proteína Akt3.

#### Ejemplo 1.1

#### 60 Escrutinio de la genoteca de ADNc en busca de Akt3

Una búsqueda en una base de datos reveló que un clon de ADNc humano contiene un segmento de una secuencia de ADNc humana que es homóloga a Akt1 y Akt2 humanas, pero diferente de las mismas. Para aislar la secuencia codificadora de longitud completa de esta isoforma de Akt3 humana no conocida previamente (denominada en esta memoria Akt3 humana), se escribió una genoteca de ADNc de corazón humano con una sonda de ADNc correspondiente a la 5'-UTR y la región codificadora de la Akt3 humana N-terminal.

Un clon de ADNc humano (nº de ID 479072) se obtuvo comercialmente (Genome System Inc.). Un fragmento de este ADN, que cubre parte de la 5'-UTR (región no traducida) y una parte de la secuencia codificadora en 5' de la Akt3 humana, se amplificaron con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los siguientes cebadores: AKT3-5'UTR-F3 (5' TCC AAA CCC TAA AGC TGA TAT CAC 3'; SEQ ID NO:3) y AKT3-C-R1 (5' CCT GGA TAG CTT CTG TCC ATT C 3'; SEQ ID NO:4). Una sonda de ADNc se marcó con [ $\alpha$ -p32]dCTP empleando un equipo de reactivos para marcar ADN cebador al azar (Boehringer Mannheim) según las instrucciones del fabricante. La sonda se purificó empleando una columna de cromatografía de spín, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Inicialmente se empleó sobre un millón de clones de fagos para escrutar la genoteca de fagos del ADNc (Clontech, nº de Cat. HL5027t). Las células hospedadoras XL1-B se inocularon a 37°C durante una noche en medio LB (suplementado con 20 mg/ml de tetraciclina, 0,2% de maltosa y MgCl<sub>2</sub> 10 mM). La infección con los fagos y el aislamiento de las membranas se realizaron tal y como se describe en Maniatis. 1989. Las membranas se desnaturalizaron, se renaturalizaron y se cocieron, a continuación, se prehibridaron con solución de hibridación durante 4 horas a 65°C. Una forma desnaturalizada de la sonda marcada con p32 (desnaturalizada con calor durante 10 minutos), se añadió a las membranas para la hibridación durante una noche. Después de la hibridación, las membranas se lavaron en serie con 2X SSC/0,1% de SDS, 1X SSC/0,1% de SDS, y 0,5X SSC/0,1% de SDS a 65°C. Las membranas se secaron al aire y se expusieron a películas de rayos X de Kodak. Después de este escrutinio primario, se seleccionaron los clones positivos para un escrutinio secundario y terciario. Los fagos positivos resultantes se purificaron y el ADN de fago se convirtió en ADN plasmídico empleando células hospedadoras BM25.8-25, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim).

Se escogieron dos clones positivos para la secuenciación completa y la caracterización posterior. Uno de estos clones (el clon nº 9) comprende parte de la 5' UTR y la secuencia codificadora N-terminal (aa 1 a 127) de la Akt3 humana. Un segundo clon (clon nº 1) comprende la mayoría de la secuencia de Akt3 humana (aa 15 hasta el extremo C-terminal) y 3'-UTR. Una secuencia de ADNc de longitud completa se formó por la fusión de estas dos secuencias parciales. Una secuencia completa que codifica una Akt3 humana se muestra en SEQ ID NO:1. La secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en SEQ ID NO:2. Una alineación de la secuencia de Akt3 humana con la secuencia de Akt3 de rata, se muestra en la Figura 1A. Una alineación de la secuencia de Akt3 humana con la de Akt1 y Akt2 humanas, se muestra en la Figura 1B.

En gran medida, Akt3 es más corta que Akt1 y Akt2, y no existe una homología significativa entre Akt2 y Akt1 o Akt2 en el extremo C-terminal de las moléculas. En particular, los 14 últimos aminoácidos en la porción C-terminal de la Akt3 humana, son diferentes de los presentes en Akt1 y Akt2 humanas. De forma significativa, la Ser473 en el extremo C-terminal de Akt1 es decisiva para su regulación (Stokeo y col. 1997, Stephens y col. 1998). Después de estimular con el factor de crecimiento, la actividad de PI3K se activa. El producto de PI3K, PtdIns(3,4,5)-P se une a Akt1, dando como resultado la translocación de Akt1 desde el citoplasma hasta un lugar próximo a la membrana citoplasmática interna, en donde se fosforila el residuo de treonina 308 y de serina 473 (Downward, 1998). La fosforilación de estos residuos es decisiva para la activación de Akt1. Una proteína quinasa identificada recientemente, PDK1, es responsable de la fosforilación de Thr308. Sin embargo, la(s) quinasa(s) que fosforila la Ser473, todavía no se ha identificado (Stokeo y col. 1997, Stephens y col. 1998). La Akt3 humana carece de Ser473, indicando un patrón de fosforilación diferente y, por tanto, una regulación diferente de la actividad de Akt3.

### Ejemplo 1.2

#### *Determinación de la distribución de Akt3 en el tejido mediante transferencia de tipo Northern*

Para someter a ensayo el patrón de expresión de Akt3, se hibridó una transferencia de ARNm de varios tejidos humanos, con una sonda de ADNc marcada con p32, obtenida a partir de la 5'-UTR de Akt3 humana. La transferencia de ARNm de varios tejidos humanos se adquirió de Clontech. Un fragmento de ADNc de Akt3 humana que se correspondía con la 5'-UTR, se amplificó con PCR empleando los siguientes cebadores: Akt3-5'UTR-F1(5'-TTT CGG AGG CTC TAG TTT GGT G-3'; SEQ ID NO:15), y Akt3-5' UTR-R1 (5'-CCC AAC TTG GAG AAA TGG TAC-3'; SEQ ID NO:16). Se marcaron 50 ng de ADNc empleando un equipo de reactivos para marcar el ADN cebador aleatoriamente (Boehringer Mannheim) según las instrucciones del fabricante. La hibridación se realizó según las instrucciones del fabricante, empleando una transferencia para hibridar con una sonda purificada y llevada a ebullición a 68°C durante 1 hora (Clontech). Después de la hibridación, la transferencia se lavó dos veces con la solución 1 (2X SSC, 0,05% de SDS) a temperatura ambiente (20 minutos cada lavado). A continuación, se lavó la transferencia con la solución 2 (0,1% de SSC, 0,1% de SDS) a 50°C durante 30 minutos. Después del lavado, la transferencia se expuso durante una noche a una película de rayos X de Kodak a 80°C. Los resultados muestran que Akt3 se expresa permanentemente (en todos los tejidos), observándose el mayor nivel de expresión en el corazón (Figura 2).

### Ejemplo 2

#### *Construcción de plásmidos de expresión de Akt3*

La actividad de PI3K se induce después de una estimulación con suero o con factor de crecimiento. La PI3K activada convierte PI3 en PI3-P, la cual se une al dominio AH/PH de Akt1, e induce la translocación de Akt1 desde el citoplasma hasta la membrana citoplasmática (Downward 1998, Alessi y col. 1996), en donde Akt se fosforila y se activa posteriormente con PDK1 (Stokeo y col. 1997, Stephens y col. 1998). La Akt fusionada con la secuencia de

## ES 2 310 515 T3

miristilación de v-Src (para la localización de la membrana) en el extremo N-terminal, conduce a la localización en la membrana del mutante Myr-Akt. Esta Akt localizada en la membrana está activa de forma constitutiva (Kulik y col., 1997), e inhibe la apoptosis inducida por diversos estímulos.

Este ejemplo describe la construcción de un plásmido de expresión para la Akt3 activada. Dos primeros clones parciales de ADNc (el clon nº 1 y el clon nº 9, descritos anteriormente) se fusionaron para obtener una secuencia codificadora de Akt3 de longitud completa. Un ADN que comprende la secuencia humana de miristilación Src, se fusionó con el extremo N-terminal de la secuencia de Akt3 de longitud completa. Una secuencia marcadora HA se fusionó con el extremo C-terminal de la secuencia de Akt3 de longitud completa. La secuencia de esta MyrAkt3HA quimérica se situó bajo el control de un promotor de CMV. La estructura artificial completa se denomina CMV6-MyrAkt3HA (Figura 2A).

### Ejemplo 2.1

#### CMV6-MyrAktHA

Este ejemplo describe la construcción de plásmidos capaces de expresar Akt3 y una forma activa de manera constitutiva de la Akt3 humana. Se obtuvo una secuencia codificadora de Akt3 de longitud completa mediante amplificación con PCR del clon nº 1, empleando los siguientes cebadores: hAKT3c19-PCR5(F): (5'-ATG AGC GAT GTT ACC ATT GTG AAA GAA GGT TGG GTT CAG AAG AGG GGA GAA TAT ATA AAA AAC TGG AGG CCA AG-3'; SEQ ID NO:5), que contiene la secuencia codificadora de los primeros 24 aminoácidos de Akt3 y hAKT3 c11-PCR3 (R): (5'-TTA TTT TTT CCA GGT ACC CAG CAT GCC-3'; SEQ ID NO:6).

Para preparar la forma de Akt3 activa de manera constitutiva, se amplificó la secuencia codificadora de Akt3 de longitud completa mediante PCR empleando los siguientes cebadores: MyrAKT3Ha-F1(5'-GCG CGC GAA TTC CCA CCA TGG GTA GCA ACA AGA GCA AGC CCA AGG ATG CCA GCC AGC GGC GCC GCA GCA GCG ATG TTA CCA TTG TGA AAG-3'; SEQ ID NO:7), que contiene la secuencia de Kozak (CCACC). La secuencia de miristilación procedente de *src* humana (subrayada) y los 8 primeros aminoácidos de la Akt3 humana (en negrita), y MyrAKT3Ha-R (5'-GCG CGC GGG CCC TTA GGC GTA GTC GGG GAC GTC GTA CGG GTA TTT TTT CCA GTT ACC CAG CAT GCC-3'; SEQ ID NO:8), que contiene la secuencia codificadora de una señal HA (en negrita). El producto de la PCR se digirió con EcoRI/ApaI y se subclonó en los sitios de EcoRI/ApaI de pCDNA3.1, produciendo pCDNA3-Myr-Akt-HA. La secuencia codificadora de MyrAktHA también se amplificó con PCR y se subclonó en los sitios KpnI/EcoRI del vector CMV6. Los cebadores empleados para la reacción de la PCR eran: CMV6-AKT3cat-F (5'-CGG GGT ACC ACC ATG GGT AGC AAC AAG AGC AAG CCC AAG GAT GCC AGC CAG-3'; SEQ ID NO:9), y CMV6-AKT3cat-R (5'-CCG GAA TTC TTA GGC GTA GTC GGG GAC GTC-3'; SEQ ID NO:10). El plásmido se verificó mediante secuenciación.

### Ejemplo 2.2

#### Expresión de AKT3 humana

Este ejemplo describe la expresión de AKT3 humana en cultivo de tejidos. Células HEK293 y células COS-7 se mantuvieron en medio DME suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS). Las células se dejaron crecer en una incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

El plásmido CMV6-[MyrAkt3HA] se transfectó transitoriamente en células HEK293. Como testigo, se transfectaron células HEK293 con el vector CMV6. Un día antes de la transfección, las células se dividieron hasta tener una densidad de 0,2 x 10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup>. Las transfecciones se realizaron empleando LipofectAmine (Gibco BRL) según las instrucciones del fabricante. Resumiendo, el ADN se mezcló en medio DME (sin suero ni antibióticos). Se añadió LipofectAmine (ADN:LipofectAmine = 1 mg : 4 ml). Después de mezclar brevemente, la mezcla de ADN/LipofectAmine se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se lavaron con 1 x PBS y se expusieron a la mezcla de ADN/LipofectAmine durante 3 horas. Después de la transfección, las células se lavaron dos veces con 1 x PBS y se pasaron a medio DMEM-10% de FBS.

Veinticuatro horas después de la transfección se lisaron las células. Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA y la actividad quinasa de los inmunosedimentos se determinó empleando péptidos procedentes de GSK-3, una diana aguas abajo de Akt1 (Cross y col. 1995). Los ensayos *in vitro* con la quinasa para Akt, se realizaron de acuerdo con Cross y col. (Cross y col., 1995) 24 horas después de la transfección. Las células se lavaron dos veces con solución de 1x PBS y se lisaron con el tampón de lisis (Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,5 mM, 0,1% de β-mercaptoetanol, 1% de Triton X-100, NaF 50 mM, pirofosfato sódico 5 mM, glicerofosfato sódico 10 mM, PMSF 0,5 mM, 2 μg/ml de aprotinina, 2 mg/ml de leupeptina y microcistina 1 mM). Los materiales insolubles se aclararon por centrifugación a 4°C durante 15 minutos. El material lisado celular se incubó con anticuerpos policlonales anti-HA (BABC0) durante 1 hora a 4°C en una plataforma giratoria. Los lechos de Proteína A-Agarosa se añadieron al material lisado durante 1 hora. Después de la inmunoprecipitación, los sedimentos se lavaron tres veces con solución de lavado A (tampón de lisis suplementado con NaCl 0,5 M), tres veces con solución de lavado B (Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, 0,03% de Brij35, EGTA 0,1 mM y 0,1% de β-mercaptoetanol), y tres veces con tampón de quinasa (MOPS 20 mM, pH 7,2, β-glicerofosfato sódico 25 mM pH 7,0, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, DTT 1 mM). Después del lavado, los sedimentos se resuspendieron en 40 μl de mezcla de reacción de quinasa [ATP 100 mM, 0,1 mg/ml de

## ES 2 310 515 T3

péptido sustrato de Crosstide (UBI),  $\text{MgCl}_2$  20 mM, inhibidor de la proteína quinasa A/PKI (UBI) 10 mM y (g-32P)-ATP 10 mCi]. Las reacciones se realizaron a 30°C durante 30 minutos. Después de completar las reacciones, las mezclas se centrifugaron brevemente y se cargaron 30  $\mu\text{l}$  de material sobrenadante en un círculo de papel de nitrocelulosa p81 (Gibco BRL). Los papeles de nitrocelulosa se lavaron tres veces con ácido fosfórico 180 mM (10 minutos cada lavado) y dos veces con acetona (2 minutos cada lavado). La radiactividad del papel se vigiló con un aparato para el recuento del centelleo. La actividad quinasa presente en las muestras transfectadas con CMV6[MyrAkt3HA], era 20 veces superior a la presente en las células transfectadas con el vector testigo CMV6, que era similar al nivel de fondo observado para este ensayo (Figura 2B).

Para someter a ensayo la expresión de MyrAkt3HA en las células transfectadas, material lisado preparado a partir de células transfectadas se sometió a inmunotransferencia con anticuerpos anti-HA. Los lisados celulares se prepararon tal y como se ha descrito anteriormente, y se sometieron a electroforesis en geles de SDS poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se trataron a continuación con solución de bloqueo (1x PBS, 0,2% de Tween 20, 5% de leche en polvo desnatada) durante una noche a 4°C. Las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-HA (dilución 1:500 en solución de bloqueo) durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con la solución de bloqueo (15 minutos cada vez), las membranas se incubaron con anticuerpos IgG de conejo anti-ratón conjugados con HRP (dilución 1:1000 en solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces en la solución de bloqueo (10 minutos cada vez) y tres veces en 1x PBS suplementado con 0,2% de Tween 20, las membranas se revelaron en ECL (PIERCE) según las instrucciones del fabricante y se expusieron a una película de rayos X de Kodak. Tal y como se muestra en la Figura 2C, una banda ancha de 60 KD (similar al tamaño de MyrAkt1HA, datos no mostrados) está presente en las muestras transfectadas con CMV6-[MyrAkt3HA], pero no en las muestras transfectadas con CMV6 (testigo negativo). Resumiendo, estos datos muestran que la transfección con CMV6-[MyrAkt3HA] da como resultado una actividad funcional de Akt.

### Ejemplo 3

#### *Clonación de ASK1 humana*

Este ejemplo describe la clonación de un ácido nucleico que codifica una proteína ASK1 humana. Se obtuvo un clon de ADNc de longitud completa de ASK1 mediante el escrutinio de una genoteca de ADNc de fagos para el corazón humano. La sonda empleada para el escrutinio era un fragmento del clon n° 26237 (Image Consortium) obtenido por digestión de pT7T3d con EcoRI/NotI. El escrutinio de la genoteca, la purificación de las placas y la conversión del ADN de fago en ADN plasmídico se realizó tal y como se ha descrito anteriormente. El clon n° 4 contenía la mayoría de la secuencia codificadora de ASK1 (desde el aminoácido 150 hasta el aminoácido 1376), y se denomina de aquí en adelante en esta memoria ASK1 de longitud completa. ASK1 de longitud completa se amplificó con PCR empleando los siguientes cebadores: ASK1-Clon n° 4F(5'-AAG GGC CGC CAG TGT GCT GGA GAG ATG AGC GAT GCC TTC-3'; SEQ ID NO:11), y Ask1-clon n° 4R (5'-CCC TCT AGA TGC TCA TTC TGC ATT TGA TCC AGC TG-3'; SEQ ID NO:12). El producto de la PCR se purificó y se subclonó en los sitios BstXI/XbaI del vector pCDNA3-nHA. El plásmido correcto, denominado pCDNA3-HA-ASK1(FL), se verificó por secuenciación. Ichijo y col. (1997) también describen la clonación y la secuencia de ASK1 humana.

### Ejemplo 4

#### *Inhibición de la muerte celular inducida con ASK1*

La hiperexpresión de la quinasa 1 que estimula la apoptosis (ASK1), conduce a la muerte celular por apoptosis (Ichijo y col. 1997). Este ejemplo muestra que la expresión de Akt3 humana inhibe la muerte celular inducida con ASK1. Un plásmido CMV- $\beta$ -gal se cotransfectó en células HEK293 de riñón embrionario humano con el plásmido de expresión de ASK1 (pCDNA3-HA-ASK1FL), tanto de forma aislada como junto con el plásmido de expresión de Akt3 (CMV6-MyrAkt3HA). Dos días después de la transfección, las células se tiñeron para estudiar la actividad  $\beta$ -galactosidasa, según el siguiente protocolo. Las células se lavaron tres veces con 1x PBS (exento de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), y se fijaron en una solución con formaldehído al 3% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron tres veces con 1x PBS, a continuación se tiñeron durante una noche en una cámara húmeda a 37°C con una solución de ferrocianuro potásico 4 mM,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, 400 mg/ml de X-Gal en PBS. Las células teñidas se lavaron tres veces con 1x PBS y se conservaron en glicerol al 70%, las células positivas para  $\beta$ -gal se contaron con un microscopio óptico.

Tal y como se muestra en la Figura 3, la transfección con el plásmido de expresión de ASK1 (en ausencia del plásmido de expresión de Akt3), conduce a una fuerte disminución de las células positivas para  $\beta$ -gal. Sin embargo, la cotransfección con el plásmido de expresión de Akt3, inhibe significativamente la muerte celular inducida por ASK1, tal y como se midió por la presencia de células positivas para  $\beta$ -gal. Resumiendo, estos datos muestran que Akt3 activada evita la muerte celular inducida con ASK1. La actividad anti-apoptótica de Akt3 combinada con su alta expresión en el tejido cardíaco, apoya su uso en la cardioprotección.

ASK1 induce la muerte celular por apoptosis en diversos tipos celulares (Ichijo y col. 1997). Sin embargo, el mecanismo molecular por el que ASK1 induce la apoptosis no está claro. Se ha observado que la expresión ectópica de ASK1 conduce a la activación de diversas rutas de señalización activadas por el estrés, tales como las rutas MKK4/JNK y MKK6/p38y se ha sugerido que la activación de estas rutas media en la apoptosis inducida con ASK1 (Ichijo y col.

1997). Sin embargo, la adición de un inhibidor específico de p38 tiene poco o ningún efecto sobre la apoptosis inducida con ASK1 (datos no mostrados), sugiriendo que ASK1 induce la muerte celular por apoptosis independientemente de la actividad quinasa de p38.

Los presentes resultados muestran que Akt3 activada inhibe significativamente la apoptosis inducida con ASK1, sugiriendo que Akt3 o una de sus dianas aguas abajo, inhibe la(s) ruta(s) apoptótica(s) inducida(s) con ASK1. Se ha publicado que IGF- inhibe la actividad de JNK a través de un mecanismo dependiente de PI3K/Akt (Okubo y col. 1998). Akt3 también puede actuar inhibiendo la actividad quinasa de JNK.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en este documento. De hecho, para los expertos en la técnica serán evidentes diversas modificaciones de la invención además de las descritas en la presente memoria a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas. Tales modificaciones se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se debe entender adicionalmente que todos los tamaños de las bases o todos los tamaños de los aminoácidos y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, dados para los ácidos nucleicos o los polipéptidos, son aproximados y se proporcionan a modo de descripción.

Diversas publicaciones se citan en esta memoria:

**Aams JM.** y col. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. Vol 281(5381): 1322-1326.

**Alessi DR.** y col. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. Vol 15(23): 6541-6551.

**Barinaga M.** 1998a. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science* Vol 281: 1303-1304.

**Barinaga M.** 1998b. Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. *Science* Vol 281: 1302-1303.

**Chang HY** y col. 1998. Activation of apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) by the adapter protein DAXX. *Science*. Vol 281 (5384): 1860-1863.

**Cross DA.** y col. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* Vol 378 (6559):785-789.

**Downward J.** 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* Vol 10 (2): 262-267.

**Dudek H.** y col. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* Vol 275 (5300): 661-665.

**Franke TF.** y col. 1995. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* Vol 81(5): 727-736.

**Franke TF.** y col. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* Vol 88(4): 435-437.

**Hemmings BA.** 1997a. Akt signalling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* Vol 275 (5300): 628-630.

**Hemmings BA.** 1997b. Ptdlns(3,4,5)P3 gets its message across. *Science* Vol 277: 534.

**Ichijo H.** y col. 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. Vol 275: 90-94.

**Kauffmann-Zeh A.** y col. 1997. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* Vol 385(6616): 544-548.

**Klippel A.** y col. 1997. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol. Cell Biol.* Vol 17(1): 338-344.

**Konishi H.** y col. 1995. Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* Vol. 216(2): 526-534.

**Kulik G.** y col. 1997. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell Biol.* Vol 17(3): 1595-1606.



## ES 2 310 515 T3

**MacLellan** WR. y col. 1998. Death by design: programmed cell death in cardiovascular biology and diseases. *Circ. Res.* Vol 81(2): 137-144.

**Okubo** Y. y col. 1998. Insulin-like growth factor-1 inhibits the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol. Chem.* Vol 273: 25961-25966.

**Pullen** N. y col. 1998. Phosphorylation and activation of p70S6K by PDK1. *Science* Vol 279: 707-710.

**Sambrook** J., **Fritsch** EF. & **Maniatis** T. 1989. *Molecular Cloning* (2ª edición).

**Staal** SP. 1987. Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol 84(14): 5034-5037.

**Stephens** L. y col. 1998. Protein kinase B kinases that mediated phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* Vol 279: 710-714.

**Stokoe** D. y col. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* Vol 277: 567-570.

**Thornberry** NA. y col. 1998. Caspases: enemies within. *Science* Vol 281: 1312-1316.

# REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que codifica una proteína Akt3 humana que comprende la secuencia C-terminal Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia, en donde el ácido nucleico tiene una característica seleccionada entre las siguientes:
  - A. se puede amplificar con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando una pareja de cebadores oligonucleótidos obtenidos a partir de SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6;
  - B. se hibrida bajo unas condiciones desde moderadamente restrictivas hasta muy restrictivas con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos tal y como se describe en SEQ ID NO:1;
  - C. codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos de SEQ ID NO:2;
  - D. codifica un polipéptido que se une específicamente a un anticuerpo generado contra un epítipo dentro de un péptido que tiene la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia.
2. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que la proteína Akt3 humana comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se describe en la SEQ ID NO:2.
3. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, que comprende la secuencia descrita en SEQ ID NO:1.
4. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en donde la pareja de cebadores oligonucleótidos es SEQ ID NO: 5 y 6.
5. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una secuencia que codifica una señal polipeptídica, en donde el ácido nucleico codifica una proteína Akt3 quimérica marcada.
6. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una secuencia que codifica una secuencia de miristilación.
7. Un vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 1.
8. El vector según la reivindicación 7, en donde el ácido nucleico que codifica una proteína Akt3 humana está ligado funcionalmente a una secuencia de control de la expresión, permitiendo la expresión de Akt3 humana en una célula hospedadora competente para la expresión.
9. El vector según la reivindicación 8, seleccionado entre el grupo consistente en una molécula de ARN, una molécula de ADN plasmídico y un vector vírico.
10. El vector según la reivindicación 9, que es una molécula de ADN plasmídico.
11. El vector según la reivindicación 9, que es un vector vírico seleccionado entre el grupo consistente en retrovirus, adenovirus, virus asociado a adenovirus, virus herpes y virus vaccinia.
12. Una célula hospedadora transfectada con el vector según la reivindicación 7.
13. Una célula hospedadora transfectada con el vector según la reivindicación 8.
14. La célula hospedadora según la reivindicación 12, seleccionada entre el grupo consistente en una célula bacteriana, una célula de levadura y una célula de mamífero.
15. Un método para producir una proteína Akt3 humana que comprende:
  - cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 12 en un medio de cultivo bajo condiciones que permitan la expresión de la Akt3 humana; y
  - aislar una proteína Akt3 humana a partir del cultivo.
16. Una proteína Akt3 humana aislada que comprende la secuencia C-terminal Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia, en donde la proteína tiene una característica seleccionada entre las siguientes:
  - A. está codificada por el ácido nucleico de la reivindicación 1;

## ES 2 310 515 T3

B. comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se describe en la SEQ ID NO:2; y

C. se une específicamente a un anticuerpo generado contra un epítipo dentro de un péptido que tiene la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia.

17. La proteína aislada según la reivindicación 16, que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se describe en SEQ ID NO:2.

18. La proteína Akt3 humana aislada según la reivindicación 16, que comprende adicionalmente una secuencia marcadora.

19. La proteína Akt3 humana aislada según la reivindicación 18, que comprende adicionalmente una secuencia de miristilación.

20. Un péptido antigénico que comprende la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 60% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia, y es un fragmento de la proteína Akt3 humana, en donde la proteína Akt3 tiene una característica seleccionada entre las siguientes:

A. está codificada por el ácido nucleico de la reivindicación 1;

B. comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se describe en la SEQ ID NO:2; y

C. se une específicamente a un anticuerpo generado contra un epítipo dentro de un péptido que tiene la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys, o una secuencia en la que más del 60% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia.

21. El péptido antigénico según la reivindicación 20, que consiste en la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys o una secuencia en la que más del 90% o del 95% de los aminoácidos son idénticos a los de dicha secuencia.

22. Un anticuerpo que se une específicamente a una proteína Akt3 humana según la reivindicación 16.

23. El anticuerpo según la reivindicación 22, que reconoce específicamente un epítipo dentro de un péptido que tiene la secuencia Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys.

24. El anticuerpo según la reivindicación 23, que es policlonal.

25. Un método para escrutar moléculas que estimulan o inhiben la actividad de Akt3 en una célula, comprendiendo el método

- poner en contacto una proteína Akt3 según la reivindicación 16 con una molécula candidata; y

- detectar la actividad de Akt3 en presencia de la molécula.

26. El método según la reivindicación 25, en donde la molécula es un agonista de Akt3.

27. El vector según la reivindicación 8, en el que la secuencia de control de la expresión comprende un promotor que es funcional en las células de mamífero.

28. El vector según la reivindicación 27, en el que el promotor se selecciona entre el grupo consistente en promotores víricos, celulares o sintéticos.

29. Un virus recombinante defectuoso para la replicación que comprende en su genoma el ácido nucleico según la reivindicación 1.

30. El virus recombinante defectuoso para la replicación según la reivindicación 29, en donde el virus se selecciona entre el grupo consistente en retrovirus, adenovirus, virus asociados a adenovirus, virus vaccinia y virus VSH.

Figura 1A

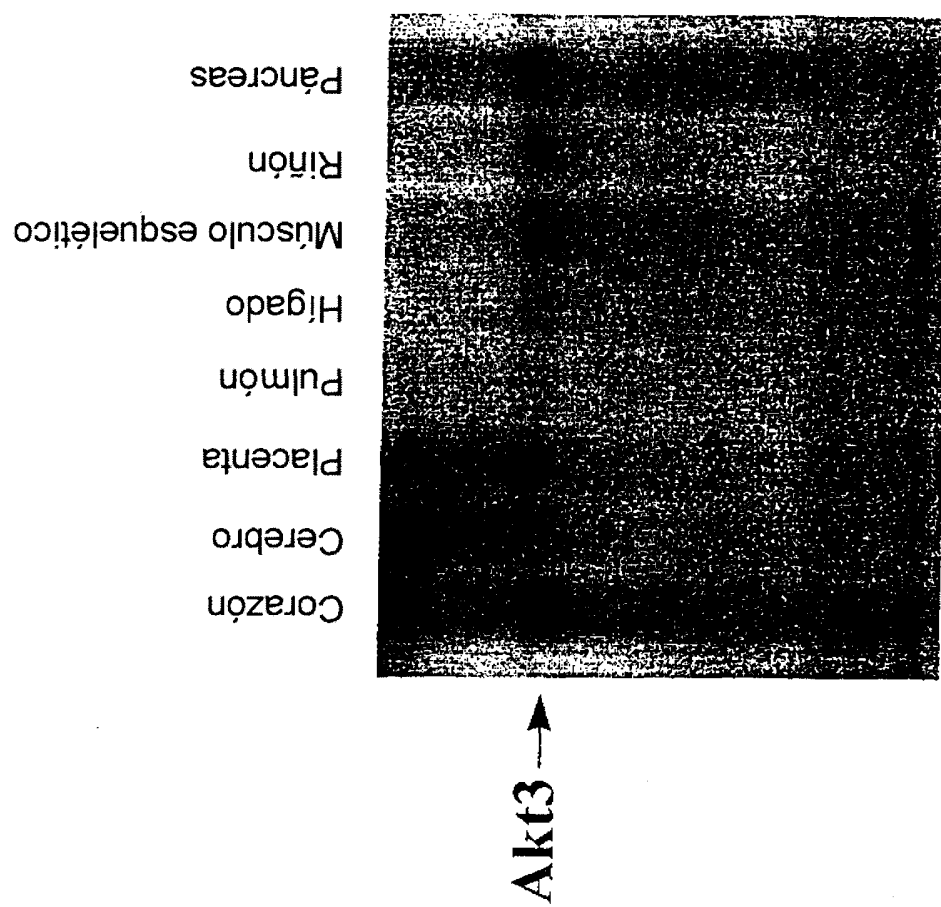
	1		50
h-akt3	MSDVTIVKEG	WVQKRGEYIK	NWRPRYFLK TDGSFIGYKE KPQDVLDPYP
rat-akt3	MSDVTIVKED	WVQKRGEYIK	NWRPRYFLK TDGSFIGYKE KPQDVLDPYP
	51		100
h-akt3	LNNFSVAKCQ	LMKTERPKPN	TFIIRCLQWT TVIERTFHVD TPEEREWE
rat-akt3	LNNFSVAKCQ	LMKTERPKPN	TFIIRCLQWT TVIERTFHVD TPEEREWE
	101		150
h-akt3	AIQAVADRLQ	RQEEERMNCS	PTSQIDNIGE EEMDASTHH KRKTMNDFDY
rat-akt3	AIQAVADRLQ	RQEEERMNCS	PTSQIDNIGE EEMDASTHH KRKTMNDFDY
	151		200
h-akt3	LKLLGKGTFG	KVILVREKAS	GKYYAMKILK KEVIIAKDEV AHTLTESRVL
rat-akt3	LKLLGKGTFG	KVILVREKAS	GKYYAMKILK KEVIIAKDEV AHTLTESRVL
	201		250
h-akt3	KNTRHPFLTS	LKYSFQTKDR	LCFVMEYVNG GELFFHLSRE RVFSEDRTF
rat-akt3	KNTRHPFLTS	LKYSFQTKDR	LCFVMEYVNG GELFFHLSRE RVFSEDRTF
	251		300
h-akt3	YGAEIVSALD	YLHSGKIVYR	DLKLENLMLD KDGHKITDF GLCKEGITDA
rat-akt3	YGAEIVSALD	YLHSGKIVYR	DLKLENLMLD KDGHKITDF GLCKEGITDA
	301		350
h-akt3	ATMKTFCGTP	EYLAPEVLED	NDYGRAVDWW GLGVVYEMM CGRLPFYNQD
rat-akt3	ATMKTFCGTP	EYLAPEVLED	NDYGRAVDWW GLGVVYEMM CGRLPFYNQD
	351		400
h-akt3	HEKLFELILM	EDIKFPRTLS	SDAKSLLSGL LIKDPNKRLG GGPDDAKEIM
rat-akt3	HEKLFELILM	EDIKFPRTLS	SDAKSLLSGL LIKDPNKRLG GGPDDAKEIM
	401		450
h-akt3	RHSFFSGVNW	QDVYDKKLVP	PEKPQVTSET DTRYFDEEFT AQTITITPPE
rat-akt3	RHSFFSGVNW	QDVYDKKLVP	PEKPQVTSET DTRYFDEEFT AQTITITPPE
	451	465	
h-akt3	KCQSDCGML	GNWKK	
rat-akt3	KCPL		

# ES 2 310 515 T3

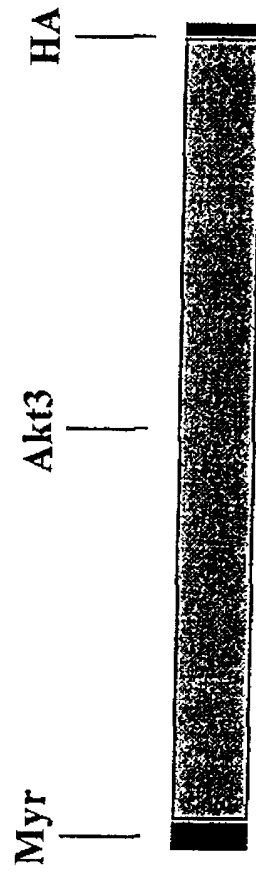
**Figura 1B**

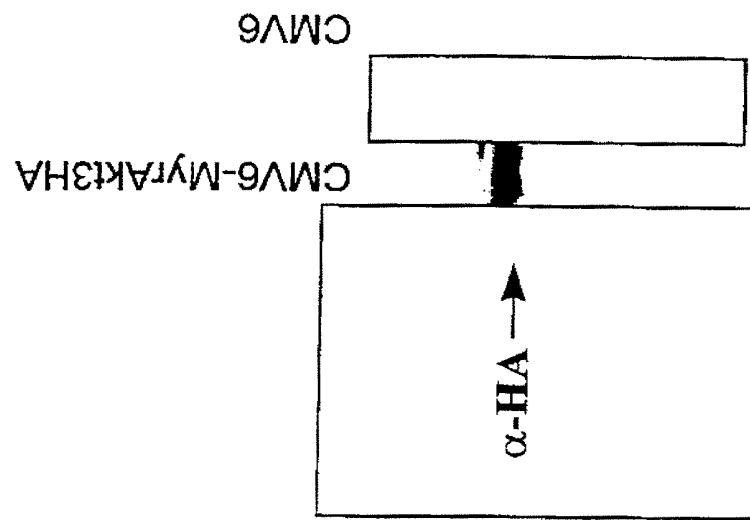
	1		50
h-akt1	MSDVAIVKEG	WLHKRGEYIK	TWRPRYFLK NDGTFIGYKE RPQDQVQREA
h-akt2	MNEVSVIKEG	WLHKRGEYIK	TWRPRYFLK SDGSFIGYKE RPEAPDQTLF
h-akt3	MSDVTIVKEG	WVQKRGEYIK	NWRPRYFLK TDGSFIGYKE KPQDQVLPY-
	51		100
h-akt1	PLNNFSVAQC	QLMKTERPRP	NTFIIRCLQW TTVIERTFHV ETPEEREWT
h-akt2	PLNNFSVAEC	QLMKTERPRP	NTFVIRCLQW TTVIERTFHV DSPDEREWM
h-akt3	PLNNFSVAKC	QLMKTERPKP	NTFIIRCLQW TTVIERTFHV DTPEEREWT
	101		150
h-akt1	TAIQTVADGL	KKQE--EEM	DFRSGSPSDN SGAEMEVS AKPKHRVTMN
h-akt2	RAIQMVANSI	KQRAPGEDPH	DYKCGSPSDS STTEEMEVAV SKARAKVTMN
h-akt3	EAIQAVADRL	QRQE--EEM	NCSPTSQIDN IGEEEMDAST THHKRK-TMN
	151		200
h-akt1	EFEYLKLLGK	GTFGKVILVK	EKATGRYYAM KILKKEVIVA KDEVAHTLTE
h-akt2	DFDYLKLLGK	GTFGKVILVR	EKATGRYYAM KILRKEVIA KDEVAHTVTE
h-akt3	DFDYLKLLGK	GTFGKVILVR	EKASGKYYAM KILKKEVIA KDEVAHTLTE
	201		250
h-akt1	NRVLQNSRHP	FLTALKYSFQ	THDRLCFVME YANGGELFFH LSRERVFSED
h-akt2	SRVLQNRHP	FLTALKYAFQ	THDRLCFVME YANGGELFFH LSRERVFTTE
h-akt3	SRVLKNRHP	FLTSALKYSFQ	TKDRLCFVME YVNGGELFFH LSRERVFSED
	251		300
h-akt1	RAREFYGAIEV	SALDYLHSEK	NVYRDLKLE NLMLDKDGH KIDDFGLCKE
h-akt2	RAREFYGAIEV	SALEYLHS-R	DVYRDLKLE NLMLDKDGH KIDDFGLCKE
h-akt3	RTRFYGAIEV	SALDYLHSGK	-IVYRDLKLE NLMLDKDGH KIDDFGLCKE
	301		350
h-akt1	GIKDGATMKT	FCGTPEYLAP	EVLEDNDYGR AVDWWGLGVV MYEMMCGRLP
h-akt2	GISDGATMKT	FCGTPEYLAP	EVLEDNDYGR AVDWWGLGVV MYEMMCGRLP
h-akt3	GITDAATMKT	FCGTPEYLAP	EVLEDNDYGR AVDWWGLGVV MYEMMCGRLP
	351		400
h-akt1	FYNQDHEKLF	ELILMEEIRF	PRTLGPPEAKS LLSGLLRKDP KQRLGGGSED
h-akt2	FYNQDHERLF	ELILMEEIRF	PRTLSPPEAKS LLAGLLKKDP KQRLGGGSPD
h-akt3	FYNQDHEKLF	ELILMEDIKF	PRTLSSDAKS LLSGLLRKDP NKRLGGGPPD
	401		450
h-akt1	AKEIMQHRFF	AGIVWQHVEE	KKLSPFFKPQ VTSETDTRYF DEEFTAQMIT
h-akt2	AKEVMEHRFF	LSINWQDVVQ	KKLLPFFKPQ VTSEVDTRYF DDEFTAQSIT
h-akt3	AKEIMRHSFF	SGVNWQDVVD	KKLVPPFPKPQ VTSETDTRYF DEEFTAQTIT
	451		482
h-akt1	ITPPDQDDSM	ECVDSERRPH	FPQFSYSASS TA
h-akt2	ITPPDRYDSL	GLLELDQRTN	FPQFSYSASI R
h-akt3	ITPPEKCCQS	DCGMLGNWKK	

**Figura 2**



**Figura 3A**

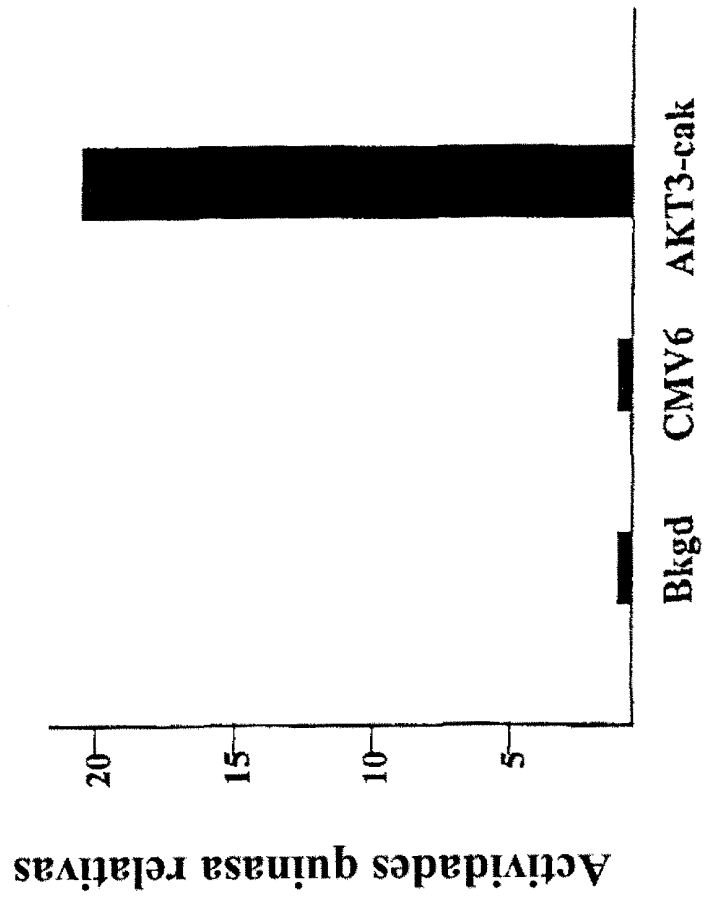




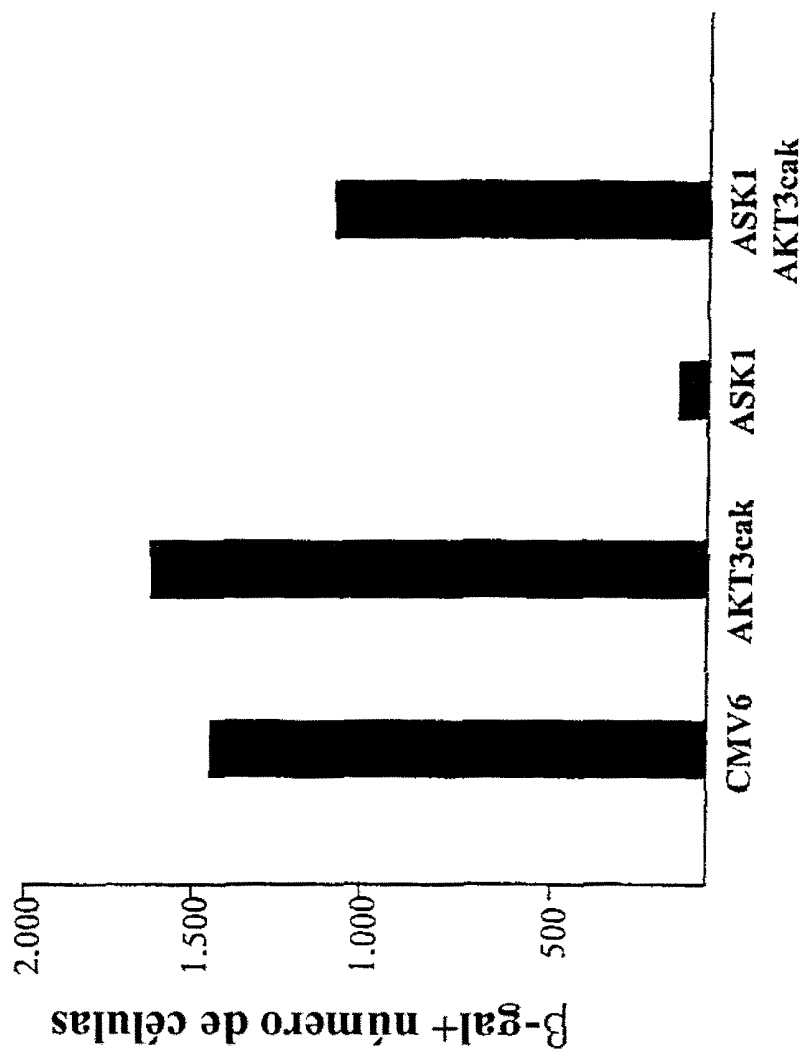
**Figura 3B**



**Figura 3C**



**Figura 4**



# ES 2 310 515 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Guo, Kun  
 Pagnoni, Marco  
 Clark, Kenneth  
 Ivashchenko, Yuri

<120> ÁCIDOS NUCLEICOS, POLIPÉPTIDOS DE AKT Y SUS USOS

<130> A3278A-WO

<140>

<141>

<150> 60/125.108

<151> 1999-03-19

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1570

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (126)..(1523)

<400> 1

```

40      gtcgacgttg caggctgagt catcactaga gagtgggaag ggcagcagca gcagagaatc 60
      caaacccctaa agctgatatc acaaagtacc atttctccaa gttgggggct cagagggggag 120
      tcatc atg agc gat gtt acc att gtg aaa gaa ggt tgg gtt cag aag agg 170
      Met Ser Asp Val Thr Ile Val Lys Glu Gly Trp Val Gln Lys Arg
45          1          5          10          15
      gga gaa tat ata aaa aac tgg agg cca aga tac ttc ctt ttg aag aca 218
      Gly Glu Tyr Ile Lys Asn Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Thr
          20          25          30
50      gat ggc tca ttc ata gga tat aaa gag aaa cct caa gat gtg gat tta 266
      Asp Gly Ser Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Lys Pro Gln Asp Val Asp Leu
          35          40          45
55      cct tat ccc ctc aac aac ttt tca gtg gca aaa tgc cag tta atg aaa 314
      Pro Tyr Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Lys Cys Gln Leu Met Lys
          50          55          60
      aca gaa cga cca aag cca aac aca ttt ata atc aga tgt ctc cag tgg 362
      Thr Glu Arg Pro Lys Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp
          65          70          75
60      act act gtt ata gag aga aca ttt cat gta gat act cca gag gaa agg 410
      Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Thr Pro Glu Glu Arg
          80          85          90          95
65      gaa gaa tgg aca gaa gct atc cag gct gta gca gac aga ctg cag agg 458
      Glu Glu Trp Thr Glu Ala Ile Gln Ala Val Ala Asp Arg Leu Gln Arg
  
```

# ES 2 310 515 T3

	100	105	110	
5	caa gaa gag gag aga atg aat tgt agt cca act tca caa att gat aat Gln Glu Glu Glu Arg Met Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gln Ile Asp Asn 115 120 125	506		
10	ata gga gag gaa gag atg gat gcc tct aca acc cat cat aaa aga aag Ile Gly Glu Glu Glu Met Asp Ala Ser Thr Thr His His Lys Arg Lys 130 135 140	554		
15	aca atg aat gat ttt gac tat ttg aaa cta cta ggt aaa ggc act ttt Thr Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe 145 150 155	602		
20	ggg aaa gtt att ttg gtt cga gag aag gca agt gga aaa tac tat gct Gly Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr Tyr Ala 160 165 170 175	650		
25	atg aag att ctg aag aaa gaa gtc att att gca aag gat gaa gtg gca Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp Glu Val Ala 180 185 190	698		
30	cac act cta act gaa agc aga gta tta aag aac act aga cat ccc ttt His Thr Leu Thr Glu Ser Arg Val Leu Lys Asn Thr Arg His Pro Phe 195 200 205	746		
35	tta aca tcc ttg aaa tat tcc ttc cag aca aaa gac cgt ttg tgt ttt Leu Thr Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr Lys Asp Arg Leu Cys Phe 210 215 220	794		
40	gtg atg gaa tat gtt aat ggg ggc gag ctg ttt ttc cat ttg tcg aga Val Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg 225 230 235	842		
45	gag cgg gtg ttc tct gag gac cgc aca cgt ttc tat ggt gca gaa att Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile 240 245 250 255	890		
50	gtc tct gcc ttg gac tat cta cat tcc gga aag att gtg tac cgt gat Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp 260 265 270	938		
55	ctc aag ttg gag aat cta atg ctg gac aaa gat ggc cac ata aaa att Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile 275 280 285	986		
60	aca gat ttt gga ctt tgc aaa gaa ggg atc aca gat gca gcc acc atg Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Ala Thr Met 290 295 300	1034		
65	aag aca ttc tgt ggc act cca gaa tat ctg gca cca gag gtg tta gaa Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu 305 310 315	1082		
	gat aat gac tat ggc cga gca gta gac tgg tgg ggc cta ggg gtt gtc Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val 320 325 330 335	1130		
	atg tat gaa atg atg tgt ggg agg tta cct ttc tac aac cag gac cat Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His 340 345 350	1178		

# ES 2 310 515 T3

gag aaa ctt ttt gaa tta ata tta atg gaa gac att aaa ttt cct cga 1226  
 Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg  
                   355                                  360                                  365

5 aca ctc tct tca gat gca aaa tca ttg ctt tca ggg ctc ttg ata aag 1274  
 Thr Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys  
                   370                                  375                                  380

10 gat cca aat aaa cgc ctt ggt gga gga cca gat gat gca aaa gaa att 1322  
 Asp Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Ala Lys Glu Ile  
                   385                                  390                                  395

15 atg aga cac agt ttc ttc tct gga gta aac tgg caa gat gta tat gat 1370  
 Met Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp  
                   400                                  405                                  410                                  415

20 aaa aag ctt gta cct cct ttt aaa cct caa gta aca tct gag aca gat 1418  
 Lys Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp  
                                   420                                  425                                  430

25 act aga tat ttt gat gaa gaa ttt aca gct cag act att aca ata aca 1466  
 Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr  
                                   435                                  440                                  445

30 cca cct gaa aaa tgt cag caa tca gat tgt ggc atg ctg ggt aac tgg 1514  
 Pro Pro Glu Lys Cys Gln Gln Ser Asp Cys Gly Met Leu Gly Asn Trp  
                   450                                  455                                  460

35 aaa aaa taa taaaaagtaa gtttcaatag ctaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1570  
 Lys Lys  
                   465

<210> 2  
 <211> 465  
 <212> PRT  
 40 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

45 Met Ser Asp Val Thr Ile Val Lys Glu Gly Trp Val Gln Lys Arg Gly  
       1                                  5                                  10                                  15  
 Glu Tyr Ile Lys Asn Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Thr Asp  
                                   20                                  25                                  30  
 Gly Ser Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Lys Pro Gln Asp Val Asp Leu Pro  
                                   35                                  40                                  45

50 Tyr Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Lys Cys Gln Leu Met Lys Thr  
       50                                  55                                  60  
 Glu Arg Pro Lys Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp Thr  
       65                                  70                                  75                                  80

55 Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Thr Pro Glu Glu Arg Glu  
                                   85                                  90                                  95  
 Glu Trp Thr Glu Ala Ile Gln Ala Val Ala Asp Arg Leu Gln Arg Gln  
                                   100                                  105                                  110

60 Glu Glu Glu Arg Met Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gln Ile Asp Asn Ile  
       115                                  120                                  125  
 Gly Glu Glu Glu Met Asp Ala Ser Thr Thr His His Lys Arg Lys Thr  
       130                                  135                                  140

65 Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly  
       145                                  150                                  155                                  160  
 Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr Tyr Ala Met

# ES 2 310 515 T3

5                                   165                                   170                                   175  
       Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp Glu Val Ala His  
                                  180                                   185                                   190  
 10   Thr Leu Thr Glu Ser Arg Val Leu Lys Asn Thr Arg His Pro Phe Leu  
                                  195                                   200                                   205  
       Thr Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr Lys Asp Arg Leu Cys Phe Val  
                                  210                                   215                                   220  
       Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu  
       225                                   230                                   235                                   240  
       Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val  
                                  245                                   250                                   255  
       Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp Leu  
                                  260                                   265                                   270  
 15   Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr  
                                  275                                   280                                   285  
       Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Ala Thr Met Lys  
                                  290                                   295                                   300  
 20   Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp  
       305                                   310                                   315                                   320  
       Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met  
                                  325                                   330                                   335  
 25   Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu  
                                  340                                   345                                   350  
       Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg Thr  
                                  355                                   360                                   365  
       Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys Asp  
                                  370                                   375                                   380  
 30   Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Ala Lys Glu Ile Met  
       385                                   390                                   395                                   400  
       Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp Lys  
                                  405                                   410                                   415  
 35   Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr  
                                  420                                   425                                   430  
       Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr Pro  
                                  435                                   440                                   445  
 40   Pro Glu Lys Cys Gln Gln Ser Asp Cys Gly Met Leu Gly Asn Trp Lys  
       450                                   455                                   460  
       Lys  
       465

45   <210> 3  
       <211> 24  
       <212> ADN  
 50   <213> Secuencia Artificial  
       <220>  
       <220>  
 55   <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de la PCR  
       <400> 3  
 60       tccaaaccct aaagctgata tcac                   24  
       <210> 4  
       <211> 22  
 65   <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial

## ES 2 310 515 T3

<220>

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de la PCR

<400> 4

cctggatagc ttctgtccat tc 22

10

<210> 5

<211> 74

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de la PCR

<400> 5

25 atgagcgatg ttaccattgt gaaagaaggt tgggttcaga agaggggaga atatataaaa 60  
aactggaggc caag 74

<210> 6

30 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de la PCR

<400> 6

ttatttttc caggtaccca gcatgcc 27

45

<210> 7

<211> 90

<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>

55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de la PCR

<400> 7

60 gcgcgcgaat tcccaccatg ggtagcaaca agagcaagcc caaggatgcc agccagcggc 60  
gccgcagcag cgatgttacc attgtgaaag 90

<210> 8

65 <211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

## ES 2 310 515 T3

<220>

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de la PCR

<400> 8

10 **gcgcgcgggc ccttaggcgt agtcggggac gtcgtacggg tattttttcc agttaccag 60**  
**catgcc 66**

<210> 9

<211> 51

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de la PCR

25 <400> 9

**cggggtacca ccatgggtag caacaagagc aagcccaagg atgccagcca g 51**

<210> 10

30 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de la PCR

<400> 10

**ccggaattct taggcgtagt cggggacgtc 30**

45 <210> 11

<211> 39

<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>

55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de la PCR

<400> 11

60 **aagggccgcc agtgtgctgg agagatgagc gatgccttc 39**

<210> 12

<211> 35

65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial



# ES 2 310 515 T3

<220>

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de la PCR

<400> 12

10 ccctctagat gctcattctg catttgatcc agctg 35

<210> 13

<211> 480

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<220>

20 <400> 13

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

# ES 2 310 515 T3

	Tyr	Arg	Asp	Ile	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Gly	His	
			275					280					285				
5	Ile	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Cys	Lys	Glu	Gly	Ile	Ser	Asp	Gly	
		290					295					300					
	Ala	Thr	Met	Lys	Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	
	305					310					315					320	
10	Val	Leu	Glu	Asp	Asn	Asp	Tyr	Gly	Arg	Ala	Val	Asp	Trp	Trp	Gly	Leu	
					325					330					335		
	Gly	Val	Val	Met	Tyr	Glu	Met	Met	Cys	Gly	Arg	Leu	Pro	Phe	Tyr	Asn	
15				340					345					350			
	Gln	Asp	His	Glu	Arg	Leu	Phe	Glu	Leu	Ile	Leu	Met	Glu	Glu	Ile	Arg	
			355					360					365				
20	Phe	Pro	Arg	Thr	Leu	Ser	Pro	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	
		370					375					380					
	Leu	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Gln	Arg	Leu	Gly	Gly	Gly	Pro	Ser	Asp	Ala	
25	385					390					395					400	
	Lys	Glu	Val	Met	Glu	His	Arg	Phe	Phe	Leu	Ser	Ile	Asn	Trp	Gln	Asp	
					405					410					415		
30	Val	Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Leu	Pro	Pro	Phe	Lys	Pro	Gln	Val	Thr	Ser	
				420					425					430			
	Glu	Val	Asp	Thr	Arg	Tyr	Phe	Asp	Asp	Glu	Phe	Thr	Ala	Gln	Ser	Ile	
35			435					440					445				
	Thr	Ile	Thr	Pro	Pro	Asp	Arg	Tyr	Asp	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu	Glu	Leu	
		450					455					460					
40	Asp	Gln	Arg	Thr	His	Phe	Pro	Gln	Phe	Ser	Tyr	Ser	Ala	Ser	Ile	Arg	
	465					470					475					480	
45	<210>	14															
	<211>	480															
	<212>	PRT															
	<213>	<i>Homo sapiens</i>															
50	<400>	14															
	Met	Ser	Asp	Val	Ala	Ile	Val	Lys	Glu	Gly	Trp	Leu	His	Lys	Arg	Gly	
55	1				5					10					15		
	Glu	Tyr	Ile	Lys	Thr	Trp	Arg	Pro	Arg	Tyr	Phe	Leu	Leu	Lys	Asn	Asp	
				20					25					30			
60	Gly	Thr	Phe	Ile	Gly	Tyr	Lys	Glu	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Asp	Gln	Arg	
			35					40					45				
	Glu	Ala	Pro	Leu	Asn	Asn	Phe	Ser	Val	Ala	Gln	Cys	Gln	Leu	Met	Lys	
65		50					55					60					

# ES 2 310 515 T3

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

65

# ES 2 310 515 T3

	385		390		395		400									
5	Glu	Ile	Met	Gln	His	Arg	Phe	Phe	Ala	Gly	Ile	Val	Trp	Gln	His	Val
				405						410					415	
	Tyr	Glu	Lys	Lys	Leu	Ser	Pro	Pro	Phe	Lys	Pro	Gln	Val	Thr	Ser	Glu
				420					425					430		
10	Thr	Asp	Thr	Arg	Tyr	Phe	Asp	Glu	Glu	Phe	Thr	Ala	Gln	Met	Ile	Thr
			435					440					445			
	Ile	Thr	Pro	Pro	Asp	Gln	Asp	Asp	Ser	Met	Glu	Cys	Val	Asp	Ser	Glu
15		450				455					460					
	Arg	Arg	Pro	His	Phe	Pro	Gln	Phe	Ser	Tyr	Ser	Ala	Ser	Ser	Thr	Ala
	465					470					475					480
20	<210> 15															
	<211> 22															
	<212> ADN															
25	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
30	<220>															
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de la PCR															
	<400> 15															
35	tttcggaggc tctagttgg tg 22															
	<210> 16															
	<211> 21															
40	<212> ADN															
	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
45	<220>															
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de la PCR															
50	<400> 16															
	cccaactgg agaatggta c 21															
	<210> 17															
55	<211> 454															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
60	<220>															
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de la PCR															
65																

# ES 2 310 515 T3

<400> 17

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

# ES 2 310 515 T3

	340	345	350
5	Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg Thr 355	360	365
	Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys Asp 370	375	380
10	Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Pro Lys Glu Ile Met 385	390	395 400
15	Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp Lys 405	410	415
	Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr 420	425	430
20	Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr Pro 435	440	445
25	Pro Glu Lys Cys Pro Leu 450		
30			
35			
40			
45			
50			
55			
60			
65			