



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 879**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02739056 .6**

86 Fecha de presentación : **18.06.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1397681**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2004**

54 Título: **Método para la identificación de agentes para el tratamiento de la diabetes.**

30 Prioridad: **18.06.2001 SE 0102147**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73 Titular/es: **BIOVITRUM AB.**  
**112 76 Stockholm, SE**

72 Inventor/es: **Bendz, Christina y**  
**Lake, Staffan**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 284 879 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la identificación de agentes para el tratamiento de la diabetes.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de las “cinasas que interactúan con la MAP cinasa” humanas Mnk2a y Mnk2b, en métodos para la identificación de agentes farmacéuticamente útiles, en particular agentes útiles para el tratamiento de la diabetes tipo II.

10 **Técnica anterior**

Una de las hormonas principales que influyen en el metabolismo es la insulina, que se sintetiza en las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. La insulina regula principalmente la dirección del metabolismo, desplazando muchos procesos hacia el almacenamiento de sustratos y alejándolos de su degradación (para revisiones, véase por ejemplo Shepherd, P.R. *et al.* (1998) *Biochem. J.* 333: 471-490; Alessi, D. R. & Downes, C. P. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 151-164). La insulina actúa para aumentar el transporte de glucosa y aminoácidos así como minerales clave tales como potasio, magnesio y fosfato desde la sangre hasta las células. También regula una variedad de reacciones enzimáticas en las células, de las que todas tienen una dirección global común, concretamente la síntesis de moléculas grandes a partir de unidades pequeñas. Una deficiencia en la acción de la insulina (diabetes mellitus) produce una grave insuficiencia en (i) el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno y la oxidación de la glucosa para dar energía; (ii) la síntesis y el almacenamiento de grasas a partir de ácidos grasos y sus precursores y la finalización de la oxidación de ácidos grasos; y (iii) la síntesis de proteínas a partir de aminoácidos.

Existen dos variedades de diabetes. La tipo I es la diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM, “insulin-dependent diabetes mellitus”; denominada antes como diabetes de aparición juvenil), para la que se requiere inyección de insulina. En este tipo, la insulina no se secreta por el páncreas y por tanto debe tomarse mediante inyección. La diabetes tipo II, diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM, “non-insulin-dependent diabetes mellitus”), se caracteriza clínicamente por hiperglucemia y resistencia a la insulina y está asociada normalmente con la obesidad. La diabetes tipo II es un grupo heterogéneo de trastornos en los que la hiperglucemia resulta tanto de una respuesta secretora de insulina insuficiente frente a glucosa como de una disminución de la eficacia de la insulina para estimular la captación de glucosa por el músculo esquelético y para restringir la producción de glucosa hepática (resistencia a insulina). Antes del desarrollo de la diabetes, los pacientes pierden generalmente la respuesta secretora de insulina temprana frente a glucosa y pueden secretar cantidades relativamente grandes de proinsulina. En la diabetes establecida, aunque los niveles de insulina en plasma en ayunas pueden ser normales o incluso superiores en los pacientes de diabetes tipo II, la secreción de insulina estimulada por glucosa está disminuida claramente. Los niveles de insulina disminuidos reducen la captación de glucosa mediada por insulina y no restringen la producción de glucosa hepática.

La homeostasis de glucosa dependen de un equilibrio entre la producción de glucosa por el hígado y la utilización de glucosa por tejidos dependientes de insulina, tales como grasa y músculo, y tejidos independientes de insulina, tales como de corazón y de riñón. En la diabetes tipo II la entrada de glucosa en la grasa y músculo está reducida y la producción de glucosa en el hígado está aumentada, debido a la resistencia a insulina en los tejidos.

Los receptores de tipo tirosina cinasas (RTK “receptor tyrosine kinases”) son un tipo importante de receptores de superficie celular. Los ligandos para los RTK son hormonas peptídicas/proteicas que incluyen el factor de crecimiento nervioso (FCN), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor de crecimiento epidérmico (EGF), e insulina. La unión de un ligando a un RTK estimula la actividad de proteína tirosina cinasa intrínseca del receptor, que estimula posteriormente una cascada de transducción de señal que conduce a cambios en la fisiología celular y patrones de expresión génica. Las rutas de señalización de RTK tienen un amplio espectro de funciones incluyendo la regulación de la proliferación y diferenciación celular, la promoción de la supervivencia celular y la modulación del metabolismo celular;

Ras es una proteína interruptora de unión a GTP que actúa como una molécula clave de señalización en las rutas provocadas por la activación de los RTK. Todos los RTK unidos a Ras en las células de mamíferos parecen utilizar una ruta de transducción de señal altamente conservada en la que Ras activada induce una cascada de cinasa que culmina en la activación de la MAP cinasa (proteína cinasa activada por mitógeno). Esta serina/treonina cinasa, que puede translocarse hacia el núcleo, fosforila muchas proteínas diferentes incluyendo factores de transcripción que regulan la expresión de proteínas importantes específicas de la diferenciación y del ciclo celular.

Los productos génicos Mnk1 y Mnk2 de murino (“cinasa que interactúa con MAP cinasa” o “cinasa que integra la señal de la MAP cinasa” 1 y 2) son serina/treonina cinasas de dominio único que comparten el 72% de identidad de secuencia (Waskiewicz A.J. *et al.* (1997) *EMBO J.* 16: 1909-1920; números de registro GenBank Y11091 y Y11092). También se ha descrito la Mnk1 humana (Fukunaga, R. *et al.* (1999) *EMBO J.* 16: 1921-1933; número de registro GenBank AB000409). Estas tres proteínas se identificaron por su capacidad de unirse de manera ajustada a MAP cinasas. Tanto Mnk1 como 2 se unen a las cinasas que regulan la señal extracelular ERK1 y ERK2, y Mnk1 también se une a la cinasa activada por estrés, p38. El factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) se ha identificado como uno de los sustratos fisiológicos de Mnk1 y Mnk2 (Scheper, G.C. *et al.* (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21:743-754).

El gen de Mnk2 humano se ha identificado y caracterizado mediante una selección de dos híbridos en levadura en la que la proteína Mnk2 interactuaba con el dominio de unión a ligando del receptor  $\theta$  de estrógeno (ER $\beta$ ) (Slentz-Kesler, K. *et al.* (2000) *Genomics* 69: 63-71). Se ha mostrado que el gen de Mnk2 humano tiene dos variantes de corte y empalme C-terminales, designadas Mnk2a (las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de Mnk2a se designan SEQ ID NOS:1 y 2, respectivamente; número de registro GenBank AF237775) y Mnk2b (las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de Mnk2b se designan SEQ ID NOS: 3 y 4, respectivamente; número de registro AF237776). Las dos isoformas son idénticas a lo largo de los primeros 385 aminoácidos de la secuencia codificante y difieren sólo en el exón final que codifica para 80 residuos adicionales para Mnk2a y para 29 residuos para Mnk2b. Se mostró además que la interacción de Mnk2 era selectiva para el receptor de estrógeno (ER) $\theta$  a diferencia de ERI y que la interacción era específica para Mnk2b a diferencia de Mnk2a o Mnk1.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que representa el efecto de la sobreexpresión de Mnk2b en los adipocitos 3T3-L1 transfectados con GLU-REx3, CRE, IRE, o SREBP-RE. Se transfectaron las células control con un vector de plásmido vacío y se fijó el nivel de expresión control a 1,00.

La figura 2 es una gráfica que representa el efecto de Mnk2b sobre la captación de glucosa, cuando se sobreexpresa en adipocitos diferenciados 3T3-L1 (2A) y la línea celular neuronal humana SHSY (2B). Se transfectaron las células control (ctrl) con un vector de plásmido vacío. Las barras grises indican las células no estimuladas, las barras blancas indican las células estimuladas con insulina.

La figura 3 es una gráfica que representa el efecto de la sobreexpresión de Mnk2b y la interrupción de la interferencia por ARN (iARN) de la expresión de Mnk2b sobre la captación de glucosa en células humanas.

### Descripción de la invención

Se ha encontrado sorprendentemente que Mnk2 está implicada en la ruta de señalización de la insulina.

En un aspecto, la invención ofrece un método para identificar un agente que modula (aumenta o disminuye) la capacidad de un polipéptido Mnk2 de modular la captación de glucosa en una célula, comprendiendo el método: poner en contacto un polipéptido Mnk2 con un agente candidato; y determinar el efecto del agente candidato sobre la capacidad del polipéptido Mnk2 para modular la captación de glucosa en una célula. En un ejemplo, el agente candidato disminuye la capacidad del polipéptido Mnk2 para disminuir la captación de glucosa en la célula.

En otro aspecto, la invención ofrece un método para identificar un agente que modula la capacidad de un polipéptido Mnk2 para modular la actividad de un elemento de respuesta frente a glucosa en una célula, comprendiendo el método: poner en contacto un polipéptido Mnk2 con un agente candidato; y determinar el efecto del agente candidato sobre la capacidad del polipéptido Mnk2 para modular la actividad de un elemento de respuesta frente a glucosa en una célula. En un ejemplo, el agente candidato disminuye la capacidad de la actividad de un elemento de respuesta frente a glucosa (por ejemplo, un elemento de respuesta descrito en el presente documento) en la célula.

En otro aspecto, la invención ofrece un método para identificar un modulador de la captación de glucosa, comprendiendo el método: proporcionar una célula que expresa un polipéptido Mnk2 recombinante; exponer la célula a un agente candidato; y medir la captación de glucosa en la célula en presencia del agente candidato, en el que la captación alterada de glucosa en la célula en presencia del agente candidato comparada con la ausencia del agente candidato indica que el agente candidato es un modulador de la captación de glucosa. En un ejemplo, el agente candidato produce un aumento de la captación de glucosa.

Un agente candidato puede contener por ejemplo, un péptido, un peptidomimético, aminoácido, análogo de aminoácido, polinucleótido, análogo de polinucleótido, nucleótido, análogo de nucleótido u otra molécula pequeña. En un ejemplo, el agente candidato inhibe una actividad biológica de Mnk2 tal como una actividad serina/treonina cinasa, la capacidad para reducir la captación de glucosa en una célula, la capacidad de disminuir la actividad de un elemento de respuesta frente a glucosa (por ejemplo un elemento descrito en el presente documento) y/o la capacidad para unirse a un ligando de Mnk2 descrito en el presente documento. En una realización, el agente candidato se une a un polipéptido Mnk2 o a un ácido nucleico (ARN o ADN) que codifica para un polipéptido Mnk2.

Los métodos de selección descritos en el presente documento pueden incluir opcionalmente una etapa de introducir en una célula un ácido nucleico que codifica para un polipéptido Mnk2. El efecto de un agente candidato sobre una actividad biológica descrita en el presente documento puede evaluarse en presencia y/o ausencia de un polipéptido Mnk2 o un ácido nucleico que codifica para un polipéptido Mnk2. Los métodos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo* usando un sistema basado en células, un sistema libre de células, o una combinación de sistemas basados en células y libres de células.

En otro aspecto, la invención ofrece un método para modular la captación de glucosa *in vitro* en una célula, comprendiendo el método poner en contacto una célula con una cantidad de un compuesto eficaz para modular la expresión o actividad de un polipéptido Mnk2 y modular por tanto la captación de glucosa en la célula.

## ES 2 284 879 T3

El polipéptido Mnk2 usado en los métodos descritos en el presente documento puede ser un polipéptido Mnk2 de mamífero, por ejemplo, un polipéptido Mnk2 humano. Por ejemplo, el polipéptido Mnk2 puede ser un polipéptido Mnk2a o Mnk2b humano.

5 El polipéptido Mnk2 puede tener una secuencia mostrada como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. Un polipéptido Mnk2 también puede diferir de la correspondiente secuencia mostrada como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. Las diferencias son, preferiblemente, diferencias o cambios en un residuo no esencial o una sustitución conservativa. En una realización, el polipéptido Mnk2 incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos aproximadamente en un 60% a una secuencia mostrada como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o un fragmento de la misma. Preferiblemente, 10 la secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 y tiene una actividad biológica Mnk2 descrita en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede ser idéntica a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4.

15 Los polipéptidos Mnk2 preferidos son al menos un 10%, preferiblemente al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, o más, de la longitud de la secuencia mostrada como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 y tienen una actividad biológica Mnk2 descrita en el presente documento. Por ejemplo, un polipéptido Mnk2 puede tener una actividad serina/treonina cinasa, reducir la captación de glucosa en una célula, disminuir la actividad de un elemento de respuesta frente a glucosa (por ejemplo, un elemento descrito en el presente documento), y/o unirse a un ligando de Mnk2 descrito en el presente documento.

20 Un polipéptido Mnk2 también incluye un polipéptido que comprende un dominio funcional del polipéptido de SEQ IDNO:2 o SEQ ID NO:4 descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de cinasa. En una realización, el polipéptido Mnk2 tiene actividad cinasa.

25 Un polipéptido Mnk2 también incluye un polipéptido que comprende al menos 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o más residuos de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. Preferiblemente, el polipéptido tiene una actividad biológica Mnk2 descrita en el presente documento.

30 En algunos aspectos de la invención el polipéptido Mnk2 puede ser un polipéptido sustancialmente puro. El término “sustancialmente puro” tal como se usa en el presente documento en referencia a un polipéptido dado significa que el polipéptido está sustancialmente libre de otras macromoléculas biológicas. Por ejemplo, el polipéptido sustancialmente puro es al menos un 75%, 80, 85, 95, o 99% puro en peso seco. La pureza puede medirse mediante cualquier método habitual apropiado conocido en la técnica, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis de HPLC.

35 En toda esta descripción los términos “protocolos habituales” y “procedimientos habituales”, cuando se usan en el contexto de técnicas de biología molecular, han de entenderse como protocolos y procedimientos que se encuentran en un manual de laboratorio ordinario tal como: Current Protocols in Molecular Biology, editores F. Ausubel *et al.*, John Wiley and Sons, Inc. 1994, o Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989.

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado tal como se entienden comúnmente por un experto habitual en la técnica que pertenece a esta invención. A continuación se describen métodos y materiales adecuados, aunque también pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo a modo de ilustración y no propuestos para ser limitativos.

50 A continuación, la invención se describe en los ejemplos adjuntos, que se proponen para ilustrar la invención, sin limitar el alcance de protección.

### Ejemplos

#### 55 Ejemplo 1

##### Identificación de LK6 y Mnk

60 La mutagénesis mediada por el elemento P es una tecnología ampliamente usada en la genética de *Drosophila* (Cooley, L. *et al.* (1988) Science 239: 1121-1128; Robertson, H.M. *et al.* (1988) Genetics 118: 461-470). El elemento P es un elemento que puede transportarse bien caracterizado, que puede introducir mutaciones hereditarias de pérdida de función en una amplia serie de genes. Acopladas con la anotación genómica del sitio de inserción del elemento P, las bibliotecas del elemento P proporcionan una herramienta genética inversa valiosa. Las selecciones genéticas que 65 usan bibliotecas de mutantes de inserción de P en genes conocidos permiten una exploración rápida del genoma para identificar posibles genes modificadores.

## ES 2 284 879 T3

La señalización del receptor de insulina afectada tiene la manifestación fenotípica de un tamaño celular más pequeño (Huang, H., *et al.* (1999) PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development. *Development* 126:5365-5372.). Se realizó una selección genética para identificar modificadores de la señalización del receptor de insulina, usando una biblioteca de líneas de *Drosophila* mutagenizadas por inserción de P. En esta selección, la manifestación fenotípica de ojo pequeño se usó como lectura. Se identificó el gen LK6 de la *D. melanogaster* (número de registro GenBank U76378) como un débil pero constante potenciador del fenotipo D.N. del receptor de insulina.

Se usó la proteína L6K de *Drosophila melanogaster* en una búsqueda TBLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/education/blasttutorial.html>) en las bases de datos de nucleótidos públicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Los resultados positivos humanos fueron MNK1 (AB000409; valor de e de e-113), MNK2a (AF237775; valor de e de e-114) y MNK2b (AF237776; valor de e de e-110). Por consiguiente, se concluyó mediante análisis bioinformático que el gen LK6 de *D. melanogaster* tiene dos homólogos humanos, Mnk1 y Mnk2.

### Ejemplo 2

#### Clonación de MNK2b

Se aisló el extremo 3' del ADNc de Mnk2b a partir del clon Incyte número 1309709. Este clon contiene una secuencia correspondiente a las últimas 570 pb de Mnk2b. Se verificó el inserto de ADNc del clon Incyte mediante secuenciación, realizada por el kit de reacción preparada para la secuenciación de ciclo de terminador ABI PrismBigDye, en sistema de secuenciación de ADN de Applied Biosystems modelo ABI 377 XL/96.

Para aislar un clon de ADNc que codifica para el extremo 5' de Mnk2b (670 pb), se usó la secuencia pública de Mnk2b (número de registro GenBank AF237776) para diseñar cebadores para PCR para la amplificación por PCR.

Como molde para la clonación, se usó ADNc producido por el hígado humano. Se realizó una primera síntesis de la cadena de ADNc, usando el sistema de elección SUPER-SCRIPT (Life Technologies; número de catálogo 18090-019), usando 1  $\mu$ g de ARNm de hígado humano (Clontech; número de catálogo 6510-1) con hexámeros aleatorios según las instrucciones del fabricante.

Se realizó la PCR de 100  $\mu$ l usando el kit de la ADN polimerasa de Pfu nativa (Stratagene; número de catálogo 600135) y 5  $\mu$ l de cada uno de los cebadores específicos para el gen LAKQ166 (SEQ ID NO:5) y LAKQ168 (SEQ ID NO:6). Se usó el ciclador térmico de ADN Perkin Elmer 480 con el programa: 1 ciclo de 94°C, 2 min.; 60°C, 1 min.; 74°C, 2 min.; 25 ciclos de 94°C, 1 min.; 58°C, 1 min.; 74°C, 2 min.; y finalmente 72°C, 7 min. seguido de enfriamiento hasta 4°C. Se realizaron cinco rondas adicionales de amplificación tal como anteriormente, excepto que la temperatura de apareamiento se disminuyó hasta 55°C.

Se cargó una alícuota, 15  $\mu$ l, de PCR sobre un gel de agarosa al 1% de baja temperatura de fusión NuSieve GTG (FMC BioProducts; número de catálogo 50082) y se escindió el fragmento de aproximadamente 670 pb del gel. Se clonaron 3  $\mu$ l del fragmento aislado en 1  $\mu$ l de plásmido pCR2.1-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen; número de catálogo K4500-01). Se transformaron 3  $\mu$ l de la mezcla de ligación en células de *E. coli* TOP 10 químicamente competentes One Shot (Invitrogen; número de catálogo C4040-03).

Se obtuvieron ADN de plásmido a partir de tres clones (3 ml de cultivo durante la noche), usando kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN; número de catálogo 27104) y se realizó la secuenciación (número A0452) posterior tal como anteriormente. El plásmido con la secuencia correcta confirmada se designó pMB 1500.

Se unieron las dos partes de Mnk2b, el extremo 3' de Incyte 1309709, y el extremo 5' de pMB 1500, mediante una ligación de tres fragmentos en pCR2.1-TOPO, produciendo pBV1556.

Se digirieron 2,4  $\mu$ g de pBM1500 con *EcoRI* y *SacI*, y se digirieron 1,8  $\mu$ g del mismo plásmido con *EcoRI* y *BglIII*. Se cargaron la mitad de las digestiones sobre un gel E al 1,2%, Invitrogen, y se cortó una banda de aproximadamente 3800 pb (fragmento a) de la digestión con *EcoRI-SacI*, y se cortó una banda de aproximadamente 680 pb (fragmento b) de la digestión con *EcoRI-BglIII*. Se digirieron 2,7  $\mu$ g del plásmido Incyte 1309709 con *SacI* y *BglIII*. Se cargó la mitad de la digestión sobre un gel E y se cortó del gel una banda de aproximadamente 700 pb (fragmento c). Se purificaron los fragmentos usando el kit de extracción del gel (Qiagen; número de catálogo 28704) y la elución posterior en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

Se realizó la ligación usando la T4 ADN ligasa Ready-To-Go (Amersham Pharmacia Biotech; número de catálogo 27-0361-01). Se mezclaron 6  $\mu$ l del fragmento A con 7  $\mu$ l de los fragmentos B y C, respectivamente. Se transformó la mezcla de ligación en células *E. coli* TOP 10 químicamente competentes One Shot, y se obtuvo el ADN de plásmido tal como anteriormente. Las digestiones control usando las enzimas de restricción para la clonación, *EcoRI*, *SacI* y *BglIII* verificaron el inserto.

Se produjo Mnk2b para la expresión de mamífero usando la tecnología de clonación Gateway™ de Life Technologies. Se diseñaron cebadores compatibles con Gateway (SEQ ID NOS:7 y 8) y se realizó la PCR usando pBV1556 como molde. Se realizó la PCR en 50  $\mu$ l usando la Taq ADN polimerasa, Roche (número de catálogo 1 435 094) y

## ES 2 284 879 T3

1  $\mu$ l de cada uno de los cebadores BEKA 248 y BEKA247. Se usó el sistema 2400 de amplificación génica por PCR de Perkin Elmer con el siguiente programa: 95°C, 5 min.; (95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 min.) x 25; y 72°C, 7 min.; seguido de enfriamiento hasta 4°C. Se cargaron 10  $\mu$ l de la reacción sobre un gel E al 1,2%, y se cortó del gel un fragmento de aproximadamente 1400 pb, y se purificó usando el kit de extracción del gel QIAquick.

5 Se clonó el fragmento de PCR en pDONR201 (Life Technologies; número de catálogo 11798-014), según las instrucciones del fabricante. El clon de entrada resultante se designó pBV27, y se confirmó el inserto mediante secuenciación. Se construyó un clon de expresión de mamífero con fusión de 5'-GST, designado pBV44 (SEQ ID NO:9), (según las instrucciones del fabricante) usando el vector de destino pDEST27 (Life Technologies; número de catálogo 11812-013). En SEQID NO:9, los aminoácidos 1 a 226 representan el dominio GST, mientras que los aminoácidos 237 a 649 representan Mnk2b humana.

### Ejemplo 3

#### 15 *Perfil de expresión*

Para determinar los niveles de expresión relativos de MNK2b en diferentes tejidos, se usó una matriz de expresión en múltiples tejidos (CLONTECH; número de catálogo 775) en un experimento de hibridación con una sonda específica para gen de 106 pb.

20 Se digirió el clon de ADNc de MNK2b, pBV27, con las enzimas de restricción *Nco*I y *Ppu*MI. Se separaron los fragmentos en un gel de agarosa al 1,2% (Invitrogen; número de catálogo G5018-01). Se escindió del gel el fragmento de 106 pb y se purificó usando el kit de extracción del gel QIAquick (QIAGEN; número de catálogo 28704).

25 Se usaron 25 ng del fragmento purificado en una reacción de marcación con <sup>32</sup>P, realizada con reactivos tal como se recomiendan en el manual de instrucciones para la síntesis de sondas de ADN Strip-EZ (Ambion; número de catálogo 1470). Se adquirió [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP usado en la reacción de Amersham Pharmacia Biotech (número de catálogo AA0004).

30 Se realizaron las condiciones de hibridación y de lavado tal como se recomienda por el manual de CLONTECH PT3307-1. Se expuso la matriz de MTE ("Multiple Tissue Expression", expresión en múltiples tejidos) en una pantalla de fósforo STORM860 durante 70 h. Se usó ImageQuant para analizar la señal de hibridación.

35 Los resultados indicaron los niveles de expresión más altos de MNK2b en el músculo esquelético. Esto fue inesperado, ya que los resultados publicados sobre los tejidos de ratón adulto mostraron expresión de ARNm de Mnk2 en todos los tejidos estudiados, excepto del cerebro (Waskiewicz A.J. *et al.* (1997) EMBO J. 16: 1909-1920).

### Ejemplo 4

#### 40 *La sobreexpresión de Mnk2b afecta a la capacidad de respuesta frente a glucosa y al metabolismo de lípidos en los adipocitos de ratón*

Se prepararon o se adquirieron vectores indicadores inducibles que contienen el gen indicador de la luciferasa de *Photinus pyralis* (luciérnaga), conducidos por un elemento promotor básico (caja TATA), así como elementos potenciadores en posición cis inducibles (repeticiones directas de las regiones promotoras de diversos genes). Los vectores indicadores se diseñan para las lecturas *in vivo* de las rutas de transducción de señal, ya que los potenciadores son puntos convergentes de muchas rutas de transducción de señales. Cuando un plásmido que expresa el gen de interés se cotransfecta en células de mamífero con un plásmido indicador en la posición cis, un aumento de la expresión de la luciferasa indica la activación transcripcional o bien directa o bien indirecta.

50 Se preparó un vector designado pGluREx3-luciferasa ((gtgCACGTGtgaCAGCTGcaa)x3) usando el vector promotor pTAL (Clontech; número de catálogo 6252). El vector pGluREx3 se diseña para monitorizar los efectos sobre la respuesta frente a glucosa (PortoisL., *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274: 8181-8190).

55 Se preparó un vector designado pSREBP-luciferasa (aTCACcCCAC) clonando dos elementos de respuesta frente a proteínas de unión al elemento regulador del colesterol (SREBP, "sterol regulatory element binding protein") en el vector del promotor pGLE2 (Promega; número de catálogo E1631). El vector pSREBP se diseña para monitorizar los efectos sobre el elemento de respuesta frente a esteroides (Yokoyama, C. *et al.* (1993) Cell 75: 187-197).

60 El vector pCRE-luciferasa, diseñado para monitorizar la activación de las rutas de transducción de señal mediadas por AMPc y la proteína (CREB) de unión a AMPc, se adquirió de Stratagene (número de catálogo 219075).

65 Se preparó un vector designado pIRE-luciferasa ((tagCAAACAaactTATTTTGaaca)x3), usando el vector del promotor pGL2 (Promega; número de catálogo E1631). El vector pIRE se diseña para monitorizar la señalización mediada por el receptor de insulina a través de la proteína (IGFBP-1) de unión al factor de crecimiento de tipo insulina.

Se transfectaron de manera transitoria los adipocitos de ratón (células 3T3-L1 diferenciadas) con el constructo de elemento de respuesta de interés, en combinación con Mnk2b o un constructo de plásmido de estructura principal

(control), usando LipofectAmine™2000 (LifeTechnologies). Tras 48 h, se lisaron las células usando un tampón de lisis (Tris-EDTA + 0,25% de Triton-X100) durante 10 min. a temperatura ambiente, y se midió la actividad de la luciferasa usando un ensayo de actividad de la luciferasa (BioThema).

5 Los resultados (figura 1) indican que la sobreexpresión de Mnk2b en los adipocitos de ratón dio como resultado una disminución del 70% de la actividad del indicador de la GLUx3-luciferasa, indicando una disminución de la capacidad de respuesta frente a glucosa en las células. Según el conocimiento de los inventores, no existen resultados dados a conocer previamente que indiquen un enlace entre Mnk2b y la captación de glucosa.

10 Los resultados mostrados en la figura 1 indican además que la sobreexpresión de Mnk2b en los adipocitos de ratón conduce a una disminución de la actividad del elemento de respuesta frente a SREBP. La conclusión es que Mnk2b afecta al metabolismo de lípidos, ya que el elemento de respuesta frente a SREBP ha mostrado controlar la transcripción de por ejemplo el gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (Yokoyama, C. *et al.* (1993) *Cell* 75: 187-197) y regular el metabolismo del colesterol (Brown, M.S. y Goldstein J.L. (1997) *Cell* 83: 331-340).

15 La sobreexpresión de Mnk2b en los adipocitos de ratón también conduce a una disminución de la actividad de los indicadores pCRE y pIRE. Estos resultados confirman los datos publicados sobre Mnk2b como parte de la ruta de señalización de la MAP-cinasa (Waskiewicz, A. *et al.* (1997) *EMBO J.* 16: 1909-1920; Fukunaga, R. y Hunter, T. (1997) *EMBO J.* 16: 1921-1933).

20 Ejemplo 5

#### *La sobreexpresión de Mnk2b modula la captación de glucosa en adipocitos*

25 Se determinó la captación de glucosa según el método de Hundal *et al.* (1994) *Biochem. J.* 297: 289-295. En resumen, tras la incubación con hormonas durante 45 minutos, si no se indica lo contrario, se enjuagan las monocapas celulares con PBS libre de glucosa. Se cuantificó la captación de glucosa incubando las células en presencia de 1  $\mu$ Ci/ml de <sup>3</sup>H-2-desoxi-glucosa en PBS durante 8 min. Se determinó la captación no específica cuantificando la radiactividad asociada a la célula en presencia de citocalasina B 10  $\mu$ M. Se determinó la captación de 2-desoxi-glucosa aspirando rápidamente el medio, seguido de tres lavados sucesivos de las monocapas celulares con PBS helado. Se lisaron las células en NaOH 0,5 M, seguido de recuento de centelleo líquido. Las tasas de transporte se normalizaron para el contenido en proteína de cada célula.

30 Los resultados (figura 2) indican que la sobreexpresión de Mnk2b en adipocitos (células 3T3-L1 diferenciadas) y una línea celular humana (SHSY) disminuyó la tasa de la captación de glucosa de manera dependiente de insulina. Los resultados confirman los resultados a partir del ensayo de indicador (ejemplo 4) e indican además que un efecto de la expresión de Mnk2b es la reducción de la captación de glucosa.

40 Ejemplo 6

#### *Modelos estructurales de proteínas Mnk*

Se prepararon tres modelos estructurales tridimensionales de Mnk1, Mnk2a y Mnk2b a partir de datos de homología. Se usó como molde para los tres modelos la estructura de la proteína cinasa dependiente de calmodulina (entrada del banco de datos de proteínas ("Protein Data Bank") 1A06). (El banco de datos de proteínas está disponible en <http://www.rcsb.org/pdb>; véase también Berman *et al.* (2000) *Nucleic Acids Research* 28: 235-242). Se prepararon los modelos estructurales usando el software ICM de MolSoft Inc. (<http://www.molsoft.com>).

50 Los modelos de Mnk1, Mnk2a y Mnk2b fueron sumamente similares pero se identificaron algunas diferencias estructurales, que pueden emplearse para conseguir la selectividad de unión. Se identificaron un número de 87 residuos no idénticos cuando se comparó Mnk2b con Mnk1. Muchos de éstos están situados lejos del sitio activo, pero dos diferencias de interés entre Mnk1 y Mnk2b son Y→H en el sitio activo (compárese la posición 95 en SEQ ID NO:4) y T→L en un bucle que puede implicarse en el reconocimiento del sustrato (compárese la posición 248 en SEQ ID NO:4).

55 Una comparación entre Mnk2a y Mnk2b indicó que el extremo C, que es la única parte diferente entre las dos variantes de corte y empalme, pliega de nuevo el sitio activo en los modelos. Esto indica la posibilidad de identificar agentes que tienen especificidad entre Mnk2a y Mnk2b.

60 Ejemplo 7

#### *Interrupción de la respuesta frente a glucosa modulada por Mnk2 en las células de neuroblastoma humano*

65 La iARN (interferencia por ARN) se refiere a la introducción de ARN de doble cadena homólogo (ARNdc) para seleccionar como diana específicamente un producto génico, dando como resultado fenotipos nulos o hipomórficos. La técnica de iARN se usó para estudiar los efectos sobre la respuesta frente a glucosa en células cultivadas con interrupción de la expresión de proteína Mnk2. se transfectaron de manera transitoria las células (SH-SY5y) de neuroblastoma humano con un elemento de respuesta frente a glucosa acoplado a un gen indicador de la luciferasa (GluREx3-lucifera-

## ES 2 284 879 T3

sa), Mnk2b o plásmido de estructura principal y [Mnk2 de iARN] usando LipofectAmine2000 (LifeTechnologies). Se mezclaron para cada pocillo en una placa de 96 pocillos 0,2  $\mu\text{g}$  de GluREx3-Luciferasa, 0,07  $\mu\text{g}$  de Mnk2b/estructura principal y 0,13  $\mu\text{g}$  [Mnk2 de iARN] con 1,8  $\mu\text{l}$  de LA2000/ $\mu\text{g}$  de ADN diluido en 50  $\mu\text{l}$  de Opti-MEM (Gibco). Tras 48 h, se lisaron las células usando 15  $\mu\text{l}$ /pocillo de tampón de lisis (TRIS-EDTA con 0,25% de Triton x 100) y se midió la actividad de la luciferasa (kit de ensayo de la actividad de la luciferasa, BioThema).

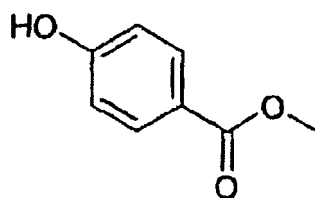
Los resultados (figura 3) indican que la interrupción de la expresión de la proteína Mnk2 en células (SH-SY5y) de neuroblastoma humano mediante el uso de iARN conduce a un aumento de la actividad del elemento de respuesta frente a glucosa. La sobreexpresión de la proteína Mnk2b en las mismas células, disminuye la actividad del elemento de respuesta frente a glucosa. Esta disminución se neutraliza por la interrupción de la proteína Mnk2b sobreexpresada que es la transfección combinada del plásmido de expresión y la iARN en las mismas células.

### Ejemplo 8

#### 15 Selección por RMN de Mnk2b de unión a compuestos

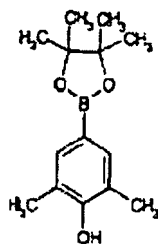
Se usó una biblioteca de diversidad que consistía en compuestos sumamente solubles en agua y relativamente pequeños para seleccionar MNK-2B nativo para agentes de unión mediante RMN (resonancia magnética nuclear). La técnica de RMN usada para identificar agentes de unión fue la diferencia de transferencia de saturación (STD “Saturation Transfer Difference”): las resonancias de  $^1\text{H}$  de proteínas se saturan por medio de un campo débil de radiofrecuencia aplicado a una región espectral estrecha. La saturación se transfiere por difusión de spin al resto de la proteína y posteriormente además a los compuestos que se unen a la proteína atenuando sus señales en el espectro de RMN. Entonces, el espectro se sustrae de un espectro obtenido en condiciones de no saturación para obtener un espectro de STD que muestra sólo las señales de los compuestos que interactúan con la proteína. En la práctica la secuencia de pulso se escribe de tal manera que la sustracción se realiza automáticamente en una de cada dos exploraciones, es decir, nunca se observan los espectros individuales (Mayer & Meyer, Angew. Chem. Int. Ed., 38, 1784-1788, 1999).

Los compuestos en la biblioteca se dividen en mezclas que consisten en 4-8 compuestos cada una. Cada muestra contenía MNK-2B nativo 1  $\mu\text{M}$ , mezcla de compuestos 200  $\mu\text{M}$ , tampón fosfato de sodio 50 mM, DTT 1 mM, pH 7,5 en aproximadamente el 98% de  $\text{D}_2\text{O}$ /el 2% de  $\text{H}_2\text{O}$ . Una muestra no contenía ninguno de los compuestos y actuó como control negativo. El volumen era 600  $\mu\text{l}$  y se usaron tubos de RMN convencionales. Se realizaron experimentos en un espectrómetro de RMN Varian Unity de 600 MHz a 20°C. Se registraron en cada muestra un experimento de STD y un experimento de  $^1\text{H}^1\text{D}$  de referencia. Se volvieron a ejecutar los agentes de unión identificados a partir de la selección como un compuesto único para la confirmación. Para estos experimentos de seguimiento se usaron muestras que contenían Mnk2B nativo 2  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$  del compuesto individual. Se identificaron como ligandos de Mnk2b varios compuestos, por ejemplo éster metílico del ácido 4-hidroxibenzoico.



Éster metílico del ácido 4-hidroxibenzoico

Un ensayo de la actividad cinasa según los métodos habituales indicó que los compuestos identificados inhibieron la actividad cinasa de Mnk2b en dependencia de la dosis. Por consiguiente, se mostró que es posible identificar compuestos pequeños, ligandos de Mnk2b.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para identificar un agente que modula la capacidad de un polipéptido Mnk2 para modular la captación de glucosa en una célula, comprendiendo el método:
- poner en contacto un polipéptido Mnk2 (cinasa 2 que interactúa con la MAP cinasa) con un agente candidato; y
- 10 determinar el efecto del agente candidato sobre la capacidad del polipéptido Mnk2 para modular la captación de glucosa en una célula.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido Mnk2 es un polipéptido Mnk2 de mamífero.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que el polipéptido Mnk2 de mamífero es un polipéptido Mnk2 humano.
4. Método según la reivindicación 2, en el que el polipéptido Mnk2 de mamífero es Mnk2a.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el polipéptido Mnk2a comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
- 20 6. Método según la reivindicación 2, en el que el polipéptido Mnk2 de mamífero es Mnk2b.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el polipéptido Mnk2b comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.
- 25 8. Método para identificar un agente que modula la capacidad de un polipéptido Mnk2 para modular la actividad de un elemento de respuesta frente a glucosa en una célula, comprendiendo el método:
- 30 poner en contacto un polipéptido Mnk2 con un agente candidato; y
- determinar el efecto del agente candidato sobre la capacidad del polipéptido Mnk2 para modular la actividad de un elemento de respuesta frente a glucosa en una célula.
- 35 9. Método según la reivindicación 8, en el que el polipéptido Mnk2 es un polipéptido Mnk2 de mamífero.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el polipéptido Mnk2 de mamífero es un polipéptido Mnk2 humano.
11. Método según la reivindicación 9, en el que el polipéptido Mnk2 de mamífero es Mnk2a.
- 40 12. Método según la reivindicación 11, en el que el polipéptido Mnk2a comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
13. Método según la reivindicación 9, en el que el polipéptido Mnk2 de mamífero es Mnk2b.
- 45 14. Método según la reivindicación 13, en el que el polipéptido Mnk2b comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4.
15. Método para identificar un modulador de la captación de glucosa, comprendiendo el método:
- 50 proporcionar una célula que expresa un polipéptido Mnk2 recombinante;
- exponer la célula a un agente candidato; y
- 55 medir la captación de glucosa en la célula en presencia del agente candidato, en el que la captación alterada de glucosa en la célula en presencia del agente candidato comparada con la ausencia del agente candidato indica que el agente candidato es un modulador de la captación de glucosa.
16. Método *in vitro* para modular la captación de glucosa en una célula, comprendiendo el método poner en contacto una célula con una cantidad de un compuesto eficaz para modular la expresión o actividad de un polipéptido Mnk2 y modular así la captación de glucosa en la célula.
- 60 17. Método según la reivindicación 16, en el que el compuesto disminuye la expresión o actividad del polipéptido Mnk2 y aumenta así la captación de glucosa en la célula.
- 65 18. Método según la reivindicación 17, en el que el compuesto disminuye la actividad cinasa del polipéptido Mnk2.

Fig. 1

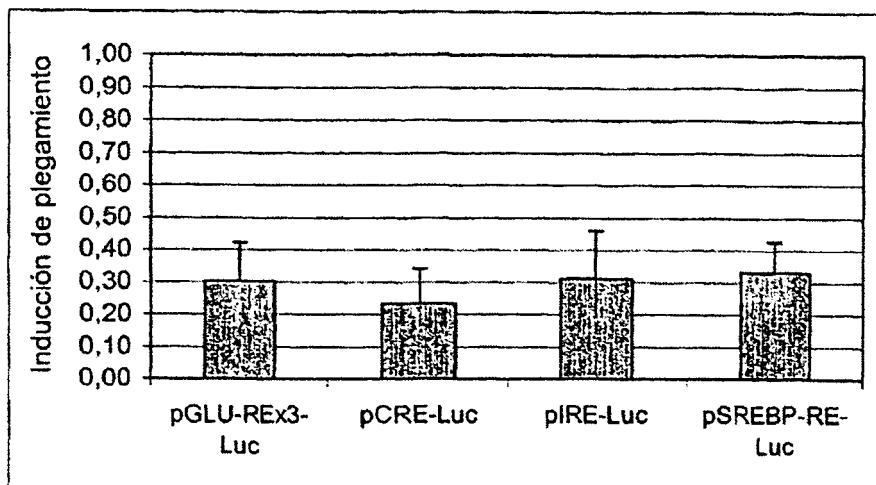


Fig. 2A

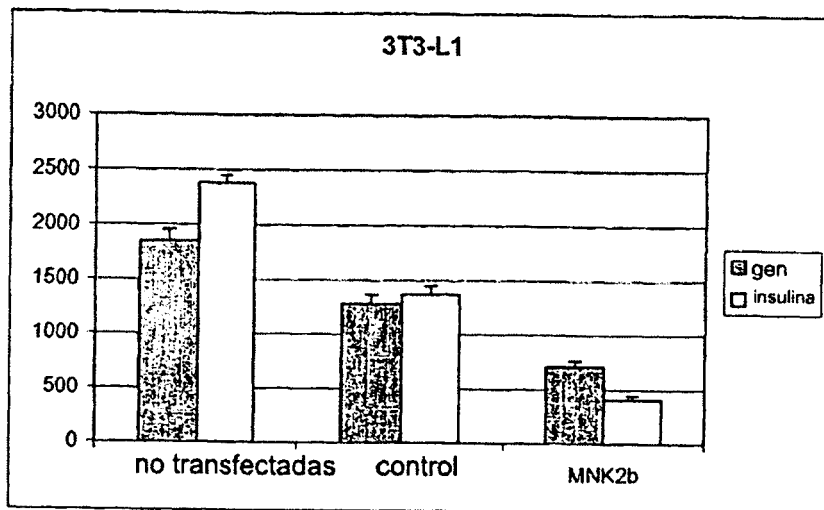


Fig. 2B

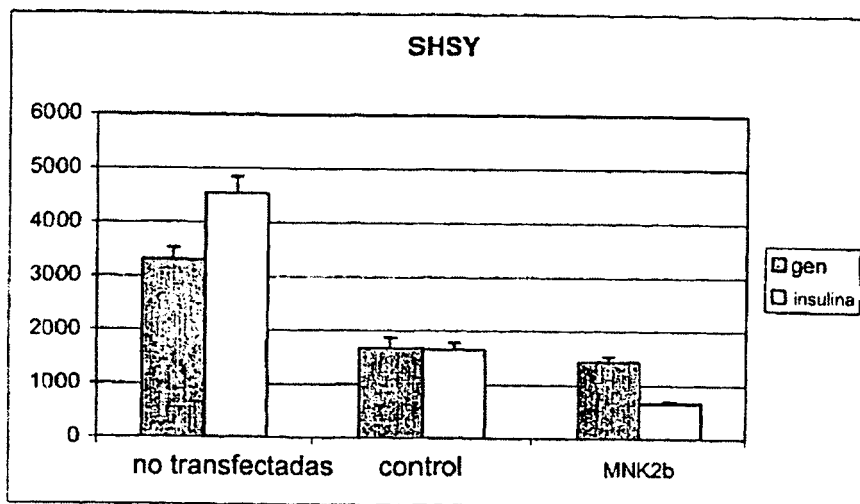
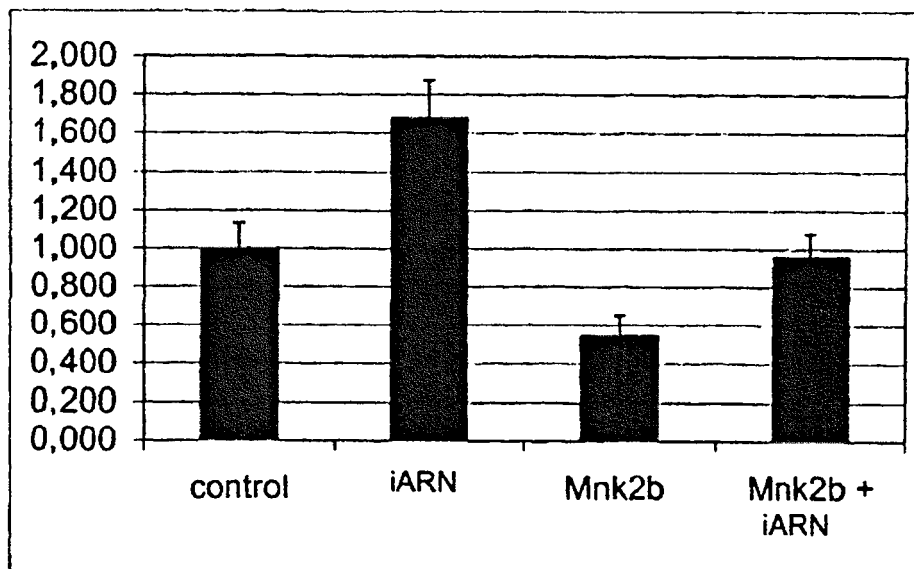


Fig. 3



# ES 2 284 879 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Biovitrum AB	
	<120> métodos nuevos	
5	<130> 00572	
	<160> 9	
	<170> PatentIn version 3.0	
10	<210> 1	
	<211> 1444	
	<212> ADN	
	<213> humano	
15	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (37)..(1434)	
20	<300>	
	<308> GenBank/AF237775	
	<309> 26-10-2000	
25	<400> 1	
	 cgggtccccctc ccccgctggc ggggcccggga cagaag atg gtg cag aag aaa cca Met Val Gln Lys Lys Pro 1 5	54
30	 gcc gaa ctt cag ggt ttc cac cgt tcg ttc aag ggg cag aac ccc ttc Ala Glu Leu Gln Gly Phe His Arg Ser Phe Lys Gly Gln Asn Pro Phe 10 15 20	102
35	 gag ctg gcc ttc tcc cta gac cag ccc gac cac gga gac tct gac ttt Glu Leu Ala Phe Ser Leu Asp Gln Pro Asp His Gly Asp Ser Asp Phe 25 30 35	150
40	 ggc ctg cag tgc tca gcc cgc cct gac atg ccc gcc agc cag ccc att Gly Leu Gln Cys Ser Ala Arg Pro Asp Met Pro Ala Ser Gln Pro Ile 40 45 50	198
45	 gac atc ccg gac gcc aag aag agg ggc aag aag aag aag cgc gcc cgg Asp Ile Pro Asp Ala Lys Lys Arg Gly Lys Lys Lys Lys Arg Gly Arg 55 60 65 70	246
50	 gcc acc gac agc ttc tcg ggc agg ttt gaa gac gtc tac cag ctg cag Ala Thr Asp Ser Phe Ser Gly Arg Phe Glu Asp Val Tyr Gln Leu Gln 75 80 85	294
55	 gaa gat gtg ctg ggg gag ggc gct cat gcc cga gtg cag acc tgc atc Glu Asp Val Leu Gly Glu Gly Ala His Ala Arg Val Gln Thr Cys Ile 90 95 100	342
60	 aac ctg atc acc agc cag gag tac gcc gtc aag atc att gag aag cag Asn Leu Ile Thr Ser Gln Glu Tyr Ala Val Lys Ile Ile Glu Lys Gln 105 110 115	390

ES 2 284 879 T3

cca ggc cac att cgg agc agg gtt ttc agg gag gtg gag atg ctg tac 438  
 Pro Gly His Ile Arg Ser Arg Val Phe Arg Glu Val Glu Met Leu Tyr  
 120 125 130

5 cag tgc cag gga cac agg aac gtc cta gag ctg att gag ttc ttc gag 486  
 Gln Cys Gln Gly His Arg Asn Val Leu Glu Leu Ile Glu Phe Phe Glu  
 135 140 145 150

10 gag gag gac cgc ttc tac ctg gtg ttt gag aag atg cgg gga ggc tcc 534  
 Glu Glu Asp Arg Phe Tyr Leu Val Phe Glu Lys Met Arg Gly Gly Ser  
 155 160 165

15 atc ctg agc cac atc cac aag cgc cgg cac ttc aac gag ctg gag gcc 582  
 Ile Leu Ser His Ile His Lys Arg Arg His Phe Asn Glu Leu Glu Ala  
 170 175 180

20 agc gtg gtg gtg cag gac gtg gcc agc gcc ttg gac ttt ctg cat aac 630  
 Ser Val Val Val Gln Asp Val Ala Ser Ala Leu Asp Phe Leu His Asn  
 185 190 195

25 aaa ggc atc gcc cac agg gac cta aag ccg gaa aac atc ctc tgt gag 678  
 Lys Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Cys Glu  
 200 205 210

30 cac ccc aac cag gtc tcc ccc gtg aag atc tgt gac ttc gac ctg ggc 726  
 His Pro Asn Gln Val Ser Pro Val Lys Ile Cys Asp Phe Asp Leu Gly  
 215 220 225 230

35 agc ggc atc aaa ctc aac ggg gac tgc tcc cct atc tcc acc ccg gag 774  
 Ser Gly Ile Lys Leu Asn Gly Asp Cys Ser Pro Ile Ser Thr Pro Glu  
 235 240 245

40 ctg ctc act ccg tgc ggc tcg gcg gag tac atg gcc ccg gag gta gtg 822  
 Leu Leu Thr Pro Cys Gly Ser Ala Glu Tyr Met Ala Pro Glu Val Val  
 250 255 260

45 gag gcc ttc agc gag gag gct agc atc tac gac aag cgc tgc gac ctg 870  
 Glu Ala Phe Ser Glu Glu Ala Ser Ile Tyr Asp Lys Arg Cys Asp Leu  
 265 270 275

50 tgg agc ctg ggc gtc atc ttg tat atc cta ctc agc ggc tac ccg ccc 918  
 Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Pro  
 280 285 290

55 ttc gtg ggc cgc tgt ggc agc gac tgc ggc tgg gac cgc ggc gag gcc 966  
 Phe Val Gly Arg Cys Gly Ser Asp Cys Gly Trp Asp Arg Gly Glu Ala  
 295 300 305 310

60 tgc cct gcc tgc cag aac atg ctg ttt gag agc atc cag gag ggc aag 1014  
 Cys Pro Ala Cys Gln Asn Met Leu Phe Glu Ser Ile Gln Glu Gly Lys  
 315 320 325

65 tac gag ttc ccc gac aag gac tgg gcc cac atc tcc tgc gct gcc aaa 1062  
 Tyr Glu Phe Pro Asp Lys Asp Trp Ala His Ile Ser Cys Ala Ala Lys  
 330 335 340

gac ctc atc tcc aag ctg ctg gtc cgt gac gcc aag cag agg ctg agt 1110  
 Asp Leu Ile Ser Lys Leu Leu Val Arg Asp Ala Lys Gln Arg Leu Ser  
 345 350 355

ES 2 284 879 T3

gcc gcc caa gtc ctg cag cac ccc tgg gtt cag ggg tgc gcc ccg gag 1158  
 Ala Ala Gln Val Leu Gln His Pro Trp Val Gln Gly Cys Ala Pro Glu  
 360 365 370

5 aac acc ttg ccc act ccc atg gtc ctg cag agg aac agc tgt gcc aaa 1206  
 Asn Thr Leu Pro Thr Pro Met Val Leu Gln Arg Asn Ser Cys Ala Lys  
 375 380 385 390

10 gac ctc acg tcc ttc gcg gct gag gcc att gcc atg aac cgg cag ctg 1254  
 Asp Leu Thr Ser Phe Ala Ala Glu Ala Ile Ala Met Asn Arg Gln Leu  
 395 400 405

15 gcc cag cac gac gag gac ctg gct gag gag gag gcc gcg ggg cag ggc 1302  
 Ala Gln His Asp Glu Asp Leu Ala Glu Glu Glu Ala Ala Gly Gln Gly  
 410 415 420

20 cag ccc gtc ctg gtc cga gct acc tca cgc tgc ctg cag ctg tct cca 1350  
 Gln Pro Val Leu Val Arg Ala Thr Ser Arg Cys Leu Gln Leu Ser Pro  
 425 430 435

25 ccc tcc cag tcc aag ctg gcg cag cgg cgg caa agg gcc agt ctg tcc 1398  
 Pro Ser Gln Ser Lys Leu Ala Gln Arg Arg Gln Arg Ala Ser Leu Ser  
 440 445 450

30 teg gcc cca gtg gtc ctg gtg gga gac cac gcc tga ccctcccatc 1444  
 Ser Ala Pro Val Val Leu Val Gly Asp His Ala  
 455 460 465

<210> 2  
 <211> 465  
 <212> PRT  
 <213> humano

35 <400> 2

Met Val Gln Lys Lys Pro Ala Glu Leu Gln Gly Phe His Arg Ser Phe  
 1 5 10 15

40 Lys Gly Gln Asn Pro Phe Glu Leu Ala Phe Ser Leu Asp Gln Pro Asp  
 20 25 30

45 His Gly Asp Ser Asp Phe Gly Leu Gln Cys Ser Ala Arg Pro Asp Met  
 35 40 45

Pro Ala Ser Gln Pro Ile Asp Ile Pro Asp Ala Lys Lys Arg Gly Lys  
 50 55 60

50 Lys Lys Lys Arg Gly Arg Ala Thr Asp Ser Phe Ser Gly Arg Phe Glu  
 65 70 75 80

55 Asp Val Tyr Gln Leu Gln Glu Asp Val Leu Gly Glu Gly Ala His Ala  
 85 90 95

Arg Val Gln Thr Cys Ile Asn Leu Ile Thr Ser Gln Glu Tyr Ala Val  
 100 105 110

60 Lys Ile Ile Glu Lys Gln Pro Gly His Ile Arg Ser Arg Val Phe Arg  
 115 120 125

ES 2 284 879 T3

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

ES 2 284 879 T3

Gln Arg Ala Ser Leu Ser Ser Ala Pro Val Val Leu Val Gly Asp His  
 450 455 460

5 Ala  
 465

- <210> 3
- 10 <211> 1564
- <212> ADN
- <213> humano
- 15 <220>
- <221> CDS
- <222> (37)..(1281)
- <300>
- 20 <308> GenBank/AF237776
- <309> 26-10-2000
- <400> 3

25	cggccccctc ccccgctggc ggggcccgga cagaag atg gtg cag aag aaa cca <span style="padding-left: 100px;">Met Val Gln Lys Lys Pro</span> <span style="padding-left: 100px;">1 5</span>	54
30	gcc gaa ctt cag ggt ttc cac cgt teg ttc aag ggg cag aac ccc ttc <span style="padding-left: 20px;">Ala Glu Leu Gln Gly Phe His Arg Ser Phe Lys Gly Gln Asn Pro Phe</span> <span style="padding-left: 40px;">10 15 20</span>	102
35	gag ctg gcc ttc tcc cta gac cag ccc gac cac gga gac tct gac ttt <span style="padding-left: 20px;">Glu Leu Ala Phe Ser Leu Asp Gln Pro Asp His Gly Asp Ser Asp Phe</span> <span style="padding-left: 40px;">25 30 35</span>	150
40	ggc ctg cag tgc tca gcc cgc cct gac atg ccc gcc agc cag ccc att <span style="padding-left: 20px;">Gly Leu Gln Cys Ser Ala Arg Pro Asp Met Pro Ala Ser Gln Pro Ile</span> <span style="padding-left: 40px;">40 45 50</span>	198
45	gac atc ccg gac gcc aag aag agg ggc aag aag aag aag cgc ggc cgg <span style="padding-left: 20px;">Asp Ile Pro Asp Ala Lys Lys Arg Gly Lys Lys Lys Lys Arg Gly Arg</span> <span style="padding-left: 40px;">55 60 65 70</span>	246
50	gcc acc gac agc ttc tcg ggc agg ttt gaa gac gtc tac cag ctg cag <span style="padding-left: 20px;">Ala Thr Asp Ser Phe Ser Gly Arg Phe Glu Asp Val Tyr Gln Leu Gln</span> <span style="padding-left: 40px;">75 80 85</span>	294
55	gaa gat gtg ctg ggg gag ggc gct cat gcc cga gtg cag acc tgc atc <span style="padding-left: 20px;">Glu Asp Val Leu Gly Glu Gly Ala His Ala Arg Val Gln Thr Cys Ile</span> <span style="padding-left: 40px;">90 95 100</span>	342
60	aac ctg atc acc agc cag gag tac gcc gtc aag atc att gag aag cag <span style="padding-left: 20px;">Asn Leu Ile Thr Ser Gln Glu Tyr Ala Val Lys Ile Ile Glu Lys Gln</span> <span style="padding-left: 40px;">105 110 115</span>	390
65	cca ggc cac att cgg agc agg gtt ttc agg gag gtg gag atg ctg tac <span style="padding-left: 20px;">Pro Gly His Ile Arg Ser Arg Val Phe Arg Glu Val Glu Met Leu Tyr</span> <span style="padding-left: 40px;">120 125 130</span>	438
70	cag tgc cag gga cac agg aac gtc cta gag ctg att gag ttc ttc gag <span style="padding-left: 20px;">Gln Cys Gln Gly His Arg Asn Val Leu Glu Leu Ile Glu Phe Phe Glu</span> <span style="padding-left: 40px;">135 140 145 150</span>	486

ES 2 284 879 T3

gag gag gac cgc ttc tac ctg gtg ttt gag aag atg cgg gga ggc tcc 534  
 Glu Glu Asp Arg Phe Tyr Leu Val Phe Glu Lys Met Arg Gly Gly Ser  
 155 160 165

5

atc ctg agc cac atc cac aag cgc cgg cac ttc aac gag ctg gag gcc 582  
 Ile Leu Ser His Ile His Lys Arg Arg His Phe Asn Glu Leu Glu Ala  
 170 175 180

10

agc gtg gtg gtg cag gac gtg gcc agc gcc ttg gac ttt ctg cat aac 630  
 Ser Val Val Val Gln Asp Val Ala Ser Ala Leu Asp Phe Leu His Asn  
 185 190 195

15

aaa ggc atc gcc cac agg gac cta aag ccg gaa aac atc ctc tgt gag 678  
 Lys Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Cys Glu  
 200 205 210

20

cac ccc aac cag gtc tcc ccc gtg aag atc tgt gac ttc gac ctg ggc 726  
 His Pro Asn Gln Val Ser Pro Val Lys Ile Cys Asp Phe Asp Leu Gly  
 215 220 225 230

25

agc ggc atc aaa ctc aac ggg gac tgc tcc cct atc tcc acc ccg gag 774  
 Ser Gly Ile Lys Leu Asn Gly Asp Cys Ser Pro Ile Ser Thr Pro Glu  
 235 240 245

30

ctg ctc act ccg tgc ggc tcg gcg gag tac atg gcc ccg gag gta gtg 822  
 Leu Leu Thr Pro Cys Gly Ser Ala Glu Tyr Met Ala Pro Glu Val Val  
 250 255 260

35

gag gcc ttc agc gag gag gct agc atc tac gac aag cgc tgc gac ctg 870  
 Glu Ala Phe Ser Glu Glu Ala Ser Ile Tyr Asp Lys Arg Cys Asp Leu  
 265 270 275

40

tgg agc ctg ggc gtc atc ttg tat atc cta ctc agc ggc tac ccg ccc 918  
 Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Pro  
 280 285 290

45

ttc gtg ggc cgc tgt ggc agc gac tgc ggc tgg gac cgc ggc gag gcc 966  
 Phe Val Gly Arg Cys Gly Ser Asp Cys Gly Trp Asp Arg Gly Glu Ala  
 295 300 305 310

50

tgc cct gcc tgc cag aac atg ctg ttt gag agc atc cag gag ggc aag 1014  
 Cys Pro Ala Cys Gln Asn Met Leu Phe Glu Ser Ile Gln Glu Gly Lys  
 315 320 325

55

tac gag ttc ccc gac aag gac tgg gcc cac atc tcc tgc gct gcc aaa 1062  
 Tyr Glu Phe Pro Asp Lys Asp Trp Ala His Ile Ser Cys Ala Ala Lys  
 330 335 340

60

gac ctc atc tcc aag ctg ctg gtc cgt gac gcc aag cag agg ctg agt 1110  
 Asp Leu Ile Ser Lys Leu Leu Val Arg Asp Ala Lys Gln Arg Leu Ser  
 345 350 355

65

gcc gcc caa gtc ctg cag cac ccc tgg gtt cag ggg tgc gcc ccg gag 1158  
 Ala Ala Gln Val Leu Gln His Pro Trp Val Gln Gly Cys Ala Pro Glu  
 360 365 370

aac acc ttg ccc act ccc atg gtc ctg cag agg tgg gac agt cac ttc 1206  
 Asn Thr Leu Pro Thr Pro Met Val Leu Gln Arg Trp Asp Ser His Phe  
 375 380 385 390

ES 2 284 879 T3

```

ctc ctc cct ccc cac ccc tgt cgc atc cac gtg cga cct gga gga ctg      1254
Leu Leu Pro Pro His Pro Cys Arg Ile His Val Arg Pro Gly Gly Leu
          395                      400                      405

5   gtc aga acc gtt act gtg aat gag tga agatcctgga ggaccctggg      1301
    Val Arg Thr Val Thr Val Asn Glu
          410

10  ccccaggcca gctcccatcg ctgggggacg gtgaacggcc atgtgttaat gttacgatgt      1361

    ttttanaaga caaaaaaaaaa aaaaaaacct caaaagtttt tttaaagtgg gggaaaaaca      1421

    tccaagcact ttaattccaa tgtaccaggt gaactgaocg agctcagaag ttttccttta      1481

15  caccaactgt caatgccgga attttgtatt ctgttttgta aagatttaat aaaagtcaaa      1541

    aaacttgcaa aaaaaaaaaa aaa                                          1564

20  <210> 4
    <211> 414
    <212> PRT
    <213> humano
25  <400> 4

    Met Val Gln Lys Lys Pro Ala Glu Leu Gln Gly Phe His Arg Ser Phe
30  1          5                      10                      15

    Lys Gly Gln Asn Pro Phe Glu Leu Ala Phe Ser Leu Asp Gln Pro Asp
    20                      25                      30

35  His Gly Asp Ser Asp Phe Gly Leu Gln Cys Ser Ala Arg Pro Asp Met
    35                      40                      45

    Pro Ala Ser Gln Pro Ile Asp Ile Pro Asp Ala Lys Lys Arg Gly Lys
40  50                      55                      60

    Lys Lys Lys Arg Gly Arg Ala Thr Asp Ser Phe Ser Gly Arg Phe Glu
    65                      70                      75

45  Asp Val Tyr Gln Leu Gln Glu Asp Val Leu Gly Glu Gly Ala His Ala
    85                      90                      95

    Arg Val Gln Thr Cys Ile Asn Leu Ile Thr Ser Gln Glu Tyr Ala Val
50  100                     105                     110

    Lys Ile Ile Glu Lys Gln Pro Gly His Ile Arg Ser Arg Val Phe Arg
    115                     120                     125

55  Glu Val Glu Met Leu Tyr Gln Cys Gln Gly His Arg Asn Val Leu Glu
    130                     135                     140

    Leu Ile Glu Phe Phe Glu Glu Glu Asp Arg Phe Tyr Leu Val Phe Glu
60  145                     150                     155                     160

    Lys Met Arg Gly Gly Ser Ile Leu Ser His Ile His Lys Arg Arg His
    165                     170                     175

65  Phe Asn Glu Leu Glu Ala Ser Val Val Val Gln Asp Val Ala Ser Ala
    180                     185                     190

```

ES 2 284 879 T3

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

<210> 5

50 <211> 28

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 5

atggtgcaga agaaaccagc cgaacttc

28

60 <210> 6

<211> 27

<212> ADN

65 <213> *Homo sapiens*

## ES 2 284 879 T3

<400> 6  
gcccaggctg aagtcacaga tcttcac 27

5  
<210> 7  
<211> 49  
<212> ADN  
10 <213> *Homo sapiens*  
<400> 7

15 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgtgcagaag aaaccagcc 49  
<210> 8  
<211> 54  
20 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 8

25 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctactcattc acagtaacgg ttct 54  
<210> 9  
30 <211> 649  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<220>  
35 <221> DOMINIO  
<222> (1)..(226)  
<220>  
40 <221> DOMINIO  
<222> (237)..(649)

45

50

55

60

65

ES 2 284 879 T3

<400> 9

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

ES 2 284 879 T3

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

65

ES 2 284 879 T3

Gly Ser Gly Ile Lys Leu Asn Gly Asp Cys Ser Pro Ile Ser Thr Pro  
 465 470 475 480  
 5 Glu Leu Leu Thr Pro Cys Gly Ser Ala Glu Tyr Met Ala Pro Glu Val  
 485 490 495  
 10 Val Glu Ala Phe Ser Glu Glu Ala Ser Ile Tyr Asp Lys Arg Cys Asp  
 500 505 510  
 15 Leu Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Tyr Pro  
 515 520 525  
 20 Pro Phe Val Gly Arg Cys Gly Ser Asp Cys Gly Trp Asp Arg Gly Glu  
 530 535 540  
 25 Ala Cys Pro Ala Cys Gln Asn Met Leu Phe Glu Ser Ile Gln Glu Gly  
 545 550 555 560  
 30 Lys Tyr Glu Phe Pro Asp Lys Asp Trp Ala His Ile Ser Cys Ala Ala  
 565 570 575  
 35 Lys Asp Leu Ile Ser Lys Leu Leu Val Arg Asp Ala Lys Gln Arg Leu  
 580 585 590  
 40 Ser Ala Ala Gln Val Leu Gln His Pro Trp Val Gln Gly Cys Ala Pro  
 595 600 605  
 45 Glu Asn Thr Leu Pro Thr Pro Met Val Leu Gln Arg Trp Asp Ser His  
 610 615 620  
 50 Phe Leu Leu Pro Pro His Pro Cys Arg Ile His Val Arg Pro Gly Gly  
 625 630 635 640  
 55 Leu Val Arg Thr Val Thr Val Asn Glu  
 645