



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 328**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02750377 .0**

96 Fecha de presentación : **31.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1549760**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54

Título: **SAK: modulación de la proliferación celular para el tratamiento del cáncer.**

30

Prioridad: **01.08.2001 US 309632 P**
21.12.2001 US 26021

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2009

73

Titular/es: **Rigel Pharmaceuticals, Inc.**
240 E. Grand Avenue
South San Francisco, California 94080, US

72

Inventor/es: **Demo, Susan;**
Hitoshi, Yasumichi y
Jenkins, Yonchu

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 320 328 T3

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

DESCRIPCIÓN

SAK: modulación de la proliferación celular para el tratamiento del cáncer.

5 Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad al documento USSN 60/309.632, presentado el 1 de agosto de 2001 y al documento USSN 10/026.021, presentado el 21 de diciembre de 2001.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para identificar y utilizar agentes, incluidas composiciones químicas de moléculas pequeñas, anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos antisentido, ARNi y ribozimas, que interfieren con la unión de un polipéptido de SAK.

15 Antecedentes de la invención

La regulación del ciclo celular desempeña un papel crítico en la enfermedad neoplásica, así como en la enfermedad causada por células no cancerosas, patológicamente en proliferación. La proliferación celular normal está firmemente regulada por la activación y desactivación de una serie de proteínas que constituyen la maquinaria del ciclo celular. La expresión y la actividad de los componentes del ciclo celular pueden alterarse durante el desarrollo de una diversidad de enfermedades humanas tales como el cáncer, la enfermedad cardiovascular, la psoriasis, donde la proliferación aberrante contribuye a la patología de la enfermedad. Existen tamices genéticos para aislar componentes importantes para la regulación del ciclo celular usando diferentes organismos tales como levaduras, gusanos, moscas, etc. Sin embargo, la implicación de una proteína en la regulación del ciclo celular en un sistema modelo no siempre es indicativa de su papel en el cáncer y en otras enfermedades proliferativas. Por consiguiente, hay una necesidad de establecer la selección para comprender las enfermedades humanas causadas por la interrupción de la regulación del ciclo celular. Es importante identificar las proteínas, sus ligandos y sustratos, y las vías de transducción de señales secuencia abajo implicados en la regulación del ciclo celular y las neoplasias en seres humanos para desarrollar reactivos terapéuticos para tratar el cáncer y otras enfermedades proliferativas.

El documento US 5.976.893 describe un procedimiento para identificar una sustancia que une una tirosina protein-cinasa serina/treonina que comprende las etapas de (i) hacer reaccionar una tirosina protein-cinasa serina/treonina con una sustancia de prueba bajo condiciones que permiten la unión de la proteína y la sustancia de prueba, en las que la proteína tiene actividad tirosina cinasa serina/treonina y una determinada secuencia de aminoácidos, y (ii) realizar el ensayo de unión, en el que la detección de unión indica que la sustancia de prueba se une a la proteína.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para identificar un compuesto capaz de interferir con la unión de un polipéptido de SAK o fragmento del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (i) combinar un polipéptido de SAK o un fragmento del mismo con un polipéptido de Chk2 y el compuesto, en el que el polipéptido de SAK o el fragmento del mismo tiene actividad cinasa y está codificado por un ácido nucleico que hibrida bajo condiciones rigurosas a un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 2; y (ii) determinar la unión del polipéptido de SAK o fragmento del mismo a Chk2.

En una forma de realización, se combinan primero el polipéptido de SAK o fragmento del mismo y el polipéptido de Chk2. En otra forma de realización, la unión del polipéptido de SAK o fragmento del mismo a Chk2 se determina *in vitro*. En otra forma de realización, el polipéptido de SAK o fragmento del mismo y el polipéptido de Chk2 se expresan en una célula. En otra forma de realización, la célula es una levadura o una célula de mamífero. En otra forma de realización, el polipéptido de SAK o fragmento del mismo se fusiona a un polipéptido heterólogo. En otra forma de realización, la unión del polipéptido de SAK o fragmento del mismo a Chk2 se determina midiendo la expresión del gen informador o la actividad cinasa de SAK.

55 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona una secuencia de nucleótidos (SEC. ID N°: 1) y de aminoácidos (SEC. ID N°: 2) de SAK humana.

60 La Figura 2 proporciona una alineación del dominio de la cinasa SAK con otras cinasas mitóticas.

La Figura 3 proporciona un resumen de estudios de validación de diana para SAK.

65 La Figura 4 proporciona los datos que muestran que la sobreexpresión de los mutantes de SAK tiene un efecto antiproliferativo más pronunciado que el tipo salvaje en las células tumorales A549.

La Figura 5 proporciona los datos que muestran que los mutantes de SAK tienen un efecto antiproliferativo más pronunciado que el tipo salvaje en las células tumorales A549.

ES 2 320 328 T3

La Figura 6 proporciona los datos que muestran que los mutantes de SAK tienen un efecto antiproliferativo más pronunciado que SAK de tipo salvaje en las células MCF7.

5 La Figura 7 proporciona los datos que muestran que SAK de tipo salvaje y los mutantes de SAK tienen efectos antiproliferativos similares en las células PC-3.

La Figura 8 proporciona los datos que muestran que un mutante K41M de SAK tiene un efecto antiproliferativo débil en las células H1299.

10 La Figura 9 proporciona los datos que muestran que SAK de tipo salvaje y los mutantes de SAK no tienen efecto antiproliferativo en células normales en estudios de positividad de GFP.

La Figura 10 proporciona los datos que muestran que SAK de tipo salvaje y las proteínas mutantes de SAK no tienen actividad antiproliferativa significativa en células normales.

15 La Figura 11 proporciona los datos que muestran que el mutante K41M de SAK no tiene efectos antiproliferativos potentes en células normales.

20 La Figura 12 proporciona los datos que muestran que la reducción de SAK con transfecciones de oligos antisentido es antiproliferativa en células HeLa y en células cancerosas A549.

La Figura 13 proporciona los datos que muestran que la reducción de SAK con transfecciones oligos antisentido es débilmente antiproliferativa débil en las células Huvec.

25 La Figura 14 proporciona los datos que muestran que el ARNm de SAK se sobreexpresa en algunas líneas celulares tumorales.

La Figura 15 proporciona un resumen de datos de SAK.

30 La Figura 16 proporciona un modelo para la actividad antiproliferativa asociada con SAK.

La Figura 17 muestra un ensayo bioquímico para la actividad cinasa de SAK.

35 La Figura 18 muestra un protocolo para el ensayo de autofosforilación de SAK.

La Figura 19 muestra la actividad de autofosforilación de SAK producida en *E. coli*.

La Figura 20 muestra que MBP es un sustrato de SAK *in vivo*.

40 La Figura 21 muestra que la actividad de SAK es comparable con la de MAPK.

Descripción detallada de la invención

Introducción

45 El gen de SAK codifica una serina/treonina cinasa, que es un miembro de la familia de cinasas análogas a Polo, que tiene una secuencia PEST de dominio cinasa en el extremo N terminal, y una caja polo (pb) en el extremo C terminal (véase, por ejemplo, Hudson y col., Gene 241: 65-73 (2000); y Karn y col., Oncol. Rep. 4: 505-510 (1997)). Se cree que los miembros de la familia de cinasas análogas a polo están involucrados la mitosis (véase, por ejemplo, Hudson, *supra*; véase también Genes Dev. 12: 3777-3787 (1998)). Estudios recientes han mostrado que la sobreexpresión de un oligonucleótido antisentido de SAK y SAK de ratón de tipo salvaje en células CHO es antiproliferativo (véase, por ejemplo, la Patente de EEUU N° 5.650.501 y la Patente de EEUU N° 5.976.893). Además, un knockout de SAK de ratón era letal a nivel embrionario, y los embriones mostraron un aumento en la apoptosis (véase, por ejemplo, Hudson y col., Curr. Biol. 11: 441-446 (2001)). Sin embargo, nunca se ha demostrado la implicación de SAK en la transformación celular, la tumorigénesis y los efectos antiproliferativos en células tumorales. Además, el papel de SAK en la regulación del ciclo celular aún no se ha dilucidado.

Como se describe a continuación, los presentes inventores identificaron SAK humana en un ensayo de proteómica, por inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Chk2h. Chk2 es el homólogo de Rad53 de levadura en mamíferos y es una cinasa implicada en la regulación del ciclo celular (véase, por ejemplo, Matsuoka y col., Science 282: 1893-1897 (1998); Blasina y col., Curr. Biol. 9 :1-10 (1999); Brown y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. EEUU 96: 3745-3750 (1999); y Chaturvedi y col., Oncogene 18: 4047-4054 (1999); véase el número de acceso NP_009125 de GenBank para una secuencia proteica de Chk2 humana y el número de acceso NM_007194 para una secuencia de ácido nucleico de Chk2 humana). Se ha mostrado que SAK se une a Chk2 después de haber aislado Chk2 unido a SAK usando un anticuerpo anti-Chk2 y analizado usando espectroscopía de masas (véase Ejemplo 1). Como se muestra en las Figuras 2-11, los estudios negativos dominantes con SAK mutante mostraron que SAK mutante tiene un fenotipo antiproliferativo más potente que SAK de tipo salvaje en células tumorales, mientras que ni el tipo salvaje ni los mutantes de SAK son antiproliferativos en células normales (usando, por ejemplo, ensayos de positividad de GFP

y ensayos del trazadores celulares). Las Figuras 12-13 demuestran que la inhibición del ARNm de SAK con oligos antisentido es antiproliferativa en las células tumorales A549 y en células HeLa. Además, la Figura 14 muestra que el ARNm de SAK se sobreexpresa en algunas líneas celulares tumorales. Estos estudios funcionales, presentados en este documento, demuestran por primera vez que la inhibición de SAK inhibirá el crecimiento de las células tumorales.

5 Por consiguiente SAK representa una diana de fármacos para compuestos que suprimen o activan la proliferación celular en células tumorales, o causan la parada del ciclo celular, causan liberación de la parada del ciclo celular, activan la apoptosis, aumentan la sensibilidad a los reactivos quimioterapéuticos (adyuvantes), y disminuyen la toxicidad de los reactivos quimioterapéuticos. Los agentes identificaron en estos ensayos, incluyendo las moléculas orgánicas pequeñas, los péptidos, péptidos cíclicos, ácidos nucleicos, anticuerpos, ácidos nucleicos antisentido, ARNi y las ribozimas, que modulan la regulación del ciclo celular y la proliferación celular a través de la modulación de la SAK, pueden usarse para tratar las enfermedades relacionadas con la proliferación celular, tales como el cáncer. En particular, los inhibidores del SAK son útiles para la inhibición del crecimiento de células cancerosas y tumorales. Los moduladores de SAK también pueden usarse para modular la sensibilidad de las células frente a los agentes quimioterapéuticos, tales como bleomicina y etopósido, y otros agentes conocidos por los expertos en la técnica. Los moduladores de SAK también pueden usarse para disminuir la toxicidad de tales reactivos quimioterapéuticos.

Por consiguiente, pueden usarse ensayos de cinasa o de autofosforilación usando SAK para identificar los moduladores de la actividad cinasa de SAK, o para identificar las proteínas que se unen a SAK, por ejemplo, sustratos de SAK. En estos ensayos puede usarse el tipo salvaje de SAK de longitud total, SAK mutante (por ejemplo, K41M, D154A o SAK con una delección interna de una de las secuencias PEST), o el dominio cinasa de SAK. Tales ensayos pueden realizarse *in vitro*, o pueden estar basados en células (véase, por ejemplo, Ejemplo 2 y Figuras 17-19). En tales ensayos puede usarse un sustrato de la serina/treonina cinasa tal como MBP o un péptido que tiene el sitio de reconocimiento de fosforilación de la serina/treonina cinasa. Para los ensayos de autofosforilación, SAK actúa como la enzima y como el sustrato. Los controles adecuados incluyen los kit para otras cinasas tales como MAP cinasa 1 y 2 (serina/treonina cinasas), Lyn (p56) o ZAP70 (véase, por ejemplo, Isakov y col., J. Biol. Chem. 271: 15753 (1996); Chan y col., Cell 71: 649 (1992)).

Tales moduladores son útiles para tratar cánceres, tales como el melanoma, el cáncer de mama, ovárico, de pulmón, gastrointestinal y de colon, de próstata, y leucemias y linfomas, por ejemplo, el mieloma múltiple. Además, tales moduladores son útiles para tratar estados de enfermedad no cancerosos causados por células patológicamente en proliferación tales como la hiperplasia de tiroides (enfermedad de Grave), la psoriasis, la hipertrofia prostática benigna, los neurofibromas, la aterosclerosis, la reestenosis y otras enfermedades vasoproliferativas.

35 Definiciones

Por “trastorno asociado con la proliferación celular” o “enfermedad asociada con la proliferación celular” en este documento se entiende un estado de enfermedad que está marcado por un exceso o por un déficit de proliferación celular o de apoptosis. Tales trastornos asociados con la proliferación celular aumentada incluyen, pero no se limitan a, proliferación patológica cancerosa y no cancerosa.

Los términos “SAK” o un ácido nucleico que codifica “SAK” se refieren a los ácidos nucleicos y a las variantes polimórficas del polipéptido, a los alelos, a los mutantes, y a los homólogos interespecies que: (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente 60% de similitud de secuencia de aminoácidos, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, de preferencia 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o mayor similitud de secuencia de aminoácidos, de preferencia sobre de una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000 o más aminoácidos, a una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de SAK (para una secuencia de ácido nucleico de SAK humana, véase, por ejemplo, la Figura 1, SEC. ID N°: 1, o número de acceso NM_014264) o secuencia de aminoácidos de una proteína SAK (para una secuencia proteica de SAK humana, véase, por ejemplo, la Figura 1, SEC. ID N°: 2 o número de acceso NP_055079); (2) se unen a los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, surgidos contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína SAK, y variantes modificadas de manera conservadora de las mismas; (3) hibridan específicamente bajo condiciones de hibridación rigurosas a una hebra antisentido correspondiente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SAK, y variantes modificadas de manera conservadora de las mismas, (4) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene más que aproximadamente 95%, de preferencia más que 96%, 97%, 98%, 99% o mayor similitud de secuencia de nucleótidos, de preferencia sobre una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000 o más nucleótidos, a un ácido nucleico de SAK o a un ácido nucleico que codifica el dominio de la cinasa. De preferencia, el dominio de la cinasa tiene más de 96%, 97%, 98%, o 99% de similitud de aminoácidos al dominio cinasa de SAK humana de SEC. ID N°: 2. Una secuencia de polinucleótidos o de polipéptidos es típicamente de un mamífero incluidos, pero no limitado a, primate, por ejemplo, ser humano; roedor, por ejemplo, rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja, o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y las proteínas incluyen las moléculas que se presentan en la naturaleza o las moléculas recombinantes. Una proteína SAK tiene típicamente actividad de cinasa, por ejemplo, actividad de serina/treonina cinasa (véase, por ejemplo, Figuras 17-19). Los ensayos de cinasa pueden realizarse según los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, usando sustratos que tienen un sitio de reconocimiento de serina/treonina cinasa (véase, por ejemplo, MAP cinasa 1 y MAP cinasa 2, y ZAP-70, y los kits comerciales utilizados para los ensayos de cinasa). Un péptido fosforilado que comprende el sitio de reconocimiento de fosforilación puede detectarse usando un anticuerpo que reconoce una serina o una treonina fosforilada. La SAK puede también empalmarse de manera alternativa (véase, por ejemplo, Hudson, *supra*).

ES 2 320 328 T3

La frase “efectos funcionales” en el contexto de los ensayos para probar los compuestos que modulan la actividad de una proteína SAK incluye la determinación de un parámetro que está indirectamente o directamente bajo la influencia de una SAK, por ejemplo un efecto fenotípico o químico, tal como la capacidad de aumentar o disminuir la proliferación celular, la apoptosis, la parada del ciclo celular, o la actividad de cinasa; o por ejemplo un efecto físico tal como la unión de ligandos o la inhibición de la unión de ligandos. Un efecto funcional por consiguiente incluye la actividad de unión de ligandos, la capacidad de las células para proliferar, la apoptosis y la actividad enzimática. “Efectos funcionales” incluye las actividades *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

Por “determinar el efecto funcional” se entiende ensayar un compuesto que aumenta o disminuye un parámetro que está indirectamente o directamente bajo la influencia de una proteína SAK, por ejemplo, medir efectos físicos y químicos o fenotípicos. Tales efectos funcionales pueden medirse por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción); hidrodinámicas (por ejemplo, forma); cromatográficas; o propiedades de solubilidad para la proteína; medición de marcadores inducibles o activación transcripcional de la proteína; medición de la actividad de unión o ensayos de unión, por ejemplo la unión a los anticuerpos; medición de cambios en la actividad de unión de ligandos o sustratos; medición de la proliferación celular; medición de la apoptosis; medición de la expresión de marcadores de superficie celular; medición de cambios en los niveles de proteína para las secuencias asociadas a SAK; medición de la estabilidad del ARN; fosforilación o desfosforilación; actividad de cinasa; identificación de la expresión secuencia abajo o de gen informador (CAT, luciferasa, β -gal, GFP y similares), por ejemplo, por medio de quimioluminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, unión de anticuerpos y marcadores inducibles.

“Inhibidores”, “activadores” y “moduladores” de secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de SAK se utilizan para referirse a moléculas activadoras, inhibidoras, o moduladoras identificadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo* de secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de SAK. Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen para bloquear parcialmente o totalmente la actividad, disminuir, evitar, retardar la activación, inactivar, desensibilizar o regular negativamente la actividad o la expresión de las proteínas de SAK, por ejemplo, antagonistas. Los “activadores” son compuestos que aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan, agonizan, o regulan positivamente la actividad de la proteína SAK, por ejemplo, agonistas. Inhibidores, activadores o moduladores también incluyen versiones modificadas genéticamente de las proteínas de SAK, por ejemplo, versiones con actividad alterada, así como ligandos que se presentan en la naturaleza y sintéticos, antagonistas, agonistas, anticuerpos, péptidos, péptidos cíclicos, ácidos nucleicos, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas químicas pequeñas y similares. Tales ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, expresar la proteína SAK *in vitro*, en células, o membranas celulares, aplicando compuestos moduladores putativos, y a continuación determinar los efectos funcionales en la actividad, como se describió anteriormente.

Las muestras o los ensayos que comprenden proteínas de SAK que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con las muestras control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el grado de inhibición. A las muestras control (no tratadas con los inhibidores) se les asigna un valor relativo de actividad proteica del 100%. La inhibición de SAK se alcanza cuando el valor de actividad con relación al control es de aproximadamente 80%, de preferencia 50%, de más preferencia 25-0%. La activación de SAK se alcanza cuando el valor de actividad con relación al control (no tratado con los activadores) es de 110%, de preferencia 150%, de más preferencia 200-500% (es decir, dos a cinco veces más elevado con relación al control), de más preferencia 1000-3000% más elevado.

El término “compuesto de prueba” o “candidato a fármaco” o “modulador” o equivalentes gramaticales según se utiliza en este documento describe cualquier molécula, sintética o que se presenta en la naturaleza, por ejemplo, proteína, oligopéptido (por ejemplo, desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, de preferencia desde aproximadamente 10 hasta 20 ó 12 a 18 aminoácidos de longitud, de preferencia 12, 15 ó 18 aminoácidos de longitud), molécula orgánica pequeña, polisacárido, lípido, ácido graso, polinucleótido, oligonucleótido, etc., a ensayar para la capacidad de modular directamente o indirectamente la proliferación celular tumoral. El compuesto de prueba puede estar en la forma de una biblioteca de compuestos de prueba, tal como una biblioteca combinatoria o aleatorizada que proporciona un grado suficiente de diversidad. Los compuestos de prueba se unen opcionalmente a una pareja de fusión, por ejemplo, compuestos marcadores, compuestos de rescate, compuestos de dimerización, compuestos estabilizadores, compuestos direccionables, y otros restos funcionales. Convencionalmente, se generan entidades químicas nuevas con propiedades útiles identificando un compuesto de prueba (llamado “compuesto líder”) con alguna propiedad o actividad deseable, por ejemplo, actividad inhibidora, creando variantes del compuesto líder, y evaluando la propiedad y la actividad de esos compuestos variantes. Frecuentemente, se utilizan procedimientos de selección de alta producción (HTS) para tal análisis.

Una “molécula orgánica pequeña” se refiere a una molécula orgánica, sintética o que se presenta en la naturaleza, que tiene un peso molecular de más de aproximadamente 50 daltons y menos de aproximadamente 2500 daltons, de preferencia menos de aproximadamente 2000 daltons, de preferencia entre aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1000 daltons, de más preferencia entre aproximadamente 200 hasta aproximadamente 500 daltons.

“Muestra biológica” incluye secciones de tejidos tales como muestras de biopsias y autopsias, y secciones congeladas tomadas para fines histológicos. Tales muestras incluyen sangre, esputo, tejido, células cultivadas, por ejemplo, cultivos primarios, explantes y células transformadas, heces, orina, etc. Una muestra biológica se obtiene típicamente de un organismo eucariota, de mayor preferencia un mamífero tal como un primate por ejemplo, chimpancés o ser humano; vaca; perro; gato; un roedor, por ejemplo, cobaya, rata, ratón; conejo; o un ave; reptil; o pez.

ES 2 320 328 T3

Los términos “idéntico” o “similitud” por ciento, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente 60% de similitud, de preferencia 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o mayor similitud) sobre una región especificada (por ejemplo, secuencia de nucleótidos SEC. ID N°: 1 o secuencia de aminoácidos SEC. ID N°: 2), cuando se compara y alinea para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación o región designada) según se mide usando algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros por defecto que se describen a continuación, o por alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, el sitio web de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> o similar). Se dice entonces que tales secuencias son “sustancialmente idénticas”. Esta definición también se refiere, o puede aplicarse, al cumplimiento de una secuencia de prueba. La definición también incluye secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, así como las que tienen sustituciones. Como se describe a continuación, los algoritmos de preferencia pueden explicar huecos y similares. De preferencia, existe similitud sobre una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o de más preferencia sobre una región que tiene 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, de ser necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. De preferencia, pueden usarse los parámetros por defecto del programa, o pueden designarse parámetros alternativos. Posteriormente el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de similitud de secuencia para las secuencias de prueba con relación a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, según se utiliza en este documento, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera de las posiciones contiguas seleccionadas del grupo constituido por desde 20 hasta 600, usualmente desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200, más usualmente desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 150 en la que una secuencia puede compararse a una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén óptimamente alineadas. Los procedimientos de alineación de las secuencias para la comparación son muy conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EEUU* 85: 2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y col., eds. suplemento 1995)).

Un ejemplo de preferencia de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col., *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402 (1977) y Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se utilizan, con los parámetros descritos en este documento, para determinar el porcentaje de similitud de secuencia para los ácidos nucleicos y las proteínas. El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible para el público a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar los pares de secuencias de puntuación elevada (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia incógnita, que coinciden o satisfacen una cierta puntuación T de umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Se hace referencia a T como al umbral de puntuación de la palabra de proximidad (Altschul y col., *supra*). Estas palabras iniciales de proximidad encontradas actúan como semilla para iniciar las búsquedas para encontrar HSPs más largos que las contienen. Las palabras encontradas se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta el punto en que puede incrementarse la puntuación de la alineación acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos con acoplamiento; siempre >0) y N (puntuación de penalización para los residuos con acoplamiento erróneo; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las palabras encontradas en cada dirección se detiene: cuando la puntuación de alineación acumulada disminuye en una cantidad X desde su valor máximo alcanzado; cuando la puntuación acumulada va hasta cero o menos, por la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o cuando se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo de BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valores por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Nacional. Acad. Sci. EEUU* 89: 10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera indistinta en este documento para referirse a un polímero de residuos aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoácido son miméticos químicos artificiales de un aminoácido correspondiente que se presenta en la naturaleza, así como a los polímeros de aminoácidos que se presentan en la naturaleza y que no se presentan naturalmente.

ES 2 320 328 T3

El término “aminoácido” se refiere a los aminoácidos sintéticos y a los que se presentan en la naturaleza, así como a los análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se presentan en la naturaleza. Los aminoácidos que se presentan en la naturaleza son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que posteriormente se modifican, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se presenta en la naturaleza, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, a un grupo carboxilo, a un grupo amino, y a un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales del péptido modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se presenta en la naturaleza. Mimético de aminoácido se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química del general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido que se presenta en la naturaleza.

En este documento puede hacerse referencia a los aminoácidos por sus símbolos comúnmente conocidos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión Bioquímica de Nomenclatura IUPAC-IUB. Puede referirse a los nucleótidos, asimismo, por sus códigos comúnmente aceptados de letra única.

“Variantes modificadas de manera conservadora” se aplica a secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a las secuencias esencialmente idénticas. Por la redundancia del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por consiguiente, en cada posición donde está especificada una alanina por un codón, el codón puede estar alterado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones del ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Uno experto reconocerá que cada codón en ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para la metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para el triptofano) puede modificarse para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de las sondas reales.

Como para las secuencias de aminoácidos, un experto en la técnica reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o a una secuencia proteica que alteren, añadan o supriman un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de manera conservadora” donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. En la técnica se conocen tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Tales variantes modificadas de manera conservadora son además de y no excluyen las variantes polimórficas, los homólogos y los alelos interespecies.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras uno para el otro: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Acido aspártico (D), Acido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirocina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

Las estructuras macromoleculares tales como las estructuras de polipéptidos pueden describirse en términos de diversos niveles de organización. Para un análisis general de esta organización, véase, por ejemplo, Alberts y col., Molecular Biology of the Cell (3^o ed., 1994) y Cantor y Schimmel, Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules (1980). “Estructura primaria” se refiere a la secuencia de aminoácidos de un péptido particular. “Estructura secundaria” se refiere a estructuras tridimensionales, ordenadas localmente, dentro de un polipéptido. Estas estructuras se conocen comúnmente como dominios, por ejemplo, dominios enzimáticos, dominios extracelulares, dominios transmembranarios, dominios de poros, y dominios citoplásmicos de cola. Los dominios son porciones de un polipéptido que forman una unidad compacta del polipéptido y tienen típicamente de 15 a 350 aminoácidos de longitud. Los dominios ejemplares incluyen dominios con actividad enzimática, por ejemplo, un dominio cinasa. Los dominios típicos están compuestos por secciones de menor organización tales como estiramientos de láminas β y hélices α . “Estructura terciaria” se refiere a la estructura tridimensional completa de un monómero del polipéptido. “Estructura cuaternaria” se refiere a la estructura tridimensional formada por la asociación no covalente de unidades terciarias independientes. Los términos anisotrópicos se conocen también como términos de energía.

“Ácido nucleico” se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros en forma de hebra única o doble. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos o residuos o enlaces modificados de la estructura principal, que son sintéticos, se presentan en la naturaleza y que no se presentan en la naturaleza, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quiral, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs).

ES 2 320 328 T3

A menos que se indique de otra manera, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente las variantes modificadas de manera conservadora del mismo (por ejemplo, sustituciones de codones redundantes) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente en forma de hebra única o doble. Específicamente, pueden lograrse sustituciones de codones redundantes generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituyen con residuos de bases mezcladas y/o desoxiinosina (Batzler y col., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka y col., *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); Rossolini y col., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). El término ácido nucleico se usa indistintamente con genes, ADNc, ARNm, oligonucleótidos y polinucleótidos.

Una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente “variantes de empalme”. De manera similar, una proteína particular codificada por un ácido nucleico abarca implícitamente cualquier proteína codificada por una variante de empalme de ese ácido nucleico. Las “variantes de empalme”, como el nombre sugiere, son productos empalmes alternativos de un gen. Después de la transcripción, una transcripción inicial del ácido nucleico puede empalmarse de manera que productos diferentes (alternativos) de empalme de ácido nucleico codifican diferentes polipéptidos. Los mecanismos para la producción de variantes de empalme varían, pero incluyen el empalme alternado de exones. Los polipéptidos alternados derivados del mismo ácido nucleico por transcripción de ultralectura están también abarcados por esta definición. Cualquier producto de una reacción de empalme, incluidas las formas recombinantes de los productos de empalme, están incluidos en esta definición.

Un “marcador” o un “resto detectable” es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otro medio físico. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, como se usan comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas que pueden hacerse detectables, por ejemplo, incorporando un radiomarcador en el péptido o pueden usarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

El término “recombinante” cuando se utiliza con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o de una proteína heterólogos o por la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula deriva de una célula modificada de esa manera. Por consiguiente, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otra manera se expresan anormalmente, se expresan poco o no se expresan nada.

El término “heterólogo” cuando se utiliza con referencia a porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación una a la otra en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de manera recombinante, con dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestas para generar un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificadora de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación una a la otra en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

La frase “condiciones de hibridación rigurosas” se refiere a las condiciones bajo las que una sonda hibridará a su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no a otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de las secuencias y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan a una temperatura aproximadamente 5-10°C más baja que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica en un pH de fuerza iónica definido. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica, pH, y concentración nucleica definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana hibridan a la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a la T_m, el 50% de las sondas ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas pueden alcanzarse también con la adición de agentes desestabilizadores tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, de preferencia 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones riguroso ejemplares pueden ser las siguientes: formamida al 50%, 5x SSC, y SDS al 1%, incubando a 42°C, o, 5x SSC, SDS al 1%, incubando a 65°C, con lavado en 0,2x SSC, y SDS al 0,1% a 65°C.

Los ácidos nucleicos que no hibridan el uno al otro bajo condiciones rigurosas son aún sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto se presenta, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la redundancia máxima de codones permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos típicamente hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Las “condiciones de hibridación moderadamente rigurosas” ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 1x SSC a 45°C. Una hibridación positiva es de al menos dos veces el fondo. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que puede usarse condiciones alternativas de hibridación y lavado para proporcionar condiciones de rigurosidad similar. Las pautas adicionales para determinar los parámetros de hibridación se proporcionan en numerosas referencias, por ejemplo, y en *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, y col.

ES 2 320 328 T3

Para PCR, es típica una temperatura de aproximadamente 36°C para la amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de apareamiento pueden variar entre aproximadamente 32°C y 48°C dependiendo de la longitud del cebador. Para la amplificación de alta rigurosidad por PCR, es típica una temperatura de aproximadamente 62°C, aunque las temperaturas de apareamiento de alta rigurosidad pueden variar desde aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 65°C, dependiendo de la longitud y la especificidad del cebador. Las condiciones típicas de ciclos para las amplificaciones de alta y baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de 90°C - 95°C durante 30 segundos - 2 minutos, una fase de apareamiento de 30 segundos - 2 minutos de duración, y una fase de extensión de aproximadamente 72°C durante 1-2 minutos. Los protocolos y pautas para las reacciones de amplificación de alta y baja rigurosidad se proporcionan, por ejemplo, en Innis y col. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.).

“Anticuerpo” se refiere a un polipéptido que comprende una región estructural de un gen de inmunoglobulina o fragmentos de la misma que se une y reconoce específicamente a un antígeno. Los genes de inmunoglobulinas reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como los innumerables genes de las regiones variables de las inmunoglobulinas. Las cadenas livianas se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como las gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Típicamente, la región de unión al antígeno de un anticuerpo será más crítica en especificidad y afinidad de unión.

Una unidad estructural ejemplar de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares de cadenas polipeptídicas idénticas, teniendo cada par una cadena “liviana” (aproximadamente 25 kD) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N terminal de cada cadena define una región variable de desde aproximadamente 100 hasta 110 o más aminoácidos responsables fundamentalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena liviana variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren estas cadenas liviana y pesada respectivamente.

Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por consiguiente, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena liviana unida a V_H-C_H1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse bajo condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de bisagra, convirtiendo de este manera el dímeros $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero de Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de bisagra (véase Fundamental Immunology (Paul ed., 3° ed. 1993). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpos en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse de novo ya sea químicamente o usando procedimientos de ADN recombinante. Por consiguiente, el término anticuerpo, según se utiliza en este documento, también incluye los fragmentos de anticuerpo producidos por modificación de anticuerpos completos, o los sintetizados de novo usando procedimientos de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena única) o los identificados usando las bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, a McCafferty y col., Nature 348: 552-554 (1990)).

Para la preparación de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos recombinantes, monoclonales o policlonales, pueden usarse muchas técnicas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor y col., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole y col., páginas. 77-96 en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); y Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2° ed. 1986)). Los genes que codifican las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo de interés pueden clonarse a partir de una célula, por ejemplo, los genes que codifican un anticuerpo monoclonal pueden clonarse a partir de un hibridoma y usarse para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. También pueden obtenerse bibliotecas de genes que codifican cadenas pesadas y livianas de anticuerpos monoclonales a partir de células de hibridoma o de células plasmáticas. Las combinaciones aleatorias de los productos genéticos de cadenas pesadas y livianas generan a gran combinación de anticuerpos con diferente especificidad antigénica (véase, por ejemplo, Kuby, Immunology (3° ed. 1997)). Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena única o de anticuerpos recombinantes (Patente de EEUU 4.946.778, Patente de EEUU 4.816.567) pueden adaptarse para producir anticuerpos para polipéptidos. También pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros para expresar anticuerpos humanos o humanizados (véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, Marks y col., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., Nature Biotechnology 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)). Como alternativa, puede usarse la tecnología de presentación en fagos para identificar anticuerpos y fragmentos heteroméricos de Fab que se unen específicamente a los antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty y col., Nature 348: 552-554 (1990); Marks y col., Biotechnology 10: 779-783 (1992)). Los anticuerpos también pueden hacerse biespecíficos, es decir, capaces de reconocer dos diferentes antígenos (véase, por ejemplo, el documento WO 93/08829, Traunecker y col., EMBO J. 10: 3655-3659 (1991); y Suresh y col., Methods in Enzymology 121: 210 (1986)). Los anticuerpos también pueden ser heteroconjugados, por ejemplo, dos anticuerpos unidos covalentemente, o inmunotoxinas (véase, por ejemplo, Patente de EEUU N° 4.676.980, documento WO 91/00360; documento WO 92/200373; y documento EP 0308936).

Los procedimientos para humanizar o primatizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente

que no es humana. Frecuentemente se hace referencia a estos residuos de aminoácidos no humanos como residuos importados, que típicamente se toman de un dominio importado variable. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (véase, por ejemplo, Jones y col., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeven y col., *Science* 239: 1534-1536 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)), sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR o CDRs) de roedor. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de EEUU N° 4.816.567), en los que se ha sustituido menos que un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, está alterada, reemplazada o cambiada de manera que el sitio de unión del antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase, función efectora y/o de especies diferentes o alteradas, o una molécula totalmente diferente que confiere propiedades nuevas al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, una toxina, una hormona, un factor de crecimiento, un fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, está alterada, reemplazada o cambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

El anticuerpo puede estar conjugado a un restos del “efector”. El restos del efector sea cualquier número de moléculas, incluyendo restos marcadores tales como marcadores radiactivos o marcadores fluorescentes, o puede ser un resto terapéutico. En un aspecto el anticuerpo modula la actividad de la proteína.

La frase “se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo o “específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con”, al referirse a una proteína o a un péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, con frecuencia en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Por consiguiente, bajo condiciones de ensayo inmunológico designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo. La unión específica a un anticuerpo bajo tales condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales surgidos para una proteína SAK, una variante polimórficas, alelos, ortólogos, y variantes modificadas de manera conservadora, o variantes de empalme, o porciones de los mismos, pueden seleccionarse para obtener sólo los anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con las proteínas de SAK y no con otras proteínas. Esta selección puede lograrse sustrayendo los anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con otras moléculas. Puede usarse una diversidad de formatos de ensayos inmunológicos para seleccionar los anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los ensayos inmunológicos ELISA en fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar los anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) para una descripción de los formatos y las condiciones de ensayos inmunológicos que pueden utilizarse para determinar inmunorreactividad específica).

En este documento se entiende por “dosis terapéuticamente eficaz” una dosis que produce los efectos para los que se la administra. La dosis exacta dependerá del objeto del tratamiento, y un experto en la técnica podrá establecerla usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (volúmenes 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); y Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

Ensayos para proteínas que modulan la proliferación celular

Pueden usarse ensayos genómicos funcionales de alta producción para identificar los moduladores de la proliferación celular. Tales ensayos pueden controlar cambios en la expresión de marcadores de superficie celular, la proliferación y la diferenciación, y la apoptosis, usando líneas celulares o células primarias. Típicamente, las células se ponen en contacto con un ADNc o una biblioteca de péptidos aleatoria (codificados por ácidos nucleicos). Los péptidos pueden ser cíclicos o circulares. La biblioteca de ADNc puede comprender ADNc sentido, antisentido, de longitud total y truncados. La biblioteca de péptidos está codificada por ácidos nucleicos. Posteriormente se controla el efecto de la biblioteca de ADNc o de péptidos en el fenotipo de proliferación celular, usando un ensayo como se describió anteriormente. El efecto del ADNc o del péptido puede validarse y distinguirse de mutaciones somáticas, usando, por ejemplo, la expresión regulable del ácido nucleico tal como la expresión de un promotor de tetraciclina. Los ADNc y los ácidos nucleicos que codifican los péptidos pueden rescatarse usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando un marcador de secuencia.

Las proteínas que interactúan con el péptido o con la proteína codificada por el ADNc (por ejemplo, SAK) pueden aislarse usando un sistema doble híbrido de levadura, un sistema doble híbrido de mamífero, inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad de las proteínas complejadas seguido por espectrometría de masas, o selección por presentación en fagos, etc. Las dianas identificadas de esa manera pueden usarse además como cebo en estos ensayos para identificar otros miembros de la ruta de la proliferación celular, cuyos miembros son también dianas para el desarrollo de fármacos (véase, por ejemplo, Fields y col., *Nature* 340: 245 (1989); Vasavada y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EEUU* 88: 10686 (1991); Fearon y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EEUU* 89: 7958 (1992); Dang y col., *Mol. Cell. Biol.* 11: 954 (1991); Chien y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EEUU* 9578 (1991); y las Patentes de EEUU N° 5.283.173, 5.667.973, 5.468.614, 5.525.490, y 5.637.463).

ES 2 320 328 T3

Las líneas celulares adecuadas incluyen A549, HeLa, Colo205, H1299, MCF7, MDA-MB-231, PC3, HMEC, PrEC. Los marcadores de superficie celular pueden ensayarse usando anticuerpos marcados fluorescentemente y FACS. La proliferación celular puede medirse usando incorporación de ³H-timidina, recuento de células por inclusión de colorante, ensayo de MTT, incorporación de BrdU, ensayo de seguimiento celular. La Apoptosis puede medirse usando la inclusión de colorante, o por medio de ensayo de la fragmentación del ADN, aumentos en el calcio intracelular, o activación de la caspasa. La producción de factor de crecimiento puede medirse usando un ensayo inmunológico tal como ELISA.

Las bibliotecas de ADNc se obtienen de cualquier fuente adecuada. Las bibliotecas que codifican péptidos aleatorios se obtienen según las técnicas conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Patentes de EEUU N° 6.153.380, 6.114.111 y 6.180.343). Puede usarse cualquier vector adecuado para las bibliotecas de ADNc y de péptidos, incluidos, por ejemplo, vectores retrovirales.

Aislamiento de ácidos nucleicos que codifican miembros de la familia de SAK

Esta invención se basa en las técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que describen los procedimientos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2° ed. 1989); Krieglner, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y col., eds., 1994).

Los ácidos nucleicos de SAK, variantes polimórficas, ortólogos y alelos que son sustancialmente idénticos a una secuencia de aminoácidos codificada por SEC. ID N°: 2 pueden aislarse usando sondas de ácidos nucleicos de SAK y oligonucleótidos bajo condiciones de hibridación rigurosas, seleccionando las bibliotecas. Como alternativa, pueden usarse bibliotecas de expresión para clonar proteína SAK, variantes polimórficas, ortólogos y alelos detectando homólogos expresados inmunológicamente con antisueros o anticuerpos purificados obtenidos contra SAK humana o porciones de la misma.

Para generar una biblioteca de ADNc, se debe elegir una fuente que sea rica en ARN de SAK. El ARNm se convierte a continuación ADNc usando la transcriptasa inversa, se liga en un vector recombinante, y se transfecta en un huésped recombinante para la propagación, selección y clonado. Los procedimientos para obtener y seleccionar bibliotecas de ADNc son muy conocidos (véase, por ejemplo, Gubler y Hoffman, *Gene* 25: 263-269 (1983); Sambrook y col., *supra*; Ausubel y col., *supra*).

Para una biblioteca genómica, se extrae el ADN del tejido y se corta mecánicamente o se digiere por medio de enzimas para dar fragmentos de aproximadamente 12-20 kb. A continuación se separan los fragmentos por centrifugación en gradiente de los tamaños indeseados y se construyen en vectores de bacteriófagos lambda. Estos vectores y fagos se empaquetan *in vitro*. Los fagos recombinantes se analizan por hibridación en placa como se describe en Benton y Davis, *Science* 196: 180-182 (1977). La hibridación de colonias se realiza como se describe en general en Grunstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, 72: 3961-3965 (1975).

Un procedimiento alternativo para aislar el ácido nucleico de SAK y sus ortólogos, alelos, mutantes, variantes polimórficas y variantes modificadas de manera conservadora combina el uso de cebadores de oligonucleótidos sintéticos y amplificación de un molde de ARN o de ADN (véase Patentes de EEUU N° 4.683.195 y 4.683.202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis y col., eds, 1990)). Pueden usarse procedimientos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR) para amplificar secuencias de ácido nucleico de SAK humana directamente del ARNm, del ADNc, de las bibliotecas genómicas o de las bibliotecas de ADNc. Pueden diseñarse oligonucleótidos redundantes para amplificar homólogos de SAK usando las secuencias proporcionadas en este documento. Pueden incorporarse sitios de endonucleasas de restricción en los cebadores. La reacción en cadena de la polimerasa u otros procedimientos de amplificación *in vitro* pueden también ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácidos nucleicos codifican las proteínas a expresar, para generar ácidos nucleicos para uso como sondas para la detección de la presencia de ARNm que codifica SAK en muestras fisiológicas, para la secuenciación de ácidos nucleicos, o para otros fines. Los genes amplificados por la reacción de PCR pueden purificarse desde geles de agarosa y clonarse en un vector adecuado.

La expresión genética de SAK también puede analizarse por medio de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, transcripción inversa y amplificación del ARNm, aislamiento del ARN total o ARN poli A⁺, la transferencia northern, transferencia de mancha, hibridación *in situ*, protección de ARNasa, tecnología de la matriz de polinucleótidos de alta densidad, por ejemplo, y similares.

Los ácidos nucleicos que codifican la proteína SAK pueden usarse con tecnología de matriz de oligonucleótidos de alta densidad (por ejemplo, GeneChipTM) para identificar la proteína SAK, ortólogos, alelos, variantes modificadas de manera conservadora y variantes polimórficas en esta invención. En el caso en que los homólogos identificados estén relacionados con la modulación de la proliferación celular, pueden usarse con GeneChipTM como herramienta de diagnóstico para detectar la enfermedad en una muestra biológica, véase, por ejemplo, Gunthand y col., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14: 869-876 (1998); Kozal y col., *Nat. Med.* 2: 753-759 (1996); Matson y col., *Anal. Biochem.* 224: 110-106 (1995); Lockhart y col., *Nat. Biotechnol.* 14: 1675-1680 (1996); Gingeras y col., *Genome Res.* 8: 435-448 (1998); Hacia y col., *Nucleic Acids Res.* 26: 3865-3866 (1998).

ES 2 320 328 T3

El gen para SAK se clona típicamente en vectores intermedios antes de la transformación en células procariotas o eucariotas para replicación y/o expresión. Estos vectores intermedios son típicamente vectores procariotas, por ejemplo, plásmidos, o vectores lanzadera.

5 *Expresión en procariotas y eucariotas*

Para obtener expresión del alto nivel de un gen clonado, tal como los ADNc que codifican SAK, uno típicamente subclona SAK en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción, y si es para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión de ribosomas para la iniciación de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., y Ausubel y col., *supra*. Los sistemas de expresión bacterianos para expresar la proteína SAK están disponibles en, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus sp.*, y *Salmonella* (Palva y col., *Gene* 22: 229-235 (1983); Mosbach y col., *Nature* 302: 543-545 (1983)). Los kits para tales sistemas de expresión están disponibles comercialmente. Los sistemas de expresión eucariotas para células de mamíferos, levaduras, y células de insectos son muy conocidos en la técnica y también están disponibles comercialmente. En particular, pueden usarse sistemas de expresión retrovirales.

La selección del promotor utilizado para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación particular. El promotor se coloca de preferencia aproximadamente a la misma distancia del sitio de comienzo de la transcripción heteróloga como lo está del sitio de comienzo de la transcripción en su configuración natural. Como se conoce en la técnica, sin embargo, puede tener lugar alguna variación en esta distancia sin pérdida de la función del promotor.

Además del promotor, el vector de expresión contiene típicamente una unidad de transcripción o una cassette de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión del ácido nucleico que codifica SAK en las células huésped. Una cassette de expresión típica contiene por consiguiente un promotor unido de manera operativa a la secuencia del ácido nucleico que codifica SAK y a las señales requeridas para la poliadenilación eficaz del transcripto, sitios de unión de ribosomas, y terminación de la traducción. Los elementos adicionales de la cassette pueden incluir potenciadores y, si se usa ADN genómico como el gen estructural, intrones con sitios dadores y aceptores de empalmes funcionales.

Además de una secuencia de promotor, la cassette de expresión debería también contener una región de terminación de la transcripción secuencia abajo del gen estructural para proporcionar la terminación eficaz. La región de terminación puede obtenerse del mismo gen que la secuencia del promotor o puede obtenerse de genes diferentes.

El vector de expresión particular utilizado para transportar la información genética dentro de la célula no es particularmente crítico. Puede usarse cualquiera de los vectores convencionales utilizados para la expresión en células eucariotas o procariotas. Los vectores de expresión bacteriana convencionales incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D, y sistemas de expresión de fusión tales como MBP, GST y LacZ. También pueden añadirse marcadores de epítipo a las proteínas recombinantes para proporcionar procedimientos convenientes de aislamiento, por ejemplo, c-myc. Pueden incluirse marcadores de secuencias en una cassette de expresión para el rescate del ácido nucleico. Pueden incluirse marcadores tales como proteínas fluorescentes, proteínas fluorescentes verde o roja, β -gal, CAT, y similares en los vectores como marcadores para la transducción del vector.

Los vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas se usan típicamente en los vectores de expresión eucariotas, por ejemplo, vectores de SV40, vectores del virus del papiloma, vectores retrovirales, y vectores derivados del virus de Epstein Barr. Otros vectores eucariotas ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, pDSVE del baculovirus, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor de CMV, del promotor temprano de SV40, de un promotor tardío de SV40, del promotor de la metalotioneína, del promotor del virus del tumor mamario murino, del promotor del virus del sarcoma de Rous, del promotor de polihedrina, u otros promotores con eficacia demostrada para la expresión en células eucariotas.

La expresión de proteínas de vectores eucariotas puede regularse también usando promotores inducibles. Con los promotores inducibles, los niveles de expresión están vinculados con la concentración de agentes inductores, tales como tetraciclina o ecidisona, por la incorporación de elementos de respuesta para estos agentes en el promotor. Generalmente, se obtiene expresión de alto nivel de promotores inducibles solamente en presencia del agente inductor; los niveles de expresión basales son mínimos.

Los vectores pueden tener un promotor regulable, por ejemplo, sistemas regulados por tet y el sistema RU-486 (véase, por ejemplo, Gossen y Bujard, *PNAS* 89: 5547 (1992); Oligino y col., *Gene Ther.* 5: 491-496 (1998); Wang y col., *Gene Ther.* 4: 432-441 (1997); Neering y col., *Blood* 88: 1147-1155 (1996); y Rendahl y col., *Nat. Biotechnol.* 16: 757-761 (1998)). Estos imparten el control de molécula pequeña en la expresión de los ácidos nucleicos de la diana candidato. Esta característica ventajosa puede usarse para determinar que un fenotipo deseado es causado por un ADNc transfectado más que por una mutación somática.

Algunos sistemas de expresión tienen marcadores que proporcionan amplificación de genes tales como timidina cinasa y dihidrofolato reductasa. Como alternativa, los sistemas de expresión de alto rendimiento que no incluyen la amplificación de genes son también adecuados, tales como el uso de un vector del baculovirus en células de insectos,

con una secuencia de codificación de SAK bajo la dirección del promotor de polihedrina u otros promotores fuertes del baculovirus.

Los elementos que se incluyen típicamente en vectores de expresión también incluyen un replicón que funciona en *E. coli*, un gen que codifica resistencia a antibióticos para permitir la selección de bacterias que llevan plásmidos recombinantes, y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido para permitir la inserción de secuencias eucariotas. El gen de la resistencia a antibióticos particular elegido no es crítico, resulta adecuado cualquiera de los muchos genes de resistencia conocidos en la técnica. Las secuencias procariontas se eligen de preferencia para que no interfieran con la replicación del ADN en células eucariotas, si es necesario.

Los procedimientos de transfección convencionales se utilizan para producir las líneas celulares bacterianas, de mamífero, de levadura o de insecto que expresan grandes cantidades de proteína SAK, que a continuación se purifican con las técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Colley y col., *J. Biol. Chem.* 264: 17619-17622 (1989); *Guide to Protein Purification*, en *Methods in Enzymology*, volumen 182 (Deutscher, ed., 1990)). La transformación de células eucariotas y procariontas se realiza según las técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Morrison, *J. Bact.* 132: 349-351 (1977); Clark-Curtiss y Curtiss, *Methods in Enzymology* 101: 347-362 (Wu y col., eds, 1983).

Puede usarse cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extrañas en las células huésped. Estos incluyen el uso de la transfección con fosfato de calcio, polibreno, la fusión de protoplastos, la electroporación, biolística, liposomas, la microinyección, los vectores plasmáticos, vectores virales y cualquiera de los otros procedimientos bien conocidos para introducir el ADN genómico clonado, el ADNc, el ADN sintético u otro material genético extraño en una célula huésped (véase, por ejemplo, a Sambrook y col., *supra*). Solamente es necesario que el procedimiento de ingeniería genética particular utilizado sea capaz de introducir con éxito al menos un gen en la célula huésped capaz de expresar SAK.

Después de que el vector de expresión se introduce en las células, las células transfectadas se cultivan bajo condiciones que favorecen la expresión de SAK, que se recupera del cultivo usando las técnicas convencionales que se identifican a continuación.

30 *Purificación de polipéptidos de SAK*

Para uso en los ensayos funcionales puede purificarse SAK que se presenta en la naturaleza o SAK recombinante. La SAK que se presenta en la naturaleza puede purificarse, por ejemplo, de tejido humano. La SAK recombinante puede purificarse de cualquier sistema de expresión adecuado.

La proteína SAK puede purificarse hasta pureza sustancial por técnicas convencionales, incluidas la precipitación selectiva con sustancias tales como el sulfato de amonio; la cromatografía en columna, procedimientos de inmunopurificación, y otros (véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); Patente de EEUU N° 4.673.641; Ausubel y col., *supra*; y Sambrook y col., *supra*).

Pueden usarse una serie de procedimientos cuando se purifica la proteína SAK recombinante. Por ejemplo, las proteínas que tienen propiedades de adhesión molecular establecidas pueden fusionarse de manera reversible a la proteína SAK. Con el ligando o el sustrato adecuado, por ejemplo, anticuerpos antifosfo S/T o anticuerpos anti-SAK, la proteína SAK puede adsorberse selectivamente a una columna de purificación y a continuación liberarse de la columna en una forma relativamente pura. La proteína fusionada se elimina posteriormente por actividad enzimática. Finalmente, la proteína SAK podía purificarse usando columnas de la inmunoafinidad. La proteína SAK recombinante puede purificarse de cualquier fuente adecuada, incluidos levaduras, células de insecto, bacterias, y células de mamífero.

50 *A. Purificación de SAK de bacterias recombinantes*

Las proteínas recombinantes son expresadas por las bacterias transformadas en grandes cantidades, típicamente después de la inducción del promotor; pero la expresión puede ser constitutiva. La inducción del promotor con IPTG es un ejemplo de un sistema de promotor inducible. Las bacterias se cultivan según los procedimientos convencionales en la técnica. Se usan células bacterianas frescas o congeladas para el aislamiento de la proteína.

Las proteínas expresadas en bacterias pueden formar agregados insolubles ("cuerpos de inclusión"). Varios protocolos son adecuados para la purificación de los cuerpos de inclusión de proteína SAK. Por ejemplo, la purificación de cuerpos de inclusión incluye típicamente la extracción, la separación y/o purificación de cuerpos de inclusión por disrupción de células bacterianas, por ejemplo, por incubación en un tampón de TRIS/HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 0,1 mM y PMSF 1 mM. La suspensión celular puede lisarse usando 2-3 pasajes a través de una prensa francesa, homogeneizarse usando un Polytron (Brinkman Instruments) o sonicarse en hielo. Los procedimientos alternativos para lisar las bacterias son evidentes para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *supra*; Ausubel y col., *supra*).

De ser necesario, los cuerpos de inclusión se disuelven, y la suspensión de células lisadas se centrifuga típicamente para separar la materia insoluble no deseada. Las proteínas que formaban los cuerpos de inclusión pueden renaturalizarse por dilución o por diálisis con un tampón compatible. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a urea (desde aproximadamente 4 M hasta aproximadamente 8 M), formamida (al menos aproximadamente al 80%,

volumen/volumen), y clorhidrato de guanidina (desde aproximadamente 4 M hasta aproximadamente 8 M). Algunos disolventes que son capaces de disolver las proteínas que forman agregados, por ejemplo SDS (dodecilsulfato de sodio), ácido fórmico al 70%, son inadecuados para uso en este procedimiento por la posibilidad de desnaturalización irreversible de las proteínas, acompañada por una falta de inmunogenicidad y/o de actividad. Aunque el clorhidrato de guanidina y agentes similares son desnaturalizantes, esta desnaturalización no es irreversible y la renaturalización puede tener lugar tras la (por diálisis, por ejemplo) o la dilución del desnaturalizante, permitiendo nuevamente la formación de la proteína inmunológica y/o biológicamente activa. Los expertos en la técnica conocen otros tampones adecuados. Las proteínas SAK humanas se separan de otras proteínas bacterianas por medio de técnicas de separación convencionales, por ejemplo, con resina de agarosa Ni-NTA.

Como alternativa, es posible purificar la proteína SAK del periplasma de las bacterias. Tras la lisis de las bacterias, cuando la proteína SAK se exporta al periplasma de las bacterias, la fracción periplásmica de las bacterias puede aislarse por choque osmótico en frío además de otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Para aislar las proteínas recombinantes del periplasma, se centrifugan las células bacterianas para formar un sedimento. Se resuspende el sedimento en un tampón que contiene sacarosa al 20%. Para lisar las células, se centrifugan las bacterias y se resuspende el sedimento en MgSO_4 5 mM helado y se mantiene en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. Se centrifuga la suspensión celular y el sobrenadante se decanta y se guarda. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante pueden separarse de las proteínas del huésped por medio de técnicas de separación convencionales muy conocidas por los expertos en la técnica.

B. Técnicas convencionales de separación de proteínas para purificar las proteínas SAK

Fraccionamiento por solubilidad

Frecuentemente como una etapa inicial, en particular si la mezcla de proteínas es compleja, un fraccionamiento salino inicial puede separar muchas de las proteínas no deseadas de la célula huésped (o proteínas derivadas del medio de cultivo celular) de la proteína recombinante de interés. La sal de preferencia es el sulfato de amonio. El sulfato de amonio precipita las proteínas con eficacia reduciendo la cantidad de agua en la mezcla de proteínas. Posteriormente las proteínas precipitan en base a su solubilidad. Cuanto más hidrófoba es una proteína, mucho más probable es que precipite en concentraciones más bajas de sulfato de amonio. Un protocolo típico incluye añadir el sulfato de amonio saturado a una disolución de proteínas de modo que la concentración resultante de sulfato de amonio sea de entre 20 y 30%. Esta concentración precipitará la mayoría de las proteínas hidrófobas. Posteriormente se desecha el precipitado (a menos que la proteína de interés sea hidrófoba) y se añade sulfato de amonio al sobrenadante hasta una concentración a la que se sabe que precipita la proteína de interés. A continuación se disuelve el precipitado en tampón y se elimina la sal en exceso si es necesario, a través de diálisis o con diafiltración. Otros procedimientos que se basan en la solubilidad de las proteínas, tales como la precipitación en etanol frío, son conocidos por los expertos en la técnica y pueden usarse para fraccionar mezclas complejas de proteínas.

Filtración diferencial por tamaños

El peso molecular de las proteínas SAK puede usarse para aislarla de las proteínas de mayor y menor tamaño usando la ultrafiltración a través de membranas de diferentes tamaños de poro (por ejemplo, las membranas Amicon o Millipore). Como una primera etapa, la mezcla de proteínas se ultrafiltra a través de una membrana con un tamaño de poro que tienen un valor de corte de peso molecular más bajo que el peso molecular de la proteína de interés. A continuación se ultrafiltra el retenido de la ultrafiltración frente a una membrana con un valor de corte molecular mayor que el peso molecular de la proteína de interés. La proteína recombinante pasará a través de la membrana hacia el filtrado. Posteriormente puede someterse el filtrado a cromatografía como se describe a continuación.

Cromatografía en columna

Las proteínas SAK pueden también separarse de otras proteínas en base a sus tamaños, carga superficial neta, capacidad hidrófoba, y afinidad para los ligandos. Además, pueden conjugarse los anticuerpos surgidos contra las proteínas a matrices de columnas y pueden inmunopurificarse las proteínas. Todos estos procedimientos son bien conocidos en la técnica. Resultará evidente para un experto que las técnicas cromatográficas pueden realizarse en cualquier escala y usando equipos de muchos fabricantes diferentes (por ejemplo, Pharmacia Biotech).

Ensayos para moduladores de proteína SAK

A. Ensayos

La modulación de una proteína SAK, y la modulación correspondiente de la proliferación celular, por ejemplo, de célula tumoral, puede evaluarse usando una diversidad de ensayos *in vitro* e *in vivo*, incluidos los modelos basados en células. Tales ensayos pueden usarse para probar inhibidores y activadores de la proteína SAK, y, por consiguiente, inhibidores y activadores de la proliferación celular, incluidos los moduladores de sensibilidad y toxicidad quimioterapéutica. Tales moduladores de la proteína SAK son útiles para tratar trastornos relacionados con la proliferación celular patológica, por ejemplo, el cáncer. Los moduladores de la proteína SAK se prueban usando SAK que se presenta en la naturaleza o SAK recombinante, de preferencia humano SAK humana.

ES 2 320 328 T3

De preferencia, la proteína SAK tendrá la secuencia según se codifica por la SEC. ID N°: 2 o una variante modificada de manera conservadora de la misma. Como alternativa, la proteína SAK del ensayo se obtendrá de un eucariota e incluirá una secuencia de aminoácidos que tiene sustancial similitud de subsecuencia de aminoácidos con SEC. ID N°: 2. Generalmente, la similitud de la secuencia de aminoácidos será de al menos 60%, de preferencia al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90%, de mayor preferencia al menos 95%.

La medición de la modulación de la proliferación celular con la proteína SAK o una célula que expresa la proteína SAK, recombinante o que se presenta en la naturaleza, puede realizarse usando una diversidad de ensayos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, según se describen en este documento. Puede usarse un cambio físico, químico o fenotípico adecuado que afecta la actividad, por ejemplo, actividad enzimática tal como la actividad de cinasa, la proliferación celular, o la unión de ligandos (por ejemplo, Chk2) para evaluar la influencia de un compuesto de prueba en el polipéptido de SAK. Cuando se determinan los efectos funcionales usando células o animales intactos, uno puede medir también una diversidad de efectos, tales como, la unión de ligandos, la actividad de cinasa, los cambios transcripcionales para los marcadores genéticos conocidos y no caracterizados (por ejemplo, transferencia northern), los cambios en el metabolismo celular, los cambios relacionados con la proliferación celular, la expresión de marcadores de superficie celular, la síntesis de ADN, los ensayos de dilución de marcadores y de colorantes (por ejemplo, los ensayos de GFP y de seguimiento celular), la inhibición del contacto, el crecimiento tumoral en ratones desnudos, etc.

Ensayos in vitro

Los ensayos para identificar los compuestos con actividad moduladora de SAK pueden realizarse *in vitro*. Tales ensayos pueden usar proteína SAK de longitud completa o una variante de la misma (véase, por ejemplo, SEC. ID N°: 2), o un mutante de la misma, por ejemplo, K41M o D154A, o un fragmento de una proteína SAK, tal como un dominio de cinasa. En los procedimientos *in vitro* de la invención puede usarse una proteína SAK recombinante o que se presenta en la naturaleza purificada. Además de la proteína SAK purificada, la proteína SAK recombinante o que se presenta en la naturaleza puede ser parte de un lisado celular o de una membrana celular. Como se describe a continuación, el ensayo de unión puede ser en estado sólido o soluble. De preferencia, la proteína o la membrana se une a un soporte sólido, de manera covalente o no covalente. Los ensayos *in vitro* de la invención son ensayos de unión de ligandos o ensayos de afinidad, a saber ensayos competitivos con Chk2 como ligando.

Otros ensayos *in vitro* incluyen medir cambios en las propiedades espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas, o de solubilidad para la proteína. Otros ensayos *in vitro* incluyen ensayos de actividad enzimática, tales como los ensayos de fosforilación o de autofosforilación (véase, por ejemplo, Figuras 17-19).

En una forma de realización, se realiza un ensayo de unión de alto rendimiento en el que la proteína SAK o un fragmento de la misma se pone en contacto con un polipéptido de Chk2 y un modulador potencial y se incuba durante una cantidad de tiempo adecuada. En una forma de realización, el modulador potencial se une a un soporte sólido, y se añade la proteína SAK. En otra forma de realización, la proteína SAK se une a un soporte sólido. Puede usarse una amplia diversidad de moduladores, como se describe a continuación, incluyendo moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, anticuerpos, y análogos de ligandos de SAK. La unión del modulador candidato se determina a través del uso del ensayo de unión competitiva, en el que se mide la interferencia con la unión de un ligando conocido, a saber un polipéptido de Chk2 en presencia de un modulador potencial. En primer lugar se une el modulador o el ligando conocido, a continuación se añade el competido. Tras lavar la proteína SAK, se determina la interferencia con la unión, del modulador potencial o del ligando conocido o sustrato. Frecuentemente, el modulador potencial o el ligando conocido está marcado.

Ensayos in vivo basados en células

La proteína SAK puede expresarse en una célula, y los cambios funcionales, por ejemplo, físicos y químicos o fenotípicos, pueden analizarse para identificar SAK y moduladores de la proliferación celular, por ejemplo, proliferación celular tumoral. También pueden usarse las células que expresan las proteínas SAK en ensayos de unión y ensayos enzimáticos. Puede medirse cualquier efecto funcional adecuado, como se describe en este documento. Por ejemplo, la morfología celular (por ejemplo, el volumen celular, el volumen nuclear, el perímetro celular y el perímetro nuclear), la unión de ligandos, la actividad de cinasa, la apoptosis, la expresión de marcadores de superficie celular, la proliferación celular, la positividad de ensayos de GFP y ensayos de dilución de colorantes (por ejemplo, ensayos de seguimiento celular con colorantes que se unen a la membrana celular), ensayos de síntesis de ADN (por ejemplo, ³H-timidina y colorantes fluorescentes que se unen al ADN tales como BrdU o el colorante de Hoescht con análisis FACS), son todos ensayos adecuados para identificar los moduladores potenciales usando un sistema basado en células. Las células adecuadas para tales ensayos basados en células incluyen células de cáncer primario o tumorales y líneas celulares, como se describe en este documento, por ejemplo, A549 (pulmón), MCF7 (mama, p53 tipo salvaje), H1299 (pulmón, p53 nulo), Hela (cervical), PC3 (próstata, p53 mutante), MDA-MB231 (mama, p53 tipo salvaje). Las líneas celulares de cáncer pueden ser p53 mutante, p53 nulo, o pueden expresar el tipo salvaje de p53. La proteína SAK puede ser recombinante o puede presentarse en la naturaleza. También, pueden usarse fragmentos de SAK o las proteínas quiméricas de SAK con actividad de cinasa en ensayos basados en células.

Los niveles celulares de polipéptido de SAK pueden determinarse midiendo el nivel de proteína o de ARNm. El nivel de proteína SAK o proteínas relacionadas con SAK se mide usando ensayos inmunológicos tales como la

ES 2 320 328 T3

transferencia western, ELISA y similares con un anticuerpo que se une selectivamente al polipéptido de SAK o a un fragmento del mismo. Para la medición del ARNm, resulta de preferencia la amplificación, por ejemplo, usando PCR, LCR o los ensayos de hibridación, por ejemplo, hibridación northern, protección de ARNs, transferencia de mancha. El nivel de proteína o de ARNm se detecta usando directamente o indirectamente los agentes de detección marcados, por ejemplo, ácidos nucleicos marcados fluorescentemente o radiactivamente, anticuerpos marcados radiactivamente o enzimáticamente, y similares, como se describe en este documento.

Como alternativa, puede medirse la expresión de SAK usando un sistema de gen informador. Tal sistema puede idearse usando un promotor de proteína SAK unido de manera operativa a un gen informador tal como acetiltransferasa del cloramfenicol, luciferasa de luciérnaga, luciferasa bacteriana, β -galactosidasa y fosfatasa alcalina. Además, la proteína de interés puede usarse como un informador indirecto a través de la unión a un segundo informador tal como la proteína fluorescente roja o verde (véase, por ejemplo, Mistili y Spector, Nature Biotechnology 15: 961-964 (1997)). La construcción informadora se transfecta típicamente en una célula. Tras el tratamiento con un modulador potencial, se mide la cantidad de transcripción, traducción o actividad del gen informador según las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

Modelos animales

Los modelos animales de proliferación celular también encuentran uso en la selección de moduladores de proliferación celular. De manera similar, la tecnología de animales transgénicos incluida la tecnología del knockout de genes, por ejemplo como resultado de la recombinación homóloga con un vector adecuado dirigido a un gen, o la sobreexpresión genética, darán como resultado la ausencia o el aumento de expresión de la proteína SAK. La misma tecnología puede aplicarse también para generar células knockout. Cuando se desea, puede ser necesaria la expresión específica de tejido o el knockout de la proteína SAK. Los animales transgénicos generados por tales procedimientos encuentran uso como modelos animales de proliferación celular y son además útiles para seleccionar moduladores de proliferación celular.

Las células knockout y los ratones transgénicos pueden generarse por inserción de un gen marcador u otro gen heterólogo en un sitio del gen endógeno de SAK en el genoma de ratón por medio de recombinación homóloga. Tales ratones pueden también generarse sustituyendo un SAK endógeno con una versión mutada del gen de SAK, o mutando un SAK endógeno, por ejemplo, por exposición a carcinógenos.

Se introduce una construcción de ADN en los núcleos de células madre embrionarias. Las células que contienen la lesión genética construida nueva se inyectan en un embrión del ratón huésped, que se vuelve a implantar en una hembra receptora. Algunos de estos embriones se convierten en ratones quiméricos que poseen células germinales derivadas parcialmente de la línea celular mutante. Por consiguiente, criando los ratones quiméricos es posible obtener una nueva línea de ratones que contienen la lesión genética introducida (véase, por ejemplo, Capecchi y col., Science 244: 1288 (1989)). Los ratones quiméricos marcados pueden obtenerse según Hogan y col., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) y Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987).

Ensayos ejemplares

Ensayos de actividad cinasa - in vitro o basados en células

Los ensayos de cinasa o autofosforilación que usan SAK pueden utilizarse para identificar moduladores de la actividad cinasa de SAK, o para identificar proteínas que se unen a SAK, por ejemplo, sustratos de SAK. En estos ensayos pueden usarse SAK de tipo salvaje de longitud total, SAK mutante (por ejemplo, K41M o D154A), o el dominio cinasa de SAK. Tales ensayos pueden realizarse *in vitro*, usando SAK recombinante o lisados celulares que comprenden SAK endógena o recombinante, o pueden estar basados en células (véase, por ejemplo, Ejemplo 2 y Figuras 17-19). En tales ensayos puede usarse un sustrato de la serina/treonina cinasa tal como MBP o un péptido que tiene el sitio de reconocimiento de fosforilación de la serina/treonina cinasa. Para los ensayos de autofosforilación, SAK actúa como la enzima y como el sustrato. Los controles adecuados incluyen los kits para otras cinasas tales como MAP cinasa 1 y 2 (serina/treonina cinasas) o ZAP70 (véase, por ejemplo, Isakov y col., J. Biol. Chem. 271: 15753 (1996); Chan y col., Cell 71: 649 (1992)). Puede usarse un anticuerpo anti-fosfo S/T conjugado a HRP para detectar la fosforilación de un sustrato genérico por SAK, y puede detectarse tras la incubación con un sustrato quimioluminiscente de HRP.

Crecimiento en agar blando o formación de colonias en suspensión

Las células normales requieren un sustrato sólido para unirse y crecer. Cuando las células se transforman, pierden este fenotipo y crecen despegadas del sustrato. Por ejemplo, las células transformadas pueden crecer en cultivo en suspensión agitado o suspendidas en medio semisólido, tal como agar semisólido o agar blando. Las células transformadas, cuando se transfectan con los genes supresores de tumores, regeneran el fenotipo normal y requieren un sustrato sólido para unirse y crecer.

Los ensayos de cultivo en agar blando o de formación de colonias en suspensión pueden usarse para identificar los moduladores de SAK. Típicamente, en este ensayo se usan células huésped transformadas (por ejemplo, células que

crecen en agar blando). Por ejemplo, pueden usarse líneas celulares HCT116 o RKO. Las técnicas para los ensayos de cultivo en agar blando o formación de colonias en suspensión se describen en Freshney, *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique*, 3º ed., Wiley-Liss, Nueva York (1994). Véase también, la sección de procedimientos de Garkavtsev y col. (1996), *supra*.

5

Inhibición por contacto y limitación de crecimiento por densidad

Las células normales típicamente crecen en un patrón plano y organizado en placa de petri hasta que entran en contacto con otras células. Cuando las células se tocan una con otra, se inhiben por contacto y el crecimiento se detiene. Cuando las células están transformadas, sin embargo, las células no se inhiben por contacto y continúan creciendo hasta densidades elevadas en focos desorganizados. Por consiguiente, las células transformadas crecen hasta una densidad de saturación más alta que las células normales. Esto puede detectarse morfológicamente por la formación de una monocapa desorientada de células o de células redondeadas en focos dentro del patrón regular de células circundantes normales. Como alternativa, puede usarse el índice de marcación con [³H]-timidina en la densidad de saturación para medir la limitación de crecimiento por densidad. Véase Freshney (1994), *supra*. Las células transformadas, cuando se ponen en contacto con los moduladores de proliferación celular, regeneran un fenotipo normal y se inhiben por contacto y podrían crecer hasta una densidad más baja.

Los ensayos de inhibición por contacto y limitación de crecimiento por densidad pueden usarse para identificar los moduladores de SAK que son capaces de inhibir la proliferación anormal y la transformación en células huésped. En este ensayo se usan, típicamente, células huésped transformadas (por ejemplo, células que no se inhiben por contacto). Por ejemplo, pueden usarse las líneas celulares RKO o HCT116. En este ensayo, el índice de marcación con [³H]-timidina en la densidad de saturación es un procedimiento de preferencia para medir la limitación de crecimiento por densidad. Las células huésped se ponen en contacto con un modulador potencial de SAK y se cultivan durante 24 horas en la densidad de saturación en condiciones del medio no limitantes. Se determina el porcentaje de células marcadas con [³H]-timidina por medio de autorradiografía. Véase, Freshney (1994), *supra*. Las células huésped en contacto con un modulador de SAK darán lugar a un índice de marcación más bajo comparado con el control (por ejemplo, células huésped transformadas transfectadas con un vector que carece de un inserto).

Factor de crecimiento o dependencia del suero

El factor de crecimiento o la dependencia del suero pueden usarse como un ensayo para identificar los moduladores de SAK. Las células transformadas tienen una dependencia del más bajo suero que sus equivalentes normales (véase, por ejemplo, Temin, *J. Natl. Cancer Inst.* 37: 167-175 (1966); Eagle y col., *J. Exp. Med.* 131: 836-879 (1970)); Freshney, *supra*. Esto es en parte por la liberación de diversos factores de crecimiento por las células transformadas. Cuando las células transformadas se ponen en contacto con un modulador de SAK, las células volverán a adquirir la dependencia del suero y liberarán factores de crecimiento en un nivel inferior.

Niveles de marcadores específicos de tumores

Las células tumorales liberan una cantidad aumentada de ciertos factores (en adelante “marcadores específicos de tumor”) que sus equivalentes normales. Por ejemplo, el activador del plasminógeno (PA) se libera del glioma humano en un nivel más alto que de las células cerebrales normales (véase, por ejemplo, Gullino, *Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth*. En Mihich (ed.): “*Biological Responses in Cancer*”, Nueva York, Academic Press, páginas 178-184 (1985)). De manera similar, el factor de angiogénesis tumoral (TAF) se libera en un nivel más alto en células tumorales que en sus equivalentes normales. Véase, por ejemplo, Folkman, *Angiogenesis and cancer*, *Sem Cancer Biol.* (1992)).

Pueden ensayarse los marcadores específicos de tumor para identificar los moduladores de SAK que disminuyen el nivel de liberación de estos marcadores desde las células huésped. Típicamente, se usan células huésped transformadas o tumorigénicas. Diversas técnicas que miden la liberación de estos factores se describen en Freshney (1994), *supra*. Véase también, Unkless y col., *J. Biol. Chem.* 249: 4295-4305 (1974); Strickland y Beers, *J. Biol. Chem.* 251: 5694-5702 (1976); Whur y col., *Br. J. Cancer* 42: 305-312 (1980); Gullino, *Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth*. En Mihich, E. (ed): “*Biological Responses in Cancer*”, Nueva York, Plenum (1985); Freshney *Anticancer Res.* 5: 111-130 (1985).

Invasividad en Matrigel

Puede usarse el nivel de invasividad en Matrigel o algún otro constituyente de la matriz extracelular como un ensayo para identificar los moduladores de SAK que son capaces de inhibir la proliferación de células anormales y el crecimiento tumoral. Las células tumorales exhiben una buena correlación entre malignidad e invasividad de células en Matrigel o algún otro constituyente de la matriz extracelular. En este ensayo, se usan típicamente células tumorigénicas como células huésped. Por consiguiente, pueden identificarse moduladores de SAK midiendo cambios en el nivel de invasividad entre las células huésped antes y después de la introducción de moduladores potenciales. Si un compuesto modula SAK, su expresión en las células huésped tumorigénicas afectará la invasividad.

Pueden usarse las técnicas descritas en Freshney (1994), *supra*. Brevemente, puede medirse el nivel de invasión de células huésped usando filtros recubiertos con Matrigel o algún otro constituyente de la matriz extracelular. La

penetración en el gel, o a través al lado distal del filtro, se clasifica como invasividad, y se clasifica histológicamente por el número de células y la distancia de movimiento, o marcando previamente las células con ^{125}I y realizando el conteo de la radiactividad en el lado distal del filtro o en el fondo de la placa. Véase, por ejemplo, Freshney (1984), *supra*.

5

Análisis de apoptosis

Puede usarse el análisis de apoptosis como un ensayo para identificar los moduladores de SAK. En este ensayo, pueden usarse líneas celulares, tales como RKO o HCT116, para seleccionar los moduladores de SAK. Las células se ponen en contacto con un modulador putativo de SAK. Las células pueden cotransfectarse con una construcción que comprende un gen marcador, tal como un gen que codifica la proteína fluorescente verde, o un colorante del seguimiento celular. El cambio apoptótico puede determinarse usando los procedimientos conocidos en la técnica, tales como tinción con DAPI y ensayo de TUNEL usando microscopio de fluorescencia. Para el ensayo de TUNEL, puede usarse el kit disponible comercialmente (por ejemplo, Fluorescein FragEL DNA Fragmentation Detection Kit (Onco-gene Research Products, N° de Catálogo QIA39) + Tetrametil-rodamina-5-dUTP (Roche, N° de Catálogo 1534 378)). Las células en contacto con los moduladores de SAK exhibirán, por ejemplo, una apoptosis aumentada comparado con el control.

20

Análisis de la parada del ciclo celular en G_0/G_1

Puede usarse la parada del ciclo celular en G_0/G_1 como un ensayo para identificar los moduladores de SAK. En este ensayo, pueden usarse líneas celulares, tales como RKO o HCT116, para seleccionar los moduladores de SAK. Las células pueden cotransfectarse con una construcción que comprende un gen marcador, tal como un gen que codifica la proteína fluorescente verde, o un colorante de seguimiento celular. Pueden usarse los procedimientos conocidos en la técnica para medir el grado de parada del ciclo celular en G_1 . Por ejemplo, puede usarse una señal de yoduro de propidio como una medida del contenido de ADN para determinar perfiles del ciclo celular en un citómetro de flujo. Puede calcularse el porcentaje de células en cada ciclo celular. Las células en contacto con un modulador de SAK exhibirán, por ejemplo, un número más alto de células que sufren parada en la fase G_0/G_1 comparado con el control.

30

Crecimiento tumoral in vivo

Pueden ensayarse los efectos de los moduladores de SAK en el crecimiento celular en ratones transgénicos o inmunosuprimidos. Pueden generarse ratones transgénicos knockout, en los que se interrumpe el gen endógeno de SAK. Tales ratones knockout pueden usarse para estudiar los efectos de SAK, por ejemplo, como modelo de cáncer, como un medio para ensayar *in vivo* los compuestos que modulan SAK, y para probar los efectos de restaurar una SAK de tipo salvaje o una SAK mutante a los ratones knockout.

35

Las células knockout y los ratones transgénicos pueden obtenerse por la inserción de un gen marcador o de otro gen heterólogo en el sitio del gen de SAK endógeno en el genoma del ratón a través de recombinación homóloga. Tales ratones pueden obtenerse también sustituyendo SAK endógeno con una versión mutada de SAK, o mutando la SAK endógena, por ejemplo, por exposición a carcinógenos.

40

Se introduce una construcción de ADN en los núcleos de células madre embrionarias. Las células que contienen la lesión genética construida nueva se inyectan en un embrión del ratón huésped, que se vuelve a implantar en una hembra receptora. Algunos de estos embriones se convierten en ratones quiméricos que poseen células germinales derivadas parcialmente de la línea celular mutante. Por consiguiente, criando los ratones quiméricos es posible obtener una nueva línea de ratones que contienen la lesión genética introducida (véase, por ejemplo, Capecchi y col., *Science* 244: 1288 (1989)). Los ratones quiméricos marcados pueden obtenerse según Hogan y col., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) y *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987). Estos ratones knockout pueden usarse como huéspedes para probar los efectos de diversos moduladores de SAK en el crecimiento celular.

50

Como alternativa, pueden usarse diversos animales huésped inmunosuprimidos o inmunodeficientes. Por ejemplo, puede usarse como huésped un ratón “desnudo” genéticamente atímico (véase, por ejemplo, Giovanella y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 52: 921 (1974)), un ratón SCID, un ratón timectomizado, o un ratón irradiado (véase, por ejemplo, Bradley y col., *Br. J. Cancer* 38: 263 (1978); Selby y col., *Br. J. Cancer* 41: 52 (1980)). Las células tumorales transplantables (típicamente aproximadamente 10^6 células) inyectadas en los huéspedes isogénicos producirán tumores invasivos en elevadas proporciones de casos, mientras que las células normales o de origen similar no lo harán. Se tratan los huéspedes con los moduladores de SAK, por ejemplo, por inyección. Después de una cantidad de tiempo adecuada, de preferencia 4-8 semanas, se mide el crecimiento tumoral (por ejemplo, por el volumen o por sus dos dimensiones mayores) y se comparan con el control. Se dice que los tumores que tienen una reducción estadísticamente significativa (usando, por ejemplo, la prueba T de Student) tienen crecimiento inhibido. Usando la reducción del tamaño tumoral como ensayo, pueden identificarse los moduladores de SAK que son capaces, por ejemplo, de inhibir la proliferación celular anormal.

65

B. Moduladores

Los compuestos probados como moduladores de la proteína SAK pueden ser cualquier molécula orgánica pequeña, o una entidad biológica, tal como una proteína, por ejemplo, un anticuerpo o un péptido, un azúcar, un ácido nucleico, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido o una ribozima, o un lípido. Como alternativa, los moduladores pueden ser versiones genéticamente alteradas de una proteína SAK. Típicamente, los compuestos de prueba serán moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, péptidos circulares, ARNi, moléculas antisentido, ribozimas y lípidos.

Esencialmente puede usarse cualquier compuesto químico como un ligando o modulador potencial en los ensayos de la invención, aunque más frecuentemente se usan los compuestos que pueden disolverse en disoluciones acuosas u orgánicas (especialmente basadas en DMSO). Los ensayos se diseñan para seleccionar grandes bibliotecas químicas automatizando las etapas del ensayo y proporcionando a los ensayos los compuestos de cualquier fuente conveniente, que típicamente se prueban en paralelo (por ejemplo, en formatos de microvaloración en placas de microvaloración en ensayos robóticos). Se apreciará que existen muchos proveedores de compuestos químicos, incluidos Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs Suiza) y similares.

Los procedimientos de selección de alto rendimiento pueden incluir proporcionar una biblioteca combinatoria de péptidos o de moléculas orgánicas pequeñas que contiene un gran número de potenciales compuestos terapéuticos (compuestos moduladores o ligandos potenciales). Tales “bibliotecas químicas combinatorias” o “bibliotecas de ligandos” se seleccionan a continuación en uno o más ensayos, según se describe en este documento, para identificar los miembros de la biblioteca (especies químicas o subclases particulares) que exhiben una actividad característica deseada. Los compuestos definidos de esta manera pueden servir como “compuestos líderes” convencionales o pueden usarse en sí mismos como compuestos terapéuticos reales o potenciales.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o por síntesis biológica, combinando un número de “unidades estructurales” químicas tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos se forma combinando una serie de unidades estructurales químicas (aminoácidos) en cada forma posible para una longitud dada del compuesto (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto del polipéptido). A través de tal mezcla combinatoria de unidades estructurales químicas pueden sintetizarse millones de compuestos químicos.

La preparación y la selección de bibliotecas químicas combinatorias son muy conocidas para los expertos en la técnica. Tales bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos (véase, por ejemplo, Patente de EEUU N° 5.010.175, Furka, Int. J. Pept. Prot. Res. 37: 487-493 (1991) y Houghton y col., Nature 354: 84-88 (1991)). También pueden usarse otros químicos para generar bibliotecas de diversidad química. Tales químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, Patente de EEUU N° 5.288.514), diversómeros tales como hidantoinas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílicos (Hagihara y col., J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con andamiaje de glucosa (Hirschmann y col., J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217-9218 (1992)), síntesis orgánica análoga de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen y col., J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho y col., Science 261:1303 (1993)), y/o peptidil fosfonatos (Campbell y col., J. Org. Chem. 59: 658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase Ausubel, Berger y Sambrook, todo *supra*), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, Patente de EEUU N° 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn y col., Nature Biotechnology, 14 (3): 309-314 (1996) y PCT/US96/10287), bibliotecas de hidratos de carbono (véase, por ejemplo, Liang y col., Science, 274: 1520-1522 (1996) y Patente de EEUU N° 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides, Patente de EEUU N° 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, Patente de EEUU N° 5.549.974; pirrolidinas, Patentes de EEUU N° 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, Patente de EEUU N° 5.506.337; benzodiazepinas, Patente de EEUU N° 5.288.514, y similares).

Los dispositivos para la preparación de las bibliotecas combinatorias están disponibles en el comercio (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Además, muchas bibliotecas combinatorias están en sí mismas disponibles en el comercio (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscú, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd, Moscú, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Colombia, MD, etc.).

C. Ensayos de alto rendimiento en estado sólido y soluble

En una forma de realización la invención proporciona ensayos solubles que usan una proteína SAK, o una célula o un tejido que expresa una proteína SAK, que se presenta en la naturaleza o recombinante. En otra forma de realización, la invención proporciona ensayos *in vitro* basados en fase sólida en un formato de alto rendimiento, en los que la proteína SAK o el sustrato de SAK están unidos a una fase sólida. Cualquiera de los ensayos descritos en este documento puede adaptarse para la selección de alto rendimiento.

ES 2 320 328 T3

En los ensayos de alto rendimiento de la invención, solubles o en estado sólido, es posible seleccionar hasta varios miles de diferentes moduladores o ligandos en un solo día. Esta metodología puede utilizarse para las proteínas SAK *in vitro*, o para los ensayos basados en células o basados en membranas que comprenden una proteína SAK. En particular, puede usarse cada pocillo de una placa de microvaloración para realizar un ensayo separado contra un modulador potencial seleccionado, o, si se quieren observar los efectos de la concentración o del tiempo de incubación, puede probarse un único modulador cada 5-10 pocillos. Por consiguiente, una única placa de microvaloración convencional puede ensayar aproximadamente 100 moduladores (por ejemplo, 96). Si se usan placas de 1536 pocillos, entonces una sola placa puede ensayar fácilmente desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1500 compuestos diferentes. Es posible ensayar muchas placas por día; es posible ensayo la selección de hasta aproximadamente 6.000, 20.000, 50.000, o más de 100.000 compuestos diferentes usando los sistemas integrados de la invención.

Para una reacción en estado sólido, la proteína de interés o un fragmento de la misma, por ejemplo, un dominio extracelular, o una célula o una membrana que comprende la proteína de interés o un fragmento de la misma como parte de una proteína de fusión puede estar unida al componente del estado sólido, directamente o indirectamente, por medio de enlace covalente o no covalente. Una marcador para unión covalente o no covalente puede ser cualquiera de una diversidad de componentes. En general, una molécula que se une al marcador (un conector del marcador) se fija a un soporte sólido, y la molécula de interés marcada se une al soporte sólido por interacción del marcador y del conector del marcador.

Puede usarse una serie de marcadores y conectores de marcadores, basándose en interacciones moleculares conocidas muy descritas en la bibliografía. Por ejemplo, donde una marcador tiene un conector natural, por ejemplo, biotina, la proteína A, o la proteína G, puede utilizarse conjuntamente con conectores de marcador adecuados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, etc.). Los anticuerpos para las moléculas con conectores naturales tales como la biotina están también muy disponibles y son conectores de marcador adecuados; véase, catálogo 1998 de SIGMA Immunochemicals, SIGMA St. Louis MO).

De manera similar, puede usarse cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo adecuado para formar un par marcador/conector de marcador. Miles de anticuerpos específicos están disponibles en el comercio y muchos otros anticuerpos están descritos en la bibliografía. Por ejemplo, en una configuración común, el marcador es un primer anticuerpo y el conector del marcador es un segundo anticuerpo que reconoce al primer anticuerpo. Además de las interacciones anticuerpo-antígeno, las interacciones receptor-ligando son también adecuadas como pares de marcador y conector de marcador. Por ejemplo, los agonistas y antagonistas de los receptores de la membrana celular (por ejemplo, interacciones receptor celular-ligando tales como transferrina, c-kit, ligandos de receptores virales, receptores de citocinas, receptores quimocinas, receptores de interleucinas, receptores de inmunoglobulinas y anticuerpos, la familia de las cadherinas, la familia de las integrinas, la familia de las selectinas, y similares; véase, por ejemplo, Pigott y Power, *The Adhesion Molecule Facts Book* (1993). De manera similar, las toxinas y los venenos, los epítomos virales, las hormonas (por ejemplo, opioides, esteroides, etc.), los receptores intracelulares (por ejemplo que median los efectos de diversos ligandos pequeños, incluidos los esteroides, la hormona tiroidea, los retinoides y la vitamina D; los péptidos), los fármacos, las lectinas, los azúcares, los ácidos nucleicos (tanto las configuraciones lineales como cíclicas del polímero), los oligosacáridos, las proteínas, los fosfolípidos y los anticuerpos todos pueden interaccionar con diversos receptores celulares.

Los polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietiliminas, sulfuros de poliarileno, polisiloxanos, poliimidias, y poliacetatos pueden también formar un marcador o un conector de marcador adecuado. Muchos otros pares de marcador/conector de marcador son también útiles en los sistemas de ensayo descritos en este documento, como resultará evidente para un experto tras la revisión de esta descripción.

Los conectores comunes tales como péptidos, poliéteres, y similares pueden también servir como marcadores, e incluyen secuencias de polipéptidos, tales como secuencias de poli gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Tales conectores flexibles son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los conectores de poli (etilenglicol) están disponibles de Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama. Estos conectores tienen opcionalmente enlaces amida, enlaces sulfhidrilo, o enlaces heterofuncionales.

Los conectores de marcador se fijan a los sustratos sólidos usando cualquiera de una diversidad de procedimientos actualmente disponibles. Los sustratos sólidos comúnmente se derivatizan o funcionalizan exponiendo todo o una porción del sustrato a un reactivo químico que une un grupo químico a la superficie que es reactivo con una porción del conector de marcador. Por ejemplo, los grupos que son adecuados para la unión a una porción de cadena más larga incluirían a las aminas, al hidroxilo, el tiol, y grupos carboxilo. Pueden usarse aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos para funcionalizar una diversidad de superficies, tales como superficies de vidrio. La construcción de tales matrices de biopolímeros de la fase sólida está bien descrita en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154 (1963) (que describe la síntesis en fase sólida de, por ejemplo, péptidos); Geysen y col., *J. Immun. Meth.* 102: 259-274 (1987) (que describe la síntesis de componentes en fase sólida en alfileres); Frank y Doring, *Tetrahedron* 44: 6031-6040 (1988) (que describe la síntesis de diversas secuencias de péptidos en discos de celulosa); Fodor y col., *Science*, 251: 767-777 (1991); Sheldon y col., *Clinical Chemistry* 39 (4): 718-719 (1993); y Kozal y col., *Nature Medicine* 2 (7): 753-759 (1996) (que describen todos matrices de biopolímeros fijados a sustratos sólidos). Los enfoques no químicos para fijar los conectores de marcador a los sustratos incluyen otros procedimientos comunes, tales como el calor, el entrecruzamiento por radiación UV, y similares.

Detección inmunológica de polipéptidos de SAK

Además de la detección de gen y de la expresión genética de SAK usando la tecnología de hibridación de ácidos nucleicos, uno puede usar también ensayos inmunológicos para detectar las proteínas SAK. Tales ensayos son útiles para seleccionar los moduladores de SAK, así como para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Los ensayos inmunológicos pueden utilizarse para analizar cualitativamente o cuantitativamente la proteína SAK. Una visión general de la tecnología aplicable puede encontrarse en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988).

A. Producción de anticuerpos

Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con las proteínas SAK son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow y Lane, *supra*; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2^o ed. 1986); y Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975)). Tales técnicas incluyen la preparación de anticuerpos por la selección de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunizando conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse y col., *Science* 246: 1275-1281 (1989); Ward y col., *Nature* 341: 544-546 (1989)).

Puede usarse una serie de inmunógenos que comprenden porciones de la proteína SAK para producir anticuerpos específicamente reactivos con la proteína SAK. Por ejemplo, puede aislarse la proteína SAK recombinante o un fragmento antigénico de la misma según se describe en este documento. La proteína recombinante puede expresarse en células eucariotas o procariotas como se describió anteriormente, y puede purificarse como se describió en general anteriormente. La proteína recombinante es el inmunógeno de preferencia para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. Como alternativa, puede usarse como inmunógeno un péptido sintético derivado de las secuencias descritas en este documento y conjugado a una proteína vehículo. La proteína que se presenta en la naturaleza puede también utilizarse en forma pura o impura. Posteriormente se inyecta el producto en un animal capaz de producir anticuerpos. Pueden generarse anticuerpos monoclonales o policlonales, para el uso posterior en ensayos inmunológicos para medir la proteína.

Los procedimientos de producción de anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la técnica. Se inmuniza una cepa endogámica de ratones (por ejemplo, ratones BALB/C) o conejos con la proteína usando un adyuvante convencional, por ejemplo adyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización convencional. Se controla la respuesta inmune del animal a la preparación del inmunógeno tomando muestras de sangre y determinando el título de reactividad para las subunidades beta. Cuando se obtienen adecuadamente títulos altos del anticuerpo para el inmunógeno, se recoge sangre del animal y se preparan los antisueros. Si se desea puede realizarse otro fraccionamiento de los antisueros para enriquecer los anticuerpos reactivos para la proteína (véase, Harlow y Lane, *supra*).

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse por diversas técnicas familiares para los expertos en la técnica. Brevemente, se immortalizan células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, comúnmente por fusión con una célula de mieloma (véase, Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519 (1976)). Los procedimientos alternativos de immortalización incluyen la transformación con el virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus, u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Las colonias que surgen de células immortalizadas únicas se seleccionan para la producción de anticuerpos de especificidad deseada y afinidad para el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por tales células pueden mejorarse por diversas técnicas, incluidas la inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado. Como alternativa, uno puede aislar las secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo seleccionando una biblioteca de ADN de las células B humanas según el protocolo del general descrito por Huse, y col., *Science* 246: 1275-1281 (1989).

Los anticuerpos monoclonales y los sueros policlonales se recogen y se valoran frente a la proteína inmunógeno en un ensayo inmunológico, por ejemplo, un ensayo inmunológico en fase sólida con el inmunógeno inmovilizado en un soporte sólido. Típicamente, se seleccionan los antisueros policlonales con un título de 10^4 o mayor y se prueban para su reactividad cruzada frente a proteínas diferentes de SAK, usando un ensayo inmunológico de unión competitiva. Los antisueros policlonales específicos y los anticuerpos monoclonales se unirán usualmente con una K_d de al menos aproximadamente 0,1 mM, más usualmente al menos aproximadamente 1 μ M, de preferencia al menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor, y de mayor preferencia, 0,01 μ M o mejor. También pueden generarse anticuerpos específicos solamente para un ortólogo particular de SAK, tal como SAK humana, extrayendo otros ortólogos que reaccionan de manera cruzada de una especie tal como un mamífero no humano. De esta manera, pueden obtenerse los anticuerpos que se unen solamente a la proteína SAK.

Una vez que están disponibles los anticuerpos específicos contra la proteína SAK, la proteína puede detectarse por medio de una diversidad de procedimientos de ensayo inmunológico. Además, el anticuerpo puede usarse terapéuticamente como un modulador de SAK. Para una revisión de procedimientos inmunológicos y de ensayos inmunológicos, véase *Basic and Clinical Immunology* (Stites y Terr., 7^o ed. 1991). Además, los ensayos inmunológicos de la presente invención pueden realizarse en cualquiera de varias configuraciones, que se resumen extensamente en *Enzyme Immunoassay* (Maggio, ed., 1980); y Harlow y Lane, *supra*.

B. Ensayos de unión inmunológicos

La proteína SAK puede detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de una serie de ensayos de unión inmunológicos bien reconocidos (véase, por ejemplo, Patentes de EEUU N° 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288 y 4.837.168).
 5 Para una revisión de los ensayos inmunológicos generales, véase también *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites y Terr, eds., 7° ed. 1991). Los ensayos de unión inmunológicos (o inmunoensayos) usan típicamente un anticuerpo que se une específicamente a una proteína o a un antígeno de elección (en este caso la proteína SAK o una subsecuencia antigénica de la misma). El anticuerpo (por ejemplo, anti-SAK) puede producirse por cualquiera de una serie de medios bien conocidos por los expertos en
 10 la técnica y como se describió anteriormente.

Los ensayos inmunológicos también usan frecuentemente un agente marcador para unirse específicamente y marcar el complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. El agente marcador puede en sí mismo ser uno de los restos que comprende el complejo anticuerpo/antígeno. Por consiguiente, el agente marcador puede ser una SAK marcada o un anticuerpo anti-SAK marcado. Como alternativa, el agente marcador puede ser un tercer resto, tal como un anticuerpo secundario, que se une específicamente al complejo anticuerpo/SAK (un anticuerpo secundario es típicamente específico para los anticuerpos de la especie de la que se obtiene el primer anticuerpo). Otras proteínas capaces de unirse específicamente a las regiones constantes de las inmunoglobulinas, tales como la proteína A o la proteína G pueden también utilizarse como el agente marcador. Estas proteínas exhiben una fuerte reactividad no inmunogénica con las regiones constantes de las inmunoglobulinas de una diversidad de especies (véase, por ejemplo, Kronval y col., *J. Immunol.* 111: 1401-1406 (1973); Akerstrom y col., *J. Immunol.* 135: 2589-2542 (1985)). El agente marcador puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, al que otra molécula puede unirse específicamente, tal como estreptavidina. Los expertos en la técnica conocen una diversidad de restos detectables.
 15
 20

A través de los ensayos, pueden ser necesarias etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de agentes reactivos. Las etapas de incubación pueden variar desde aproximadamente 5 segundos hasta varias horas, opcionalmente desde aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, del antígeno, del volumen de disolución, de las concentraciones, y similares. Usualmente, los ensayos se realizarán a temperatura ambiente, aunque pueden llevarse a cabo en un intervalo de
 25 temperaturas, tal como 10°C a 40°C.
 30

Formatos de ensayos no competitivos

Los ensayos inmunológicos para detectar SAK en muestras pueden ser competitivos o no competitivos. Los ensayos inmunológicos no competitivos son ensayos en los que se mide directamente la cantidad de antígeno. En un ensayo "sandwich" de preferencia, por ejemplo, los anticuerpos anti-SAK pueden unirse directamente a un sustrato sólido en el que están inmovilizados. Estos anticuerpos inmovilizados posteriormente capturan SAK presente en la muestra de prueba. Las proteínas SAK inmovilizadas de esta manera son unidas posteriormente por un agente marcador, tal como un segundo anticuerpo de SAK que lleva un marcador. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede carecer de marcador, pero puede, a su vez, ser unido por un tercer anticuerpo marcado específico para los anticuerpos de la especie de la que se obtiene el segundo anticuerpo. El segundo o tercer anticuerpo se modifica típicamente con un resto detectable, tal como biotina, al que se une específicamente otra molécula, por ejemplo, estreptavidina, para proporcionar un resto detectable.
 35
 40

Formatos de ensayos competitivos

En los ensayos competitivos, la cantidad de proteína SAK presente en la muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de una proteína SAK conocida, añadida (exógena), desplazada (por competición) de un anticuerpo anti-SAK por la proteína SAK desconocida presente en una muestra. En un ensayo competitivo, se añade una cantidad conocida de proteína SAK a una muestra y posteriormente se pone la muestra en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína SAK. La cantidad de proteína SAK exógena unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de proteína SAK presente en la muestra. En una forma de realización particularmente de preferencia, el anticuerpo está inmovilizado en un sustrato sólido. La cantidad de proteína SAK unida al anticuerpo puede determinarse midiendo la cantidad de SAK presente en el complejo proteína SAK/anticuerpo, o como alternativa midiendo la cantidad de proteína no complejada restante. La cantidad de proteína SAK puede detectarse proporcionando una molécula de SAK marcada.
 45
 50
 55

Otro ensayo competitivo de preferencia es un ensayo de inhibición de hapteno. En este ensayo la proteína SAK conocida se inmoviliza en un sustrato sólido. Se añade una cantidad conocida de anticuerpo anti-SAK a la muestra, y posteriormente se pone la muestra en contacto con la SAK inmovilizada. La cantidad de anticuerpo anti-SAK unido a SAK inmovilizada conocida es inversamente proporcional a la cantidad de proteína SAK presente en la muestra. Una vez más, la cantidad de anticuerpo inmovilizado puede detectarse detectando la fracción inmovilizada del anticuerpo o la fracción del anticuerpo que permanece en la disolución. La detección puede ser directa donde el anticuerpo está marcado o indirecta por posterior adición de un resto marcado que se une específicamente al anticuerpo como se describió anteriormente.
 60
 65

ES 2 320 328 T3

Determinaciones de reactividad cruzada

Los ensayos inmunológicos en el formato de unión competitiva también pueden usarse para las determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, puede inmovilizarse una proteína SAK a un soporte sólido. Se añaden las proteínas (por ejemplo, SAK y homólogas) al ensayo que compiten por la unión de los antisueros al antígeno inmovilizado. La capacidad de las proteínas añadidas de competir por la unión de los antisueros a la proteína inmovilizada se compara con la capacidad de la proteína SAK de competir con sí misma. Se calcula la reactividad cruzada por ciento para las proteínas anteriores, usando cálculos convencionales. Se seleccionan y se combinan los antisueros con menos del 10% de reactividad cruzada con cada una de las proteínas añadidas presentadas anteriormente. Opcionalmente se eliminan los anticuerpos con reactividad cruzada de los antisueros combinados por inmovilización con las proteínas consideradas añadidas, por ejemplo, homólogos poco relacionados.

Los antisueros inmovilizados y combinados se usan a continuación en un ensayo inmunológico de unión competitiva como se describió anteriormente para comparar una segunda proteína, que se cree que tal vez puede ser un alelo o una variante polimórfica de una proteína SAK, con la proteína del inmunógeno. Para hacer esta comparación, se ensaya cada una de las dos proteínas en una gran variedad de concentraciones y se determina la cantidad de cada proteína necesaria para inhibir el 50% de la unión de los antisueros a la proteína inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína necesaria para inhibir el 50% de la unión es menor que 10 veces la cantidad de proteína SAK que se necesita para inhibir el 50% de unión, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a los anticuerpos policlonales generados para el inmunógeno de SAK.

Otros formatos de ensayo

El análisis de transferencia Western (inmunotransferencia) se utiliza para detectar y cuantificar la presencia de SAK en la muestra. La técnica comprende generalmente separar las proteínas de la muestra por electroforesis en gel en base al peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado, (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon, o un filtro de nailon derivatizado), e incubar la muestra con los anticuerpos que se unen específicamente a SAK. Los anticuerpos anti-SAK se unen específicamente a SAK en el soporte sólido. Estos anticuerpos pueden marcarse directamente o como alternativa pueden detectarse posteriormente usando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos de oveja anti-ratón marcados) que se unen específicamente a los anticuerpos anti-SAK.

Otros formatos de ensayo incluyen los ensayos inmunológicos de liposomas (LIA), que usan liposomas diseñados para unir moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados. Los productos químicos liberados se detectan a continuación según las técnicas convencionales (véase Monroe y col., Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34-41 (1986)).

Reducción de la unión no específica

Un experto en la técnica apreciará que frecuentemente es deseable minimizar la unión no específica en los ensayos inmunológicos. En particular, donde el ensayo incluye un antígeno o anticuerpo inmovilizado en un sustrato sólido es deseable minimizar la cantidad de unión no específica al sustrato. Los medios para reducir tal unión no específica son conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente, esta técnica implica recubrir el sustrato con una composición proteínica. En particular, las composiciones de proteínas tales como la seroalbúmina bovina (SAB), la leche desnatada en polvo, y la gelatina se utilizan ampliamente siendo la de mayor preferencia la leche en polvo.

Marcadores

El marcador o grupo detectable particular utilizado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo utilizado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Tales marcadores detectables se han desarrollado bien en el campo de ensayos inmunológicos y, en general, la mayoría de los marcadores útiles en tales procedimientos puede aplicarse a la presente invención. Por consiguiente, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen las perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS™), los colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo de Tejas, rodamina, y similares), los radio-marcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), las enzimas (por ejemplo, peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina y otras comúnmente usadas en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como el oro coloidal o las perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador puede acoplarse directamente o indirectamente al componente deseado del ensayo según los procedimientos conocidos en la técnica. Como se indicó anteriormente, puede usarse una amplia diversidad de marcadores, con la elección del marcador dependiendo de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible, y las disposiciones de eliminación.

Los marcadores no radiactivos se unen frecuentemente por medios indirectos. Generalmente, se une una molécula del ligando (por ejemplo, biotina) de manera covalente a la molécula. Posteriormente, el ligando se une a otras moléculas (por ejemplo, estreptavidina), que es intrínsecamente detectable o que está unida de manera covalente a un

sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente. Los ligandos y sus dianas pueden utilizarse en cualquier combinación adecuada con anticuerpos que reconocen la proteína SAK, o anticuerpos secundarios que reconocen anti-SAK.

5 Las moléculas pueden también conjugarse directamente a los compuestos generadores de la señal, por ejemplo, por conjugación con una enzima o un fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, en particular fosfatasas, esterases y glicosidasas, u oxidotasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen la fluoresceína y sus derivados, la rodamina y sus derivados, el dansilo, la umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen la luciferina, y 2,3-dihidroftalazinedionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de diversos sistemas marcadores o productores de señales que pueden utilizarse, véase la Patente de EEUU N° 4.391.904.

15 Los medios para detectar los marcadores son muy conocidos por los expertos en la técnica. Por consiguiente, por ejemplo, donde el marcador es un marcador radiactivo, el medio para la detección incluye un contador de centelleo o una película fotográfica como en autorradiografía. Donde el marcador es un marcador fluorescente, puede detectarse excitando el fluorocromo con la longitud de onda de luz adecuada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede detectarse de manera visual, por medio del uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de acoplamiento de carga (CCDs) o fotomultiplicadores y similares. De manera similar, los marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando los sustratos adecuados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Los marcadores colorimétricos o quimioluminiscentes pueden detectarse simplemente observando el color asociado con el marcador. De esta manera, en diferentes ensayos de varilla de inmersión, el oro conjugado aparece frecuentemente rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

25 Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de componentes marcados. Por ejemplo, los ensayos de aglutinación pueden usarse para detectar la presencia de anticuerpos diana. En este caso, las partículas recubiertas con antígeno son aglutinadas por las muestras que comprenden los anticuerpos diana. En este formato, ninguno de los componentes necesita estar marcado y la presencia del anticuerpo diana se detectada por simple inspección visual.

Transfección celular y terapia génica

30 Los ácidos nucleicos de la proteína SAK para la transfección de células *in vitro* e *in vivo* pueden insertarse en cualesquiera de un número de vectores bien conocidos para la transfección de células y organismos diana como se describe a continuación. Los ácidos nucleicos se transfectan en las células, *ex vivo* o *in vivo*, a través de la interacción del vector y de la célula diana. El ácido nucleico, bajo el control de un promotor, expresa a continuación una proteína SAK, mitigando de esa manera los efectos de la ausencia, inactivación parcial, o la expresión anormal de un gen de SAK, particularmente en lo que se refiere a la proliferación celular. Las composiciones se administran a un paciente en una cantidad suficiente para provocar una respuesta terapéutica en el paciente. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como “dosis o cantidad terapéuticamente eficaz”.

40 Tales procedimientos de terapia génica se han sido utilizado para corregir los defectos genéticos adquiridos y heredados, el cáncer y otras enfermedades en una serie de contextos. La capacidad para expresar genes artificiales en seres humanos facilita la prevención y/o cura de muchas de enfermedades humanas importantes, incluidas muchas enfermedades que son no susceptibles de tratamiento por otras terapias (para una revisión de los procedimientos de terapia génica, véase Anderson, *Science* 256: 808-813 (1992); Nabel y Felgner, *TIBTECH* 11: 211-217 (1993); Mitani y Caskey, *TIBTECH* 11: 162-166 (1993); Mulligan, *Science* 926-932 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11: 167-175 (1993); Miller, *Nature* 357: 455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6 (10): 1149-1154 (1998); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8: 35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1): 31-44 (1995); Haddada y col., en *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Doerfler y de Böhm eds., 1995); y Yu y col., *Gene Therapy* 1: 13-26 (1994)).

Composiciones farmacéuticas y administración

55 Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular a administrar (por ejemplo, ácido nucleico, proteína, compuestos moduladores o célula transducida), así como por el procedimiento particular utilizado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17^o ed., 1989). La administración puede ser en cualquier manera conveniente, por ejemplo, por inyección, administración oral, inhalación, aplicación transdérmica, o administración rectal.

60 Las formulaciones adecuadas para la administración oral están constituidas por (a) disoluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del ácido nucleico envasado suspendido en diluentes, tales como agua, disolución salina o PEF 400; (b) cápsulas, sellos o comprimidos, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada del componente activo, como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido adecuado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, materiales de carga, aglutinantes, diluyentes, agentes tamponadores, humectantes, conservantes, aromatizantes, tinturas, agentes disgregantes y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de pastilla pueden comprender el componente activo en un sabor, por ejemplo, sacarosa, así como pastillas

que comprenden el componente activo en una base inerte, tales como gelatina y glicina o sacarosa y emulsiones de acacia, geles, y similares conteniendo, además del componente activo, vehículos conocidos en la técnica.

5 El compuesto de elección, solo o en combinación con otros componentes adecuados, puede transformarse en formulaciones de aerosol (es decir, que pueden “nebulizarse”) para la administración vía inhalación. Las formulaciones de aerosol pueden colocarse en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

10 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vía intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneals y subcutánea, incluyen las disoluciones de inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto, y las suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por infusión intravenosa, por vía oral, tópica, 15 intraperitoneal, intravesical o intratecal. La administración parenteral y la administración intravenosa son los procedimientos de administración de preferencia. Las formulaciones recomendadas pueden presentarse en recipientes sellados de monodosis o dosis múltiples, tales como ampollas y viales.

20 Las disoluciones y suspensiones de inyección pueden prepararse a partir polvos, gránulos y comprimidos estériles de los tipos previamente descritos. Las células transducidas por ácidos nucleicos para terapia *ex vivo* también pueden administrarse por vía intravenosa o parenteral como se describió anteriormente.

25 La dosis administrada a un paciente debería ser suficiente para provocar una respuesta terapéutica ventajosa en el paciente con el tiempo. La dosis se determinará por la eficacia del vector particular usado y por la afección del paciente, así como el peso corporal o el área de superficie del paciente a tratar. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, la naturaleza, y la extensión de cualquier efecto secundario adverso que acompañe la administración de un vector particular, o el tipo de célula transducida en un paciente particular.

30 Para determinar la cantidad eficaz del vector a administrar en el tratamiento o la profilaxis de afecciones debidas a la expresión disminuida o aberrante de la proteína SAK, el médico evalúa los niveles plasmáticos circulantes del vector, la toxicidad del vector, la progresión de la enfermedad y la producción de anticuerpos anti-vector. En general, el equivalente de dosis de un ácido nucleico desnudo de un vector es desde aproximadamente 1 μg hasta 100 μg para un paciente típico de 70 kilogramos, y las dosis de vectores que incluyen una partícula retroviral se calculan para dar una cantidad equivalente de ácido nucleico terapéutico.

35 Para la administración, los compuestos y las células transducidas de la presente invención pueden administrarse en una tasa determinada por la DL-50 del inhibidor, el vector, o el tipo de células transducidas, y los efectos secundarios del inhibidor, del vector o del tipo celular en diferentes concentraciones, en relación a la masa y a la salud general del paciente. La administración puede realizarse por medio de dosis únicas o divididas.

40 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitan la invención reivindicada.

45 Ejemplo 1

Identificación de SAK usando ensayo de proteómica y función de SAK en la modulación de la proliferación celular y de las células tumorales

50 El análisis por espectrometría de masas de los hits generados en la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para el “cebo” de Chk2 se utilizaron para identificar las moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular. Se mostró que SAK se une a Chk2 después de aislar un complejo Chk2-SAK de un ensayo de unión usando inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Chk2, y analizarlo usando espectroscopía de masas. Según se muestra en las Figuras 2-11, los estudios de dominante negativa con SAK mutante mostraron que SAK mutante tiene un fenotipo antiproliferativo más fuerte que SAK de tipo salvaje en células tumorales, mientras que ni el tipo salvaje ni SAK mutante son antiproliferativas en las células normales (usando, por ejemplo, positividad de GFP y ensayos de seguimiento celular). Las Figuras 12-13 demuestran que la inhibición del ARNm de SAK con oligos antisentido es antiproliferativa en las células tumorales A549 y en las células HeLa. Además, la Figura 14 muestra que el ARNm de SAK está sobreexpresado en algunas líneas celulares tumorales. Estos estudios funcionales demuestran que la inhibición de SAK inhibirá 60 el crecimiento de las células tumorales.

Ejemplo 2

Ensayo para la actividad cinasa de SAK

65 Las muestras incluyen TRA-dGFP, TRA-SAK ts, TRA-SAK K41M y simulación. El dominio cinasa de SAK y otros mutantes de SAK pueden también usarse en este ensayo.

ES 2 320 328 T3

Las células se transfectan con ácidos nucleicos que codifican las proteínas de muestra usando transfección con Ca^{2+} , y se incuban durante 24 horas. Se tratan las células con Nocodiazol durante 18 horas, con una liberación de 2 horas. Se lisan las células con un tampón de lisis que comprende HEPES 50 mM, pH 7,4, Triton al 1%, inhibidores de proteinasa, inhibidores de fosfatasa, EDTA y EGTA. Se inmunoprecipita (por ejemplo, con anticuerpos anti-GFP de conejo).

Se lavan las perlas con el tampón de lisis, a continuación el tampón de cinasa (MOPS 20mM, pH 7,2, fosfato de β -glicerol 25 mM, EGTA 5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y DTT 1 mM). Se añaden 30 μl de tampón de cinasa a las perlas, posteriormente se añade Histon o MBP (sustrato, 20 μg). Se añade γ - ^{32}P -ATP (10 μCi (66 nM) y ATP frío (90 μM final)/ MgCl_2 (67,5 mM final). Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente y se somete a SDS PAGE.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para identificar un compuesto capaz de interferir con la unión de un polipéptido de SAK o un fragmento del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

10 (i) combinar un polipéptido de SAK o un fragmento del mismo con un polipéptido de Chk2 y el compuesto, en el que el polipéptido de SAK o el fragmento del mismo tiene actividad cinasa y está codificado por un ácido nucleico que hibrida bajo condiciones rigurosas a un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 2; y

(ii) determinar la unión del polipéptido de SAK o fragmento del mismo a Chk2.

15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de SAK o fragmento del mismo y el polipéptido de Chk2 se combinan primero.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la unión del polipéptido de SAK o fragmento del mismo a Chk2 se determina *in vitro*.

20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de SAK o fragmento del mismo y el polipéptido de Chk2 se expresan en una célula.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la célula es una levadura o una célula de mamífero.

25 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el polipéptido de SAK o fragmento del mismo se fusiona a un polipéptido heterólogo.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la unión del polipéptido de SAK o fragmento del mismo a Chk2 se determina midiendo la expresión de un gen informador.

30 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la unión del polipéptido de SAK o fragmento del mismo a Chk2 se determina midiendo la actividad cinasa de SAK.

35

40

45

50

55

60

65

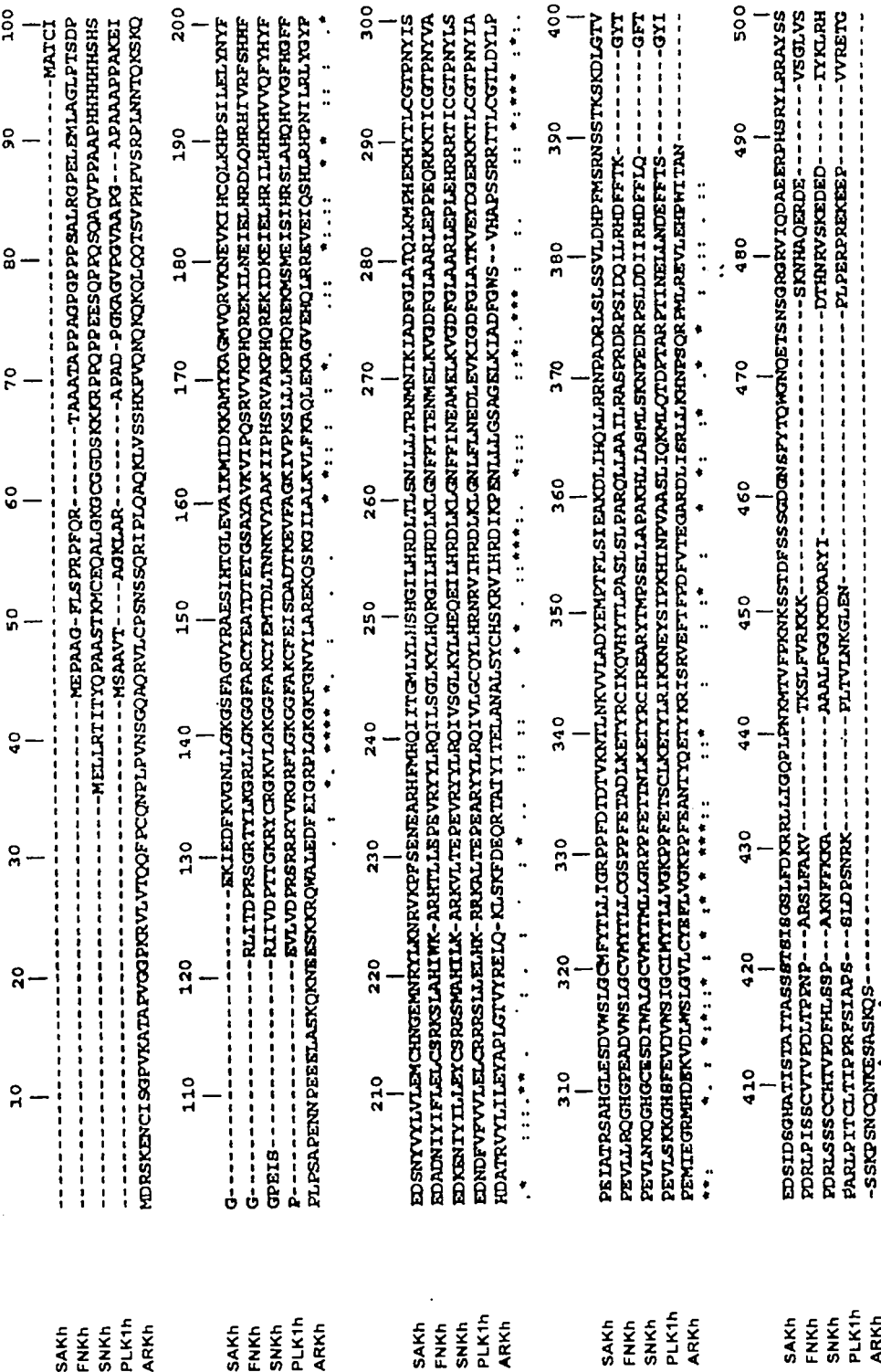
Figura 1

ATGGACCATGCTAATGAGGGTCATCGTATTTGTTTAGCACTGGAATCCATAAT
 TTCAGAAGAGGAAAGGAAACTAGGAGTGCTCCCTTTTCCCAATAATCATA
 GGAAGAAAACCTGGTAGTACTAGTTCACCTAAGGCCTTATCACCTCCTCCTTC
 TGTGGATTCAAATTACCCAACGAGAGATAGAGCATCTTTCAACAGAATGGTC
 ATGCATAGTGCTGCTTCTCCAACACAGGCACCAATCCTTAATCCCTCTATGGT
 TACAAATGAAGGACTGGTCTTACAACACTACAGCTTCTGGAACAGACATCTCTT
 CTAATAGTCTAAAAGATTGTCTTCTAAATCAGCACAACTTTTGAAATCTGTT
 TTTGTGAAAAATGTTGGTTGGGCTACACAGTTAACTAGTGGAGCTGTGTGGGT
 TCAGTTTAATGATGGGTCCCAGTTGGTTGTGCAGGCAGGAGTGTCTTCTATCA
 GTTATACCTCACCAAATGGTCAAACAACACTAGGTATGGAGAAAATGAAAAATT
 ACCAGACTACATCAAACAGAAATTACAGTGTCTGTCTTCCATCCTTTTGATGT
 TTTCTAATCCGACTCCTAATTTTCATTGA

>Secuencia de aminoácidos de SAK (SEC. ID N°: 2)

MATCIGEKIEDFKVGNLLGKGSFAGVYRAESIHTGLEVAIKMIDKKAMYKAGMV
 QRVQNEVKIHCQLKHP
 SILELYNYFEDSNYVYLVLEMCHNGEMNRYLKNRVKPFSENEARHFHQIITGM
 LYLHSHGILHRDLTSL
 NLLLTRNMNIKIADFGLATQLKMPHEKHYTELCGTPNYISPEIATRSAHGLESDVW
 SLGCMFYTLIGRPP
 FDTDVKNLTKVVLADYEMPSFLSIEAKDLIHQLLRNPADRLSLSVLDHPPFM
 SRNSSTKSKDLGTVE
 DSIDSGHATISTAITASSSTISGSLFDKRRLLIGQPLPNKMTVFPKNKSSTDFSSSG
 DGNSFYTQWGNQ
 ETSNSGRGRVIQDAEERPHSRYLRRAYSDDRSGTSNSQSQAKTYTMERCHSAEM
 LSVSKRSGGGENEERY
 SPTDNNANIFNFKEKTSSSSGSFERPDNNQALS NHLCPGKTPFPFADPTPQTETV
 QQWFGNLQINHLR
 KTTEYDSISPNRDFQGHPLQKDTSKNAWTDTKVKKNSDASDNAHSVKQQNTM
 KYMTALHSKPEIIQQEC
 VFGSDPLSEQSKTRGMEPPWGYQNRTLRSITSPLVAHRLKPIRQKTKKAVVSILD
 SEEVCVELVKEYASQ
 EYVKEVLQISSDGNTITIYYPNGGRGFPLADRPPSPTDNI SRYSPDNLPEKYWRKY
 QYASRFVQLVRSKS
 PKITYFTRYAKCILMENS PGADFEVWFYDGVKIHKTEDFIQVIEKTGKSYTLKSES
 EVNSLKEEIKMYMD
 HANEGHRICLALESIISEEERKTRSAPFFPIIIGRKPSTSSPKALSPPPSVDSNYPTR
 DRASFNRMMVMH
 SAASPTQAPILNPSMVTNEGLGLTTTASGTDISSNSLKDCLPKSAQLLKS FVKNV
 GWATQLTSGAVVWQ
 FNDGSQLVVQAGVSSI SYTSPNGQTRYGENEKLPDYIKQKLQCLSSILLMFSNPT
 PNFH

Alineamiento del dominio cinasa de SAK con otras cinasas mitóticas



Dos mutantes de SAKh generadas para los estudios de dominantes negativas: D154A y K41M

FIG. 2.

Resumen de los estudios de validación de diana: SAK

Estudios de dominantes negativas		Tumor						Normal	
Actividad antiproliferativa		A549	Hela	PC-3	MCF7	H1299	HMEC	PrEC	
Ts									
Fusión de GFP	+	+	++	++	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
IRE5 GFP	+	+			+/-	nd	+/-	+/-	nd
K41M									
Fusión de GFP	++	++	++	++	+	+/-	+/-	+/-	+/-
IRE5 GFP	++	++	++	++	+	nd	+/-	+/-	nd
D154A									
Fusión de GFP	++	nd	++	++	+	+/-	+/-	+/-	+/-
IRE5 GFP	++	nd	++	++	+	nd	+/-	+/-	nd
Antisentido:									
	Hela	A549		H1299					
	+	+/-		+/-					

(+ indica efecto antiproliferativo en el estudio de positividad de GFP, de seguimiento celular o en los estudios antisentido)

FIG. 3

La sobreexpresión de las mutantes de SAK tiene un efecto antiproliferativo más pronunciado que el tipo salvaje en células A549

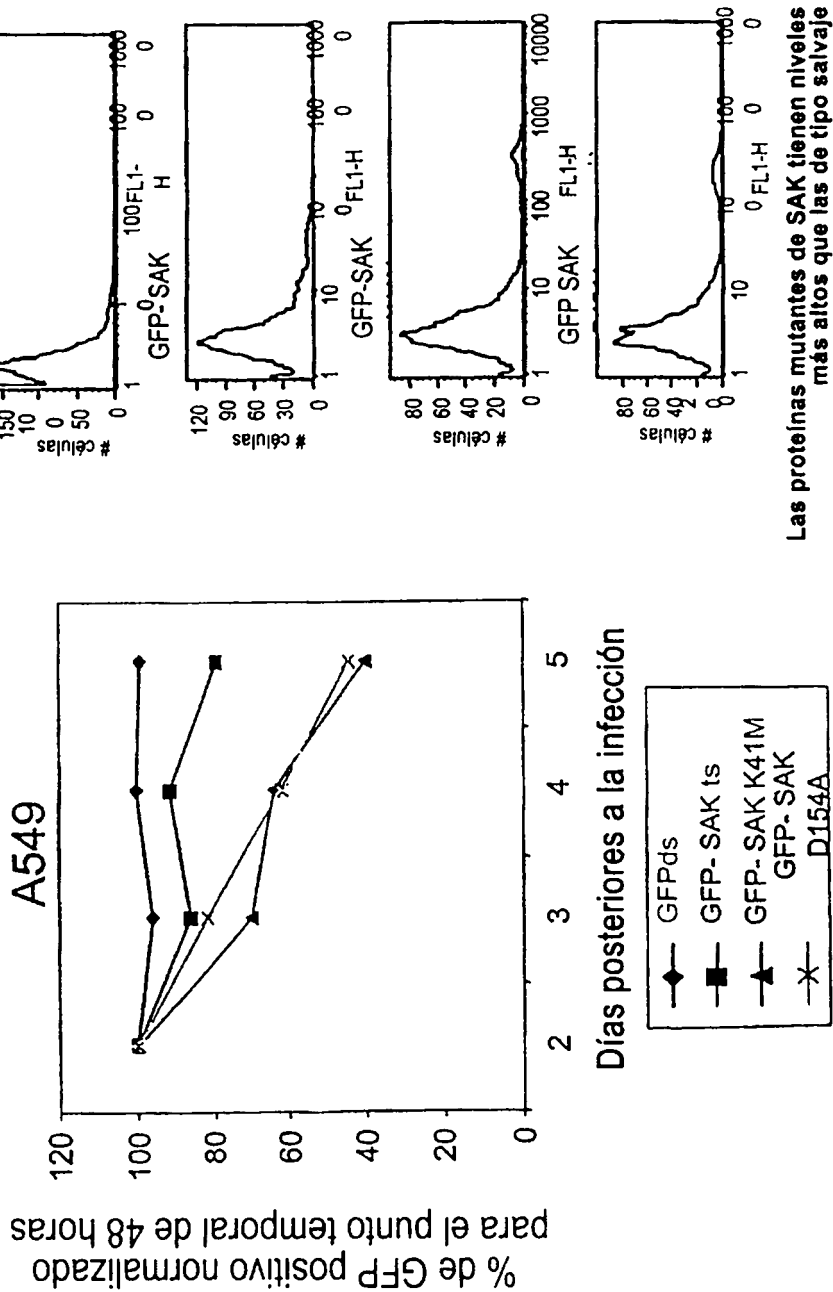


FIG . 4

Las mutantes de SAK tienen un efecto antiproliferativo más pronunciado comparado con el tipo salvaje en células A549

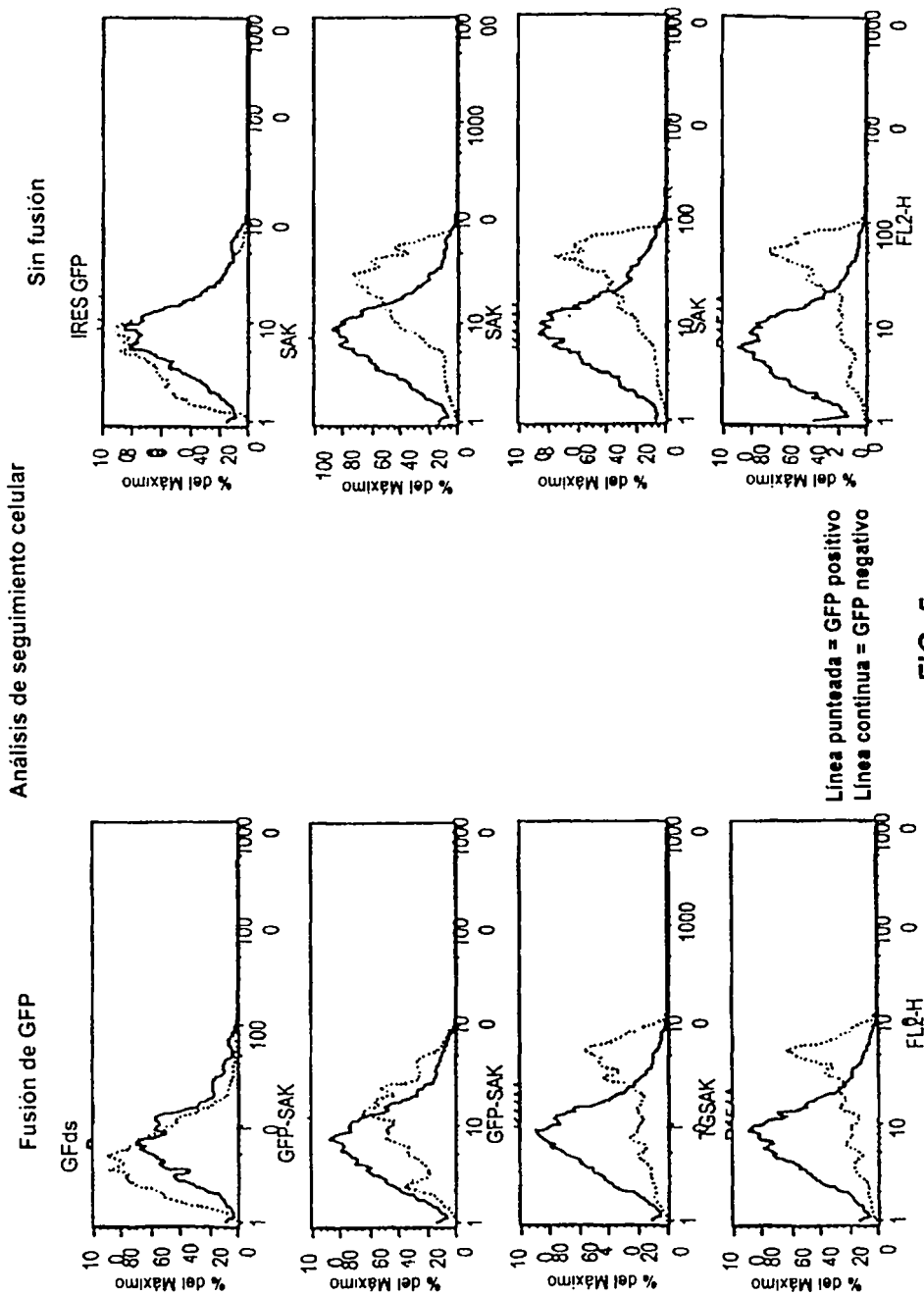


FIG. 5

Las mutantes de SAK tienen un efecto antiproliferativo más significativo que el tipo salvaje en células MCF7

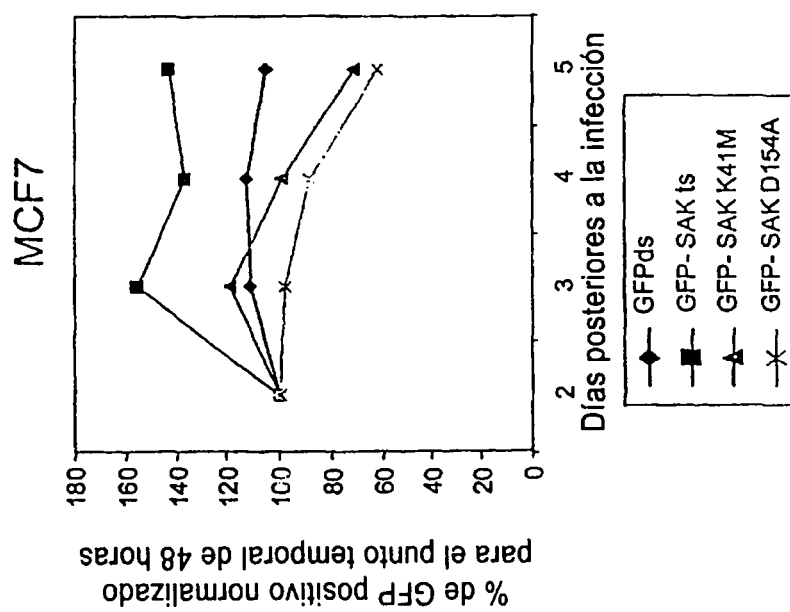


FIG. 6

**El tipo salvaje y los mutantes de SAK
 tienen efectos antiproliferativos similares en las células PC-3**

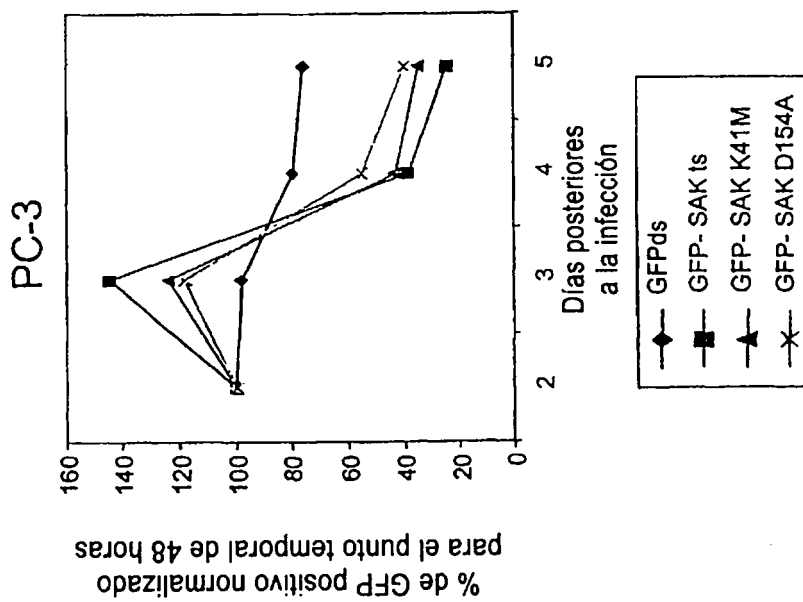


FIG. 7

La mutante de SAK K42M tiene un efecto antiproliferativo débil en las células H1299

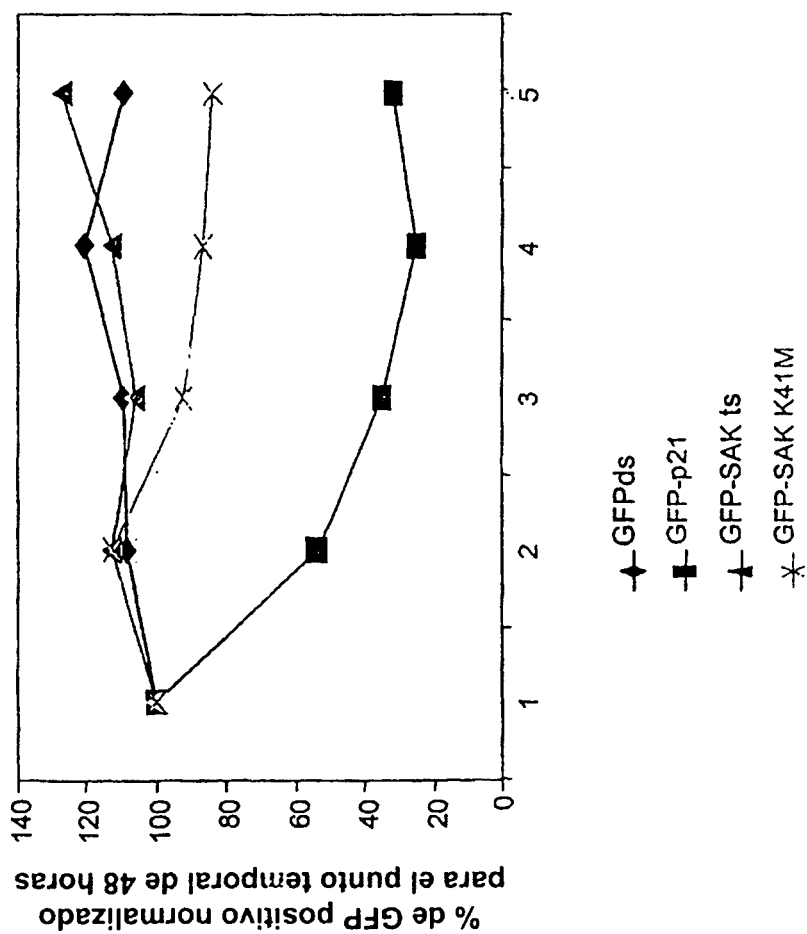
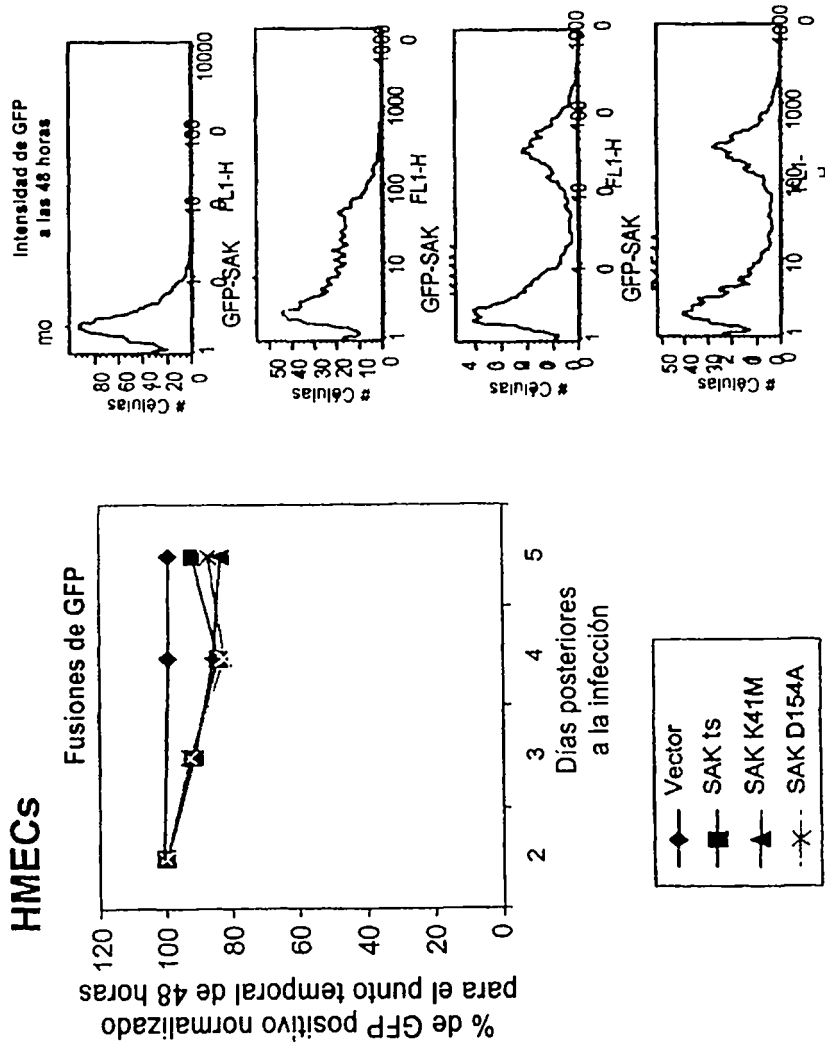


FIG. 8

El tipo salvaje y las mutantes de SAK no tienen efectos antiproliferativos en células normales en estudios de positividad de GFP



Las proteínas mutantes de SAK tienen niveles de expresión más altos que las de tipo salvaje

FIG. 9

Las proteínas de tipo salvaje y las mutantes de SAK no tienen actividad antiproliferativa significativa en células normales

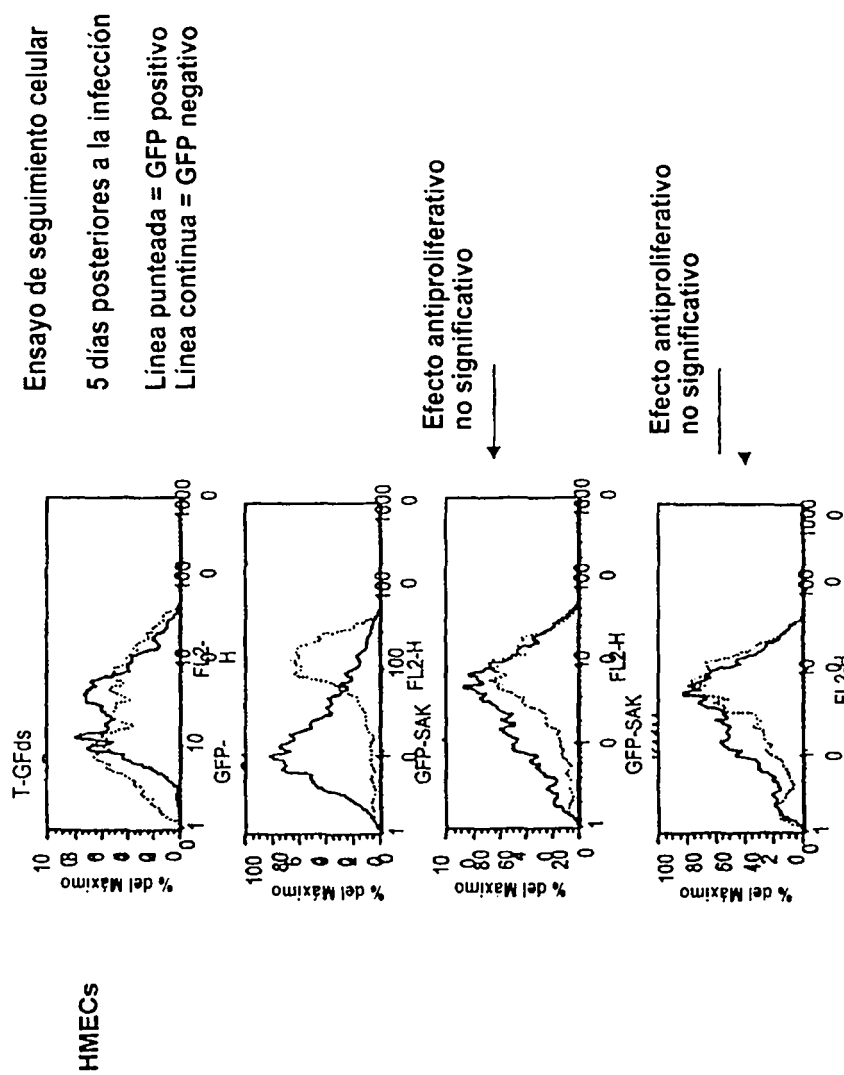


FIG. 10

La mutante de SAK K41M no tiene efectos antiproliferativos potente en células normales

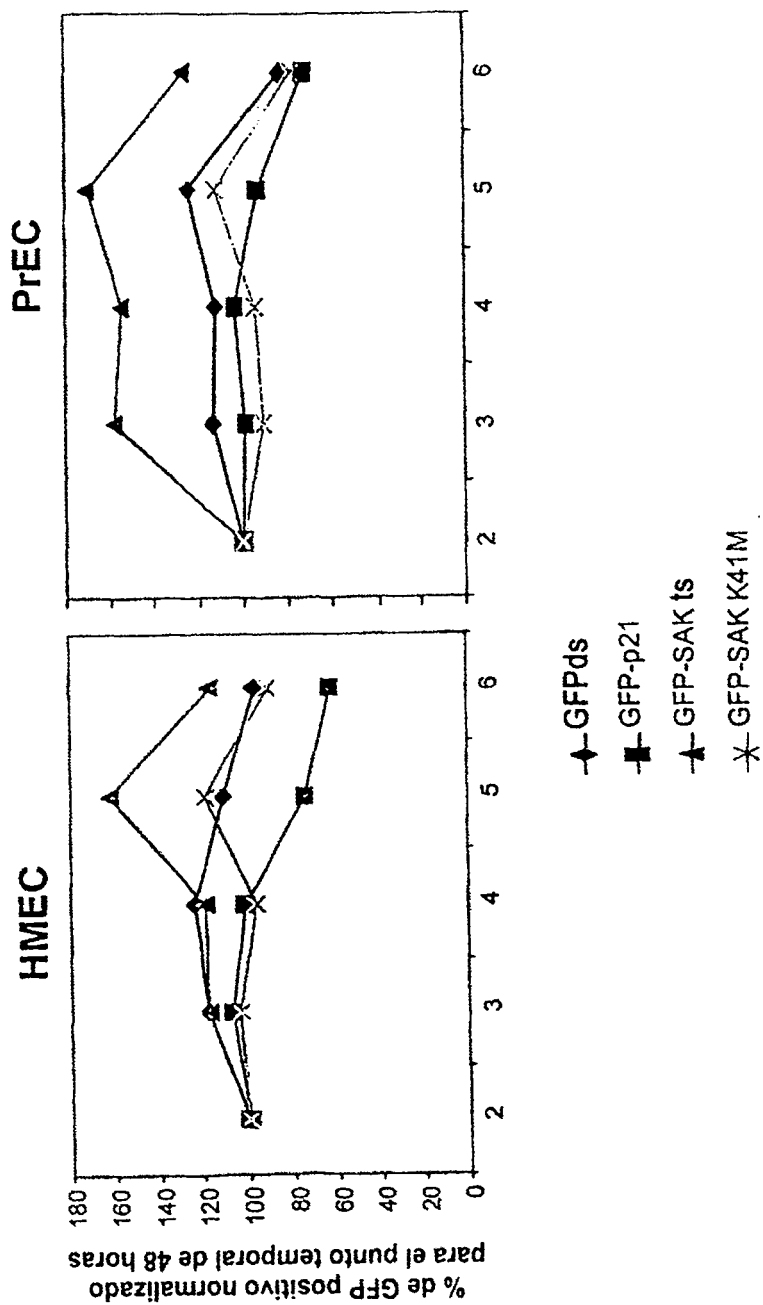


FIG. 11

La reducción de SAK con transfecciones oligos antisentido es antiproliferativa en células HeLa y A549

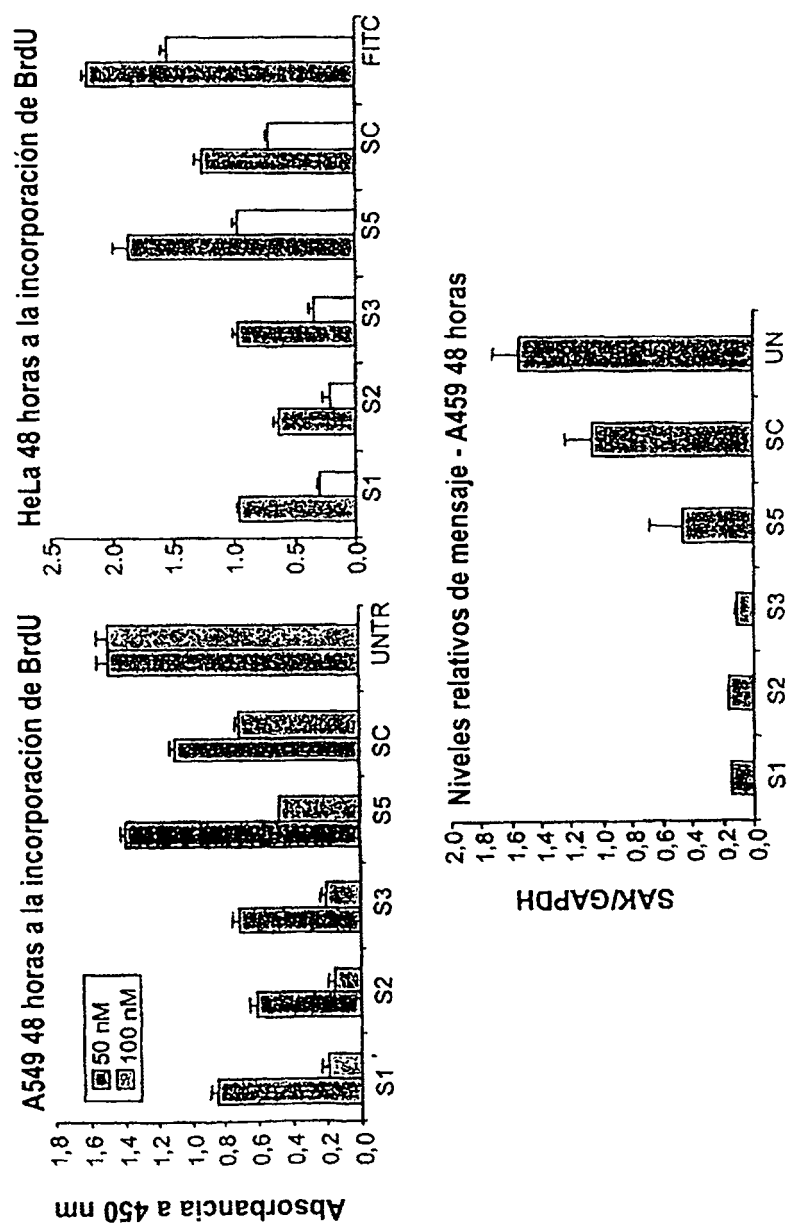


FIG. 12

La reducción de SAK con transfecciones de oligos antisentido es débilmente antiproliferativa en células Huvec

ES 2 320 328 T3

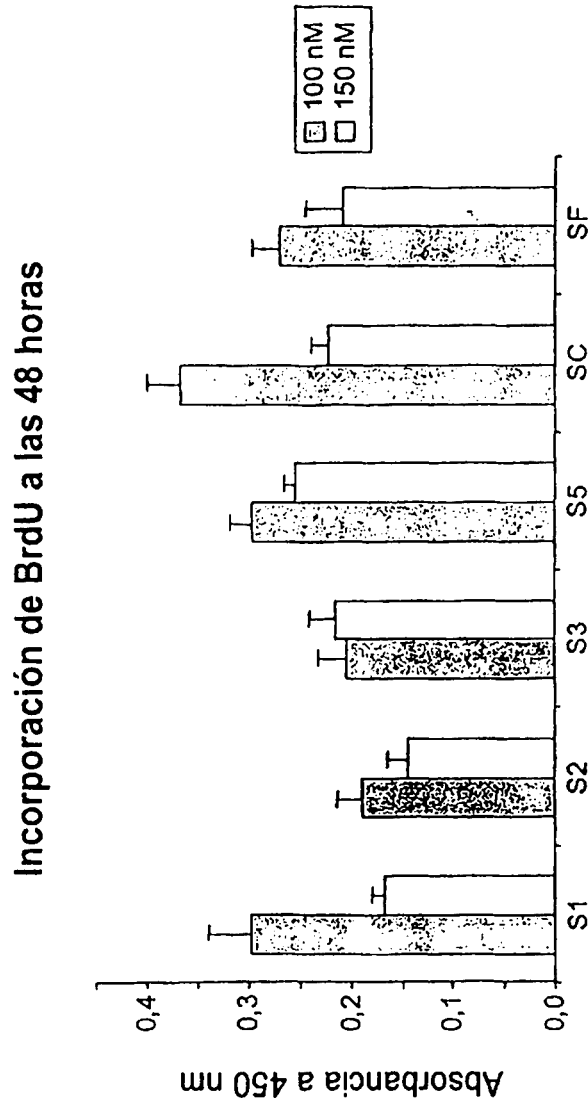
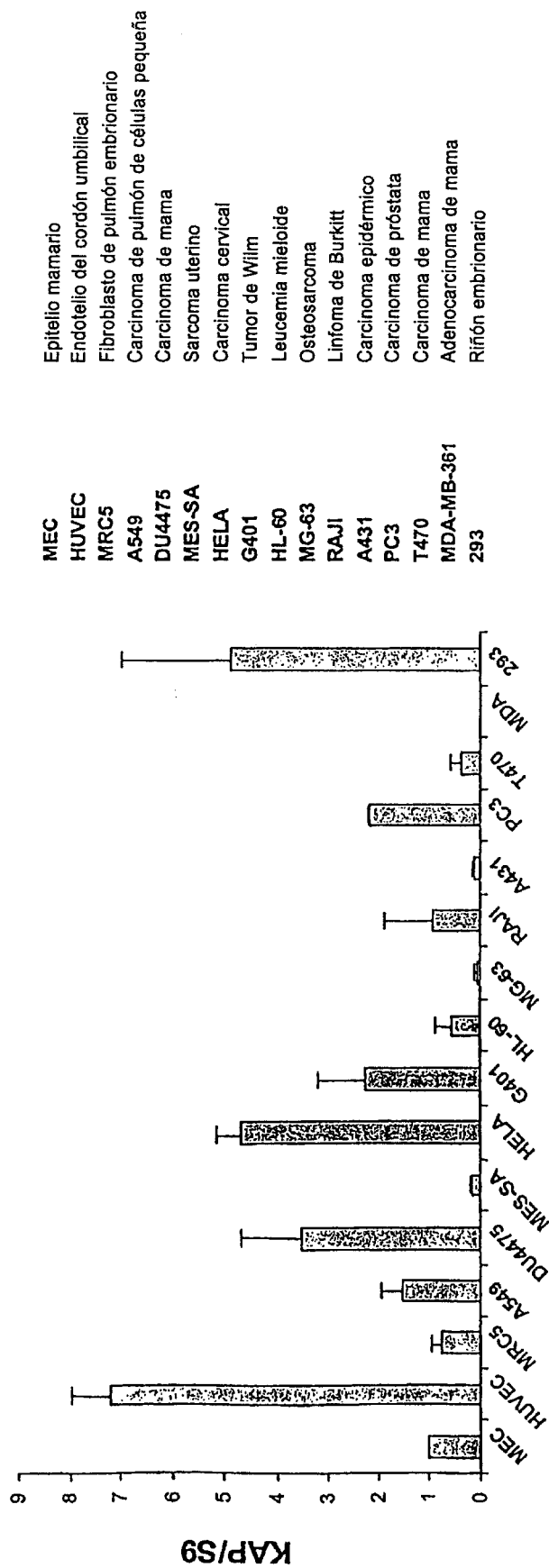


FIG. 13

El ARNm de SAK está sobreexpresado en algunas líneas celulares tumorales

Expresión relativa



Epitelio mamario
 Endotelio del cordón umbilical
 Fibroblasto de pulmón embrionario
 Carcinoma de pulmón de células pequeñas
 Carcinoma de mama
 Sarcoma uterino
 Carcinoma cervical
 Tumor de Wilms
 Leucemia mieloide
 Osteosarcoma
 Linfoma de Burkitt
 Carcinoma epidérmico
 Carcinoma de próstata
 Carcinoma de mama
 Adenocarcinoma de mama
 Riñón embrionario

FIG. 14

Resumen de SAK

Identificación

Proteómica- proteína que interactúa con Chk2

Estudios funcionales

Estudios de dominante negativa

- SAK mutante tiene un fenotipo antiproliferativo más potente que SAK de tipo salvaje en células tumorales mientras que ni el tipo salvaje ni las mutantes de SAK son antiproliferativas en células normales.
- El nivel de expresión más alto de SAK mutante comparado con el tipo salvaje dificulta la validación de SAK sólo por la estrategia de dominante negativa

Estudios antisentido

Estudios preliminares sugieren que la inhibición del ARNm de SAK con oligos antisentido es antiproliferativa en células A549 y HeLa

Bibliografía

Bibliografía de soporte importante muestra que la reducción antisentido de SAK de ratón es antiproliferativa y que el knockout de SAK de ratón da como resultado un paro del ciclo celular y apoptosis aumentados.

FIG. 15

Modelo para la actividad antiproliferativa asociada con la inhibición de SAK

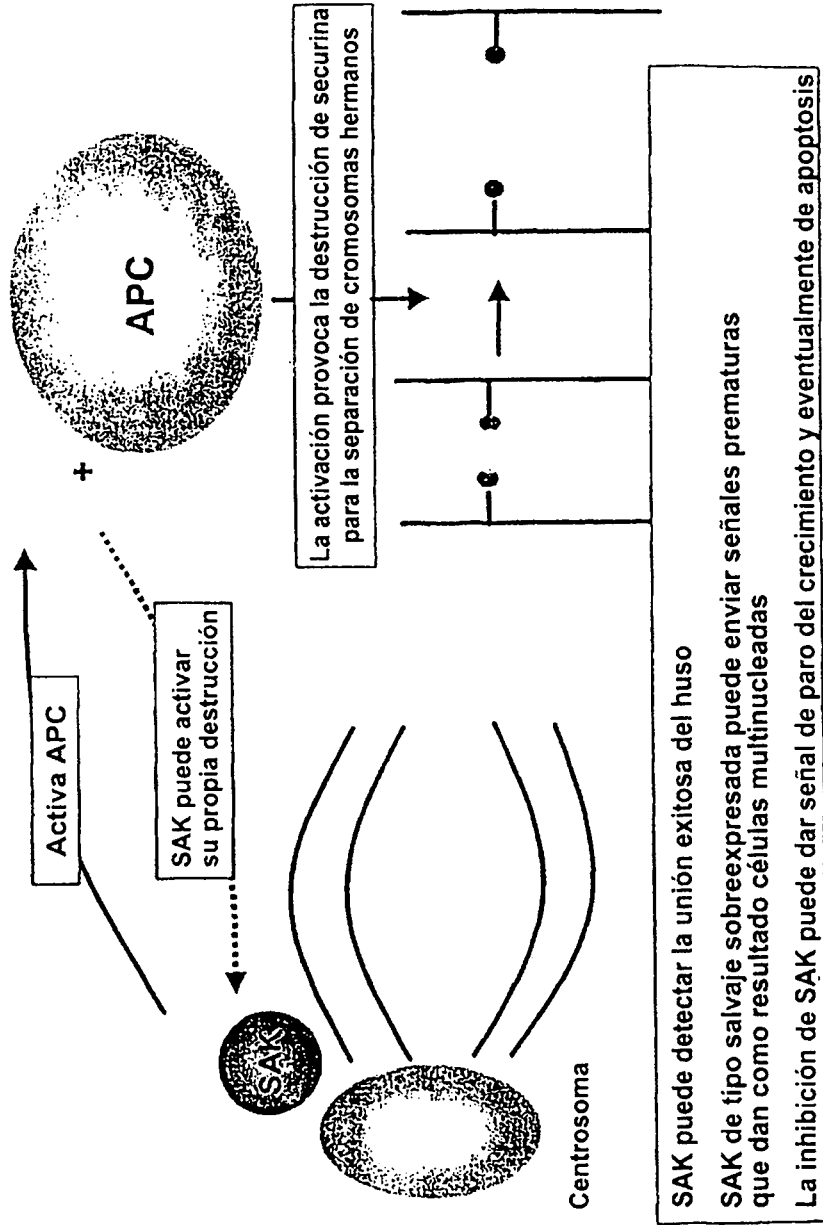


FIG. 16

Ensayo bioquímico para la actividad cinasa de SAK

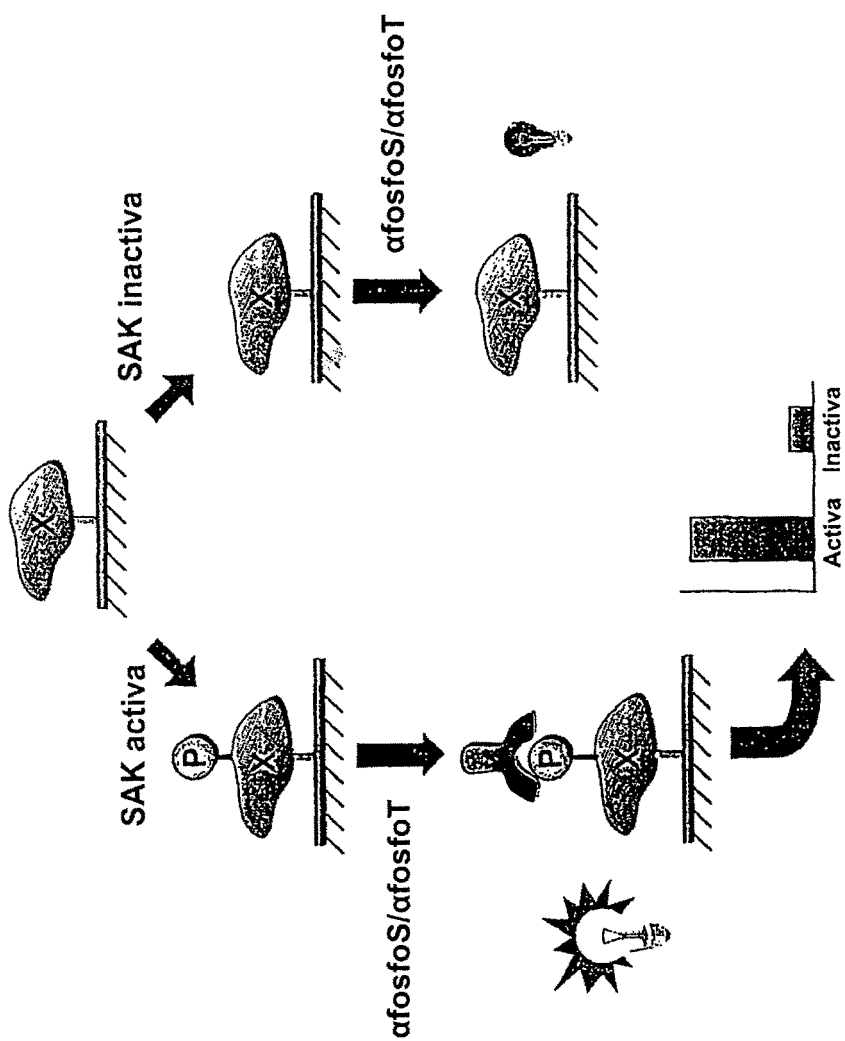


FIG. 17

Protocolo para el ensayo de autofosforilación de SAK Assay

Unir Sak de lisados de *E. coli* a Ni-NTA agarosa O/N a 4 °C



Lavar Ni-NTA con tampón de lisis (Hepes 20 mM, pH 7,2, NaCl 0,5 M, Tween-20 al 0,5%, fosfato de β -glicerol 25 mM, NaF 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, NaPyP 1 mM, glicerol al 10%)



Lavar Ni-NTA con tampón de cinasa (MOPS 20 mM, pH 7,2, fosfato de β -glicerol 25 mM, EGTA 5 mM, Na_3VO_4 1 mM)



Resuspender Sak unida a resina en 10 μ l de tampón de cinasa
Añadir 10 μ l de mezcla marcadora (MgCl_2 20 mM, MnCl_2 2 mM, ATP 0,2 mM, γ - ^{32}P ATP 0,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ en tampón de cinasa
Incubar a 30 °C, 15 minutos

FIG. 18

Actividad de autofosforilación de Sak producida en *E. coli*

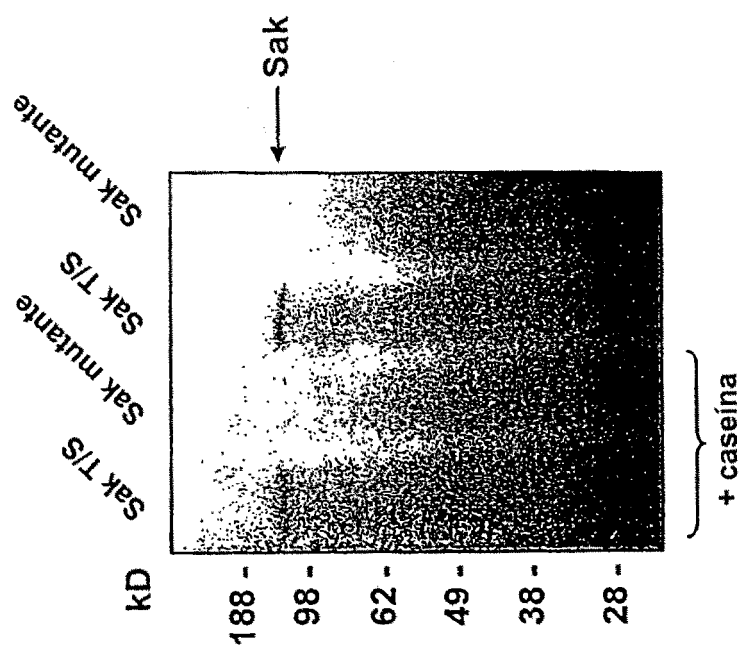
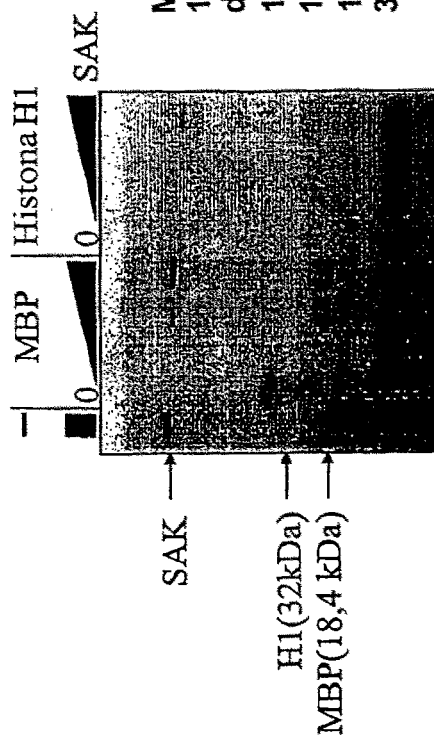


FIG. 19

MBP (Proteína básica de la mielina) es un sustrato de SAK in vitro



Mezcla:
10, 30, 100 ng de SAK en 10 μ l de tampón de almacenamiento
15 μ l de tampón de cinasa
1 μ l de MBP (5 μ g/ μ l) o H1 (5 μ g/ μ l)
1 μ l de γ -³²P ATP (3000 Ci/mmol)
3 μ l de ATP 500 μ M

Incubado 1 hora a TA,
cargado 1/4 en SDS-PAGE

Fig. 20

