



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 327 815**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01910461 .1**

(96) Fecha de presentación : **08.02.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1263939**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.12.2002**

(54) Título: **18477, proteína quinasa humana y usos de la misma.**

(30) Prioridad: **11.02.2000 US 182059 P**
12.09.2000 US 659287

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2009

(73) Titular/es: **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, Inc.**
75 Sidney Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

(72) Inventor/es: **Kapeller-Libermann, Rosana;**
Meyers, Rachel, E. y
Williamson, Mark

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

18477, proteína quinasa humana y usos de la misma.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un nuevo ácido nucleico de proteína quinasa y a secuencias de polipéptidos. También se proporcionan vectores, células anfitrionas y procedimientos recombinantes para hacer y usar las nuevas moléculas.

10 **Antecedentes de la invención**

El fosfato estrechamente asociado con una molécula, por ejemplo, una proteína, se conoce desde el pasado siglo diecinueve. Desde entonces, se ha encontrado una gran variedad de enlaces covalentes de fosfato con proteínas. El más común se refiere a la esterificación de fosfato con serina, treonina y tirosina enlazándose en menores cantidades con lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico y cisteína. La presencia de moléculas fosforiladas, por ejemplo proteínas, implica la existencia de una o más quinasas, por ejemplo, proteínas quinasas, capaces de hidrolizar diferentes moléculas fosforiladas, por ejemplo, residuos de aminoácidos fosforilados en proteínas.

Las proteínas quinasas juegan roles críticos en la regulación de los cambios bioquímicos y morfológicos asociados con el crecimiento y la división celular (D'Urso y colaboradores (1990) "Science" 250:786-791; Birchmeier y colaboradores (1993) "Bioessays" 15:185-189). Sirven como receptores del factor del crecimiento y como transductores de señales y se han visto implicadas en la transformación y malignidad celular. (Hunter y asociados. (1992) "Cell" 70:375-387; Posada y colaboradores (1992) "Mol. Biol. Cell" 3:583-592; Hunter y colaboradores (1994) "Cell" 79:573-582). Por ejemplo, las proteínas quinasa han demostrado que participan en la transmisión de las señales procedentes de los receptores del factor del crecimiento (Strugill y colaboradores (1998) "Nature" 344:715-718; Gómez y colaboradores (1991) "Nature" 353:170-173), en el control de la entrada en mitosis de las células (Nurse (1990) "Nature" 344:503-508; Maller (1991) "Curr. Opin. Cell Biol." 3:269-275) y en la regulación del agrupamiento de la actina (Husain-Chishti y colaboradores (1988) "Nature" 334:718-721).

Las proteínas quinasas puede dividirse en diferentes grupos basándose bien en la similitud de la secuencia de aminoácido o bien en la especificidad para los residuos de serina/treonina o de tirosina. También se ha descrito un pequeño número de quinasas de doble especificidad. Dentro de la amplia clasificación, las quinasas pueden subdividirse además en familias cuyos miembros comparten un mayor grado de identidad de la secuencia de aminoácidos de dominio catalítico y también tienen propiedades bioquímicas similares. La mayoría de los miembros de las familias de la proteína quinasa comparten características estructurales fuera del dominio de la quinasa que reflejan sus particulares roles celulares. Estos incluyen dominios reguladores que controlan la actividad o interacción de la quinasa con otras proteínas (Hanks y colaboradores (1988) "Science" 241:42-52).

Las quinasas reguladas por señales extracelulares/proteínas quinasas asociadas con microtúbulos (Erk/MAPK) y las quinasas dirigidas por ciclinas (Cdk) representan dos grandes familias de quinasas de serina-treonina. Consulte Songyang y colaboradores (1996) "Mol. Cell. Biol." 16:6486-6493). Ambos tipos de quinasas funcionan en el crecimiento de las células, en la división de las células y en la diferenciación de las células, en respuesta a estímulos extracelulares. Los miembros de la familia Erk/MAPK son participantes críticos en las vías de señalización extracelular. Los activadores anteriores así como los componentes de Erk/MAPK son fosforilados después del contacto de las células con factores del crecimiento u hormonas o después de los estresores, por ejemplo, el calor, la luz ultravioleta y las citoquinas inflamatorias. Estas quinasas transportan mensajes que han sido transmitidos desde la membrana de plasma hasta el citoplasma mediante quinasas anteriores al interior del núcleo donde fosforilan los factores de transcripción y efectúan la modulación de la transcripción de genes (Karin y asociados (1995) "Curr. Biol." 5:747-757). Los sustratos de la familia Erk/MAPK incluyen c-fos, c-jun, APF2 y los miembros Elk1, Sap1a y c-Ets-1 de la familia ETS (citados por Brott y colaboradores (1998) "Proc. Natl Acad. Sci. USA" 95:963-968).

Las Cdk regulan la transición entre etapas sucesivas del ciclo de las células. La actividad de estas moléculas es controlada por eventos de fosforilación y mediante la asociación con la ciclina. La actividad de las Cdk es negativamente regulada por la asociación de pequeñas moléculas inhibitoras (Dylnacht, (1997) "Nature" 389:148 - 152). Las dianas de la Cdk incluyen varios activadores transcripcionales tales como p110Rb, p107 y factores de transcripción tales como p53, E2F y ARN polimerasa II, así como varias proteínas citoesqueléticas y proteínas de señalización citoplásmica (citadas anteriormente en Brott y colaboradores).

Se ha aislado una proteína en la *Drosophila*, denominada *nemo*, que tiene homología con las Erk/MAPK y las Cdk. Se ha informado (Brott y colaboradores, antes citado) de un homólogo mamífero de *nemo*, designado NLK. Esta proteína quinasa se autofosforila y se localiza en una gran extensión en el núcleo. Esta proteína mostró homología para ambas familias de quinasas (Erk/MAPK y Cdk). No posee el motivo característico TXY de fosforilación de las MAPK en el dominio VIII conservado de la quinasa. En cambio exhibe la secuencia TQE que se parece a la secuencia THE hallada en algunas Cdk.

Más recientemente, se demostró que la NLK podría regular las proteínas que contienen el dominio HMG relacionadas con POP-1. La proteína de señalización Wnt regula factores de transcripción que contienen dominios de grupos de alta movilidad (HMG) para dirigir decisiones sobre el destino celular en el desarrollo de los animales. En el C.

elegans, el represor POP-1 que contiene el dominio del HMG distingue el destino de las células hijas anteriores del de las células hijas posteriores a través del desarrollo. La señalización de Wnt regula la actividad de POP-1 en las células hijas posteriores, por ejemplo, E. Meneghini y colaboradores, (1999) "Nature" 399:793-797 muestran que los genes MOM-4 y LIT-1 eran también necesarios para regular POP-1 no sólo en *E.* sino en otras células hijas posteriores. MOM-4 y LIT-1 son homólogos de los componentes mamíferos de la vía de la proteína quinasa de activación mitogénica (MAPK) de la TAK-1 (que transforma la quinasa beta-activada del factor del crecimiento y la quinasa similar a nemo (NLK), respectivamente). MOM-4 y TAK-1 enlazan proteínas relacionadas que promueven su actividad de quinasa. Los autores del informe concluyeron que la vía relacionada con la MAPK coopera con la transducción de la señal de Wnt para regular la actividad de POP-1.

En un informe adicional del mismo grupo (Ishitani y colaboradores, (1999) "Nature" 399:798-802) se mostraba que la vía relacionada con la TAK-1-NLK-MAPK contrarresta la señalización entre la beta-catenina y el factor de transcripción del TCF. La vía de señalización de Wnt regula los procesos de desarrollo a través de un complejo de beta-catenina y la familia del factor de las células T/factor potenciador linfóide (TCF/LEF) de los factores de transcripción de grupos de alta movilidad. Wnt estabiliza la beta-catenina que luego se une al TCF y activa la transcripción de los genes. Esta vía de señales se conserva en los vertebrados, *Drosophila* y *C. elegans*. En *C. elegans*, MOM-4 y LIT-1 regulan la señalización de Wnt durante la embriogénesis. MOM-4 es homólogo de la TAK-1 (una quinasa activada mediante la transformación del factor beta del crecimiento). LIT-1 es homólogo de la proteína quinasa quinasa quinasa de activación mitogénica (MAP3K) y de la quinasa similar a NEMO (NLK) relacionada con la quinasa MAP (MAPK) en las células de los mamíferos. Esto eleva la posibilidad de que TAK-1 y NLK estén relacionadas en la señalización de Wnt en células de los mamíferos. Los autores informaron que la activación de la TAK-1 estimula la actividad de la NLK y regula la activación transcripcional intermediada por la beta-catenina y el TCF. La inyección de NLK suprimió la inducción de la duplicación de ejes mediante beta-catenina micro-inyectada en embriones de *Xenopus*. Se mostró que la NLK fosforila los factores TCF/LEF en inhibe la interacción del complejo beta-catenina-TCF con el ADN. Consecuentemente, se demostró que la vía similar a TAK-1-NLK-MAPK regula negativamente la vía de señalización de Wnt.

Las proteínas quinasas juegan roles críticos en el crecimiento celular. Por lo tanto, los nuevos polinucleótidos y proteínas de la proteína quinasa son útiles para modular el crecimiento, la diferenciación y/o el desarrollo celular. También, las quinasas tales como 18477 pueden ser importantes en la carcinogénesis y en la tumorigénesis.

Resumen de la invención

Se suministran moléculas aisladas de ácido nucleico que se corresponden con secuencias de ácido nucleico de proteínas quinasas. Adicionalmente, se incluyen secuencias de aminoácidos que se corresponden con los polinucleótidos. En particular, la presente invención suministra una molécula aislada de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2 o las secuencias de polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos depositada en un anfitrión bacteriano ATCC Accession Number PTA-1775. Además se suministran péptidos de quinasa que tienen secuencias de aminoácidos codificadas por las moléculas de ácido nucleico aquí descritas.

La presente invención también suministra vectores y células anfitrionas para la expresión recombinante de las moléculas de ácido nucleico aquí descritas, así como procedimientos para hacer dichos vectores y células anfitrionas y para utilizarlos para la producción mediante técnicas recombinantes de los polipéptidos o los péptidos de la invención.

Las moléculas de quinasa de la presente invención son útiles para modular el crecimiento celular y/o las vías metabólicas celulares particularmente para regular una o más proteínas involucradas en el crecimiento y el metabolismo. Consecuentemente, en un aspecto, esta invención suministra moléculas aisladas de ácido nucleico que codifican proteínas de quinasa, así como fragmentos de ácido nucleico adecuados como iniciadores o sondas de hibridización para la detección de ácidos nucleicos que codifican quinasa.

Otro aspecto de esta invención se refiere a una proteína y a un polipéptido de quinasa aislados o recombinantes. Las proteínas y polipéptidos de quinasa preferidos poseen al menos una actividad biológica que posee la quinasa que se produce de forma natural.

Se suministran anticuerpos que se unen selectivamente a un polipéptido de quinasa. Dichos anticuerpos son útiles en la detección de un polipéptido de quinasa así como en la modulación del crecimiento y el metabolismo celular.

En otro aspecto, la presente invención suministra un procedimiento para detectar la presencia de la actividad o la expresión de la quinasa en una muestra biológica poniendo en contacto la muestra biológica con un agente capaz de detectar un indicador de la actividad de la quinasa de forma que se detecte la presencia de la actividad de la quinasa en la muestra biológica.

En otro aspecto más, la invención suministra un procedimiento para modular la actividad de la quinasa que comprende la puesta en contacto de una célula con un agente que module (inhiba o estimule) la actividad o expresión de la quinasa de forma que se module la actividad de la expresión de la quinasa en la célula. En una realización, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a la proteína de quinasa. En otra realización, el agente modula la expresión de la proteína de quinasa mediante la modulación de la transcripción de un gen de la quinasa, el corte y el empalme de un ARNm quinasa o la traducción de un ARNm quinasa. En otra realización adicional, el agente es una molécula de

ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que es de sentido contrario a la cadena codificante del ARNm quinasa o del gen de la quinasa.

En una realización, los procedimientos de la presente invención se utilizan para tratar a un sujeto que tiene una afección que se caracteriza por una actividad de la proteína quinasa o una expresión de ácido nucleico aberrantes mediante la administración al sujeto de un agente que es un modulador de la quinasa. En una realización, el modulador de la quinasa es una proteína de quinasa. En otra realización, el modulador de la quinasa es una molécula de ácido nucleico de quinasa.

En otro aspecto, la invención suministra un procedimiento para identificar un compuesto que se une o modula la actividad de una proteína de quinasa. En general, dichos procedimientos comprenden la detección de una actividad biológica de una proteína de quinasa en la presencia y en la ausencia de un compuesto de ensayo y la identificación de aquellos compuestos que alteran la actividad de la proteína de quinasa.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A, 1B y 1C muestran la secuencia de nucleótidos 18477 (SEQ ID NO: 6) y la secuencia de aminoácido deducida (SEQ ID NO: 2).

La figura 2 muestra la expresión de 18477 y de la ciclina B1 en células sincronizadas WI-38 a lo largo de un transcurso de tiempo de 27 horas.

La figura 3 muestra la expresión de 18477 en tejidos humanos normales.

La figura 4 muestra los datos de expresión de Taqman para 18477 en diferentes líneas de células Xeno-amigas.

La figura 5 muestra la expresión de 18477 y de la ciclina B1 en líneas celulares del colon.

La figura 6 muestra la predicción PSORT de localización de proteínas. La predicción es para una localización nuclear con un potencial motivo de diana vacuolar.

Descripción detallada de la invención

Moléculas eucarióticas de ácido nucleico de la proteína quinasa y polipéptidos

Las moléculas aisladas de ácido nucleico de la presente invención codifican un polipéptido de proteína quinasa eucariótica. Las proteínas quinasa eucarióticas (descritas, por ejemplo, por Hanks y asociados (1995) "FASEB J." 9: 576-596) son enzimas que pertenecen a una familia extensiva de proteínas que comparten un núcleo catalítico conservado común para las proteínas quinasas tanto de serina/treonina como de tirosina. Hay un número de regiones conservadas en el dominio catalítico de las proteínas quinasa. Una de estas regiones, situada en la extremidad del terminal N del dominio catalítico, es una extensión rica en glicina de residuos en la proximidad de un residuo de lisina, que ha manifestado estar implicada en la unión de ATP. Otra región, situada en la parte central del dominio catalítico, contiene un residuo de ácido aspártico conservado que es importante para la actividad catalítica de la enzima (Knighton y asociados (1991) "Science" 253: 407-414). Para esta región se han descrito dos patrones de signatura: uno específico para las serina/treonina quinasas y uno para las tirosina quinasas.

Los polipéptidos de la proteína quinasa eucariótica pueden incluir una de las siguientes secuencias de consenso (SEQ ID NOS: 3, 4 y 5, respectivamente):

[LIV] – G – {P} – G – {P} – [FYWMGSTNH] – [SGA] – {PW} – [LIVCAT] – {PD} – x
[GSTACLIVMFY] – x(5,18) – [LIVMFYWCSTAR] – [AIVP] – [LIVMFAGCKR] – K
[K se une a ATP]

[LIVMFYC] – x – [HY] – x – D – [LIVMFY] – K – x(2) – N – [LIVMFYCT](3) [D es un residuo de sitio activo]

[LIVMFYC] – x – [HY] – x – D – [LIVMFY] – [RSTAC] – x(2) – N – [LIVMFYC](3) [D es un residuo de sitio activo]

La presente invención se basa, al menos en parte, en la identificación de un nuevo ácido nucleico de proteína quinasa y en moléculas de polipéptido que pueden jugar un rol, o una función, en la señalización de las vías asociadas con el crecimiento celular y/o las vías metabólicas celulares y/o una infección viral productiva. Estas vías metabólicas y del crecimiento se describen en Lodish y colaboradores (1995) "Molecular Cell Biology" (Scientific American Books Inc., New York, N.Y.) y "Stryer Biochemistry", (W. H. Freeman, New York).

La proteína quinasa 18477 puede modular la fosforilación en una amplia variedad de tejidos y células que incluyen, aunque no en sentido limitativo, muestras clínicas tumorales de islotes, piel, endotelio, mama, colon, hígado, cerebro, corazón, riñón, músculos esqueléticos, tráquea, aorta, tejido adiposo, intestino delgado, testículo, placenta, hígado fetal, corazón fetal, cuello uterino, timo, amígdalas, ganglio linfático y pulmón. Además, la quinasa está regulada por el ciclo celular en células WI-38 (G2/M). Se han utilizado datos de Taqman para confirmar datos de expresión de matriz que muestran la expresión de 18477 regulada en la fase S-G2/M de células WI-38 sincronizadas. El gen ha demostrado ser similar a la CEK1 (*S. pombe*) y la proteína de supresión tumoral, papiloma (*D. melanogaster*). La CEK1 ha sido relacionada en progresión de anafase con la levadura de fisión. El papiloma es un homólogo de la quinasa humana de distrofia miotónica y es necesario para el control de la forma y la proliferación celular. El gen ha sido mapeado en el cromosoma humano 10 con un cromosoma sintético mo 18. GAAT13D02 (5cR) D10S593 (12.6cR) son marcadores flanqueantes. Las mutaciones/loci próximos incluyen el adenocarcinoma 1 de la próstata humana; el SCIDA, inmunodeficiencia severa combinada, tipo ATHABASCAN; IDDM10, diabetes mellitas, dependiente de la insulina, 10; RDPA, enfermedad de REFSUM con pìpecolicacidemia aumentada; OB10, obesidad, susceptibilidad a, sobre el cromosoma 10; ratón: AX, ataxia, TW, "twirler"; LAH, cabello lanceolado; NIDD2, diabetes mellitas 2 no dependiente de la insulina. Los genes conocidos próximos incluyen MGA1, DNMT2, CREM y CACNB2.

Además, las quinasas de la presente invención son dianas de medicamentos descritos por Goodman y Gilman (1996) "Pharmacological Basis of Therapeutics" (9ª edición) Hartman & Limbard Editors.

Las quinasas de la invención contienen dominios o motivos, identificados por procedimientos rutinarios de exploración de la homología, por ejemplo, en ProDom, Pfam Prosite, MEMSAT y PSORT. Dicho análisis ha identificado un dominio de proteína quinasa eucariótica para las quinasas de la presente invención.

En la figura 6 se muestra la predicción PSORT de localización de la proteína para la proteína quinasa 18477 y se predice la localización nuclear con un motivo de localización vacuolar potencial. Un análisis de patrones en Prosite muestra una signatura del sitio activo de proteína quinasa de serina/treonina. Una búsqueda de dominios completos en Pfam muestra una alta puntuación para los dominios de la proteína quinasa eucariótica y alguna homología con el dominio del terminal C de la proteína quinasa.

El término "quinasa" incluye una proteína, un polipéptido u otra molécula no proteinácea que sea capaz de modular su propio estado de fosforilación o el estado de fosforilación de una proteína, un péptido u otra molécula diferente no proteinácea. Sin embargo, el término "quinasa", cuando se refiere a las proteínas o a los polipéptidos de la invención, se refiere a una proteína quinasa, ya que las quinasas de la invención son proteína quinasas.

Las quinasas pueden tener una especificidad (es decir, una especificidad para fosforilar) para residuos de serina/treonina, residuos de tirosina o residuos tanto de serina/treonina como de tirosina, por ejemplo las quinasas de doble especificidad. Tal como aquí se denominan, las quinasas, tales como las proteínas quinasas, incluyen preferiblemente un dominio catalítico de aproximadamente 200-400 residuos de aminoácidos de longitud, preferiblemente aproximadamente 200-300 residuos de aminoácidos de longitud o más preferiblemente aproximadamente 250-300 residuos de aminoácidos de longitud, que incluye preferiblemente 5-20, más preferiblemente 5-15 o más preferiblemente 11 motivos altamente conservados o sus dominios separados por secuencias de aminoácidos con conservación reducida o mínima. La especificidad de una quinasa para la fosforilación bien de tirosina o bien de serina/treonina puede predecirse mediante la secuencia de dos de los subdominios (VIb y VIII) en los cuales se conservan diferentes residuos en cada clase (según se describe, por ejemplo, por Hanks y colaboradores (1998) "Science" 241: 42-52. Estos subdominios también se describen aquí con mayor detalle.

Las quinasas juegan un rol en las vías de señalización asociadas con el crecimiento celular. Por ejemplo, las proteínas quinasas están involucradas en la regulación de la transmisión de señales desde receptores celulares, por ejemplo, los receptores del factor de crecimiento, en la entrada en mitosis de las células y en la regulación de la función del citoesqueleto, por ejemplo, el agrupamiento de la actina.

Ensayos para la medición de la actividad de la quinasa son bien conocidos en la técnica dependiendo de la quinasa en particular. Protocolos de ensayo específicos están disponibles en fuentes estándar conocidas por aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, consulte "Kinases" en Ausubel y colaboradores, eds. (1994-1998) "Current Protocols in Molecular Biology" (3) y en las referencias aquí citadas; <http://www.sdsc.edu/Kinases/pkr/pkprotocols.html>; y <http://www.sdsc.edu/Kinases/pkr/pkprotocols/tyr.synpepassay.html>

La inhibición o sobreestimulación de la actividad de las quinasas involucradas en las vías de señalización asociadas con el crecimiento celular pueden tender a perturbar el crecimiento celular, lo que a su vez tiende a producir enfermedades relacionadas con el crecimiento celular. Según aquí se utiliza, una "enfermedad relacionada con el crecimiento celular" incluye una enfermedad, afección o estado caracterizado por una desregulación, por ejemplo, una sobreregulación o una subregulación, del crecimiento celular. La desregulación del crecimiento celular puede ser de-

bida a la desregulación de la proliferación celular, de la progresión del ciclo celular, de la diferenciación celular y/o de la hipertrofia celular. Ejemplos de enfermedades relacionadas con el crecimiento celular, incluyen enfermedades cardiovasculares tales como la insuficiencia cardíaca, la hipertensión, la fibrilación atrial, la cardiomiopatía dilatada, la cardiomiopatía idiopática o la angina; las enfermedades proliferativas o las enfermedades diferenciativas tales como el cáncer, por ejemplo, el melanoma, el cáncer de próstata, el cáncer cervical, el cáncer de mama, el cáncer de colon o el sarcoma. También se incluyen las enfermedades asociadas con células o tejidos viralmente infectados. Las composiciones son útiles para el tratamiento de una infección viral, tal como una infección de un virus de ADN, incluyendo, aunque no en sentido limitativo, el HBV.

La proteína quinasa 18477 se expresa en muestras clínicas tumorales de isletas, piel, endotelio, mama, colon, hígado, cerebro, corazón, riñón, mama, colon, músculo esquelético, tráquea, aorta, tejido adiposo, intestino delgado, testículo, placenta, hígado fetal, corazón fetal, cuello uterino, timo, amígdala, ganglio linfático y pulmón. La expresión del gen es particularmente relevante en la progresión del ciclo celular y en la diferenciación celular, y consecuentemente, es particularmente relevante para el desarrollo, la diferenciación y la carcinogénesis. 18477 es una quinasa regulada por el ciclo celular. Se ha comprobado que se reduce 2-5 veces en tumores de colon 9/11 en comparación con tejidos normales del colon (figura 5). El gen se expresa en muestras clínicas de tumores que incluyen, aunque no en sentido limitativo, mama, colon y pulmón. Muchos genes regulados por el ciclo celular pueden considerarse protooncogenes. Los genes regulados por el ciclo celular controlan la proliferación celular. Así, la modulación de estos genes y sus actividades reguladoras pueden permitir el control de la proliferación y la invasión de células tumorales. Consecuentemente, la invención presentada se refiere a procedimientos y composiciones para la modulación, diagnóstico y tratamiento de enfermedades asociadas con los tejidos en los cuales se expresa el gen, y particularmente, en la carcinogénesis especialmente en mama, colon y pulmón.

Nueva secuencia de quinasa

La presente invención se basa, al menos en parte, en la identificación de una nueva proteína quinasa y de las moléculas de ácido nucleico que la codifican, que comprenden una familia de moléculas que tienen ciertas características estructurales y funcionales conservadas. El término "familia" cuando se refiere a la proteína y a las moléculas de ácido nucleico de la invención tiene la intención de significar dos o más proteínas de ácido nucleico que tienen un dominio o motivo estructural común y que tienen suficiente identidad de la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, según aquí se define. Los miembros de dicha familia pueden producirse de forma natural o no natural y pueden ser bien de la misma o bien de diferentes especies. Por ejemplo, una familia puede contener una primera proteína de origen humano así como otras proteínas distintas de origen humano o, alternativamente, puede contener homólogos de origen no humanos. Los miembros de una familia también pueden tener características funcionales comunes.

La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico de proteína quinasa, preferiblemente una molécula de proteína quinasa humana, identificada basándose en un motivo de consenso o característica de dominio de la proteína de la familia de proteínas de la proteína quinasa.

El gen de quinasa de la invención se identificó en bibliotecas de ADNc humano. Los clones, a los cuales se dirige la presente invención, contienen un transcrito que tiene una secuencia de ADNc correspondiente que se pone en manifiesto en la SEQ ID NO: 1. Este transcrito tiene un marco abierto de lectura de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que se pone de manifiesto en la SEQ ID NO: 2, respectivamente.

Un plásmido que contiene el inserto de ADNc de 18477 se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, el 19 de abril de 2000, y se le asignó el Acceso Number PTA-1775. Este depósito se mantendrá bajo los términos del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional de Depósito de microorganismos para propósitos de procedimiento de patente. Este depósito se efectuó simplemente para comodidad de aquellos expertos en la materia.

Los polipéptidos de quinasa preferidos de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o de uno de sus dominios.

Consecuentemente, otra realización de la invención se refiere a proteínas y polipéptidos de quinasa aislados que tienen actividad de proteína de quinasa. Según se utiliza aquí de forma intercambiable, una "actividad de proteína de quinasa", "actividad biológica de una proteína de quinasa" o "actividad funcional de una proteína de quinasa" se refiere a una actividad ejercida por una proteína, polipéptido o molécula de ácido nucleico de quinasa sobre una célula sensible a la quinasa según se determina *in vivo* o *in vitro*, de acuerdo con técnicas de ensayo estándar. Una actividad de quinasa puede ser una actividad directa, tal como la autofosforilación o una asociación con o una actividad enzimática sobre una segunda proteína, tal como sobre c-fos, c-jun, APF2, y los miembros Elkl, Sapla y c-Ets de la familia ETS, u otros factores de transcripción, dianas de la función o de la interacción de Cdk, tales como la ciclina, las moléculas pequeñas inhibidoras analizadas en Dynlacht, anteriormente, y en Nigg ((1995) "Bioessays" 17: 471-480), coactivadores transcripcionales tales como p110Rb y p107 y factores de transcripción tales como p53, E2F, y ARN polimerasa II, proteínas citoesqueléticas y proteínas de señalización citoplásmica como las anteriormente citadas en Brott y colaboradores, factores TCF/LEF, POP-1 y otras proteínas que contienen el dominio HMG, o una actividad indirecta, tal como una actividad de señalización celular intermediada por las vías Wnt o MAPK, por ejemplo, tal como se analizó anteriormente. En una realización preferida, la actividad de la quinasa incluye al menos una o más de las siguientes actividades: (1) la modulación (estimulación y/o potenciación o inhibición) de la proliferación, el

crecimiento y/o el metabolismo celular (por ejemplo, en aquellas células en las cuales se expresa la secuencia, incluyendo células infectadas por virus); (2) la regulación de la transmisión de señales desde los receptores celulares, por ejemplo, los receptores del factor del crecimiento; (3) la modulación de la entrada en mitosis de las células; (4) la modulación de la diferenciación celular; (5) la modulación de la muerte de las células y (6) la regulación de la función del citoesqueleto, por ejemplo, el agrupamiento de la actina.

Una molécula de ácido nucleico o proteína de quinasa “aislada” o “purificada”, o una parte biológicamente activa de las mismas, está substancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o substancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Preferiblemente, un ácido nucleico “aislado” está libre de secuencias (preferiblemente secuencias que codifican proteínas) que planteen de forma natural el ácido nucleico (es decir, las secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido nucleico. Para los propósitos de la invención, cuando se utiliza “aisladas” para referirse a moléculas de ácido nucleico se excluyen los cromosomas aislados. Por ejemplo, en varias realizaciones, la molécula aislada de ácido nucleico de quinasa puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de las secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico. Una proteína de quinasa que está substancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína de quinasa que tienen menos de aproximadamente un 30%, un 20%, un 10% o un 5% (de su peso en seco) de proteína diferente a la quinasa (también denominada de ahora en adelante “proteína contaminante”). Cuando la proteína de quinasa o una de sus partes biológicamente activa se produce de forma recombinante, preferiblemente, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10% o el 5% del volumen de la preparación de la proteína. Cuando se produce la proteína de quinasa mediante síntesis química, preferiblemente las preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente un 30%, un 20%, un 10% o un 5% (del peso en seco) de precursores químicos o productos químicos diferentes a la quinasa.

En las siguientes subsecciones se describen con mayor detalle diferentes aspectos de la invención.

I. Moléculas aisladas de ácido nucleico

Un aspecto de la invención pertenece a una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de quinasa así como una molécula de ácido nucleico suficiente para su utilización como sonda de hibridización para identificar ácidos nucleicos que codifican quinasa (por ejemplo, ARNm de quinasa) y fragmentos para su uso como iniciadores de PCR para la amplificación o mutación de las moléculas del ácido nucleico de la quinasa. Tal como aquí se utiliza, el término “molécula de ácido nucleico” tiene la intención de incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo ARNm) y análogos del ADN o del ARN generados usando análogos de nucleótidos. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser de cadena simple o de cadena doble, preferiblemente son ADN de cadena doble.

Una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de quinasa de la presente invención incluye la secuencia que se manifiesta en la SEQ ID NO: 1 y el complemento de la misma. Por “complemento” se entiende una secuencia de nucleótidos que es suficientemente complementaria para dar una secuencia de nucleótidos tal que pueda hibridizarse en la secuencia de nucleótidos dada para formar así un dúplex estable. La correspondiente secuencia de aminoácidos para la proteína de quinasa codificada por la secuencia de nucleótidos se pone de manifiesto en la SEQ ID NO: 2.

Puede utilizarse un fragmento de una secuencia de nucleótidos de quinasa como sonda de hibridización o iniciador de PCR utilizando procedimientos analizados más adelante.

Las secuencias de nucleótidos de quinasa de la invención pueden utilizarse como sondas y/o iniciadores para identificar y/o clonar homólogos de la quinasa en otros tipos de células, por ejemplo, a partir de otros tejidos, así como homólogos de la quinasa a partir de otros mamíferos. Dichas sondas pueden utilizarse para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican las mismas o idénticas proteínas. Estas sondas pueden utilizarse como parte de un equipo de prueba de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresen mal una proteína de quinasa, tal como mediante la medición de los niveles de un ácido nucleico que codifica la quinasa en una muestra de células de un sujeto, por ejemplo, detectando los niveles de ARNm de la quinasa o determinando si ha mutado o se eliminado un gen de quinasa genómico.

De esta forma, procedimientos tales como la PCR, hibridización y similares pueden utilizarse para identificar dichas secuencias que tienen substancialmente identidad con las secuencias de la invención. Consulte, por ejemplo, Sambrook y colaboradores (1989) “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Plainview, NY) e Innis y colaboradores (1990) “PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications” (Academia Press, NY). Las secuencias de nucleótidos de quinasa basadas en su identidad de secuencia para las secuencias de nucleótidos de quinasa aquí manifestadas o para fragmentos y variantes de los mismos están comprendidas por la presente invención.

En un procedimiento de hibridización, puede utilizarse toda o parte de una secuencia conocida de nucleótidos de quinasa para detectar ADNc o bibliotecas genómicas. Procedimientos para la construcción de dichos ADNc y bibliotecas genómicas son generalmente conocidos en la técnica y se presentan en Sambrook y colaboradores (1989) “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Plainview, NY). Las

denominadas sondas de hibridización pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos, y pueden estar etiquetados con un grupo detectable tal como P^{32} , o cualquier otro marcador detectable, tal como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Pueden hacerse sondas para hibridización etiquetando oligonucleótidos sintéticos basados en las secuencias conocidas de nucleótidos de quinasa aquí presentadas. Adicionalmente también pueden utilizarse iniciadores degenerados diseñados sobre la base de residuos conservados de nucleótidos o aminoácidos en una secuencia conocida de nucleótidos de quinasa o en una secuencia codificada de aminoácidos. La sonda comprende típicamente una región de secuencia de nucleótidos que se hibridiza bajo condiciones rigurosas hasta al menos aproximadamente 12, preferiblemente aproximadamente 25, más preferiblemente aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 ó 400 nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos de quinasa de la invención o un fragmento o variante de la misma. La preparación de sondas para la hibridización es generalmente conocida en la técnica y se presenta en Sambrook y colaboradores (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Plainview, NY).

Tal como aquí se utiliza, el término "se hibridiza bajo condiciones rigurosas" tiene la intención de describir condiciones para la hibridización y el lavado bajo las cuales las secuencias de nucleótidos que tengan al menos un 60%, un 65%, un 70%, preferiblemente un 75% de identidad con cada una de las otras permanecen hibridizadas entre sí. Dichas condiciones rigurosas son conocidas por aquellos expertos en la materia y pueden encontrarse en "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons, New York (1989)), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferido no limitativo de condiciones rigurosas de hibridización es la hibridización en 6X del cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguida por uno o más lavados en 0,2 X SSC, 0,1% SDS a 50-65°C. En otra realización preferida, condiciones rigurosas comprenden la hibridización en 6X de SSC a 42°C, seguida por el lavado de 1X de SSC a 55°C. Preferiblemente, una molécula aislada de ácido nucleico que se hibridiza bajo condiciones rigurosas en una secuencia de quinasa de la invención se corresponde con una molécula de ácido nucleico que se produce de forma natural. Tal como aquí se utiliza, una molécula de ácido nucleico "que se produce de forma natural" se refiere a una molécula de ARN o de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se produce en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).

Así, además de la secuencias de nucleótidos de quinasa aquí presentadas, las moléculas aisladas de ácido nucleico de la invención también comprenden secuencias de ADN homólogo identificadas y aisladas a partir de células y/u organismos mediante hibridización con las secuencias completas o parciales obtenidas a partir de la secuencia de nucleótidos de quinasa aquí presentada.

La invención también comprende moléculas de ácido nucleico que forman estructuras helicoidales triples. Por ejemplo, la expresión del gen de la quinasa puede ser inhibida mediante el reconocimiento de las secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora del gen de la quinasa en células diana. Consulte de forma general, Helene (1991) "Anticancer Drug Des." 6(6): 569; Helene (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27; y Maher (1992) "Bloassays" 14(12): 807.

En realizaciones preferidas, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden modificarse en el grupo de base, en el grupo de azúcar o en el esqueleto de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la hibridización o la solubilidad de la molécula. Por ejemplo, puede modificarse el esqueleto de fosfato de desoxirribosa de los ácidos nucleicos para generar ácidos nucleicos peptídicos (consulte Hyrup y colaboradores (1996) "Bioorganic & Medicinal Chemistry" 4:5). Según aquí se utilizan, los términos "ácidos nucleicos peptídicos" o PNA se refieren a copias gemelas del ácido nucleico, por ejemplo copias gemelas del ADN, en las cuales el esqueleto de fosfato de desoxirribosa se sustituye por un esqueleto pseudo peptídico y solamente se conservan cuatro nucleobases naturales. El esqueleto neutro de los PNA ha demostrado que permite la hibridización específica en ADN y ARN bajo condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros del PNA puede realizarse usando protocolos estándar de síntesis peptídica de fase sólida según se describe en Hyrup y colaboradores (1996) *supra*; Perry-O'Keefe y colaboradores (1996) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 93: 14670.

Los PNA de una molécula de quinasa pueden utilizarse en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Los PNA puede utilizarse como agentes antisentido o antígenos para la modulación específica de la secuencia de la expresión genética, por ejemplo, induciendo la detención de la transcripción o traducción o inhibiendo la replicación. Los PNA de la invención también pueden utilizarse, por ejemplo, en el análisis de mutaciones simples de pares de bases en un gen, por ejemplo, mediante el pinzamiento de la PCR dirigido por el PNA, como enzimas de restricción artificial cuando se utiliza en combinación con otras enzimas, por ejemplo, S1 nucleasas (Hyrup (1996), *supra*) o como sondas o iniciadores para secuenciación e hibridización del ADN (Hyrup (1996), *supra*; Perry-O'Keefe y colaboradores (1996), *supra*).

En otra realización, pueden modificarse los PNA de una molécula de quinasa, por ejemplo, para mejorar la estabilidad, especificidad o captación celular, uniendo un grupo lipófilo u otros grupos cooperantes al PNA, mediante la formación de quimeras de PNA-ADN, o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de administración de medicamentos conocidas en la técnica. La síntesis de quimeras de PNA-ADN puede realizarse según se describe en Hyrup (1996), *supra*; Finn y colaboradores (1996) "Nucleic Acids Res." 24(17): 3357-63; Mag y colaboradores (1989) "Nucleic Acids Res." 17: 5973; y Peterser y colaboradores (1975) "Bioorganic Med. Chem. Lett." 5: 1119.

II. *Proteínas quinasa aisladas y anticuerpos antiquinasa*

Las proteínas de quinasa están también incluidas dentro de la presente invención. Por “proteína de quinasa” se quiere dar a entender una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos manifestada en la SEQ ID NO: 2.

Puede utilizarse un péptido de quinasa aislado de la invención como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unan a las proteínas de quinasa usando técnicas convencionales para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Puede utilizarse la proteína de quinasa de longitud completa o, alternativamente, la invención suministra fragmentos peptídicos antigénicos de la proteína de quinasa para uso como inmunógenos. El péptido antigénico de la proteína de quinasa comprende al menos 8, preferiblemente 10, 15, 20 ó 30 residuos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 2 y comprende un epítipo de una proteína de quinasa, de tal forma que un anticuerpo levantado contra el péptido forme un complejo inmune específico con la proteínas de quinasa. Los epítopos preferidos comprendidos por el péptido antigénico son regiones de una proteína de quinasa que están situadas sobre la superficie de la proteína, por ejemplo, regiones hidrófilas.

Consecuentemente, otro aspecto de la invención pertenece a los anticuerpos antiquinasa policlonales y monoclonales que se unen a una proteína de quinasa. Los anticuerpos policlonales antiquinasa pueden prepararse inmunizando un sujeto adecuado (por ejemplo, un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero) con el inmunógeno de la quinasa. El título del anticuerpo antiquinasa en el sujeto inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas convencionales, tal como un ensayo de inmunosorbente unido a la enzima (ELISA) usando proteína de quinasa inmovilizada. En un período de tiempo adecuado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos antiquinasa están en lo más alto, pueden obtenerse células productoras de anticuerpos a partir del sujeto y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tal como la técnica del hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975) “Nature” 256: 495-497, la técnica del hibridoma de las células B humanas (Kozbor y colaboradores (1983) “Immunol. Today” 4: 72), la técnica del hibridoma EBV (Cole y colaboradores (1985) “in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy”, ed. Reisfeld and Sell (Alan R. Liss, Inc., New York, NY), pág. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas es bien conocida (consulte de forma general Coligan y colaboradores, eds. (1994) “Current Protocols in Immunology” (John Wiley & Sons, Inc. New York, NY); Gafre y colaboradores (1977) “Nature” 266: 55052; Kenneth (1980) “in Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analyses” (Plenum Publishing Corp., NY; y Lemer (1981) “Yale J. Biol. Med.”, 54: 387-402).

Alternativamente a la preparación de hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales, puede identificarse un anticuerpo antiquinasa monoclonal y aislarse mediante la detección de una biblioteca de inmunoglobulina combinatorial recombinante (por ejemplo, una biblioteca de expresión de fagos de anticuerpos) con una proteína de quinasa para aislar así los miembros de la biblioteca de la inmunoglobulina que se unen a la proteína de quinasa. Los equipos para generar y detectar bibliotecas de expresión de fagos están comercialmente disponibles (por ejemplo, el *Recombinant Phage Antibody Sistem*, de Pharmacia, núm. de Catálogo 27-9400-01; y el *SurfZAP & Phage Display Kit* de Stratagene, núm. de Catálogo 240612). Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente adecuados para su uso en la generación y detección de bibliotecas de expresión de anticuerpos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. núm. 5.223.409; en las publicaciones de PCT núm. WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690 y WO 90/02809; en Fuchs y colaboradores (1991) “Bio/Technology” 9: 1370 -1372; Hay y colaboradores (1992) “Hum. Antibod. Hybridomas” 3: 81-85; Huse y colaboradores (1989) “Science” 246: 1275-1281; Griffiths y colaboradores (1993) “EMBO J.” 12: 725-734.

Adicionalmente, dentro del alcance de la invención están anticuerpos antiquinasa recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden partes tanto humanas como no humanas que pueden hacerse mediante técnicas convencionales de ADN recombinante. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo utilizando los procedimientos descritos en las publicaciones del PCT núm. WO 86101533 y WO 87/02671; en las solicitudes de patentes europeas núm. 184.187, 171.492, 125.023 y 173.494; en las patentes de EE.UU. núm. 4.816.567 y 5.225.539; en las solicitudes de patente europea 125.023; en Better y colaboradores (1988) “Science” 240: 1041-1043; Liu y colaboradores (1987) “Proc. Natl. Acad. Sci USA” 84: 3439-3443; Liu y colaboradores (1987) “J. Immunol” 139: 3521-3526; Sun y colaboradores (1987) “Proc. Natl. Acad. Sci USA” 84: 214-218; Nishimura y colaboradores (1987) “Canc. Res.” 47: 999-1005; Word y colaboradores (1985) “Nature” 314: 446-449; Shaw y colaboradores (1988) “J. Natl Cancer Inst.” 80: 1553-1559; Morrison (1985) “Science” 229: 1202 -1207; Oi y colaboradores (1986) “Bio/Techniques” 4: 214; Jones y colaboradores (1986) “Nature” 321: 552-525; Verhoeyan y colaboradores (1988) “Science” 239: 1534; y Beidler y colaboradores (1988) “J. Immunol” 141: 4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Dichos anticuerpos pueden producirse utilizando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina endógena, pero que puedan expresar genes humanos de cadena pesada y ligera. Consulte, por ejemplo, Lonberg y Huszar (1995) “Int. Rev. Immunol” 13: 65-93; y las patentes de EE.UU. núm. 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016 y 5.545.806. Además pueden contactarse empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA), para el suministro de anticuerpos dirigidos contra un antígeno seleccionado que utilizan una tecnología similar a la anteriormente descrita.

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse usando una técnica denominada "selección guiada". En esta aproximación un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado por ejemplo un anticuerpo de murina, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. Esta tecnología es descrita por Jespers y colaboradores (1994) "Bio/Technology" 12: 899 - 903.

Puede utilizarse un anticuerpo antiquinasa, por ejemplo un anticuerpo monoclonal para aislar proteínas de quinasa mediante técnicas convencionales, tales como la cromatografía de afinidad o la inmunoprecipitación. Un anticuerpo antiquinasa puede facilitar la purificación de proteína de quinasa natural a partir de células y de la proteína quinasa recombinantemente producida, expresada en las células anfitrionas. Además, puede utilizarse un anticuerpo antiquinasa para detectar proteína de quinasa (por ejemplo, en un lisado celular o en sobrenadante de células). Para evaluar la abundancia y patrón de expresión de la proteína de quinasa. Los anticuerpos antiquinasa pueden utilizarse diagnósticamente para monitorizar los niveles de proteína en un tejido como parte de un procedimiento de estudio clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento del anticuerpo con una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diferentes enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa o la acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/ biotina y avidin/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen la umbeliferona, fluoresceína, la fluoresceína isotiocianato, la rodamina, la diclorotriacilamina fluoresceína, el cloruro de dansilo o la ficoeritrina; ejemplo de material luminiscente incluye el luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen la luciferasa, la luciferina y la aequorina; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen el I^{125} , I^{131} , S^{35} o H^3 .

Además, un anticuerpo (o un fragmento del mismo) puede conjugarse con una molécula terapéutica tal como una fitotoxina, un agente terapéutico o un ión metálico radioactivo. Una citotoxina o un agente citotóxico incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D; 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina o sus análogos u homólogos. Los agentes terapéuticos incluyen, aunque no en sentido limitativo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mecaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil de carbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina de platino (II) (DDO) (cispatin), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (inicialmente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (inicialmente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes antimicóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Los conjugados de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, la molécula del medicamento no se construye con las limitaciones de los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la molécula del medicamento puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseable. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, -alfa.-interferona, .beta.-interferona, el factor del crecimiento de los nervios, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, activador plasminogénico del tejido o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor de estimulación de la colonia de macrófagos de granulocitos ("GM-CSF"), factor de estimulación de la colonia de granulocitos ("G-CSF") u otros factores del crecimiento.

Son bien conocidas las técnicas para conjugar dicha molécula terapéutica con anticuerpos (consulte, por ejemplo, Arnon y colaboradores "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Reisfeld y colaboradores (editores), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y colaboradores, "Antibodies for Drug Delivery", en "Controlled Drug Delivery" (2ª edición), Robinson y colaboradores (Editores), pág. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Torpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en "Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications", Pinchera y colaboradores (editores), pág. 475-506 (1985); "Análisis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", Baldwin y colaboradores (editores), pág. 303-16 (Academia Press 1985), y Torpe y colaboradores, "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", "Immunol. Rev.", 62: 119-58 (1982). Alternativamente, puede conjugarse un anticuerpo con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos según se describe por Segal en la patente de EE.UU. núm. 4.676.980.

III. Vectores de expresión recombinante y células anfitrionas

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína de quinasa (o una parte de la misma). "Vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido unida, tal como un "plásmido", un bucle de ADN circular de doble cadena, dentro del cual pueden ligarse segmentos de ADN adicionales, o un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse dentro del genoma viral. Los vectores son útiles para la replicación autónoma en una célula anfitriona o pueden integrarse dentro del genoma de una célula anfitriona después de su introducción dentro de la célula anfitriona y de esta forma se replican junto con el genoma anfitrión (por ejemplo, vectores de mamífero no episómico). Los vectores de expresión son capaces de dirigir la expresión de los genes

a los que están operativamente unidos. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante toman a menudo la forma de plásmidos (vectores). No obstante, la invención se dirige a incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tal como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que efectúan funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula anfitriona. Esto significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células anfitrionas a usar para la expresión, operativamente unidas a la secuencia de ácido nucleico a expresar. “Operativamente unida” tiene la intención de significar que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la secuencia o secuencias reguladoras de forma que se permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula anfitriona cuando se introduce el vector dentro de la célula anfitriona). El término “secuencia reguladora” tiene la intención de incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Consulte por ejemplo, Goeddel (1990) “Gene Expression Technology: Methods in Enzymology” 185 (Academic Press, San Diego, California). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células anfitrionas y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solamente en ciertas células anfitrionas (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas para el tejido). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula anfitriona a transformar, el nivel deseado de expresión de proteína. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse dentro de células anfitrionas para así producir proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos según aquí se describe (por ejemplo, proteína de quinasa, formas mutantes de proteína de quinasa, proteínas de fusión, etc.).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención, pueden estar diseñados para la expresión de proteína de quinasa en células anfitrionas procarióticas o eucarióticas. La expresión de proteínas en procariotes a menudo se lleva a cabo en *E. Colli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas bien de fusión o bien de no fusión. Los vectores de fusión añaden un número de aminoácidos a una proteína codificada en los mismos, habitualmente en el terminal amino de la proteína recombinante. Vectores típicos de expresión de fusión incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Jonson (1988) “Gene” 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA), y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) que funden glutatióna S-transferasa (GST), proteína de unión de maltosa E o proteína A, respectivamente, con la proteína recombinante diana. Ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* inducibles de no fusión adecuados incluyen pTRc (Amann y colaboradores (1988) “Gene” 69: 301-315) y pET 11d (Studier y colaboradores (1990) en “Gene Expression Technology: Methods in Enzymology” 185 (Academia Press, San Diego, California), pág. 60-89). Estrategias para maximizar la expresión de proteínas recombinantes en *E. Colli* pueden encontrarse en Gottesman (1990) en “Gene Expression Technology: Methods in Enzymology” 185 (Academia Press, San Diego, California), pág. 119-128) y Wada y colaboradores (1992) “Nucleic Acids res.” 20: 2111-2118. La expresión de los genes diana a partir del vector pTrc se apoya en la transcripción del ARN polimerasa anfitrión a partir de un promotor de fusión trp-lac híbrido.

Células anfitrionas eucarióticas adecuadas incluyen células de insectos (ejemplos de vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células cultivadas de insectos (por ejemplo, células Sf 9) incluyen las series pAc (Smith y colaboradores (1983) “Mol. Cell Biol.” 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) “Virology” 170: 31-39)); células de levadura (ejemplos de vectores para su expresión en levaduras *S. cerevisiae* incluyen pYepSecl (Baldari y colaboradores (1987) “EMBO J.” 6: 229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz (1982) “Cell” 30: 933-943), pJRY88 (Schultz y colaboradores (1987) “Gene” 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, California), y pPicZ (Invitrogen Corporation, San Diego, California); o células de mamíferos (vectores de expresión en mamíferos incluyen pCDM8 (Seed (1987) “Nature” 329.840) y pMT2PC (Kaufman y colaboradores (1987) “EMBO J.” 6: 187-195)). Células de mamíferos adecuadas incluyen células del ovario del hámster chino (CHO) o COS. En las células de mamíferos, las funciones de control de los vectores de expresión a menudo son proporcionadas por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores habitualmente utilizados se derivan del poliovirus, del adenovirus 2, del citomegalovirus y del Simian Virus 40. Para obtener información sobre otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procarióticas como eucarióticas, consulte los capítulos 16 y 17 de Sambrook y colaboradores (1989) “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York). Consulte, Goeddel (1990) “Gene Expression Technology: Methods in Enzymology” 185 (Academic Press, Dan Diego, California). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

Los términos “célula anfitriona” y “célula anfitriona recombinante” se usan aquí de forma intercambiable. Debe entenderse que dichos términos se refieren no solo a la célula sujeto particular sino a la progenie o potencial progenie de dicha célula. Ya que se pueden producir ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido tanto a mutaciones como influencias medio ambientales, dicha progenie, de hecho puede no ser idéntica a la célula padre, pero todavía está incluida dentro del alcance del término según aquí se utiliza.

En una realización, el vector de expresión es un vector de expresión recombinante de mamífero que comprende elementos reguladores específicos para el tejido que dirigen la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula en particular. Promotores adecuados específicos para el tejido incluyen el promotor de la albúmina (específico para el hígado); Pinkert y colaboradores (1987) “Genes Dev.” 1: 268-277), promotores específicos del tejido linfóide (Calame y Eaton (1988) “Adv. Immunol” 43: 235-275), promotores particulares de los receptores de las célu-

las T (Winoto y Baltimore (1989) "EMBO J." 8: 729-733) e inmunoglobulinas (Banerji y colaboradores (1983) "Cell" 33: 729-740; Queen y Baltimore (1983) "Cell" 33: 741-748; promotores específicos para las neuronas (por ejemplo, el promotor del neurofilamento); Byrne y Ruddle (1989) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 86: 5473-5477), promotores específicos para el páncreas (Edlund y colaboradores (1985), "Science" 230: 912-916) y promotores específicos para las glándulas mamarias (por ejemplo, el promotor del suero de la leche); Patente de EE.UU. num. 4.873.316 y publicación de Solicitud de Patente Europea num. 264.166). También se incluyen promotores regulados por la forma de desarrollo, por ejemplo los promotores homeóticos de la murina (Kessel y Gruss (1990) "Science" 249:3 74-379), el promotor de la α -fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) "Genes Dev." 3: 537-546), y similares.

La invención suministra además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la invención clonada dentro del vector de expresión en una orientación antisentido. Esto es, la molécula de ADN está operativamente unida a una secuencia reguladora de manera que permita la expresión (mediante la transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que sea antisentido para el ARNm de la quinasa. Pueden seleccionarse secuencias reguladoras operativamente unidas a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido para dirigir la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos de células, por ejemplo, promotores y/o potenciadores virales, o las secuencias reguladoras pueden seleccionarse para dirigir la expresión constitutiva directa específica para el tejido o específica para el tipo de célula de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede tener la forma de un plásmido recombinante, fagómico o virus atenuado en el cual se producen ácidos nucleicos antisentido bajo el control de una región reguladora de alta eficacia, cuya actividad puede determinarse por el tipo de célula dentro de la cual se introduce el vector. Para un análisis de la regulación de la expresión de genes usando genes antisentido consulte Weintraub y colaboradores (1986) "Reviews-Trenes in Genetics", vol 1(1).

El ADN del vector puede introducirse dentro de células procarióticas o eucarióticas por medio de técnicas convencionales de transformación o transfección. Según aquí se utilizan, los términos "transformación" y "transfección" tienen la intención de referirse a una variedad de técnicas reconocidas para la introducción de ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) dentro de una célula anfitriona, incluyendo la coprecipitación de fosfato de calcio o cloruro de calcio, la transfección intermediada por DEAE destrán, la lipofección o la electroporación. Pueden encontrarse procedimientos adecuados para la transformación o transfección de células anfitrionas en Sambrook y colaboradores (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York) y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable en células de mamífero, se sabe, que dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, solamente una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño dentro de su genoma. Para identificar y seleccionar estas células integrantes, se introduce un gen que codifique un marcador seleccionable (por ejemplo, para la resistencia a los antibióticos) generalmente dentro de las células anfitrionas junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a medicamentos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Puede introducirse un ácido nucleico que codifique un marcador seleccionable dentro de la célula anfitriona sobre el mismo vector que el que codifica una proteína de quinasa o puede introducirse sobre un vector separado. Las células establemente transfectadas con ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección medicamentosa (por ejemplo, las células que tengan incorporado el gen del marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras morirán).

Una célula anfitriona de la invención, tal como una célula anfitriona procariótica o eucariótica en un cultivo, puede utilizarse para producir (es decir, expresar) proteína de quinasa. Consecuentemente, la invención suministra además procedimientos para producir proteína de quinasa usando las células anfitrionas de la invención. En una realización, el procedimiento comprende el cultivo de la célula anfitriona de la invención, dentro de la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica una proteína de quinasa, en un medio adecuado de forma que se produzca proteína de quinasa. En otra realización, el procedimiento comprende además el aislamiento de la proteína de quinasa del medio o de la célula anfitriona.

Las células anfitrionas de la invención también pueden utilizarse para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, en una realización, una célula anfitriona de la invención es un ovocito no humano fertilizado o una célula madre embrionaria humana dentro de la cual se ha introducido una secuencia codificante de la quinasa. Dichas células anfitrionas pueden utilizarse entonces para crear animales transgénicos no humanos en los cuales se han introducido secuencias exógenas de quinasa dentro de su genoma o animales homólogos recombinantes en los cuales se han alterado secuencias endógenas de quinasa. Dichos animales son útiles para estudiar la función y/o la actividad de los genes y proteínas de quinasa y para identificar y/o evaluar moduladores de la actividad de la quinasa. Según aquí se utiliza, "animal transgénico" es un animal no humano, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un roedor, tal como una rata o un ratón, en el cual una o más de las células del animal incluye un transgen. Otros ejemplos de animales transgénicos incluyen primates, ovejas, perros, vacas, cabras, gallinas, anfibios, etc. no humanos. Un transgen es un ADN exógeno que se integra dentro del genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, dirigiendo así la expresión de un producto de gen codificado en uno o más tipos de células o de tejido del animal transgénico. Según aquí se utiliza, un "animal homólogo recombinante" es un animal no humano, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ratón, en el cual un gen endógeno de la quinasa se ha alterado mediante recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula de ADN exógeno introducida dentro de una célula del animal, por ejemplo, una célula embrionaria de un animal no humano, antes del desarrollo del animal.

Un animal transgénico no humano de la invención puede crearse introduciendo ácido nucleico que codifique quinasa dentro del pronúcleo macho de un ovocito fertilizado, por ejemplo, mediante microinyección, infección retroviral y permitiendo que el ovocito se desarrolle en un animal hembra sustituto pseudoembarazado. La secuencia de ADN de la quinasa puede introducirse como un transgen dentro del genoma del animal no humano. Alternativamente, puede aislarse el gen de la quinasa basándose en la hibridización y utilizarse como un transgen. También pueden incluirse secuencias intrónicas y señales de poliadenilación en el transgen para incrementar la eficacia de la expresión del transgen. Una secuencia reguladora específica para el tejido puede estar operativamente unida al transgen de la quinasa para dirigir la expresión de la proteína de quinasa en células particulares. Procedimientos para generar animales transgénicos no humanos por medio de manipulación embrionaria y microinyección, particularmente animales tales como ratones, se han convertido en habituales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. núm. 4.736.866, 4.870.009 y 4.873.191 y en Hogan (1986) "Manipulating the Mouse Embryo" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1986). Se utilizan procedimientos similares para la producción de otros animales transgénicos. Un animal transgénico fundador puede identificarse basándose en la presencia del transgen de la quinasa en su genoma y/o en la expresión de ARNm de quinasa en tejidos o células de los animales. Entonces puede utilizarse un animal transgénico fundador para engendrar animales adicionales que lleven el transgen. Además, los animales transgénicos no humanos, que lleven un transgen que codifica el gen de la quinasa, pueden engendrarse además en otros animales transgénicos no humanos que lleven otros transgenes.

Para crear un animal homólogo recombinante no humano, se prepara un vector que contiene al menos una parte de un gen de la quinasa o un homólogo del gen dentro del cual se ha introducido una eliminación, una adición o una sustitución para alterar así, por ejemplo perturbar funcionalmente, el gen de la quinasa. En una realización preferida, el vector está diseñado de forma que después de la recombinación homóloga, el gen endógeno de la quinasa sea funcionalmente interrumpido (es decir, no codifique más una proteína funcional; dichos vectores también son denominados como vectores "knock out"). Alternativamente, el vector puede diseñarse de forma que, después de la recombinación homóloga el gen endógeno de la quinasa se mute o se altere de cualquier otra manera pero codifique aún la proteína funcional (por ejemplo, la región reguladora superior puede alterarse para alterar así la expresión de la proteína endógena de la quinasa). En el vector de recombinación homóloga, la parte alterada del gen de la quinasa está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por ácido nucleico adicional del gen de la quinasa para permitir que se produzca la recombinación homóloga entre el gen exógeno de la quinasa soportado por el vector y un gen endógeno de la quinasa en una célula madre embrionaria no humana. El ácido nucleico flanqueante adicional de la quinasa es de una longitud suficiente para asegurar el éxito de la recombinación homóloga con el gen endógeno. Típicamente, se incluyen varias kilobases del ADN flanqueante (en ambos extremos 5' y 3') en el vector (consulte, por ejemplo, Thomas y Capecchi (1987) "Cell" 51: 503 para una descripción de los vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce dentro de una línea de células madre humanas embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las cuales el gen de la quinasa introducido se ha recombinado de forma homóloga con el gen endógeno de la quinasa (consulte, por ejemplo, Li y colaboradores (1992) "Cell" 69: 915. Las células seleccionadas se inyectan entonces dentro de un blastocisto de un animal no humano (por ejemplo, un ratón) para formar quimeras de agregación (consulte, por ejemplo, Bradley (1987) "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach". Editorial Robertson (IRL, Oxford), pág. 113-152. Entonces puede implantarse un embrión quimérico en un animal hembra sustituto no humano pseudoembarazado y llevarse a término el embrión. La progenie que alberga el ADN homológamente recombinado en sus células germen puede utilizarse para engendrar animales en los cuales todas las células del animal contienen el ADN homológamente recombinado mediante la transmisión de la línea germinal del transgen. Procedimientos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos se describen adicionalmente en Bradley (1991) "Current Opinión in BIO/Technology" 2: 823-829 y en las publicaciones PCT núm. WO 90/11354, WO 91/01140, WO 92/0968 y WO 93/04169.

En otra realización, pueden producirse los animales transgénicos no humanos que contienen los sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del transgen. Un ejemplo de tal sistema es el sistema de recombinasa *cre/loxP* del bacteriófago P1. Para la descripción del sistema de recombinasa *cre/loxP*, consulte, por ejemplo, Lakso y colaboradores (1992) "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 89: 6232-6236. Otro ejemplo de un sistema recombinante es el sistema de recombinasa FLP *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman y colaboradores (1991) "Science" 251: 1351-1355). Si se utiliza un sistema de recombinasa *cre/loxP* para regular la expresión del transgen, se necesitan animales que contengan transgenes que codifiquen tanto la recombinasa *Cre* como una proteína seleccionada. Dichos animales pueden obtenerse a través de las construcciones de animales transgénicos "dobles", por ejemplo, apareando dos animales transgénicos, uno que contenga un transgen que codifique una proteína seleccionada y el otro que contenga un transgen que codifique una recombinasa.

Clones de los animales transgénicos no humanos aquí descritos pueden producirse también de acuerdo con los procedimientos descritos en Wilmot y colaboradores (1997) "Nature" 385: 810-813 y las publicaciones PCT núm. WO 97/07688 y WO 97/07669.

En general, los procedimientos para la producción de animales transgénicos no humanos incluyen la introducción de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la secuencia de ácido nucleico es capaz de expresar la proteína en un animal transgénico, dentro de una célula en cultivo o *in vivo*. Cuando se introduce *in vivo*, el ácido nucleico se introduce dentro de un organismo intacto de manera que uno o más tipos de células y, consecuentemente, uno o más tipos de tejido, expresen el ácido nucleico que codifica la proteína. Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse virtualmente dentro de todas las células en un organismo transfectando una célula en un cultivo, tal como una célula madre embrionaria no humana, según se ha descrito aquí para la producción de

animales transgénicos no humanos, y esta célula puede utilizarse para producir un organismo transgénico completo. Según se ha descrito, en una realización adicional, la célula anfitriona puede ser un ovocito fertilizado. Entonces se permite el desarrollo en dichas células en un animal hembra sustituto para producir el organismo transgénico.

5 IV. Composiciones farmacéuticas

Las moléculas de ácido nucleico de quinasas, las proteínas de quinasas y los anticuerpos antiquinasas (también aquí denominados “compuestos activos”) de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración. Dichas composiciones comprenden típicamente la molécula de ácido nucleico, la proteína o el anticuerpo y el excipiente farmacéuticamente aceptable. Según se utiliza aquí la frase “excipiente farmacéuticamente aceptable” tiene la intención de incluir cualquier solvente, medio de dispersión, revestimiento, agente antibacteriano y agente antifungal, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos suplementariamente activos en las composiciones.

Las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento de las enfermedades aquí analizadas. Las composiciones son suministradas en cantidades terapéuticamente efectivas. Por “cantidades terapéuticamente efectivas” se tiene la intención de referirse a una cantidad suficiente para modular la respuesta deseada. Según se definió aquí, una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína o un polipéptido (es decir, una dosificación eficaz) oscila entre 0,001 y 30 mg/kg del peso del cuerpo, preferiblemente aproximadamente entre 0,01 y 25 mg/kg del peso del cuerpo, más preferiblemente aproximadamente entre 0,1 y 20 mg/kg del peso del cuerpo incluso más preferiblemente aproximadamente entre 1 y 10 mg/kg, entre 2 y 9 mg/kg, entre 3 y 8 mg/kg, entre 4 y 7 mg/kg o entre 5 y 6 mg/kg del peso del cuerpo.

Los expertos en la materia apreciarán que ciertos factores pueden influenciar la dosificación requerida para tratar de forma efectiva a un sujeto, incluyendo, aunque no en sentido limitativo, la severidad de la enfermedad o dolencia, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína, polipéptido o anticuerpo puede incluir un tratamiento simple o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, el sujeto se trata con anticuerpo, proteína o polipéptido en la banda de entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg del peso del cuerpo, una vez por semana, durante aproximadamente entre 1 y 10 semanas, preferiblemente entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente aproximadamente entre 3 y 7 semanas e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas. También se apreciará que la dosificación efectiva de anticuerpo, proteína o polipéptido usado en el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo del curso de un tratamiento en particular. Los cambios de la dosificación resultarán y serán evidentes a partir de los resultados de pruebas de diagnóstico tales como las aquí descritas.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su forma de administración. Ejemplos de formas de administración incluyen parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, la inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y administración rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, una solución salina, aceites fijos, glicoles de polietileno, glicerina, glicol de polipropileno u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como el alcohol de bencilo o parabenos de metilo; antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el bisulfato de sodio; agentes quelantes, tales como el ácido etilendiaminotetracético; amortiguadores, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como el cloruro de sodio o la dextrosa. Puede ajustarse el pH con ácidos o bases, tales como el ácido hidrocórico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede estar encerrada en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (en las que el agua es el soluble) o dispersiones y polvo estéril para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los excipientes adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL® (BASF; Parsippany, NJ) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta la extensión de que exista la capacidad de administración mediante jeringas. Debe ser estable bajo condiciones de fabricación y mantenimiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como las bacterias y los hongos. El excipiente debe ser un solvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, glicol de polipropileno y glicol de polietileno líquido y sustancias similares) y sus mezclas adecuadas. La fluidez adecuada puede mantenerse, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse mediante diferentes agentes antibacterianos y antifungales, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede efectuarse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones estériles inyectables pueden prepararse incorporando el compuesto activo (por ejemplo, una proteína de quinasas o un anticuerpo antiquinasas) en la cantidad requerida en un solvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes anteriormente enumerados, seguida por una esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos seleccionados entre los anteriormente enumerados. En el caso de polvo estéril para la preparación de soluciones estériles inyectables, los procedimientos de preparación preferidos son el secado por vacío y el secado por congelación, que da como resultado un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada y esterilizada de los mismos.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte y un excipiente comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en forma de comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, tabletas o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un excipiente fluido para su uso como colutorio en el que el compuesto en el excipiente fluido se aplica oralmente, se agita y se expectora o se traga. Pueden incluirse como parte de la composición agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales coadyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, tabletas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un amalgamador, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrador, tal como el ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como el estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente endulzante, tal como sucrosa o sacarina; o un agente saborizante, tal como peppermint, salicilato de metilo o saborizante de naranja. Para su administración mediante inhalación, los compuestos son administrados en forma de aerosol desde un envase o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o desde un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser mediante un medio transmucosal o transdérmico. Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes adecuados para la barrera a penetrar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal puede realizarse a través del uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, salvas, geles o cremas tal como generalmente se conoce en la técnica. Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales para supositorios, tales como mantequilla de coco y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con excipientes que protegerán el compuesto contra la rápida eliminación del cuerpo, tales como formulaciones de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como el acetato de etileno vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Como excipientes farmacológicamente aceptables también pueden utilizarse las suspensiones liposomales (incluyendo los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales). Estas pueden prepararse de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, tal como se describe en la patente de EE.UU. núm. 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitarias para facilitar las dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo que se calcula que produce el efecto terapéutico deseado en asociación con el excipiente farmacéutico requerido. Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, entre aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ y aproximadamente 15 mg/kg (por ejemplo, entre 0,1 y 20 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para su administración a un paciente, bien sea, por ejemplo, mediante uno o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ y aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores antes mencionados. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o mayores períodos, dependiendo del estado, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El proceso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. Un régimen de dosificación ejemplar se presenta en el documento WO 94/04188. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención vienen dictadas y son directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a conseguir y de las limitaciones inherentes en la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden insertarse dentro de vectores y usarse como vectores de terapia genética. Los vectores de terapia genética pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, administración local (patente de EE.UU. núm. 5.328.470) o mediante inyección esterotáctica (consulte, por ejemplo, Chen y colaboradores (1994) "Proc. Natl. Acad. Sci USA" 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia genética puede incluir el vector de terapia genética en un diluyente aceptable o puede comprender una matriz de liberación lenta en la cual está embebido el vehículo de administración genética. Alternativamente, cuando el vector completo de administración genética puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por

ejemplo los vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración genética.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar incluidas en un envase, paquete o dispensador junto con las instrucciones para su administración.

V. Usos y procedimientos de la invención

Las moléculas de ácido nucleico, las proteínas, los homólogos de las proteínas y los anticuerpos aquí descritos pueden usarse en uno o más de los siguientes procedimientos: (a) pruebas de selección; (b) pruebas de detección (por ejemplo, mapeo cromosómico, tipificación de tejidos, biología forense); (c) medicina predictiva (por ejemplo, pruebas de diagnóstico, pruebas de pronóstico, ensayos clínicos de monitorización y farmacogenómica) y (d) métodos de tratamiento (por ejemplo, terapéutico y profiláctico). Las moléculas aisladas de ácido nucleico de la invención pueden usarse para expresar proteína de quinasa (por ejemplo, por medio de un vector de expresión recombinante en una célula anfitriona en aplicaciones de terapia genética), para detectar ARNm de quinasa (por ejemplo, en una muestra biológica) o una lesión genética en un gen de quinasa y para modular la actividad de la quinasa. Además, las proteínas de quinasa pueden usarse para seleccionar medicamentos o compuestos que modulen el crecimiento y/o el metabolismo celular así como para tratar enfermedades caracterizadas por una producción insuficiente o excesiva de proteína de quinasa o por la producción de formas de proteína de quinasa que tienen una actividad reducida o aberrante en comparación con la proteína quinasa de tipo salvaje. Además, los anticuerpos anti-quinasa de la invención pueden usarse para detectar proteínas aisladas de quinasa y modular la actividad de la quinasa.

A. Pruebas de selección

La invención suministra un procedimiento (también aquí denominado “prueba de selección”) para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de ensayo (por ejemplo, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros medicamentos) que se unen a las proteínas de quinasa o tienen efecto estimulante o inhibidor, por ejemplo, sobre la actividad de la quinasa.

Los compuestos de ensayo de la presente invención pueden obtenerse usando cualquiera de las numerosas aproximaciones de los procedimientos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica incluyendo bibliotecas de fase sólida o de fase de solución paralelas y espacialmente direccionables, procedimientos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución, el procedimiento de bibliotecas “one-bead one-compound” y procedimientos de bibliotecas sintéticas que usan selección de cromatografía por afinidad. La aproximación de bibliotecas biológicas se limita a las bibliotecas de péptidos, mientras que las otras cuatro aproximaciones son aplicables a bibliotecas de péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas de los compuestos (Lam (1997) “Anticancer Drug Des.” 12: 145).

Ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo, DeWitt y colaboradores (1993) “Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 90: 6909; Erb y colaboradores (1994) “Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 91: 11422; Zuckermann y colaboradores (1994) “J. Med. Chem.” 37: 2678; Cho y colaboradores (1993) “Science” 261: 1303; Carrell y colaboradores (1994) “Angew. Chem. Ed. Engl.” 33: 2059; Carrell y colaboradores (1994) “Angew. Chem. Ed. Engl.” 33: 2061 y Gallop y colaboradores (1994) “J. Med. Chem.” 37:1233.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) “Bio/Techniques” 13: 412-421, o en microesferas (Lam (1991) “Nature” 354: 82-84), chips (Fodor (1993) “Nature” 364: 555-556), bacterias (patente de EE.UU. núm. 5.223.409), esporas (patentes de EE.UU. núm. 5.571.698, 5.403.484 y 5.223.409), plásmidos (Cull y asociados (1992) “Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 89: 1865-1869 o fago (Scott y Smith (1990) “Science” 249: 386-390; Devlin (1990) “Science” 249: 404-406; Cwirla y colaboradores (1990) “Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 87: 6378-6382 y Felici (1991) “J. Mol. Biol.” 222: 301-310).

Puede lograrse la determinación de la capacidad para unirse a la proteína de quinasa del compuesto de ensayo, por ejemplo, acoplando el compuesto de ensayo con un radioisótopo o una etiqueta enzimática de forma que pueda determinarse la unión del compuesto de ensayo con la proteína de quinasa o con una parte biológicamente activa de la misma detectando el compuesto etiquetado en un complejo. Por ejemplo, los compuestos de ensayo pueden estar etiquetados con I^{125} , S^{35} , C^{14} o H^3 , bien directa o indirectamente, y detectarse el radioisótopo mediante recuento directo de la emisión de radio o mediante recuento por centelleo. Alternativamente los compuestos de ensayo pueden ser enzimáticamente etiquetados, por ejemplo, con peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o luciferasa, y detectarse la etiqueta enzimática mediante la determinación de la conversión de un sustrato adecuado en producto.

De forma similar, se puede determinar la capacidad de la proteína de quinasa para unirse o interactuar con una molécula diana de la quinasa. Por “molécula diana” se entiende una molécula con la cual se une o interactúa de forma natural la proteína de quinasa. En una realización preferida, la capacidad de la proteína de quinasa para unirse o interactuar con una molécula diana de la quinasa puede monitorizarse monitorizando la actividad de la molécula diana. Por ejemplo, la actividad de la molécula diana puede monitorizarse detectando la inducción de un segundo mensajero celular de la diana (por ejemplo, Ca^{2+} , diacilglicerol, IP3, etc.), detectando la actividad catalítica/enzimática de la diana sobre un sustrato adecuado, detectando la inducción de un gen reportero (por ejemplo, un elemento regulador sensible a la quinasa operativamente unido a un ácido nucleico que codifique una marcador detectable, por ejemplo, luciferasa) o detectando una respuesta celular, por ejemplo, una infección viral, una diferenciación celular o una proliferación

celular. Los eventos bioquímicos, los sustratos y las moléculas efectoras incluyen, aunque no en sentido limitativo, aquellos anteriormente analizados, incluyendo aquellas funciones mostradas en las figuras y las funciones relacionadas con la NLK, incluyendo las funciones similares a las de MAPK/Erk y Cdk.

5 En otra realización adicional, un ensayo de la presente invención es un ensayo libre de células que comprende la puesta en contacto de una proteína quinasa con un compuesto de ensayo y la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para unirse a la proteína de quinasa. La unión del compuesto de ensayo con la proteína de quinasa puede determinarse bien directa o bien indirectamente según se describió anteriormente. En una realización preferida, el ensayo incluye la puesta en contacto de la proteína de quinasa con un compuesto conocido que se una a la proteína de quinasa para formar una mezcla de ensayo, la puesta en contacto de la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo y la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para unirse preferentemente con la proteína de quinasa en comparación con el compuesto conocido.

15 En otra realización, un ensayo es un ensayo libre de células que comprende la puesta en contacto de proteína de quinasa con un compuesto de ensayo y la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad de la proteína quinasa o de una parte biológicamente activa de la misma. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de una proteína de quinasa puede lograrse, por ejemplo, determinando la capacidad de la proteína de quinasa para unirse a una molécula diana de quinasa según se determinó anteriormente para la determinación de la unión directa. En una realización alternativa, la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de una proteína de quinasa puede lograrse determinando la capacidad de la proteína de quinasa para modular adicionalmente una molécula diana de quinasa. Por ejemplo, puede determinarse la actividad catalítica/enzimática de la molécula diana sobre un sustrato adecuado, tal como se describió previamente.

25 En otra realización adicional, el ensayo libre de células comprende la puesta en contacto de la proteína de quinasa con un compuesto conocido que se una a una proteína de quinasa para formar una mezcla de ensayo, la puesta en contacto de la mezcla de ensayo con un compuesto de prueba y la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para unirse o modular preferentemente la actividad de una molécula diana de la quinasa.

30 En los ensayos antes mencionados, puede ser deseable inmovilizar bien una proteína de quinasa o bien su molécula diana para facilitar la separación de las formas complejas de las no complejas de una o de ambas proteínas, así como adaptar la automatización del ensayo. En una realización, puede suministrarse una proteína de fusión que añada un dominio que permita que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión de glutadiona-S-transferasa/quinasa o las proteínas de fusión de glutadiona-S-transferasa/diana pueden ser absorbidas sobre microesferas de glutadiona sefarosa. (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microconcentración derivadas de la glutadiona, que se combinan entonces con el compuesto de ensayo o con el compuesto de ensayo y bien con la proteína diana no absorbida o bien con la proteína de quinasa, y la mezcla se incuba bajo condiciones propicias para la formación de complejos (por ejemplo, condiciones fisiológicas para la sal y el pH). Después de la incubación, se lavan las microesferas o los pocillos de la placa de microconcentración para eliminar cualquier componente no enlazado y se mide la formación de complejo bien directa o bien indirectamente, por ejemplo, tal como se describió previamente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz y determinarse el nivel de unión o de actividad de la quinasa usando técnicas convencionales.

45 En los ensayos de selección de la invención pueden usarse también otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices. Por ejemplo, bien la proteína de quinasa o bien su molécula diana pueden inmovilizarse utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Pueden prepararse moléculas de quinasa o moléculas diana biotiniladas a partir de biotina NHS-(N-hidroxí-succinimida) usando procedimientos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, el equipo de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL) e inmovilizarse en los pocillos de las placas de 96 pocillos revestidos de estreptavidina (Pierce Chemicals). Alternativamente, pueden obtenerse anticuerpos reactivos con una proteína de quinasa o con las moléculas diana pero que no interfieren con la unión de la proteína de quinasa con su molécula diana a partir de los pocillos de la placa y de la proteína diana o de quinasa no enlazada atrapada en los pocillos mediante conjugación de anticuerpos. Procedimientos para detectar dichos complejos incluyen, además de aquellos descritos anteriormente para los complejos inmovilizados por GST, la inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con la proteína de quinasa o la molécula diana, así como los ensayos de enlace enzimático que se apoyan en la detección de la actividad enzimática asociada con la proteína de quinasa o la molécula diana.

55 En otro aspecto adicional de la invención, las proteínas de quinasa pueden usarse como "proteínas cebo" en un ensayo de dos híbridos o un ensayo de tres híbridos (consulte, por ejemplo, la patente de EE.UU. núm. 5.283.317; Zervos y colaboradores (1993) "Cell" 72: 223-232; Madura y colaboradores (1993) "J. Biol. Chem." 268: 12046 - 12054; Bartel y colaboradores (1993) "Bio/Techniques" 14: 920-924; Iwabuchi y colaboradores (1993) "Oncogene" 8: 1693-1696 y la publicación PCT núm. WO 94/10300), para identificar otras proteínas que se unen o interactúan con la proteína de quinasa ("proteínas de unión con la quinasa" o "quinasa-bp") y modulan la actividad de la quinasa. Dichas proteínas de unión con la quinasa es probable que estén también involucradas en la propagación de señales por las proteínas de quinasa, por ejemplo, como elementos superiores o inferiores de una vía de señalización.

65 La presente invención se refiere además a nuevos agentes identificados mediante los ensayos de selección anteriormente descritos y a los usos de los mismos para tratamientos como los que aquí se describen

B. Ensayos de detección

Partes o fragmentos de las secuencias de ADNc aquí identificadas (y las correspondientes secuencias de los genes completos) pueden utilizarse de muchas maneras como reactivos de polinucleótidos. Por ejemplo, estas secuencias pueden usarse para: (1) efectuar el mapeo de sus respectivos genes sobre un cromosoma; (2) identificar un individuo a partir de una muestra biológica diminuta (tipificación de tejidos) y (3) ayudar en la identificación forense de una muestra biológica. Estas aplicaciones se describen en las siguientes subsecciones.

1. Mapeo de cromosomas

Las secuencias aisladas, completas o parciales, de los genes de quinasa de la invención pueden usarse para efectuar el mapeo de sus respectivos genes de quinasa sobre un cromosoma, facilitando así la localización de las regiones de los genes asociadas con una enfermedad genética. Puede utilizarse el análisis por ordenador de las secuencias de quinasa para seleccionar rápidamente los iniciadores de la PCR (preferiblemente, con una longitud de 12-25 bp) que no se extiendan más de un exón en el ADN genómico, simplificando así el proceso de amplificación. Entonces pueden utilizarse estos iniciadores para la detección por PCR de híbridos de células somáticas que contengan cromosomas humanos individuales. Solamente esos híbridos que contienen el gen humano que se corresponde con las secuencias de la quinasa darán como resultado un fragmento amplificado.

Los híbridos de células somáticas se preparan fundiendo células somáticas de diferentes mamíferos (por ejemplo, células humanas y de ratón). Como híbridos de células humanas y de ratón crecen y se dividen, gradualmente pierden los cromosomas humanos en orden aleatorio, pero conservan los cromosomas del ratón. Usando un medio en el que las células de ratón no puedan crecer (porque carecen de una enzima particular), pero en el que sí pueden crecer las células humanas, se conservará el cromosoma humano que contiene el gen que codifica la enzima necesaria. Utilizando diferentes medios, pueden establecerse paneles de líneas de células híbridas. Cada línea de células de un panel contiene bien un cromosoma humano único o bien un pequeño número de cromosomas humanos y un conjunto completo de cromosomas del ratón, permitiendo el mapeo sencillo de genes individuales para cromosomas humanos específicos (D'Eustachio y colaboradores (1983) "Science" 220: 919-924). También pueden producirse híbridos de células somáticas que contienen solamente fragmentos de cromosomas humanos usando cromosomas humanos con traslocaciones y eliminaciones.

Otras estrategias de mapeo que pueden utilizarse similarmente para mapear una secuencia de quinasa en su cromosoma incluyen la hibridización *in situ* (descrita en Fan y colaboradores (1990) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 87: 6223-27), la predetección con cromosomas etiquetados clasificados por el flujo y la preselección mediante hibridización en bibliotecas de ADNc específicas para el cromosoma. Además, puede usarse la hibridización *in situ* por fluorescencia (FISH) de una secuencia de ADN en una extensión cromosómica de metafase para suministrar una ubicación cromosómica precisa en un solo paso. Para revisar esta técnica, consulte Verma y colaboradores (1988) "Human chromosomes: A manual of basic techniques" (Pergamon Press, NY). La técnica FISH puede utilizarse con una secuencia de ADN corta de hasta 500 ó 600 bases. Sin embargo, los clones más largos de 1.000 bases tienen una mayor probabilidad de unirse a una única ubicación cromosómica con una intensidad de señal suficiente para la detección simple. Preferiblemente, 1.000 bases y más preferiblemente 2.000 bases, serán suficientes para obtener buenos resultados en un periodo de tiempo razonable.

Los reactivos para el mapeo de cromosomas pueden usarse individualmente para marcar un cromosoma único o un sitio único sobre ese cromosoma o pueden utilizarse paneles de reactivos para marcar múltiples sitios y/o múltiples cromosomas. Los reactivos que se corresponden con las regiones no codificantes de los genes son los realmente preferidos para propósitos de mapeo. Es más probable que se conserven las secuencias codificantes dentro de familias de genes, aumentando así las oportunidades de hibridización cruzada durante el mapeo cromosómico.

Una vez mapeada una secuencia en una ubicación cromosómica precisa, puede correlacionarse la posición física de la secuencia sobre el cromosoma con los datos del mapa genético. Dichos datos se encuentran, por ejemplo, en "V. McKusick, *Mendelian inheritance in man*", disponible en línea a través de la "Johns Hopkins University Welch Medical Library". Entonces puede identificarse la relación entre los genes y la enfermedad, mapeada para la misma región cromosómica, a través del análisis de los enlaces (herencia compartida de genes físicamente adyacentes), descrito, por ejemplo, por Egeland y colaboradores (1987) "Nature" 325: 783-787.

Además, pueden determinarse las diferencias en las secuencias de ADN entre individuos afectados y no afectados con una enfermedad asociada con el gen de la quinasa. Si se observa una mutación en algunos o en todos los individuos afectados pero no en los individuos no afectados, entonces es probable que la mutación sea el agente causante de la enfermedad en particular. La comparación entre individuos afectados y no afectados generalmente comprende buscar primero en los cromosomas alteraciones estructurales tales como eliminaciones o translocaciones que sean visibles a partir de extensiones de cromosomas o detectables usando la PCR basándose en esa secuencia de ADN. Finalmente, puede realizarse la secuenciación completa de los genes de diferentes individuos para confirmar la presencia de una mutación y para diferenciar las mutaciones de los polimorfismos.

2. Tipificación de tejidos

Las secuencias de quinasa de la presente invención también pueden usarse para identificar individuos a partir de muestras biológicas diminutas. El ejército de los EE.UU., por ejemplo, está considerando el uso del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para la identificación de su personal. En esta técnica, un ADN genómico de un individuo se digiere con una o más enzimas de restricción y se estudia sobre un Southern Blot para dar como resultado bandas de identificación únicas. Las secuencias de la presente invención son útiles como marcadores adicionales de ADN para RFLP (esto se describe en la patente de EE.UU. 5.272.057).

Además, las secuencias de la presente invención pueden utilizarse para suministrar una técnica alternativa para determinar base por base la secuencia real de ADN de partes seleccionadas del genoma de un individuo. Así, las secuencias de quinasa de la invención pueden usarse para preparar dos iniciadores de la PCR a partir de los extremos 5' y 3' de las secuencias. Estos iniciadores pueden usarse entonces para amplificar el ADN de un individuo y posteriormente secuenciarlo.

Los paneles de las correspondientes secuencias de ADN de individuos, preparados de esta forma, pueden proporcionar identificaciones únicas de individuos, ya que cada individuo tendrá un conjunto único de secuencias de ADN debido a las diferencias alélicas. Las secuencias de quinasa de la invención únicamente representan partes del genoma humano. Las variaciones alélicas se producen en algún grado en las regiones codificantes de estas secuencias y en un mayor grado en las regiones no codificantes. Se estima que la variación alélica entre individuos humanos se produce con una frecuencia de aproximadamente una vez por cada 500 bases. Cada una de las secuencias aquí descritas puede, en algún grado, utilizarse como estándar con el cual puede compararse el ADN de un individuo para propósitos de identificación.

3. Uso de secuencias parciales de quinasa en biología forense

En la biología forense también pueden usarse técnicas de identificación basadas en el ADN. De esta manera, puede utilizarse la tecnología de la PCR para amplificar secuencias de ADN tomadas de muestras biológicas muy pequeñas, por ejemplo, cabello, piel o fluidos corporales, por ejemplo, sangre, saliva o semen hallados en el lugar del crimen. La secuencia amplificada puede compararse entonces con un estándar permitiendo así la identificación del origen de la muestra biológica.

Las secuencias de la presente invención puede usarse par suministrar reactivos de polinucleótidos, por ejemplo, iniciadores de la PCR orientados hacia lugares específicos del genoma humano, lo cual puede mejorar la fiabilidad de las identificaciones forenses basadas en el ADN suministrando, por ejemplo, otro "marcador de identificación" que es único para un individuo en particular. Según se mencionó anteriormente, puede utilizarse información de secuencias de base real para la identificación como una alternativa precisa a los patrones formados mediante fragmentos generados por enzimas de restricción. Las secuencias dirigidas a una región no codificante de la SEQ ID NO: 1 son particularmente adecuadas para este uso ya que los mayores números de polimorfismos se producen en la región no codificante, facilitando la diferenciación de individuos mediante el uso esta técnica. Ejemplos de reactivos de polinucleótidos incluyen la secuencia de la quinasa o una parte de la misma, por ejemplo, fragmentos derivados de una región no codificante de la SEQ ID NO: 1 que tengan una longitud de al menos 20 ó 30 bases.

Las secuencias de quinasa aquí descritas pueden utilizarse además para suministrar reactivos de polinucleótidos, por ejemplo, sondas etiquetadas o etiquetables que pueden utilizarse, por ejemplo, en una técnica de hibridización *in situ*, para identificar un tejido específico. Esto puede ser muy útil en los casos en los que el patólogo forense se encuentra con un tejido de origen desconocido. Pueden usarse paneles de dichas sondas de quinasa para identificar tejidos por especies y/o por tipo de órgano.

C. Medicina predictiva

La presente invención pertenece también al campo de la medicina predictiva en la cual se utilizan pruebas de diagnóstico, pruebas de pronóstico, farmacogenómica y ensayos clínicos de monitorización para propósitos (predictivos) de pronóstico para tratar profilácticamente a un individuo. Estas aplicaciones se describen en las siguientes subsecciones.

1. Pruebas de diagnóstico

Un aspecto de la presente invención se refiere a pruebas de diagnóstico para detectar la proteína y/o la expresión del ácido nucleico de la quinasa así como la actividad de la quinasa, en el contexto de una muestra biológica. Un procedimiento ejemplar para detectar la presencia o ausencia de proteína de quinasa en una muestra biológica comprende la obtención de una muestra biológica de un sujeto de estudio y la puesta en contacto de la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar la proteína o el ácido nucleico de la quinasa (por ejemplo, el ARNm o el ADN genómico) que codifica la proteína de la quinasa de manera que se detecte la presencia de la proteína de quinasa en la muestra biológica. Los resultados obtenidos con una muestra biológica del sujeto de estudio pueden compararse con los resultados obtenidos con una muestra biológica de un sujeto de control.

Un agente preferido para detectar el ARNm o el ADN genómico de la quinasa es una sonda etiquetada de ácido nucleico capaz de hibridizarse con el ARNm o el ADN genómico de la quinasa. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico de quinasa de longitud completa o parcial, tal como el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o una parte del mismo, tal como una molécula de ácido nucleico de al menos 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridizarse específicamente bajo condiciones estrictas con el ARNm o el ADN genómico de la quinasa. Aquí se describen otras sondas adecuadas para su uso en las pruebas de diagnóstico de la invención.

Un agente preferido para detectar proteína de quinasa es un anticuerpo capaz de unirse a la proteína de quinasa, preferiblemente un anticuerpo con una etiqueta detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o más preferiblemente monoclonales. Puede utilizarse un anticuerpo intacto o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(abN)₂). El término “etiquetado”, con respecto a la sonda o al anticuerpo, tiene la intención de incluir el etiquetado directo de la sonda o del anticuerpo acoplando (es decir, enlazando físicamente) una sustancia detectable en la sonda o el anticuerpo, así como el etiquetado indirecto de la sonda o del anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que esté directamente etiquetado. Ejemplo de etiquetado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario fluorescentemente etiquetado y etiquetando el extremo libre de una sonda de ADN con biotina de manera que pueda detectarse con estreptavidina fluorescentemente etiquetada.

El término “muestra biológica” tiene la intención de incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados a partir de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos biológicos presentes dentro de un sujeto. Esto es, el procedimiento de detección de la invención puede usarse para detectar ARNm, proteína o ADN genómico de la quinasa en una muestra *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm de quinasa incluyen ensayos de inmunsorbetes enlazados de enzimas (ELISA), ensayos Western Blots, inmunoprecipitaciones y e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico de la quinasa incluyen las hibridizaciones Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de la proteína de quinasa incluyen la introducción dentro de un sujeto de un anticuerpo etiquetado de quinasa. Por ejemplo, un anticuerpo puede etiquetarse con un marcador radioactivo cuya presencia y localización en el sujeto pueden detectarse mediante técnicas convencionales para la formación de imágenes.

En una realización, la muestra biológica contiene moléculas de proteínas del sujeto de estudio. Alternativamente, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del sujeto de estudio o moléculas de ADN genómico del sujeto de estudio. Las muestras biológicas pueden obtenerse de la sangre, del plasma, de células o del tejido del sujeto.

La invención también comprende equipos para detectar la presencia de proteínas de quinasa en una muestra biológica (una muestra de ensayo). Dichos equipos pueden usarse para determinar si un sujeto padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con la expresión aberrante de la proteína de quinasa. Por ejemplo, el equipo puede comprender un compuesto o agente etiquetado capaz de detectar proteína o ARNm de la quinasa en una muestra biológica y medios para determinar la cantidad de proteína de quinasa en la muestra (por ejemplo, un anticuerpo anti-quinasa o una sonda de oligonucleótidos que se una al ADN que codifica una proteína quinasa, por ejemplo, SEQ ID NO: 1). Los equipos también pueden incluir instrucciones para observar si el sujeto de estudio padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con la expresión aberrante de secuencias de quinasa si la cantidad de proteína o de ARNm de quinasa está por encima o por debajo de un nivel normal.

Para los equipos basados en anticuerpos, el equipo puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (por ejemplo, unido a un soporte sólido) que se una a la proteína de quinasa; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente que se una a la proteína de quinasa o al primer anticuerpo y que esté conjugado con un agente detectable. Para los equipos basados en oligonucleótidos, el equipo puede comprender, por ejemplo (1) un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido detectablemente etiquetado, que se hibridice con una secuencia de ácido nucleico de quinasa o (2) un par de iniciadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico de la quinasa.

El equipo también puede comprender, por ejemplo, un agente neutralizador, un conservante o un agente estabilizador de proteínas. El equipo puede comprender también los componentes necesarios para detectar el agente detectable (por ejemplo, una enzima o un sustrato). El equipo también puede contener una muestra de control o una serie de muestras que puedan ser analizadas y comparadas con la muestra de ensayo contenida. Cada componente del equipo está habitualmente encerrado dentro de un envase individual y la totalidad de los diferentes envases están dentro de un paquete único junto con las instrucciones para observar si el sujeto de estudio padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con la expresión aberrante de proteínas de quinasa.

2. Pruebas de pronóstico

Los procedimientos aquí descritos pueden además utilizarse como pruebas de diagnóstico o de pronóstico para identificar sujetos que padecen o están en riesgo de desarrollar una enfermedad o una afección asociada con la proteína quinasa, la expresión del ácido nucleico de la quinasa o la actividad de la quinasa. Las pruebas de pronóstico pueden utilizarse para propósitos predictivos para el tratamiento profiláctico de un individuo antes de la aparición de una enfermedad caracterizada o asociada con la proteína quinasa, la expresión del ácido nucleico de la quinasa o la actividad de la quinasa.

Así, la presente invención suministra un procedimiento en el cual se obtiene una muestra de ensayo de un sujeto y se detecta una proteína o un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm o ADN genómico) de la quinasa, en el que se diagnostica la presencia de la proteína o el ácido nucleico de la quinasa en un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o una afección asociada con la expresión o la actividad aberrante de la quinasa. Según aquí se utiliza, una “muestra de ensayo” se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser una muestra de fluido biológico, de células o de tejido.

Además del uso de las pruebas de pronóstico aquí descritas, la presente invención suministra procedimientos para determinar si se puede administrar un agente específico (por ejemplo, un agonista, un antagonista, un peptidomimético, una proteína, un péptido, un ácido nucleico, una molécula pequeña u otro candidato a medicamento) a un sujeto para tratar de forma eficaz una enfermedad o afección asociada con una actividad o una expresión aberrante de la quinasa. De esta forma, se obtiene una muestra de ensayo y se detecta una proteína o un ácido nucleico de la quinasa. La presencia de la proteína o del ácido nucleico de la quinasa sirve como diagnóstico para un sujeto al que se puede administrar el agente para tratar la enfermedad asociada con la expresión o la actividad aberrante de la quinasa.

3. Farmacogenómica

Los agentes o moduladores que tienen efectos estimuladores o inhibidores sobre la actividad de la quinasa (por ejemplo, la expresión de genes de la quinasa) tal como los identificados mediante un ensayo de detección aquí descrito, pueden ser administrados a individuos para tratar (profiláctica o terapéuticamente) enfermedades asociadas con una actividad aberrante de la quinasa así como para modular el crecimiento, la diferenciación y/o el metabolismo celular. En conjunción con dicho tratamiento, puede considerarse la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre un genotipo de un individuo y la respuesta de ese individuo a un compuesto o medicamento extraño) del individuo. Las diferencias en el metabolismo de los agentes terapéuticos pueden dar como resultado la toxicidad severa o el fallo terapéutico alterando la relación entre la dosis y la concentración en sangre del medicamento farmacéuticamente activo. De esta forma, la farmacogenómica del individuo permite la selección de agentes eficaces (por ejemplo, medicamentos) para tratamientos profilácticos o terapéuticos basados en la consideración del genotipo de individuo. Dicha farmacogenómica puede usarse además para determinar las dosis y regímenes terapéuticos adecuados. Consecuentemente, puede determinarse la actividad de la proteína de quinasa, la expresión del ácido nucleico de la quinasa o el contenido de mutaciones de los genes de la quinasa en un individuo para así seleccionar el agente o agentes adecuados para el tratamiento profiláctico o terapéutico del individuo.

La farmacogenómica tiene relación con las variaciones hereditarias clínicamente significativas en la respuesta a los medicamentos debido a la disposición modificada a los medicamentos y a la acción anómala en las personas afectadas. Consulte, por ejemplo, Linder (1997) “Clin. Chem.” 43(2): 254-266. En general, pueden diferenciarse dos tipos de condiciones farmacogenéticas. Las condiciones farmacogenéticas transmitidas como un factor simple que alteran el modo en el que los medicamentos actúan sobre el cuerpo se denominan “acción alterada del medicamento”. Las condiciones genéticas transmitidas como factores simples que alteran el modo en el que el cuerpo actúa sobre los medicamentos se denominan “metabolismo alterado del medicamento”. Estas condiciones farmacogenéticas pueden producirse bien como defectos raros o bien como polimorfismos. Por ejemplo, la carencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PD) es una enzimopatía comúnmente heredada en la que la principal complicación clínica es la hemólisis después de la ingesta de medicamentos oxidantes (antipalúdicos, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y el consumo de alubias.

Como realización ilustrativa, la actividad de las enzimas de metabolización de los medicamentos es el principal determinante tanto de la intensidad como de la acción del medicamento. El descubrimiento de los polimorfismos genéticos de las enzimas de metabolización de los medicamentos (por ejemplo, la N-acetiltransferasa 2 (NAT2) y las enzimas CYP2D6 y CYP2C19 del citocromo P450) ha proporcionado una explicación de por qué algunos pacientes no obtienen los efectos esperados de los medicamentos o muestran una respuesta exagerada a los medicamentos y una seria toxicidad después de tomar la dosis habitual y segura de un medicamento. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizante extensivo (EM) y el metabolizante pobre (PM). La prevalencia del PM es diferente entre diferentes poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica la CYP2D6 es altamente polifórmico y se han identificado algunas mutaciones en el PM, que conducen a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizantes pobres de la CYP2D6 y de la CYP2C19 experimentan con bastante frecuencia una respuesta exagerada a los medicamentos y efectos secundarios cuando reciben dosis estándar. Si un metabolito es la molécula terapéuticamente activa, un PM no mostrará respuesta terapéutica, como se ha demostrado para el efecto analgésico de la codeína mediado por su metabolito, la morfina, formado por la CYP2D6. El otro extremo son los metabolizantes denominados ultra-rápidos que no responden a las dosis estándar. Recientemente, se ha identificado que la base molecular del metabolismo ultra-rápido es debida a la amplificación genética de la CYP2D6.

Así, puede determinarse la actividad de la proteína de quinasa, la expresión de ácido nucleico de la quinasa o el contenido de mutaciones de los genes de la quinasa en un individuo para así seleccionar el agente o agentes adecuados para el tratamiento terapéutico o profiláctico del individuo. Además pueden utilizarse estudios farmacogenéticos para aplicar la genotipificación de alelos polimórficos que codifican las enzimas de metabolización de los medicamentos para la identificación de un fenotipo de respuesta a los medicamentos de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o selección de medicamentos, puede evitar reacciones adversas o fallos terapéuticos y mejorar de esta manera la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trata un sujeto con un modulador de la quinasa, tal como un modulador identificado por uno de los ensayos ejemplares de detección aquí descritos.

4. Monitorización de los efectos durante los ensayos clínicos

La monitorización de la influencia de los agentes (por ejemplo, medicamentos, compuestos) sobre la expresión o actividad de los genes de la quinasa (por ejemplo, la capacidad de modular la proliferación y/o diferenciación celular aberrante) puede aplicarse no sólo en la detección básica de medicamentos sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la efectividad de un agente, según se determina mediante un ensayo de detección según aquí se describe, para aumentar o reducir la expresión de genes de quinasa, los niveles de proteínas o la actividad de las proteínas, puede monitorizarse en ensayos clínicos de sujetos que exhiban expresión de genes de quinasa, niveles de proteínas o actividad de proteínas amplificados o reducidos. En dicho trastorno de la proliferación celular, puede utilizarse como marcador del crecimiento y diferenciación celular.

Por ejemplo, y no a modo de limitación, pueden identificarse los genes que son modulados en las células mediante el tratamiento con un agente (por ejemplo, un compuesto, un medicamento o una pequeña molécula) que module la actividad de la quinasa (por ejemplo, según se identifica mediante un ensayo de detección aquí descrito). Así, para estudiar el efecto de los agentes sobre trastornos de la proliferación celular, por ejemplo, en un ensayo clínico, pueden aislarse células y prepararse y analizarse el ARN para buscar los niveles de expresión de los genes de la quinasa y otros genes implicados en el trastorno. Los niveles de expresión de los genes (es decir, el patrón de expresión de los genes) pueden identificarse mediante un análisis de transferencia Northern o RT-PCR, según aquí se describe, o alternativamente midiendo la cantidad de proteína producida, mediante uno de los procedimientos aquí descritos, o midiendo los niveles de actividad de los genes de la quinasa. De esta manera, el patrón de expresión de los genes puede servir como marcador, indicativo de la respuesta fisiológica al agente de las células. Consecuentemente, este estado de respuesta puede determinarse antes, y en diferentes puntos durante el tratamiento del individuo con el agente.

En una realización preferida, la presente invención suministra un procedimiento para monitorizar la efectividad del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, un antagonista, un peptidomimético, una proteína, un péptido, un ácido nucleico, una molécula pequeña u otro medicamento candidato identificado mediante los ensayos de detección aquí descritos), que comprende los pasos de (1) obtener una muestra de preadministración de un sujeto antes de la administración del agente; (2) detectar el nivel de expresión de una proteína, ARNm o ADN genómico de la quinasa en la muestra de preadministración; (3) obtener una o más muestras de postadministración del sujeto; (4) detectar el nivel de expresión o de actividad de la proteína, ARNm o ADN genómico de la quinasa en las muestras de postadministración; (5) comparar el nivel de expresión o de actividad de la proteína, ARNm o ADN genómico de la quinasa en la muestra de preadministración con la proteína, ARNm o ADN genómico de la quinasa en la muestra de postadministración y (6) alterar consecuentemente la administración del agente al sujeto para provocar el efecto deseado, es decir, por ejemplo, un aumento o reducción de la expresión o la actividad de la proteína de la quinasa.

C. Agente terapéutico para uso en el tratamiento

La presente invención suministra un agente terapéutico para uso en el tratamiento tanto profiláctico como terapéutico de una enfermedad o de un trastorno asociado con la expresión o la actividad aberrante de la quinasa en un sujeto en riesgo o susceptible de dicho trastorno. Adicionalmente, las composiciones de la invención encuentran uso en el tratamiento de los trastornos aquí descritos. "Tratamiento" se define aquí como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o a la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o a una línea celular de un paciente que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición hacia dicha enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, paliar, alterar, remediar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad. Un "agente terapéutico" incluye, aunque no en sentido limitativo, moléculas pequeñas, péptidos, anticuerpos, ribozimas, y oligonucleótidos antisentido.

1. Procedimientos profilácticos

En un aspecto, la invención suministra un agente para uso en la prevención en un sujeto de una enfermedad o estado asociado con una expresión o actividad aberrante de la quinasa mediante la administración al sujeto de un agente que module la expresión de la quinasa o al menos una actividad del gen de la quinasa. Los sujetos con riesgo de enfermedad provocada o participada por una expresión o actividad aberrante de la quinasa pueden identificarse, por ejemplo, mediante cualquier combinación de pruebas de diagnóstico o pronóstico según aquí se describe. La administración de un agente profiláctico puede producirse antes de la manifestación de los síntomas característicos de una aberración de la quinasa, de manera que se evite la enfermedad o trastorno, o alternativamente se retrase su progresión. Dependiendo del tipo de aberración de la quinasa puede utilizarse, por ejemplo, un agente agonista de la quinasa o antagonista de la quinasa para el tratamiento del sujeto. El agente apropiado puede determinarse basándose en los ensayos de detección aquí descritos.

2. Procedimientos terapéuticos

Otro aspecto de la invención se refiere a un agente para uso en la modulación de la expresión o actividad de la quinasa para propósitos terapéuticos. El uso modulador de la invención comprende la puesta en contacto de una célula con un agente que module una o más de las actividades de la actividad de la proteína de quinasa asociada con la célula. Un agente que module la actividad de la proteína quinasa puede ser un agente como el aquí descrito, tal como un ácido nucleico o una proteína, un ligando consanguíneo de producción natural de una proteína de quinasa, un péptido,

un peptidomimético de la quinasa u otra molécula pequeña. En una realización, el agente estimula una o más de las actividades biológicas de la proteína de quinasa. Ejemplos de dichos agentes estimuladores incluyen la proteína de quinasa activa y una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de quinasa que ha sido introducido en la célula. En otra realización, el agente inhibe una o más de las actividades biológicas de la proteína de quinasa. Ejemplos de dichos agentes inhibidores incluyen moléculas de ácido nucleico antisentido de quinasa y anticuerpos anti-quinasa.

Estos procedimientos moduladores pueden realizarse *in vitro* (por ejemplo, cultivando la célula con el agente) o, alternativamente, *in vivo* (por ejemplo, administrado el agente a un sujeto). Como tal, la presente invención suministra un agente para uso en el tratamiento de un individuo afectado por una enfermedad o afección caracterizada por la expresión o la actividad aberrante de una proteína o una molécula de ácido nucleico de quinasa. En una realización, el uso comprende la administración de un agente (por ejemplo, un agente identificado por un ensayo de detección aquí descrito) o una combinación de agentes que module (por ejemplo, que aumente o que reduzca) la expresión o actividad de la quinasa. Otra realización comprende una proteína o una molécula de ácido nucleico de quinasa para uso como terapia para compensar la expresión o actividad aberrante o reducida de la quinasa.

La estimulación de la actividad de la quinasa es deseable en situaciones en la cuales una proteína de quinasa está anormalmente reducida y/o en las que una actividad incrementada de la quinasa probablemente tendrá un efecto beneficioso. A la inversa, la inhibición de la actividad de la proteína quinasa es deseable en situaciones en las cuales la actividad de la quinasa está anormalmente aumentada y/o en las que una actividad reducida de la quinasa probablemente tendrá un efecto beneficioso.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria técnica son indicativas del nivel de los expertos en la materia a la cual pertenece esta invención.

Aunque la anterior invención se ha descrito con algún detalle por medio de ilustraciones y ejemplos para propósitos de mayor claridad y mejor comprensión, será obvio que pueden practicarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Aquellos expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de establecer, utilizando nada más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones aquí descritas específicas de la invención. Dichos equivalentes están destinados a ser incluidos por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica una proteína quinasa seleccionada entre:

- a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 1, o el inserto de ADNc del plásmido depositado con ATCC como Accession Number PTA-1775;
- b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO: 2; y
- c) el complemento de a).

2. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 1, que se selecciona entre:

- a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 1, o el inserto de ADNc del plásmido depositado con ATCC como Accession Number PTA-1775 o su complemento; y
- b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO: 2.

3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, que además comprende secuencias de ácido nucleico de vectores.

4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, que además comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido heterólogo.

5. Una célula anfitriona que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

6. La célula anfitriona de la reivindicación 5 que es una célula anfitriona de mamífero.

7. La célula anfitriona de la reivindicación 5 que es una célula anfitriona de mamífero no humano.

8. Un polipéptido aislado que tiene actividad de proteína quinasa seleccionado entre:

- a) un polipéptido que está codificado por una molécula de ácido nucleico que consta de la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 1 o del inserto de ADNc del plásmido depositado con ATCC como Accession Number PTA-1775; y
- b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO: 2.

9. El polipéptido aislado de la reivindicación 8 que está codificado por la molécula de ácido nucleico que consta de la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 1 o del inserto de ADNc del plásmido depositado con ATCC como Accession Number PTA-1775.

10. El polipéptido aislado de la reivindicación 8 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO: 2.

11. El polipéptido de la reivindicación 8 que comprende además secuencias de aminoácidos heterólogos.

12. Un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido que consta de la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO: 2.

13. Un procedimiento para producir un polipéptido que tiene actividad de proteína quinasa, seleccionándose el polipéptido entre:

- a) un polipéptido que está codificado por una molécula de ácido nucleico que consta de la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 1 o del inserto de ADNc del plásmido depositado con ATCC como Accession Number PTA-1775; y
- b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO: 2; que comprende el cultivo de la célula anfitriona de la reivindicación 7 bajo condiciones en las que se exprese una molécula de ácido nucleico que codifique dicho polipéptido.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 en el que dicho polipéptido está codificado por la molécula de ácido nucleico que consta de la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 1 o del inserto de ADNc del plásmido depositado con ATCC como Accession Number PTA-1775.

15. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO: 2.

16. Un procedimiento para detectar la presencia de un polipéptido de la reivindicación 8 en una muestra, que comprende:

a) el contacto de la muestra con un anticuerpo de la reivindicación 12; y

b) la determinación de si el anticuerpo se une con el polipéptido en la muestra.

17. Un equipo para llevar a cabo el procedimiento de la reivindicación 16 que comprende el anticuerpo de la reivindicación 12 e instrucciones para su uso.

18. Un procedimiento para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 en una muestra, que comprende los pasos de:

a) poner en contacto la muestra con una sonda o un iniciador de ácido nucleico que se hibridice selectivamente con la molécula de ácido nucleico; y

b) determinar si la sonda o el iniciador de ácido nucleico se une a una molécula de ácido nucleico en la muestra.

19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la muestra comprende moléculas de ARNm y se pone en contacto con una sonda de ácido nucleico.

20. Un procedimiento para identificar un compuesto que se une a un polipéptido de la reivindicación 8 que comprende los pasos de:

a) poner en contacto un polipéptido o una célula que exprese un polipéptido de la reivindicación 8 con un compuesto de ensayo; y

b) determinar si el polipéptido se une al compuesto de ensayo.

21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que la unión del compuesto de ensayo con el polipéptido se detecta mediante un procedimiento seleccionado entre:

a) la detección de la unión detectando directamente la unión del compuesto de ensayo/el polipéptido; y

b) la detección de la unión usando un ensayo de unión de competición.

22. Un procedimiento para identificar un compuesto que module la actividad de un polipéptido de la reivindicación 8 que comprende:

a) poner en contacto un polipéptido de la reivindicación 8 con un compuesto de ensayo; y

b) determinar el efecto del compuesto de ensayo sobre la actividad del polipéptido para identificar así un compuesto que modula la actividad del polipéptido.

23. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento del cáncer de colon.

24. Una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer de colon.

25. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento del cáncer de colon.

ES 2 327 815 T3

Archivo de entrada Fbh18477bl. Sec; Archivo de salida 18477. trans
Longitud de secuencia 3003

	M	D	P	T	A	G	S	
GGCTGCTCGCGGAGGGGAGTGTACGCGGGCCGCTGTAGGCTGTCCAGCG	ATG	GAT	CCC	ACC	GCG	GGA	AGC	21
K K E P G G G A A T E E G V N R I A V P								27
AAG AAG GAG CCT GGA GGA GGC GCG GCG ACT GAG GAG GGC GTF AAT AGG ATC GCA GTG CCA								81
K P P S I E E F S I V K P I S R G A F G								47
AAA CCG CCC TCC ATT GAG GAA TTC AGC ATA GTG AAG CCC ATT AGC CGG GGC GCC TTC GGG								141
K V Y L G Q K G G K L Y A V K V V K K A								67
AAA GTG TAT CTG GGG CAG AAA GGC GGC AAA TTG TAT GCA GTA AAG GTT GTT AAA AAA GCA								201
D M I N K N M T H Q V Q H E R D A L A L								87
GAC ATG ATC AAC AAA AAT ATG ACT CAT CAG GTC CAA GCT GAG AGA GAT GCA CTG GCA CTA								261
S K S P F I V H L Y Y S L Q S A N N V Y								107
AGC AAA AGC CCA TTC ATT GTC CAT TTG TAT TAT TCA CTG CAG TCT GCA AAC AAT GTC TAC								321
L V M E Y L I G G D V K S L L H I Y G Y								127
TTG GTA ATG GAA TAT CTT ATT GGG GGA GAT GTC AAG TCT CTC CTA CAT ATA TAT GGT TAT								381
F D E E M A V K Y I S E V A L A L D Y L								147
TTT GAT GAA GAG ATG GCT GTG AAA TAT ATT TCT GAA GTA GCA CTG GCT GTA GAC TAC CTT								441
H R H G I I H R D L K P D N M L I S N E								167
CAC AGA CAT GGA ATC ATC CAC AGG GAC TTG AAA CCG GAC AAT ATG CTT ATT TCT AAT GAG								501
G H I K L T D F G L S K V T L N R D I N								187
GGT CAT ATT AAA CTG ACG GAT TTT GGC CTT TCA AAA GTT ACT TTG AAT AGA GAT ATT AAT								561
M M D I L T T P S M A K P R Q D Y S R T								207
ATG ATG GAT ATC CTT ACA ACA CCA TCA ATG GCA AAA CCT AGA CAA GAT TAT TCA AGA ACC								621
P G Q V L S L I S S L G F N T P I A E K								227
CCA GGA CAA GTG TTA TCG CTT ATC AGC TCG TTG GAA TTT AAC ACA CCA ATT GCA GAA AAA								681
N Q D P A N I L S A C L S E T S Q L S Q								247
AAT CAA GAC CCT GCA AAC ATC CTT TCA GCC TGT CTG TCT GAA ACA TCA CAG CTT TCT CAA								741
G L V C P M S V D Q K D T T P Y S S K L								267
GGA CTC GTA TGC CCT ATG TCT GTA GAT CAA AAG GAC ACT ACG CCT TAT TCT AGC AAA TTA								801
L K S C L E T V A S N P G M P V K C L T								287
CTA AAA TCA TGT CTT GAA ACA GTT GCC TCC AAC CCA GGA ATG CCT GTG AAG TGT CTA ACT								861
S N L L Q S R K R L A T S S A S S Q S H								307
TCT AAT TTA CTC CAG TCT AGG AAA AGG CTG GCC ACA TCC AGT GCC AGT AGT CAA TCC CAC								921
T F I S S V E S E C H S S P K W E K D C								327
ACC TCC ATA TCC AGT GTG GAA TCA GAA TGC CAC AGC AGT CCC AAA TGG GAA AAA GAT TGC								981
Q E S D E A L G P T M M S V N A V E K L								347
CAG GAA AGT GAT GAA GCA TTG GGC CCA ACA ATG ATG AGT TGG AAT GCA GTT GAA AAG TTA								1041
C A K S A N A I E T K G F N K K D L E L								347
TGC GCA AAA TCT GCA AAT GCC ATT GAG ACG AAA GGT TTC AAT AAA AAG GAT CTG GAG TTA								1047
A L S P I H N S S A L P T T G R S C V N								387

FIG. 1A.

ES 2 327 815 T3

```

GCT CTT TCT CCC ATT CAT AAC AGC AGT GCC CTT CCC ACC ACT GGA CGC TCT TGT GTA AAC 1161
L A K K C F S G E V S W E A V E L D V N 407
CTT GCT AAA AAA TGC TTC TCT GGG GAA GTT TCT TGG GAA GCA GTA GAA CTG GAT GTA AAT 1221
N I N M D T D T S Q L G F H Q S N Q W A 427
AAT ATA AAT ATG GAC ACT GAC ACA AGT CAG TTA GGT TTC CAT CAG TCA AAT CAG TGG GCT 1281
V D S G G I S E E H L G K R S L K R N F 447
GTG GAT TCT GGT GGG ATA TCT GAA GAG CAC CTT GGG AAA AGA AGT TTA AAA AGA AAT TTT 1341
E L V D S S P C K K I I Q N K K T C V E 467
GAG TTG GTT GAC TCC AGT CCT TGT AAA AAA ATT ATA CAG AAT AAA AAA ACT TGT GTA GAG 1401
Y K H N E M T N C Y T N Q N T G L T V E 487
TAT AAG CAT AAC GAA ATG ACA AAT TGT TAT ACA AAT CAA AAT ACA GGC TTA ACA GTT GAA 1461
V Q D L K L S V H K S Q Q N D C A N K E 507
GTG CAG GAC CTT AAG CTA TCA GTG CAC AAA AGT CAA CAA AAT GAC TGT GCT AAT AAG GAG 1521
N I V N S F T D K Q Q T P E K L P I P M 527
AAC ATT GTC AAT TCT TTT ACT GAT AAA CAA CAA ACA CCA GAA AAA TTA CCT ATA CCA ATG 1581
I A K N L M C E L D E D C E K N S K R D 547
AAC ATT GTC AAT TCT TTT ACT GAT AAA CAA CAA ACA CCA GAA AAA TTA CCT ATA CCA ATG 1641
Y L S S S F L C S D D D R A S K N I S M 567
TAC TTA AGT TCT AGT TTT CTA TGT TCT GAT GAT GAT AGA GCT TCT AAA AAT ATT TCT ATG 1701
N S D S S F P G I S I M E S P L E S Q P 587
AAC TCT GAT TCA TCT TTT CCT GGA ATT TCT ATA ATG GAA AGT CCA TTA GAA AGT CAG CCC 1761
L D S D R S I K E S S F E E S N I E D P 607
TTA GAT TCA GAT AGA AGC ATT AAA GAA TCC TCT TTT GAA GAA TCA AAT ATT GAA GAT CCA 1821
L I V T P D C Q E K T S P K G V E N P A 627
CTT ATT GTA ACA CCA GAT TGC CAA GAA AAG ACC TCA CCA AAA GGT GTC GAG AAC CCT GCT 1881
V Q E S N Q K M L G P P L E V L K T L A 647
GTA CAA GAG AGT AAC CAA AAA ATG TTA GGT CCT CCT TTG GAG GTG CTG AAA ACG TTA GCC 1941
S K R N A V A F R S F N S H I N A S N N 667
TCT AAA AGA AAT GCT GTT GCT TTT CGA AGT TTT AAC AGT CAT ATT AAT GCA TCC AAT AAC 2001
S E P S R M N M T S L D A M D I S C A Y 687
TCA GAA CCA TCC AGA ATG AAC ATG ACT TCT TTA GAT GCA ATG GAT ATT TCG TGT GCC TAC 2061
S G S Y P M A I T P T Q K R R S C M P H 707
AGT GGT ACT TAT CCC ATG GCT ATA ACC CCT ACT CAA AAA AGA AGA TCC TGT ATG CCA CAT 2121
Q Q T P N Q I K S G T P Y R T P K S V R 727
CAG CAG ACC CCA AAT CAG ATC AAG TCG GGA ACT CCA TAC CGA ACT CCG AAG AGT GTG AGA 2181
R G V A P V D D G R I L G T P D Y L A P 747
AGA GGG GTG GCC CCC GTT GAT GAT GGG CGA ATT CTA GGA ACC CCA GAC TAC CTT GCA CCT 2241
E L L L G R A H G P A V D V W A L G V C 767
GAG CTG TTA CTA GGC AGG GCC CAT GGT CCT GCG GTA GAC TGG TGG GCA CTT GGA GTT TGC 2301
L F E F L T G I P P F N D E T P Q Q V F 787
TTG TTT GAA TTT CTA ACA GGA ATT CCC CCT TTC AAT GAT GAA ACA CCA CAA CAA GTA TTC 2361

```

FIG. 1B.

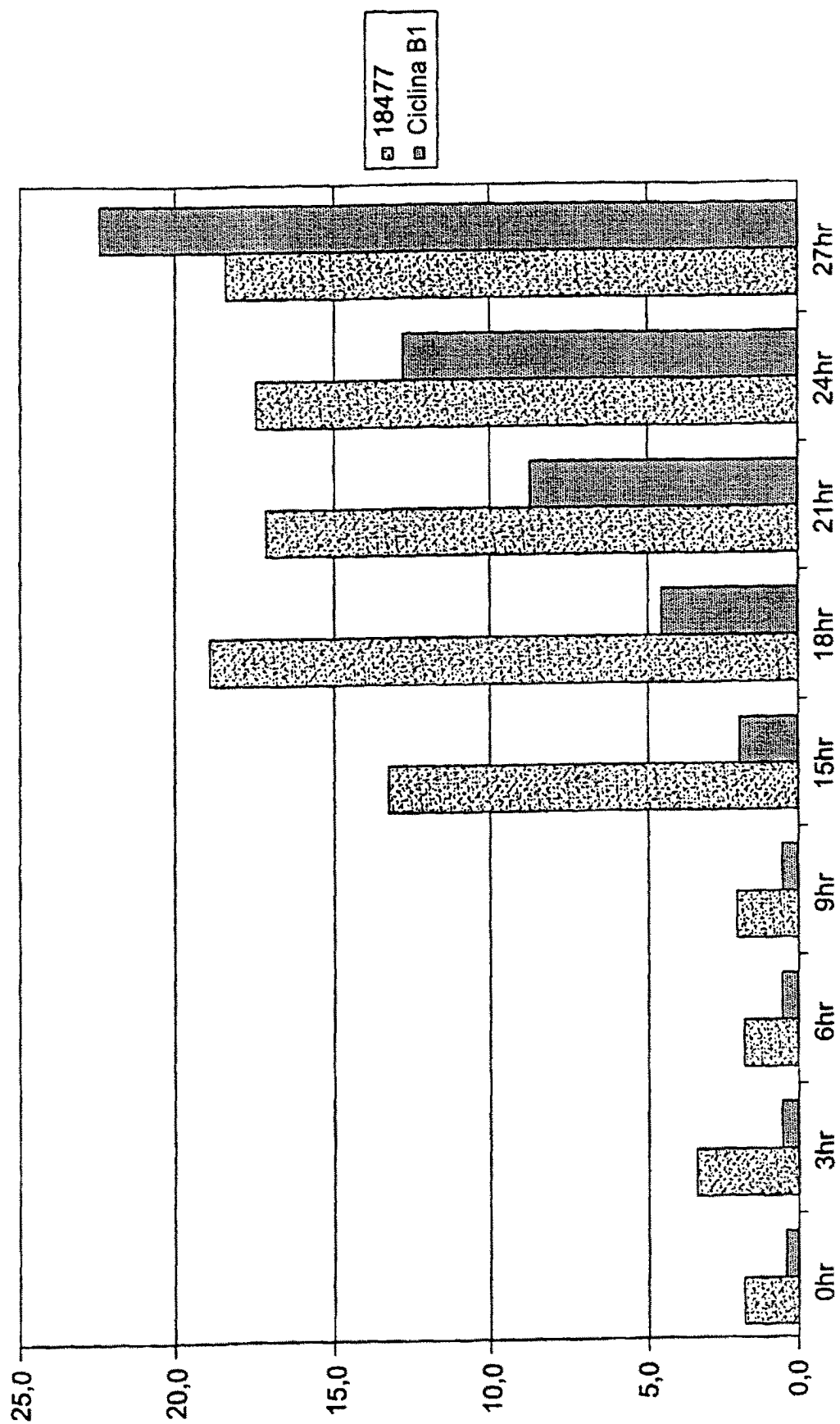
Q N I L K R D I P W P E G E E K L S D N	807
CAG AAT ATT CTG AAA AGA GAT ATC CCT TGG CCA GAA GGT GAA GAA AAG TTA TCT GAT AAT	2421
A Q S A V E I L L T I D D T K R A G M K	827
GCT CAA AGT GCA GTA GAA ATA CTT TTA ACC ATT GAT GAT ACA AAG AGA GCT GGA ATG AAA	2481
E L K R H P L F S D V D W E N L Q H Q T	847
GAG CTA AAA CGT CAT CCT CTC TTC AGT GAT GTG GAC TGG GAA AAT CTG CAG CAT CAG ACT	2541
M P F I P Q P D D E T D T S Y F E A R N	867
ATG CCT TTC ATC CCC CAG CCA GAT GAT GAA ACA GAT ACC TCC TAT TTT GAA GCC AGG AAT	2601
T A Q H L T V S G F S L *	880
ACT GCT CAG CAC CTG ACC GTA TCT GGA TTT AGT CTG TAG	2640

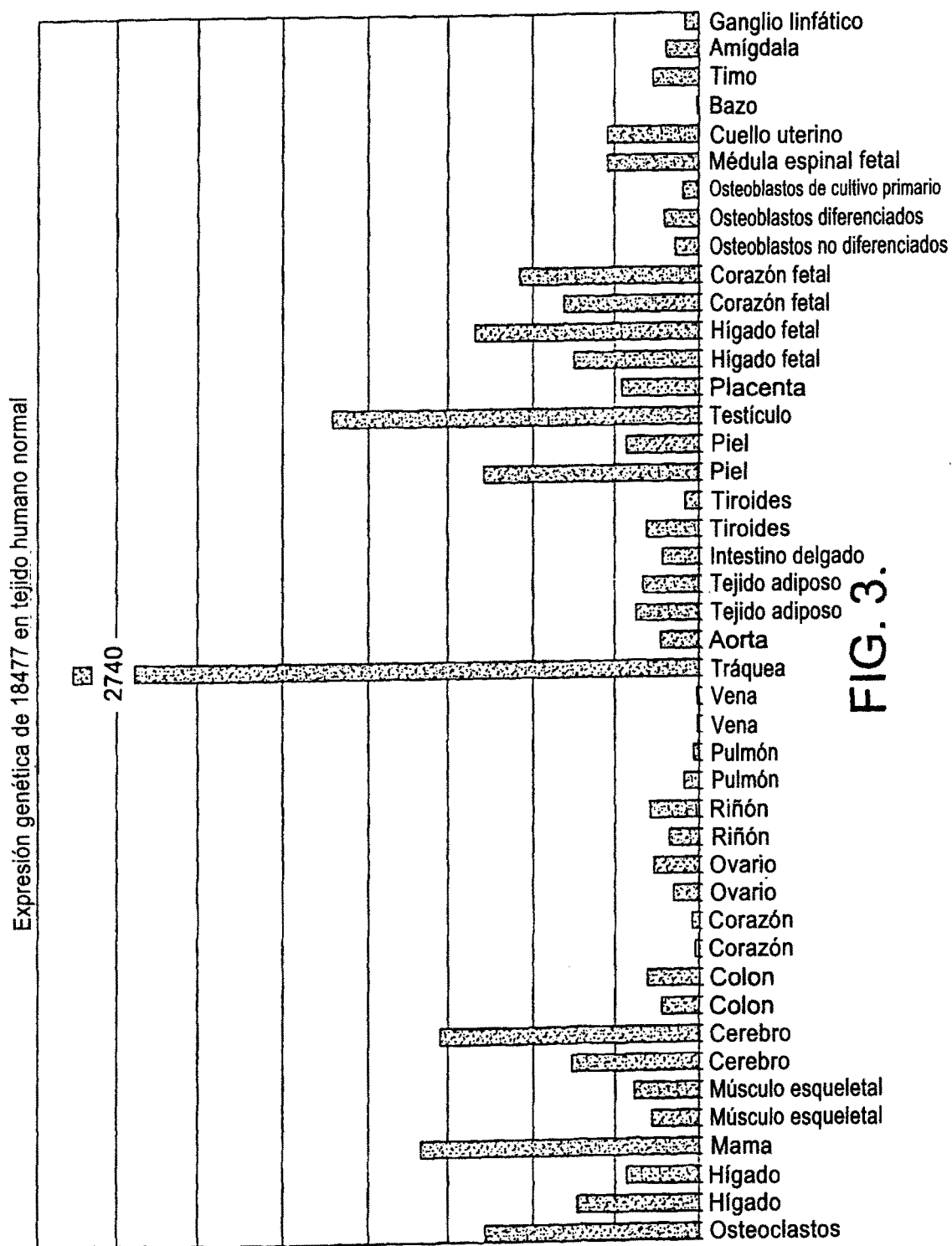
CACAAAAATTTTCCTTTTAGTCTAGCCTCGTGTATAGAATGAACTTGCATAATTATATACTCCTTAATACTAGATTGA
TCTAAGGGGGAAAGATCATTATTTAACCTAGTTCAATGTGCTTTTAATGTACGTTACAGCTTTCACAGAGTTAAAGGC
TGAAAGGAATATAGTCAGTAATTTATCTTAACCTCAAACTGTATATAAATCTTCAAAGCTTTTTTCATCTATTTATT
TGTTTATTGCACTTTATGAAAAGTGAAGCATCAATAAAATTAGAGGACACTATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIG. 1C.

FIG. 2.

Expresión de 18477 y ciclina B1 en células WI-38 sincronizadas





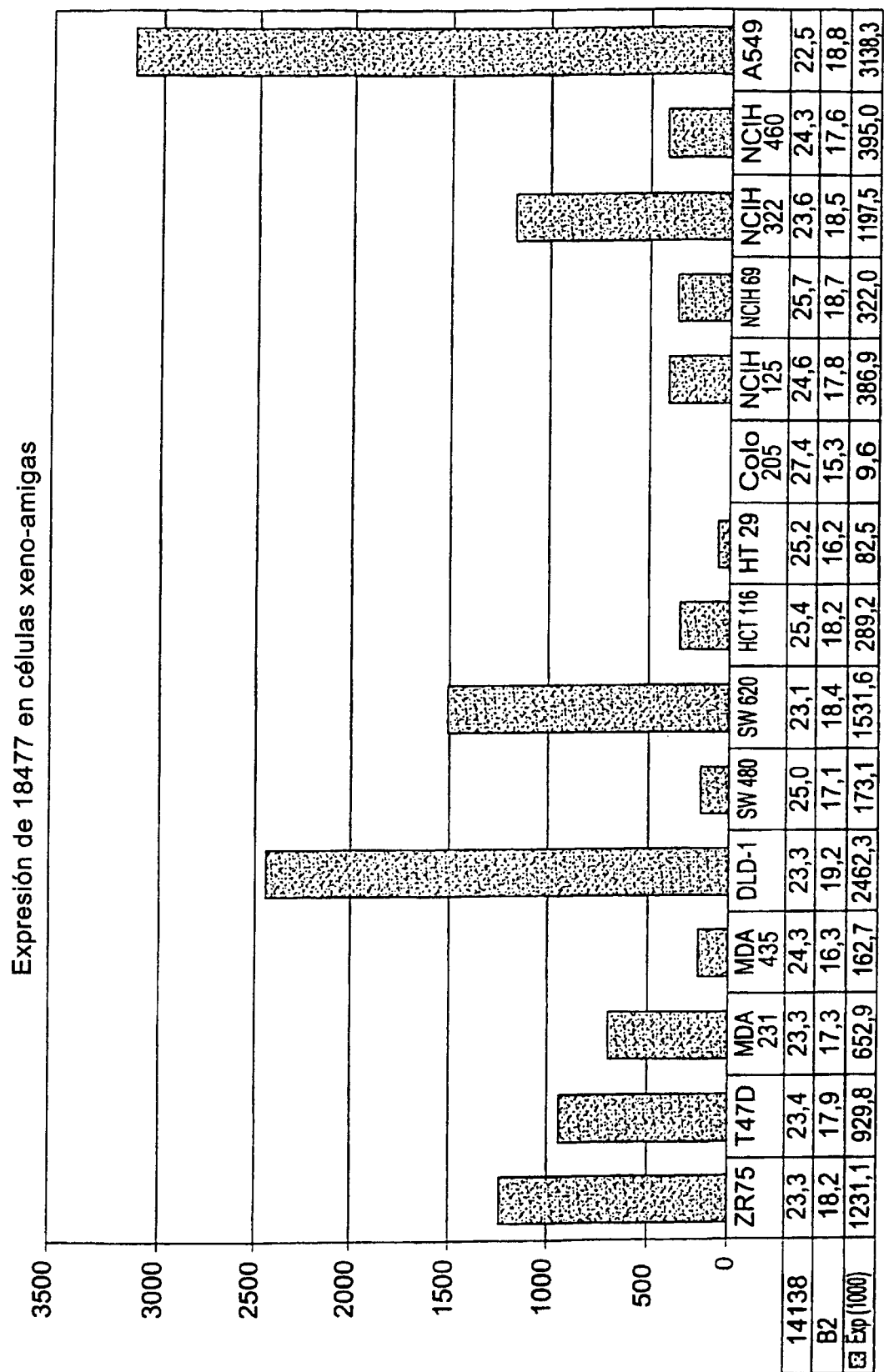


FIG. 4.

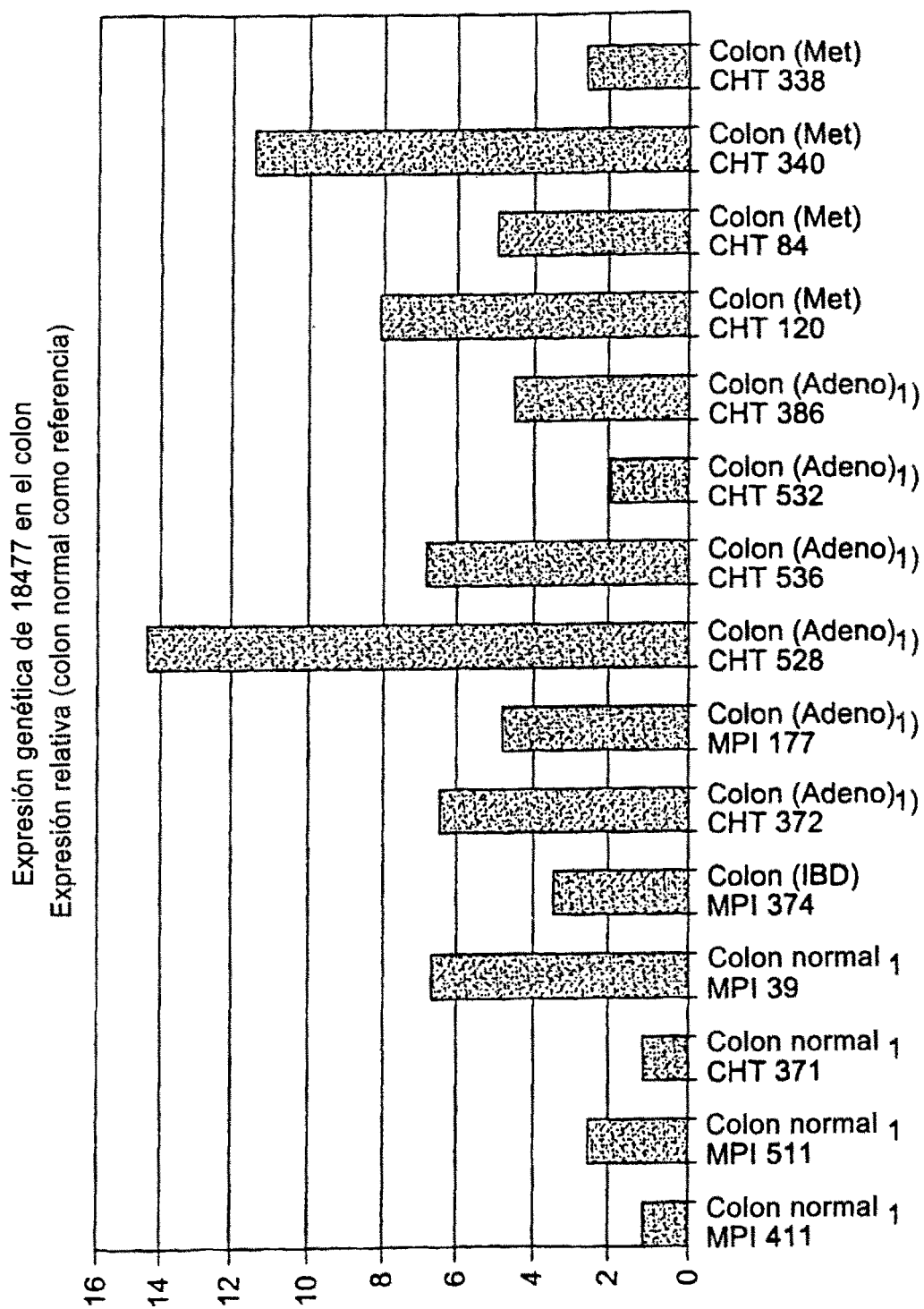


FIG. 5A.

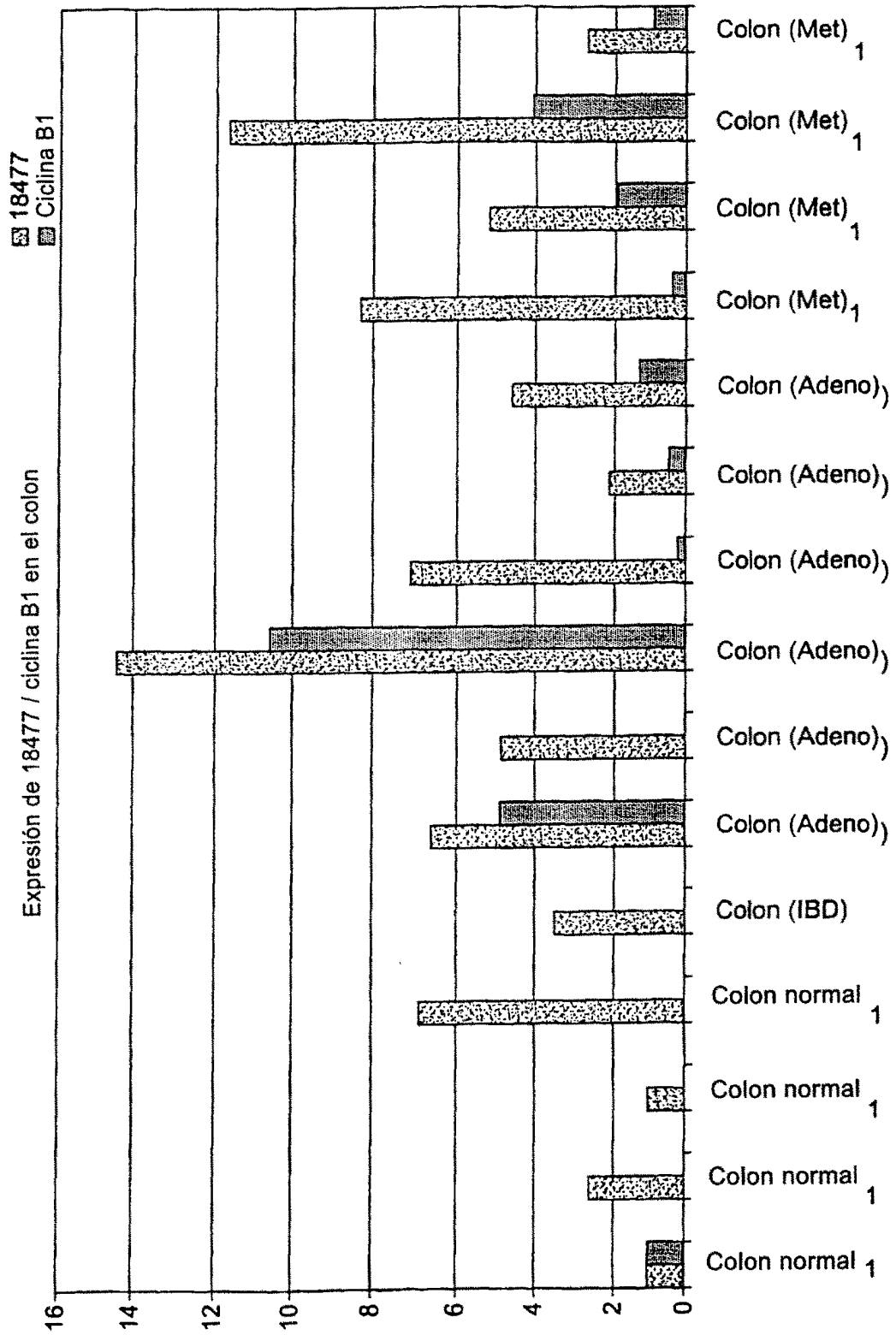


FIG. 5B.

PSORT Predicción de localización de proteínas

MITDISC: discriminación de secuencias diana mitocondriales

Contenido R :	0	Momento Hid (75):	8,63
Momento Hid (95):	1,01	Contenido G :	1
Contenido D/E :	2	Contenido de S/T :	2
Puntuación:	-7,17		

"Gavel" Predicción de sitios de escisión para presecuencias mitocondriales de corte no encontradas

NUCDISC: discriminación de señales de localización nuclear

pat4: ninguna
 pat7: PTQKRRS (4) en 697
 bipartita: ninguna
 contenido de residuos básicos: 10,6%
 Puntuación NLS : -0,13

Resultados finales (K = 9/23)

91,3 %: nuclear
 8,7 %: citoplásmica

la predicación para 18477 es nuc (k = 23)

Inicio	Fin	Característica	Secuencia
522	525	VAC: Posible motivo de diana vacuolar	KLPI

FIG. 6.

ES 2 327 815 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Meyers, Rachel
Kapeller-Libermann, Rosanna
5 Rory, A.J. Curtis
Williamson, Mark

<120> 18477, PROTEÍNA QUINASA HUMANA Y USOS DE LA MISMA
10
<130> 35800/208928

<160> 6
15
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
20 <211> 3864
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

25 <220>
<221> CDS
<222> (913) ... (3552)

30 <221> misc_feature
<222> (1) ... (3864)
<223> n = A, T, C o G

35 <400> 1

40 ggtcttttagc tgnntttttaa ggggagaaca gcctttaccc tctttggact ttttcttcgt
60
tttttttttt tttggagacg gagtttcggt ctttcgccca ggctggcgta cagtggcgcg
120
atctcggtc actgcaacct ctgctccccg ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc
180
45 ggagtagctg ggattacagg tgcccgccac cacgcccggc tgatttcctc ttaagacttt
240
ctacagcttc cttatgaaat cttctgactg ggccttgagc aataaggtct tttgctacaa
300
tttagtgctc ttttcctcac actaaatcga aaactctccc tgttggctcct gatctgtttc
360
50 agtcaggcaa attacatcct gggaaaacgt cagatgacag gggaggccac tcgcttcctg
420
ctcatccagt ttcgacactt tctgtgcttt cattagcttc cagacctcag ccctggcccy
480
55 cgctttactg tacagtcaga actgggtttct acgcctcgcg aggggtgggag gtcgtgtatg
540
ggaggaggac cgcttcccac cagcctcggt ggggaagccag gagaaatctc ttcaaactcct
600
gcgattcaga gtcaagtccc agtcgccctt ttctggtcgg ctcagaactg tttgtgcctc
660
60 ctccctcatg aggaatgatg tcagtggggc cgcggtcgcc gccacgaag agtgtaaggc
720
tgcgaagtgc gggctttccc ggcgccccct ccgtccgct ctgcgtaggg gaggtgacga
780
65 gggcggggcg cggcgggcggg gtgacgtcac ggccgcgcgc ggcgtgggcg gagcctcact
840

ES 2 327 815 T3

```

ttgaacccag ttggcgggaa ttgctgctcg cggaggggca gtgtacgcgg ggccgctgta
900
ggctgtccag cg atg gat ccc acc gcg gga agc aag aag gag cct gga gga
5 951
          Met Asp Pro Thr Ala Gly Ser Lys Lys Glu Pro Gly Gly
          1          5          10

ggc gcg gcg act gag gag ggc gtg aat agg atc gca gtg cca aaa ccg
10 999
Gly Ala Ala Thr Glu Glu Gly Val Asn Arg Ile Ala Val Pro Lys Pro
    15          20          25

ccc tcc att gag gaa ttc agc ata gtg aag ccc att agc cgg ggc gcc
15 1047
Pro Ser Ile Glu Glu Phe Ser Ile Val Lys Pro Ile Ser Arg Gly Ala
    30          35          40          45

ttc ggg aaa gtg tat ctg ggg cag aaa ggc ggc aaa ttg tat gca gta
20 1095
Phe Gly Lys Val Tyr Leu Gly Gln Lys Gly Gly Lys Leu Tyr Ala Val
    50          55          60

aag gtt gtt aaa aaa gca gac atg atc aac aaa aat atg act cat cag
25 1143
Lys Val Val Lys Lys Ala Asp Met Ile Asn Lys Asn Met Thr His Gln
    65          70          75

gtc caa gct gag aga gat gca ctg gca cta agc aaa agc cca ttc att
30 1191
Val Gln Ala Glu Arg Asp Ala Leu Ala Leu Ser Lys Ser Pro Phe Ile
    80          85          90

gtc cat ttg tat tat tca ctg cag tct gca aac aat gtc tac ttg gta
35 1239
Val His Leu Tyr Tyr Ser Leu Gln Ser Ala Asn Asn Val Tyr Leu Val
    95          100          105

atg gaa tat ctt att ggg gga gat gtc aag tct ctc cta cat ata tat
40 1287
Met Glu Tyr Leu Ile Gly Gly Asp Val Lys Ser Leu Leu His Ile Tyr
    110          115          120          125

ggg tat ttt gat gaa gag atg gct gtg aaa tat att tct gaa gta gca
45 1335
Gly Tyr Phe Asp Glu Glu Met Ala Val Lys Tyr Ile Ser Glu Val Ala
    130          135          140

ctg gct cta gac tac ctt cac aga cat gga atc atc cac agg gac ttg
50 1383
Leu Ala Leu Asp Tyr Leu His Arg His Gly Ile Ile His Arg Asp Leu
    145          150          155

aaa ccg gac aat atg ctt att tct aat gag ggt cat att aaa ctg acg
55 1431
Lys Pro Asp Asn Met Leu Ile Ser Asn Glu Gly His Ile Lys Leu Thr
    160          165          170

gat ttt ggc ctt tca aaa gtt act ttg aat aga gat att aat atg atg
60 1479
Asp Phe Gly Leu Ser Lys Val Thr Leu Asn Arg Asp Ile Asn Met Met
65

```

ES 2 327 815 T3

	175	180	185
5	gat atc ctt aca aca cca tca atg gca aaa cct aga caa gat tat tca 1527 Asp Ile Leu Thr Thr Pro Ser Met Ala Lys Pro Arg Gln Asp Tyr Ser 190 195 200 205		
10	aga acc cca gga caa gtg tta tcg ctt atc agc tcg ttg gga ttt aac 1575 Arg Thr Pro Gly Gln Val Leu Ser Leu Ile Ser Ser Leu Gly Phe Asn 210 215 220		
15	aca cca att gca gaa aaa aat caa gac cct gca aac atc ctt tca gcc 1623 Thr Pro Ile Ala Glu Lys Asn Gln Asp Pro Ala Asn Ile Leu Ser Ala 225 230 235		
20	tgt ctg tct gaa aca tca cag ctt tct caa gga ctc gta tgc cct atg 1671 Cys Leu Ser Glu Thr Ser Gln Leu Ser Gln Gly Leu Val Cys Pro Met 240 245 250		
25	tct gta gat caa aag gac act acg cct tat tct agc aaa tta cta aaa 1719 Ser Val Asp Gln Lys Asp Thr Thr Pro Tyr Ser Ser Lys Leu Leu Lys 255 260 265		
30	tca tgt ctt gaa aca gtt gcc tcc aac cca gga atg cct gtg aag tgt 1767 Ser Cys Leu Glu Thr Val Ala Ser Asn Pro Gly Met Pro Val Lys Cys 270 275 280 285		
35	cta act tct aat tta ctc cag tct agg aaa agg ctg gcc aca tcc agt 1815 Leu Thr Ser Asn Leu Leu Gln Ser Arg Lys Arg Leu Ala Thr Ser Ser 290 295 300		
40	gcc agt agt caa tcc cac acc ttc ata tcc agt gtg gaa tca gaa tgc 1863 Ala Ser Ser Gln Ser His Thr Phe Ile Ser Ser Val Glu Ser Glu Cys 305 310 315		
45	cac agc agt ccc aaa tgg gaa aaa gat tgc cag gaa agt gat gaa gca 1911 His Ser Ser Pro Lys Trp Glu Lys Asp Cys Gln Glu Ser Asp Glu Ala 320 325 330		
50	ttg ggc cca aca atg atg agt tgg aat gca gtt gaa aag tta tgc gca 1959 Leu Gly Pro Thr Met Met Ser Trp Asn Ala Val Glu Lys Leu Cys Ala 335 340 345		
55	aaa tct gca aat gcc att gag acg aaa ggt ttc aat aaa aag gat ctg 2007 Lys Ser Ala Asn Ala Ile Glu Thr Lys Gly Phe Asn Lys Lys Asp Leu 350 355 360 365		
60	gag tta gct ctt tct ccc att cat aac agc agt gcc ctt ccc acc act 2055 Glu Leu Ala Leu Ser Pro Ile His Asn Ser Ser Ala Leu Pro Thr Thr		
65			

ES 2 327 815 T3

	370	375	380
5	gga cgc tct tgt gta aac ctt gct aaa aaa tgc ttc tct ggg gaa gtt 2103 Gly Arg Ser Cys Val Asn Leu Ala Lys Lys Cys Phe Ser Gly Glu Val 385 390 395		
10	tct tgg gaa gca gta gaa ctg gat gta aat aat ata aat atg gac act 2151 Ser Trp Glu Ala Val Glu Leu Asp Val Asn Asn Ile Asn Met Asp Thr 400 405 410		
15	gac aca agt cag tta ggt ttc cat cag tca aat cag tgg gct gtg gat 2199 Asp Thr Ser Gln Leu Gly Phe His Gln Ser Asn Gln Trp Ala Val Asp 415 420 425		
20	tct ggt ggg ata tct gaa gag cac ctt ggg aaa aga agt tta aaa aga 2247 Ser Gly Gly Ile Ser Glu Glu His Leu Gly Lys Arg Ser Leu Lys Arg 430 435 440 445		
25	aat ttt gag ttg gtt gac tcc agt cct tgt aaa aaa att ata cag aat 2295 Asn Phe Glu Leu Val Asp Ser Ser Pro Cys Lys Lys Ile Ile Gln Asn 450 455 460		
30	aaa aaa act tgt gta gag tat aag cat aac gaa atg aca aat tgt tat 2343 Lys Lys Thr Cys Val Glu Tyr Lys His Asn Glu Met Thr Asn Cys Tyr 465 470 475		
35	aca aat caa aat aca ggc tta aca gtt gaa gtg cag gac ctt aag cta 2391 Thr Asn Gln Asn Thr Gly Leu Thr Val Glu Val Gln Asp Leu Lys Leu 480 485 490		
40	tca gtg cac aaa agt caa caa aat gac tgt gct aat aag gag aac att 2439 Ser Val His Lys Ser Gln Gln Asn Asp Cys Ala Asn Lys Glu Asn Ile 495 500 505		
45	gtc aat tct ttt act gat aaa caa caa aca cca gaa aaa tta cct ata 2487 Val Asn Ser Phe Thr Asp Lys Gln Gln Thr Pro Glu Lys Leu Pro Ile 510 515 520 525		
50	cca atg ata gca aaa aac ctt atg tgt gaa ctc gat gaa gac tgt gaa 2535 Pro Met Ile Ala Lys Asn Leu Met Cys Glu Leu Asp Glu Asp Cys Glu 530 535 540		
55	aag aat agt aag agg gac tac tta agt tct agt ttt cta tgt tct gat 2583 Lys Asn Ser Lys Arg Asp Tyr Leu Ser Ser Ser Phe Leu Cys Ser Asp 545 550 555		
60	gat gat aga gct tct aaa aat att tct atg aac tct gat tca tct ttt 2631 Asp Asp Arg Ala Ser Lys Asn Ile Ser Met Asn Ser Asp Ser Ser Phe		
65			

ES 2 327 815 T3

	560	565	570
5	cct gga att tct ata atg gaa agt cca tta gaa agt cag ccc tta gat 2679 Pro Gly Ile Ser Ile Met Glu Ser Pro Leu Glu Ser Gln Pro Leu Asp 575 580 585		
10	tca gat aga agc att aaa gaa tcc tct ttt gaa gaa tca aat att gaa 2727 Ser Asp Arg Ser Ile Lys Glu Ser Ser Phe Glu Glu Ser Asn Ile Glu 590 595 600 605		
15	gat cca ctt att gta aca cca gat tgc caa gaa aag acc tca cca aaa 2775 Asp Pro Leu Ile Val Thr Pro Asp Cys Gln Glu Lys Thr Ser Pro Lys 610 615 620		
20	ggt gtc gag aac cct gct gta caa gag agt aac caa aaa atg tta ggt 2823 Gly Val Glu Asn Pro Ala Val Gln Glu Ser Asn Gln Lys Met Leu Gly 625 630 635		
25	cct cct ttg gag gtg ctg aaa acg tta gcc tct aaa aga aat gct gtt 2871 Pro Pro Leu Glu Val Leu Lys Thr Leu Ala Ser Lys Arg Asn Ala Val 640 645 650		
30	gct ttt cga agt ttt aac agt cat att aat gca tcc aat aac tca gaa 2919 Ala Phe Arg Ser Phe Asn Ser His Ile Asn Ala Ser Asn Asn Ser Glu 655 660 665		
35	cca tcc aga atg aac atg act tct tta gat gca atg gat att tcg tgt 2967 Pro Ser Arg Met Asn Met Thr Ser Leu Asp Ala Met Asp Ile Ser Cys 670 675 680 685		
40	gcc tac agt ggt tca tat ccc atg gct ata acc cct act caa aaa aga 3015 Ala Tyr Ser Gly Ser Tyr Pro Met Ala Ile Thr Pro Thr Gln Lys Arg 690 695 700		
45	aga tcc tgt atg cca cat cag cag acc cca aat cag atc aag tcg gga 3063 Arg Ser Cys Met Pro His Gln Gln Thr Pro Asn Gln Ile Lys Ser Gly 705 710 715		
50	act cca tac cga act ccg aag agt gtg aga aga ggg gtg gcc ccc gtt 3111 Thr Pro Tyr Arg Thr Pro Lys Ser Val Arg Arg Gly Val Ala Pro Val 720 725 730		
55	gat gat ggg cga att cta gga acc cca gac tac ctt gca cct gag ctg 3159 Asp Asp Gly Arg Ile Leu Gly Thr Pro Asp Tyr Leu Ala Pro Glu Leu 735 740 745		
60	tta cta ggc agg gcc cat ggt cct gcg gta gac tgg tgg gca ctt gga 3207 Leu Leu Gly Arg Ala His Gly Pro Ala Val Asp Trp Trp Ala Leu Gly		
65			

ES 2 327 815 T3

```

750              755              760              765
5      gtt tgc ttg ttt gaa ttt cta aca gga att ccc cct ttc aat gat gaa
      3255
      Val Cys Leu Phe Glu Phe Leu Thr Gly Ile Pro Pro Phe Asn Asp Glu
              770              775              780
10     aca cca caa caa gta ttc cag aat att ctg aaa aga gat atc cct tgg
      3303
      Thr Pro Gln Gln Val Phe Gln Asn Ile Leu Lys Arg Asp Ile Pro Trp
              785              790              795
15     cca gaa ggt gaa gaa aag tta tct gat aat gct caa agt gca gta gaa
      3351
      Pro Glu Gly Glu Glu Lys Leu Ser Asp Asn Ala Gln Ser Ala Val Glu
              800              805              810
20     ata ctt tta acc att gat gat aca aag aga gct gga atg aaa gag cta
      3399
      Ile Leu Leu Thr Ile Asp Asp Thr Lys Arg Ala Gly Met Lys Glu Leu
              815              820              825
25     aaa cgt cat cct ctc ttc agt gat gtg gac tgg gaa aat ctg cag cat
      3447
      Lys Arg His Pro Leu Phe Ser Asp Val Asp Trp Glu Asn Leu Gln His
      830              835              840              845
30     cag act atg cct ttc atc ccc cag cca gat gat gaa aca gat acc tcc
      3495
      Gln Thr Met Pro Phe Ile Pro Gln Pro Asp Asp Glu Thr Asp Thr Ser
              850              855              860
35     tat ttt gaa gcc agg aat act gct cag cac ctg acc gta tct gga ttt
      3543
      Tyr Phe Glu Ala Arg Asn Thr Ala Gln His Leu Thr Val Ser Gly Phe
              865              870              875
40     agt ctg tag cacaaaaatt ttccttttag tctagcctcg tggtatagaa
      3592
      Ser Leu  *
45
      tgaacttgca taattatata ctccttaata ctagattgat ctaaggggga aagatcatta
      3652
      tttaacctag ttcaatgtgc ttttaatgta cgttacagct ttcacagagt taaaaggctg
      3712
      aaaggaatat agtcagtaat ttatcttaac ctcaaaactg tatataaatc ttcaaagctt
      3772
      ttttcattcta tttattttgt ttattgcact ttatgaaaac tgaagcatca ataaaattag
      3832
55     aggacactat tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa
      3864

60 <210> 2
    <211> 879
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
65

```

ES 2 327 815 T3

<400> 2

	Met	Asp	Pro	Thr	Ala	Gly	Ser	Lys	Lys	Glu	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala
	1				5					10					15	
5	Thr	Glu	Glu	Gly	Val	Asn	Arg	Ile	Ala	Val	Pro	Lys	Pro	Pro	Ser	Ile
				20					25					30		
	Glu	Glu	Phe	Ser	Ile	Val	Lys	Pro	Ile	Ser	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Lys
			35					40					45			
	Val	Tyr	Leu	Gly	Gln	Lys	Gly	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Val
10		50					55					60				
	Lys	Lys	Ala	Asp	Met	Ile	Asn	Lys	Asn	Met	Thr	His	Gln	Val	Gln	Ala
	65					70				75						80
	Glu	Arg	Asp	Ala	Leu	Ala	Leu	Ser	Lys	Ser	Pro	Phe	Ile	Val	His	Leu
					85					90					95	
15	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Gln	Ser	Ala	Asn	Asn	Val	Tyr	Leu	Val	Met	Glu	Tyr
				100					105					110		
	Leu	Ile	Gly	Gly	Asp	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Tyr	Gly	Tyr	Phe
			115					120					125			
	Asp	Glu	Glu	Met	Ala	Val	Lys	Tyr	Ile	Ser	Glu	Val	Ala	Leu	Ala	Leu
20		130					135					140				
	Asp	Tyr	Leu	His	Arg	His	Gly	Ile	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Asp
	145					150					155					160
	Asn	Met	Leu	Ile	Ser	Asn	Glu	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Thr	Asp	Phe	Gly
				165					170						175	
25	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Arg	Asp	Ile	Asn	Met	Met	Asp	Ile	Leu
				180					185					190		
	Thr	Thr	Pro	Ser	Met	Ala	Lys	Pro	Arg	Gln	Asp	Tyr	Ser	Arg	Thr	Pro
			195					200					205			
30	Gly	Gln	Val	Leu	Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Leu	Gly	Phe	Asn	Thr	Pro	Ile
		210					215					220				
	Ala	Glu	Lys	Asn	Gln	Asp	Pro	Ala	Asn	Ile	Leu	Ser	Ala	Cys	Leu	Ser
	225					230					235					240
	Glu	Thr	Ser	Gln	Leu	Ser	Gln	Gly	Leu	Val	Cys	Pro	Met	Ser	Val	Asp
35				245					250						255	
	Gln	Lys	Asp	Thr	Thr	Pro	Tyr	Ser	Ser	Lys	Leu	Leu	Lys	Ser	Cys	Leu
			260					265						270		
	Glu	Thr	Val	Ala	Ser	Asn	Pro	Gly	Met	Pro	Val	Lys	Cys	Leu	Thr	Ser
		275						280					285			
40	Asn	Leu	Leu	Gln	Ser	Arg	Lys	Arg	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser
		290					295					300				
	Gln	Ser	His	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Cys	His	Ser	Ser
	305					310					315					320
	Pro	Lys	Trp	Glu	Lys	Asp	Cys	Gln	Glu	Ser	Asp	Glu	Ala	Leu	Gly	Pro
45				325						330					335	
	Thr	Met	Met	Ser	Trp	Asn	Ala	Val	Glu	Lys	Leu	Cys	Ala	Lys	Ser	Ala
			340					345						350		
	Asn	Ala	Ile	Glu	Thr	Lys	Gly	Phe	Asn	Lys	Lys	Asp	Leu	Glu	Leu	Ala
		355					360					365				
50	Leu	Ser	Pro	Ile	His	Asn	Ser	Ser	Ala	Leu	Pro	Thr	Thr	Gly	Arg	Ser
		370					375					380				
	Cys	Val	Asn	Leu	Ala	Lys	Lys	Cys	Phe	Ser	Gly	Glu	Val	Ser	Trp	Glu
	385					390					395					400
55	Ala	Val	Glu	Leu	Asp	Val	Asn	Asn	Ile	Asn	Met	Asp	Thr	Asp	Thr	Ser
				405						410					415	
	Gln	Leu	Gly	Phe	His	Gln	Ser	Asn	Gln	Trp	Ala	Val	Asp	Ser	Gly	Gly
			420						425					430		
	Ile	Ser	Glu	His	Leu	Gly	Lys	Arg	Ser	Leu	Lys	Arg	Asn	Phe	Glu	
60		435					440					445				
	Leu	Val	Asp	Ser	Ser	Pro	Cys	Lys	Lys	Ile	Ile	Gln	Asn	Lys	Lys	Thr
		450					455					460				
	Cys	Val	Glu	Tyr	Lys	His	Asn	Glu	Met	Thr	Asn	Cys	Tyr	Thr	Asn	Gln
	465					470					475					480
65	Asn	Thr	Gly	Leu	Thr	Val	Glu	Val	Gln	Asp	Leu	Lys	Leu	Ser	Val	His

ES 2 327 815 T3

					485					490					495	
	Lys	Ser	Gln	Gln	Asn	Asp	Cys	Ala	Asn	Lys	Glu	Asn	Ile	Val	Asn	Ser
				500					505					510		
5	Phe	Thr	Asp	Lys	Gln	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Leu	Pro	Ile	Pro	Met	Ile
			515					520					525			
	Ala	Lys	Asn	Leu	Met	Cys	Glu	Leu	Asp	Glu	Asp	Cys	Glu	Lys	Asn	Ser
		530					535					540				
10	Lys	Arg	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ser	Phe	Leu	Cys	Ser	Asp	Asp	Asp	Arg	
	545				550					555					560	
	Ala	Ser	Lys	Asn	Ile	Ser	Met	Asn	Ser	Asp	Ser	Ser	Phe	Pro	Gly	Ile
				565						570					575	
	Ser	Ile	Met	Glu	Ser	Pro	Leu	Glu	Ser	Gln	Pro	Leu	Asp	Ser	Asp	Arg
			580						585					590		
15	Ser	Ile	Lys	Glu	Ser	Ser	Phe	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Glu	Asp	Pro	Leu
			595					600					605			
	Ile	Val	Thr	Pro	Asp	Cys	Gln	Glu	Lys	Thr	Ser	Pro	Lys	Gly	Val	Glu
		610					615					620				
20	Asn	Pro	Ala	Val	Gln	Glu	Ser	Asn	Gln	Lys	Met	Leu	Gly	Pro	Pro	Leu
	625					630					635				640	
	Glu	Val	Leu	Lys	Thr	Leu	Ala	Ser	Lys	Arg	Asn	Ala	Val	Ala	Phe	Arg
				645						650					655	
	Ser	Phe	Asn	Ser	His	Ile	Asn	Ala	Ser	Asn	Asn	Ser	Glu	Pro	Ser	Arg
25			660						665					670		
	Met	Asn	Met	Thr	Ser	Leu	Asp	Ala	Met	Asp	Ile	Ser	Cys	Ala	Tyr	Ser
			675					680					685			
	Gly	Ser	Tyr	Pro	Met	Ala	Ile	Thr	Pro	Thr	Gln	Lys	Arg	Arg	Ser	Cys
		690				695					700					
30	Met	Pro	His	Gln	Gln	Thr	Pro	Asn	Gln	Ile	Lys	Ser	Gly	Thr	Pro	Tyr
	705				710					715					720	
	Arg	Thr	Pro	Lys	Ser	Val	Arg	Arg	Gly	Val	Ala	Pro	Val	Asp	Asp	Gly
				725					730						735	
35	Arg	Ile	Leu	Gly	Thr	Pro	Asp	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Leu	Gly
			740						745					750		
	Arg	Ala	His	Gly	Pro	Ala	Val	Asp	Trp	Trp	Ala	Leu	Gly	Val	Cys	Leu
		755						760					765			
	Phe	Glu	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Pro	Phe	Asn	Asp	Glu	Thr	Pro	Gln
		770				775					780					
40	Gln	Val	Phe	Gln	Asn	Ile	Leu	Lys	Arg	Asp	Ile	Pro	Trp	Pro	Glu	Gly
	785				790					795					800	
	Glu	Glu	Lys	Leu	Ser	Asp	Asn	Ala	Gln	Ser	Ala	Val	Glu	Ile	Leu	Leu
				805					810					815		
45	Thr	Ile	Asp	Asp	Thr	Lys	Arg	Ala	Gly	Met	Lys	Glu	Leu	Lys	Arg	His
			820						825					830		
	Pro	Leu	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Trp	Glu	Asn	Leu	Gln	His	Gln	Thr	Met
			835					840					845			
	Pro	Phe	Ile	Pro	Gln	Pro	Asp	Asp	Glu	Thr	Asp	Thr	Ser	Tyr	Phe	Glu
50		850				855					860					
	Ala	Arg	Asn	Thr	Ala	Gln	His	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	
	865				870						875					

- 55 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Desconocido
- 60 <220>
 <223> Secuencia de consenso para la proteína quinasa eucariótica
- 65 <221> VARIANT
 <222> (1)... (1)
 <223> El residuo 1 también podría ser Isoleucina o Valina

ES 2 327 815 T3

- <221> VARIANT
<222> (3) ... (3)
<223> El residuo 3 es cualquier aminoácido excepto Prolina
- 5
<221> VARIANT
<222> (5) ... (5)
<223> El residuo 5 es cualquier aminoácido excepto Prolina
- 10
<221> VARIANT
<222> (6) ... (6)
<223> El residuo 6 podría ser también Tirosina, Triptófano, Metionina, Glicina, Serina, Treonina, Aspargina
o Histidina
- 15
<221> VARIANT
<222> (7) ... (7)
<223> El residuo 7 podría ser también Glicina o Alanina
- 20
<221> VARIANT
<222> (8) ... (8)
<223> El residuo 8 es cualquier aminoácido excepto Prolina o Triptófano
- 25
<221> VARIANT
<222> (9) ... (9)
<223> El residuo 9 podría ser también Isoleucina, Valina, Cisteína, Alanina o Treonina
- 30
<221> VARIANT
<222> (10) ... (10)
<223> El residuo 10 es cualquier aminoácido excepto Prolina o Ácido aspártico
- 35
<221> VARIANT
<222> (12) ... (12)
<223> El residuo 12 podría ser también Serina, Treonina, Alanina, Cisteína, Leucina, Isoleucina, Valina, Metionina,
Fenilalanina o Tirosina
- 40
<221> VARIANT
<222> (13) ... (13)
<223> Posición 13 "Xaa" se refiere a cualquier sitio entre los residuos 5 y 18 (cualquier aminoácido)
- 45
<221> VARIANT
<222> (14) ... (14)
<223> El residuo 14 podría ser también Isoleucina, Valina, Metionina, Fenilalanina, Tirosina, Triptófano, Cisteína,
Treonina, Alanina o Arginina
- 50
<221> VARIANT
<222> (15) ... (15)
<223> El residuo 15 podría ser también Isoleucina, Valina o Prolina
- 55
<221> VARIANT
<222> (16) ... (16)
<223> El residuo 16 podría ser también Isoleucina, Valina, Metionina, Fenilalanina, Alanina, Glicina, Cisteína, Lisina
o Arginina
- 60
65

ES 2 327 815 T3

<400> 4

Leu Xaa His Xaa Asp Leu Lys Xaa Xaa Asn Leu Leu Leu
1 5 10

5

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Desconocido

<220>

<223> Secuencia de consenso para la proteína quinasa Eucariótica

15

<221> VARIANT

<222> (1)... (1)

<223> El residuo 1 podría ser también Isoleucina, Valina, Metionina, Fenilalanina, Tirosina o Cisteína

20

<221> VARIANT

<222> (3) ... (3)

<223> El residuo 3 podría ser también Tirosina

25

<221> VARIANT

<222> (6) ... (6)

<223> El residuo 6 podría ser también Isoleucina, Valina, Metionina, Fenilalanina o Tirosina

30

<221> VARIANT

<222> (7) ... (7)

<223> El residuo 7 podría ser también Serina, Treonina, Alanina, o Cisteína

35

<221> VARIANT

<222> (11)... (13)

<223> El residuo 11-13 podría ser también triple Isoleucina, Valina, Metionina, Fenilalanina, Tirosina o Cisteína

40

<221> VARIANT

<222> (2) ... (2)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

45

<221> VARIANT

<222> (4) ... (4)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

50

<221> VARIANT

<222> (8) ... (9)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

55

<400> 5

Leu Xaa His Xaa Asp Leu Arg Xaa Xaa Asn Leu Leu Leu
1 5 10

60

<210> 6

<211> 3003

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 327 815 T3

<220>

<221> CDS

<222> (52) ... (2688)

5

<400> 6

```

ggctgctcgc ggaggggcag tgtacgcggg gccgctgtag gctgtccagc g atg gat
57
10
Met Asp
1

ccc acc gcg gga agc aag aag gag cct gga gga ggc gcg gcg act gag
105
15
Pro Thr Ala Gly Ser Lys Lys Glu Pro Gly Gly Gly Ala Ala Thr Glu
5 10 15

gag ggc gtg aat agg atc gca gtg cca aaa ccg ccc tcc att gag gaa
153
20
Glu Gly Val Asn Arg Ile Ala Val Pro Lys Pro Pro Ser Ile Glu Glu
20 25 30

ttc agc ata gtg aag ccc att agc cgg ggc gcc ttc ggg aaa gtg tat
201
25
Phe Ser Ile Val Lys Pro Ile Ser Arg Gly Ala Phe Gly Lys Val Tyr
35 40 45 50

ctg ggg cag aaa ggc ggc aaa ttg tat gca gta aag gtt gtt aaa aaa
249
30
Leu Gly Gln Lys Gly Gly Lys Leu Tyr Ala Val Lys Val Val Lys Lys
55 60 65

gca gac atg atc aac aaa aat atg act cat cag gtc caa gct gag aga
297
35
Ala Asp Met Ile Asn Lys Asn Met Thr His Gln Val Gln Ala Glu Arg
70 75 80

gat gca ctg gca cta agc aaa agc cca ttc att gtc cat ttg tat tat
345
40
Asp Ala Leu Ala Leu Ser Lys Ser Pro Phe Ile Val His Leu Tyr Tyr
85 90 95

tca ctg cag tct gca aac aat gtc tac ttg gta atg gaa tat ctt att
393
45
Ser Leu Gln Ser Ala Asn Asn Val Tyr Leu Val Met Glu Tyr Leu Ile
100 105 110

ggg gga gat gtc aag tct ctc cta cat ata tat ggt tat ttt gat gaa
441
50
Gly Gly Asp Val Lys Ser Leu Leu His Ile Tyr Gly Tyr Phe Asp Glu
115 120 125 130

gag atg gct gtg aaa tat att tct gaa gta gca ctg gct cta gac tac
489
55
Glu Met Ala Val Lys Tyr Ile Ser Glu Val Ala Leu Ala Leu Asp Tyr
135 140 145

ctt cac aga cat gga atc atc cac agg gac ttg aaa ccg gac aat atg
537
60
Leu His Arg His Gly Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Asp Asn Met
150 155 160

ctt att tct aat gag ggt cat att aaa ctg acg gat ttt ggc ctt tca
585
65
Leu Ile Ser Asn Glu Gly His Ile Lys Leu Thr Asp Phe Gly Leu Ser
165 170 175

```

ES 2 327 815 T3

	aaa gtt act ttg aat aga gat att aat atg atg gat atc ctt aca aca	
	633	
5	Lys Val Thr Leu Asn Arg Asp Ile Asn Met Met Asp Ile Leu Thr Thr	
	180 185 190	
	cca tca atg gca aaa cct aga caa gat tat tca aga acc cca gga caa	
	681	
10	Pro Ser Met Ala Lys Pro Arg Gln Asp Tyr Ser Arg Thr Pro Gly Gln	
	195 200 205 210	
	gtg tta tcg ctt atc agc tcg ttg gga ttt aac aca cca att gca gaa	
	729	
15	Val Leu Ser Leu Ile Ser Ser Leu Gly Phe Asn Thr Pro Ile Ala Glu	
	215 220 225	
	aaa aat caa gac cct gca aac atc ctt tca gcc tgt ctg tct gaa aca	
	777	
20	Lys Asn Gln Asp Pro Ala Asn Ile Leu Ser Ala Cys Leu Ser Glu Thr	
	230 235 240	
	tca cag ctt tct caa gga ctc gta tgc cct atg tct gta gat caa aag	
	825	
25	Ser Gln Leu Ser Gln Gly Leu Val Cys Pro Met Ser Val Asp Gln Lys	
	245 250 255	
	gac act acg cct tat tct agc aaa tta cta aaa tca tgt ctt gaa aca	
	873	
30	Asp Thr Thr Pro Tyr Ser Ser Lys Leu Leu Lys Ser Cys Leu Glu Thr	
	260 265 270	
	gtt gcc tcc aac cca gga atg cct gtg aag tgt cta act tct aat tta	
	921	
35	Val Ala Ser Asn Pro Gly Met Pro Val Lys Cys Leu Thr Ser Asn Leu	
	275 280 285 290	
	ctc cag tct agg aaa agg ctg gcc aca tcc agt gcc agt agt caa tcc	
	969	
40	Leu Gln Ser Arg Lys Arg Leu Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ser Gln Ser	
	295 300 305	
	cac acc ttc ata tcc agt gtg gaa tca gaa tgc cac agc agt ccc aaa	
	1017	
45	His Thr Phe Ile Ser Ser Val Glu Ser Glu Cys His Ser Ser Pro Lys	
	310 315 320	
	tgg gaa aaa gat tgc cag gaa agt gat gaa gca ttg ggc cca aca atg	
	1065	
50	Trp Glu Lys Asp Cys Gln Glu Ser Asp Glu Ala Leu Gly Pro Thr Met	
	325 330 335	
	atg agt tgg aat gca gtt gaa aag tta tgc gca aaa tct gca aat gcc	
	1113	
55	Met Ser Trp Asn Ala Val Glu Lys Leu Cys Ala Lys Ser Ala Asn Ala	
	340 345 350	
	att gag acg aaa ggt ttc aat aaa aag gat ctg gag tta gct ctt tct	
	1161	
60	Ile Glu Thr Lys Gly Phe Asn Lys Lys Asp Leu Glu Leu Ala Leu Ser	
	355 360 365 370	
65		

ES 2 327 815 T3

ccc att cat aac agc agt gcc ctt ccc acc act gga cgc tct tgt gta
 1209
 Pro Ile His Asn Ser Ser Ala Leu Pro Thr Thr Gly Arg Ser Cys Val
 5 375 380 385

 aac ctt gct aaa aaa tgc ttc tct ggg gaa gtt tct tgg gaa gca gta
 1257
 Asn Leu Ala Lys Lys Cys Phe Ser Gly Glu Val Ser Trp Glu Ala Val
 10 390 395 400

 gaa ctg gat gta aat aat ata aat atg gac act gac aca agt cag tta
 1305
 Glu Leu Asp Val Asn Asn Ile Asn Met Asp Thr Asp Thr Ser Gln Leu
 15 405 410 415

 ggt ttc cat cag tca aat cag tgg gct gtg gat tct ggt ggg ata tct
 1353
 Gly Phe His Gln Ser Asn Gln Trp Ala Val Asp Ser Gly Gly Ile Ser
 20 420 425 430

 gaa gag cac ctt ggg aaa aga agt tta aaa aga aat ttt gag ttg gtt
 1401
 Glu Glu His Leu Gly Lys Arg Ser Leu Lys Arg Asn Phe Glu Leu Val
 25 435 440 445 450

 gac tcc agt cct tgt aaa aaa att ata cag aat aaa aaa act tgt gta
 1449
 Asp Ser Ser Pro Cys Lys Lys Ile Ile Gln Asn Lys Lys Thr Cys Val
 30 455 460 465

 gag tat aag cat aac gaa atg aca aat tgt tat aca aat caa aat aca
 1497
 Glu Tyr Lys His Asn Glu Met Thr Asn Cys Tyr Thr Asn Gln Asn Thr
 35 470 475 480

 ggc tta aca gtt gaa gtg cag gac ctt aag cta tca gtg cac aaa agt
 1545
 Gly Leu Thr Val Glu Val Gln Asp Leu Lys Leu Ser Val His Lys Ser
 40 485 490 495

 caa caa aat gac tgt gct aat aag gag aac att gtc aat tct ttt act
 1593
 Gln Gln Asn Asp Cys Ala Asn Lys Glu Asn Ile Val Asn Ser Phe Thr
 45 500 505 510

 gat aaa caa caa aca cca gaa aaa tta cct ata cca atg ata gca aaa
 1641
 Asp Lys Gln Gln Thr Pro Glu Lys Leu Pro Ile Pro Met Ile Ala Lys
 50 515 520 525 530

 aac ctt atg tgt gaa ctc gat gaa gac tgt gaa aag aat agt aag agg
 1689
 Asn Leu Met Cys Glu Leu Asp Glu Asp Cys Glu Lys Asn Ser Lys Arg
 55 535 540 545

 gac tac tta agt tct agt ttt cta tgt tct gat gat gat aga gct tct
 1737
 Asp Tyr Leu Ser Ser Ser Phe Leu Cys Ser Asp Asp Asp Arg Ala Ser
 60 550 555 560

 65

ES 2 327 815 T3

aaa aat att tct atg aac tct gat tca tct ttt cct gga att tct ata
 1785
 Lys Asn Ile Ser Met Asn Ser Asp Ser Ser Phe Pro Gly Ile Ser Ile
 565 570 575
 atg gaa agt cca tta gaa agt cag ccc tta gat tca gat aga agc att
 1833
 Met Glu Ser Pro Leu Glu Ser Gln Pro Leu Asp Ser Asp Arg Ser Ile
 580 585 590
 aaa gaa tcc tct ttt gaa gaa tca aat att gaa gat cca ctt att gta
 1881
 Lys Glu Ser Ser Phe Glu Glu Ser Asn Ile Glu Asp Pro Leu Ile Val
 595 600 605 610
 aca cca gat tgc caa gaa aag acc tca cca aaa ggt gtc gag aac cct
 1929
 Thr Pro Asp Cys Gln Glu Lys Thr Ser Pro Lys Gly Val Glu Asn Pro
 615 620 625
 gct gta caa gag agt aac caa aaa atg tta ggt cct cct ttg gag gtg
 1977
 Ala Val Gln Glu Ser Asn Gln Lys Met Leu Gly Pro Pro Leu Glu Val
 630 635 640
 ctg aaa acg tta gcc tct aaa aga aat gct gtt gct ttt cga agt ttt
 2025
 Leu Lys Thr Leu Ala Ser Lys Arg Asn Ala Val Ala Phe Arg Ser Phe
 645 650 655
 aac agt cat att aat gca tcc aat aac tca gaa cca tcc aga atg aac
 2073
 Asn Ser His Ile Asn Ala Ser Asn Asn Ser Glu Pro Ser Arg Met Asn
 660 665 670
 atg act tct tta gat gca atg gat att tcg tgt gcc tac agt ggt tca
 2121
 Met Thr Ser Leu Asp Ala Met Asp Ile Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Ser
 675 680 685 690
 tat ccc atg gct ata acc cct act caa aaa aga aga tcc tgt atg cca
 2169
 Tyr Pro Met Ala Ile Thr Pro Thr Gln Lys Arg Arg Ser Cys Met Pro
 695 700 705
 cat cag cag acc cca aat cag atc aag tcg gga act cca tac cga act
 2217
 His Gln Gln Thr Pro Asn Gln Ile Lys Ser Gly Thr Pro Tyr Arg Thr
 710 715 720
 ccg aag agt gtg aga aga ggg gtg gcc ccc gtt gat gat ggg cga att
 2265
 Pro Lys Ser Val Arg Arg Gly Val Ala Pro Val Asp Asp Gly Arg Ile
 725 730 735
 cta gga acc cca gac tac ctt gca cct gag ctg tta cta ggc agg gcc
 2313
 Leu Gly Thr Pro Asp Tyr Leu Ala Pro Glu Leu Leu Leu Gly Arg Ala
 740 745 750

ES 2 327 815 T3

```

cat ggt cct gcg gta gac tgg tgg gca ctt gga gtt tgc ttg ttt gaa
2361
5 His Gly Pro Ala Val Asp Trp Trp Ala Leu Gly Val Cys Leu Phe Glu
755 760 765 770

ttt cta aca gga att ccc cct ttc aat gat gaa aca cca caa caa gta
2409
10 Phe Leu Thr Gly Ile Pro Pro Phe Asn Asp Glu Thr Pro Gln Gln Val
775 780 785

ttc cag aat att ctg aaa aga gat atc cct tgg cca gaa ggt gaa gaa
2457
15 Phe Gln Asn Ile Leu Lys Arg Asp Ile Pro Trp Pro Glu Gly Glu Glu
790 795 800

aag tta tct gat aat gct caa agt gca gta gaa ata ctt tta acc att
2505
20 Lys Leu Ser Asp Asn Ala Gln Ser Ala Val Glu Ile Leu Leu Thr Ile
805 810 815

gat gat aca aag aga gct gga atg aaa gag cta aaa cgt cat cct ctc
2553
25 Asp Asp Thr Lys Arg Ala Gly Met Lys Glu Leu Lys Arg His Pro Leu
820 825 830

ttc agt gat gtg gac tgg gaa aat ctg cag cat cag act atg cct ttc
2601
30 Phe Ser Asp Val Asp Trp Glu Asn Leu Gln His Gln Thr Met Pro Phe
835 840 845 850

atc ccc cag cca gat gat gaa aca gat acc tcc tat ttt gaa gcc agg
2649
35 Ile Pro Gln Pro Asp Asp Glu Thr Asp Thr Ser Tyr Phe Glu Ala Arg
855 860 865

aat act gct cag cac ctg acc gta tct gga ttt agt ctg tagcacaaaa
2698
45 Asn Thr Ala Gln His Leu Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
870 875

attttccttt tagtctagcc tcgtgttata gaatgaactt gcataattat atactcctta
2758
50 atactagatt gatctaaggg ggaaagatca ttatttaacc tagttcaatg tgcttttaaat
2818
gtacggttaca gctttcacag agttaaaagg ctgaaaggaa tatagtcagt aatttatctt
2878
55 aacctcaaaa ctgtatataa atcttcaaag cttttttcat ctatttattt tgtttattgc
2938
actttatgaa aactgaagca tcaataaaat tagaggacac tattgaaaaa aaaaaaaaaa
2998
60 aaaaa
3003

65

```