



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 077**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01936370 .4**

86 Fecha de presentación : **17.05.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1282700**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

54 Título: **Serina-treonina-proteína-cinasa neuronal.**

30 Prioridad: **17.05.2000 DE 100 24 171**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **AXARON Bioscience AG.**
Im Neuenheimer Feld 515
69120 Heidelberg, DE

72 Inventor/es: **Schneider, Armin;**
Klaussner, Bettina;
Fischer, Achim;
Newrzella, Dieter;
Götz, Bernhard;
Rossner, Moritz;
Eisenhardt, Gisela;
Kuner, Rohini;
Trutzel, Annette;
Kammandel, Birgitta;
Jomana Naim, Stephanie y
Schwaninger, Markus

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

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

Serina-treonina-proteína-cinasa neuronal.

5 La presente invención se refiere a una serina-treonina-proteína-cinasa, a ácidos nucleicos, que codifican esta cinasa y a su empleo para el diagnóstico y la terapia de enfermedades neuronales y neoplásticas.

10 La apoplejía, que se denomina también embolia, derrame cerebral, insulto apoplético, participa aproximadamente en el 15% de todos los casos de fallecimiento, quedando afectados de igual modo los hombres y las mujeres. Los síntomas comprenden trastornos de la conciencia hasta el coma, frecuentemente incluso hemiplejía espástica, cuadros muy diversos de carencias motoras centrales, sensibles y sensoriales así como espasmos focales o generalizados. En cualquier caso, una apoplejía consiste en un trastorno circulatorio acompañado de carencia de oxígeno en la zona de una región cerebral circunscrita. Como desencadenantes entran en consideración dos mecanismos fundamentales. En primer lugar una hemorragia masiva, encefalorragia, que participa en el 15% de los casos, presentándose ésta, tras la 15 rotura de los vasos, en la mayoría de los casos, tras la rotura de las arterias estrio-lenticulares, con lo cual se destruyen regiones cerebrales limitadas. Este mecanismo tiene como consecuencia una elevada letalidad. Como dolencias causales entran en consideración, de manera especial, la hipertonia, la arteriosclerosis, el aneurisma intracraneal y, en raros casos, una coagulopatía por consumo de factores. Como segundo mecanismo participa un infarto cerebral, encefalomalacia, considerándose ésta como origen en el 85% de los casos. En este caso se produce, por regla general, la 20 formación de una necrosis. Los orígenes de la misma son, entre otras cosas, una trombosis arterial, una tromboembolia o una isquemia funcional con el lumen vascular abierto, por ejemplo como consecuencia de una caída de la presión sanguínea. El infarto cerebral "necrosis isquémica" constituye entre el 70 y el 80% aproximadamente de las causas de la apoplejía. Frecuentemente la arteriosclerosis representa la dolencia causante fundamental. La sintomatología de una encefalomalacia, rara, que se desarrolla lentamente, se denomina como ictus progresivo "progressive stroke". 25 Deben ser considerados como síntomas precoces de un infarto cerebral los síntomas carenciales neurológicos que se presentan de manera pasajera sin formación de deterioro tisular ("ataques isquémicos transitorios"). Se supone que el origen se debe a un trastorno circulatorio limitado pasajero debido a una estenosis o provocado por microembolias. El diagnóstico abarca, además de una exploración general y neurológica, también una tomografía computarizada craneal, una exploración doble por ultrasonidos cerebrovascular, una punción lumbar, una escintilografía cerebral dinámica, un EEG así como una tomografía por resonancia magnética nuclear. 30

El fundamento molecular de la isquemia y de los cuadros sucesivos, relacionados con la misma, son casi desconocidos hasta el momento actual. Sin embargo se supone que es necesaria una serie compleja de procesos bioquímicos hasta la aparición de la apoplejía. 35

La presente invención tenía como fundamento el problema industrial de identificar los genes que participan en la génesis de la apoplejía como consecuencia de carencias locales de oxígeno y, por lo tanto, abrir nuevas posibilidades de profilaxis y de terapia para la apoplejía. De igual modo, la presente invención tenía como fundamento el problema industrial de encontrar proteínas que participen en la génesis de la apoplejía. 40

Los problemas industriales citados se resuelven por medio de un ácido nucleico, que codifique una serina-treonina-proteína-cinasa, eligiéndose el ácido nucleico entre:

- 45 a) el ácido nucleico, con una de las secuencias según SEQ ID Nr. 1 - 4 y el ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia según una de las SEQ ID Nr. 5 - 8;
- b) el ácido nucleico, que codifica una proteína, que presente al menos una identidad del 70% con respecto a una proteína según una de las SEQ ID Nr. 5 - 8, y cuya expresión pueda ser inducida por medio de isquemia cerebral focal y por perfusión. 50

De igual modo, se describen los ácidos nucleicos siguientes:

- i) el ácido nucleico, que hibridiza con un ácido nucleico según a);
- 55 ii) el ácido nucleico, que fue hibridizado con un ácido nucleico según a), teniéndose en consideración la degeneración del código genético;
- 60 iii) los derivados de un ácido nucleico según a) - c), obtenidos por substitución, por adición, por inversión y/o por delección de una o de varias bases; y el ácido nucleico complementario a un ácido nucleico según a) - d).

A título de ejemplo se intercambiarán en los derivados de las proteínas según la SEQ ID Nr. 5 - 8 los restos de arginina por restos de lisina, los restos de valina por restos de isoleucina y los restos del ácido asparagínico por restos del ácido glutamínico. En este caso son muy similares las propiedades físicoquímicas de los aminoácidos intercambiados y de los ácidos intercambiantes (por ejemplo la ocupación espacial, la basicidad, la hidrofobicidad). Sin embargo pueden intercambiarse también uno o varios aminoácidos con respecto a su orden, aportarse o eliminarse, o pueden 65

combinarse entre sí varias de estas medidas. Las proteínas, que están modificadas de este modo con respecto a las SEQ ID Nr. 5-8 tienen, de manera preferente, al menos un 70% y, de manera especialmente preferente, al menos un 90% de identidad secuencial con respecto a las secuencias SEQ ID Nr. 5-8, calculada según el algoritmo de Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990. La proteína aislada y sus variantes funcionales pueden aislarse ventajosamente del cerebro de mamíferos tales como el *Homo sapiens*, el *Rattus norvegicus* o el *Mus musculus*. De igual modo deben entenderse por variantes funcionales los homólogos procedentes de otros mamíferos.

Los ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, según las SEQ ID Nr. 1 - 4 representan ácidos nucleicos, como los que se aíslan a partir del ratón (SEQ ID Nr. 1 y 2) o bien de los seres humanos (SEQ ID Nr. 3 y 4). En este caso los ácidos nucleicos según la SEQ ID Nr. 2 y según la SEQ ID Nr. 4 son variantes de empalme de mayor longitud de la SEQ ID Nr. 1 o bien de la SEQ ID Nr. 3. Se considerarán de conformidad con la invención también aquellos ácidos nucleicos, que codifiquen una proteína, que presente de manera preferente al menos un 70%, de manera muy especialmente preferente al menos un 90% de identidad con respecto a una de las proteínas tales como las SEQ ID Nr. 1 - 4.

Los “derivados” de conformidad con la invención de los ácidos nucleicos precedentemente citados, por ejemplo las variantes alelofórmicas, se diferencian de los ácidos nucleicos citados según las SEQ ID Nr. 1 - 4 por la substitución, por la adición, por la inversión y/o por la delección de una o de varias bases, manteniéndose, sin embargo, la actividad cinasa. Los derivados, tales como los homólogos o las secuencias de ácidos nucleicos secuencialmente emparentadas pueden aislarse a partir de todas las especies de mamíferos, con inclusión de los seres humanos, según los procedimientos usuales mediante hibridación con una de las secuencias de ácidos nucleicos de conformidad con la invención o con fragmentos de los mismos.

Se entenderá por “equivalentes funcionales” también los homólogos del ácido nucleico según la SEQ ID Nr. 1 - 4, por ejemplos los homólogos procedentes de otros mamíferos, las secuencias acortadas, el ADN de hebra sencilla o el ARN o el APN de las secuencias de ácidos nucleicos codificantes y no codificantes. Tales equivalentes funcionales pueden aislarse a partir de los ácidos nucleicos de las SEQ ID Nr. 1 - 4, por ejemplo con los procedimientos usuales de hibridación o con la técnica de la RCP, a partir de otros vertebrados, tales como mamíferos. Para la hibridación se utilizan de manera ventajosa oligonucleótidos de regiones conservadas, que pueden ser determinadas por el técnico en la materia de manera conocida. Sin embargo pueden utilizarse también para la hibridación fragmentos de mayor longitud de los ácidos nucleicos de conformidad con la invención o la secuencia completa. Según el ácido nucleico - oligonucleótido, fragmento de mayor longitud o secuencia completa - empleados o según el tipo de ácido nucleico que sea utilizado para la hibridación - ADN o ARN - se modifican las condiciones patrón para la hibridación. De este modo, las temperaturas la fusión de los híbridos de ADN: ADN se encuentran por ejemplo aproximadamente 10° por debajo de la de los híbridos de ADN-ARN de igual longitud.

Se entenderá por “condiciones patrón”, por ejemplo, según las temperaturas del ácido nucleico comprendidas entre 42 y 58°C en una solución tampón acuosa con una concentración comprendida entre 0,1 y 5 x SSC (1 X SSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 15 mM, pH 7,2) o adicionalmente en presencia de un 50% de formamida tal como por ejemplo 42°C en 5 x SSC, 50% de formamida. De manera ventajosa las condiciones para la hibridación para los híbridos de ADN:ADN son de 0,1 x SSC y a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 20°C y 45°C, de manera preferente comprendidas entre aproximadamente 30°C y 45°C. Para los híbridos de ADN: ARN las condiciones para la hibridación se encuentran ventajosamente en 0,1 x SSC y a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 30°C y 55°C, de manera preferente comprendidas entre aproximadamente 45°C y 55°C. Estas temperaturas indicadas para la hibridación son, por ejemplo, los valores calculados de la temperatura de fusión para un ácido nucleico con una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos y con un contenido G + C del 50% en ausencia de formamida. Las condiciones experimentales para la hibridación de ADN han sido descritas en los manuales especializados de la genética, tal como por ejemplo la publicación Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning”, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 y pueden calcularse según las fórmulas conocidas por el técnico en la materia, por ejemplo en función de la longitud de los ácidos nucleicos, del tipo de los híbridos o del contenido G + C. El técnico en la materia puede ver otras informaciones relativas a la hibridación en los siguientes manuales: Ausubel *et al.* (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Se entenderá igualmente por el concepto de “derivados” las secuencias de conformidad con la invención según las SEQ ID Nr. 1 - 4 también las variantes del promotor, que se encuentren conectadas por delante de las regiones codificantes de las secuencias de conformidad con la invención; éstas pueden modificarse mediante uno o varios intercambios de nucleótidos, mediante inserción, mediante adición y/o mediante delección, sin que queden afectadas negativamente las propiedades del promotor, especialmente la potencia del promotor y la aptitud a la inducción. El concepto de derivado abarca sin embargo, también, aquellas variantes de promotores, que queden reforzadas en cuanto a su actividad a partir de las secuencias de conformidad con la invención por medio de uno o de varios intercambios de nucleótidos.

Las “enfermedades neoplásticas” son aquellas, que están relacionadas con un comportamiento de crecimiento anormal de las células, la eliminación de los mecanismos intercelulares de inhibición, etc. A éstas pertenecen, por ejemplo, los carcinomas como proliferaciones anormales de células endodermales, las enfermedades linfoneoplásticas, los melanomas, etc.

ES 2 305 077 T3

Un ácido nucleico preferente codifica una proteína con una secuencia según una de las SEQ ID Nr. 5 - 8 o una proteína que presente al menos un 70% de identidad con respecto a una de las secuencias citadas.

5 En otra forma preferente de realización, el ácido nucleico tiene una identidad al menos del 70% con respecto a los segmentos codificantes de una de las secuencias según una de las SEQ ID Nr. 1 - 4.

En otra forma preferente de realización, el ácido nucleico codifica una secuencia proteínica según una de las SEQ ID Nr. 5 - 8, siendo especialmente preferente el ácido nucleico, que codifica la SEQ ID Nr. 7.

10 De manera preferente, el ácido nucleico de conformidad con la invención es un ADN, pudiendo entrar en consideración sin embargo también un ARN o un APN.

15 Como ácido nucleico, de conformidad con la invención, son especialmente preferentes aquellos, que sean adecuados de inhibir la expresión de una serina-treonina-cinasa en orientación no codificante o antisentido con respecto a un promotor tras la introducción en una célula huésped.

20 Los constructos, de conformidad con la invención, contienen la secuencia de ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, en combinación con otras secuencias, con las cuales no están asociados usualmente en el genoma de una célula huésped. Tales “secuencias foráneas” son, de manera preferente, elementos genéticos de regulación, las señales de transcripción y las señales de traducción (denominados también como “elementos reguladores de la expresión” o secuencias derivadas de vectores). Las secuencias, de conformidad con la invención, están enlazadas funcionalmente con estos elementos.

25 Este enlazamiento puede conducir a un aumento o a una disminución de la expresión génica, de conformidad con la aplicación deseada. Con los constructos de ácidos nucleicos recombinantes, preparados de este modo, pueden transformarse organismos huésped. Además de estas secuencias reguladoras, puede estar presente la regulación natural de estas secuencias por delante de los genes estructurales propiamente dichos y puede ser modificada genéticamente en caso dado de tal manera, que la regulación natural sea interrumpida y quede aumentada la expresión de los genes. Sin embargo, el constructo génico puede estar formado también de una manera más sencilla, es decir que no se insertan señales de regulación adicionales por delante de las secuencias y no se elimina el promotor natural con su regulación. En su lugar puede mutarse la secuencia reguladora natural de tal manera, que ya no se verifique ningún tipo de regulación y que se aumente la expresión génica. Sobre el extremo 3' de las secuencias de ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, puede insertarse otros elementos reguladores ventajosos. Las secuencias de los ácidos nucleicos según las SEQ ID Nr. 1 - 4 y/o las secuencias que codifican las proteínas correspondientes según las SEQ ID Nr. 5 - 8 pueden estar contenidas en una o en varias copias de un constructo génico, o pueden estar localizadas en constructos génicos independientes. Las secuencias reguladoras ventajosas están contenidas, por ejemplo, en los promotores tales como el promotor cos, el promotor tac, el promotor trp, el promotor tet, el promotor trp-tet, el promotor Ipp, el promotor lac, el promotor Ipp-lac, el promotor lacIq, el promotor T7, el promotor T5, el promotor T3, el promotor gal, el promotor trc, el promotor ara, el promotor SP6, el promotor I-PR o el promotor I-PL, que encuentran aplicación, de manera preferente, en las bacterias gram-negativas. Otras secuencias reguladoras ventajosas están contenidas, por ejemplo, en los promotores gram-positivos tales como amy y SPO2, en los promotores de la levadura tales como ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH o en los promotores de los mamíferos tales como CaM-cinasa 11, CMV, nestina, L7, BDNF, NF, MBP, NSE, beta-globina, GFAP, GAP43, la tirosina hidroxilasa, la subunidad 1 receptora de cainato, la subunidad B receptora del glutamato. En principio pueden emplearse todos los promotores naturales con sus secuencias reguladoras como las que han sido citadas precedentemente. De igual modo, pueden emplearse, ventajosamente también, los promotores sintéticos. Estas secuencias reguladoras deben posibilitar la expresión específica de las secuencias de los ácidos nucleicos y la expresión proteínica. Esto puede significar, por ejemplo, según el organismo huésped, que el gen es expresado o que es sobreexpresado solamente tras la inducción, o que es expresado y/o que es sobreexpresado inmediatamente. De manera preferente, las secuencias reguladoras o bien los factores reguladores pueden influenciar en este caso positivamente la expresión y, de este modo, pueden aumentarla. De este modo puede llevarse a cabo un reforzamiento de los elementos reguladores, de manera ventajosa, en el plano de la transcripción, utilizándose potentes señales de transcripción tales como promotores y/o “reforzadores”. Sin embargo, también es posible un reforzamiento de la traducción, mejorándose, por ejemplo, la estabilidad del ARNm. Se entenderá por “reforzadores”, por ejemplo, aquellas secuencias de ADN, que provoquen una expresión acrecentada mediante un efecto de interacción mejorado entre la ARN-polimerasa y el ADN. A título de otras secuencias reguladoras pueden citarse, por ejemplo, las “regiones de control local” (“locus control regions”), los “silenciadores” (“silencer”) o cualquier secuencia parcial de los mismos. Estas secuencias pueden emplearse, de manera ventajosa, para una expresión específica del tejido. Una forma preferente de realización consiste en el enlazamiento de la secuencia de ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, con un promotor, colocándose el promotor en el sentido 5' “hacia arriba”. Otras señales reguladoras tales como los terminadores situados en 3' o las señales de poliadenilación o los reforzadores pueden encontrar aplicación funcional en el constructo de los ácidos nucleicos. Se entenderá bajo el concepto también los constructos vectoriales completos. Estos constructos vectoriales o vectores se utilizan para la expresión en un organismo huésped adecuado. De manera ventajosa se insertarán los ácidos nucleicos y/o los genes, de conformidad con la invención, para las Ser-Thr-proteínas en un vector específico para el huésped, que posibilite una expresión óptima de los genes en el huésped seleccionado. Los vectores son perfectamente conocidos por el técnico en la materia y pueden tomarse, por ejemplo, del libro Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). De igual modo se entenderá por vectores, además de los plásmidos, también todos los otros vectores conocidos por el técnico en la materia tales como, por ejemplo, los fagos, los virus tales como el SV40, el CMV, el

baculovirus, el adenovirus, el virus Sindbis, los transposones, los elementos IS, los fasmidos, los fagémidos, los cósmidos, los ADN lineales o circulares. Estos vectores pueden replicarse de manera autónoma en el organismo huésped o pueden replicarse por vía cromosómica. Para la integración en los mamíferos se utilizará, de manera ventajosa, ADN lineal. La expresión de las secuencias de ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, o bien del constructo de ácidos nucleicos recombinante puede aumentarse de manera ventajosa mediante el aumento del número de copias génicas y/o mediante el reforzamiento de los factores reguladores, que influyen positivamente sobre la expresión génica. De este modo puede llevarse a cabo un reforzamiento de los elementos reguladores de manera preferente en el plano de la transcripción, utilizándose señales de transcripción más potentes tales como promotores y reforzadores. Sin embargo es posible, de igual modo, un reforzamiento de la traducción, mejorándose, por ejemplo, la estabilidad del ARNm o aumentándose la eficiencia de lectura de este ARNm sobre los ribosomas. Para aumentar el número de copias génicas pueden incorporarse las secuencias de los ácidos nucleicos o los genes homólogos, por ejemplo en un fragmento de ácido nucleico o bien en un vector, que contenga, de manera preferente, las secuencias génicas reguladoras, asociadas con los genes correspondientes o que contenga una actividad de promotor que actúe de manera análoga. De manera especial se utilizarán aquellas secuencias reguladoras, que refuerzan la expresión génica. Las secuencias de los ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, pueden ser clonadas en un solo vector junto con las secuencias que codifican proteínas interactuantes y, a continuación, pueden expresarse en el organismo deseado. De manera alternativa puede aportarse también cada una de las secuencias de los ácidos nucleicos potencialmente interactuantes y las secuencias, que codifican m30, respectivamente en un vector independiente y éstos pueden aplicarse, por separado, en el organismo correspondiente por medio de los métodos usuales tales como la transformación, la transfección, la transducción, la electroporación o el cañón de partículas. De igual modo puede expresarse el constructo de los ácidos nucleicos de conformidad con la invención o los ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, también en forma de fragmentos adecuados desde el punto de vista terapéutico y de diagnóstico. Para la generación de la proteína recombinante pueden emplearse sistemas vectoriales u oligonucleótidos, que prolonguen a los ácidos nucleicos o al constructo de los ácidos nucleicos con determinadas secuencias de nucleótidos y que codifiquen, de este modo, polipéptidos modificados, que sirvan para una purificación más sencilla. Se han dado a conocer en la literatura a título de tales “marcadores” (“Tags”), por ejemplo el marcador de hexa-histidina o los epitopos, que puedan ser reconocidos como antígenos de diversos anticuerpos (Studier *et al.*, Meth. Enzymol., 185, 1990: 60 - 89 y Ausubel *et al.* (eds.) 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York).

Como células huésped son adecuadas, en principio, todas aquellas células que posibiliten una expresión de los ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, sus variantes alelofórmicas, sus equivalentes o sus derivados funcionales o del constructo recombinante de los ácidos nucleicos. Por células huésped se entenderán, por ejemplo, las bacterias, los hongos, las levaduras, las células vegetales o animales. Las células/ organismos huésped preferentes son las bacterias tales como *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* o *Pseudomonas*, microorganismos eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, células eucariotas superiores procedentes de los seres humanos o de los animales, por ejemplo las células COS, HeLa, HEK293, Sf9 o CHO. La combinación formada por el organismo huésped y por los vectores apropiados para los organismos tales como los plásmidos, los virus o los fagos tales como, por ejemplo, los plásmidos con el sistema de ARN-polimerasa/promotor, los fagos λ , Mu u otros fagos o transposones atenuados y/o otras secuencias ventajosamente reguladoras constituyen un sistema de expresión. Se entenderá por el concepto de sistema de expresión, de manera preferente, por ejemplo la combinación constituida por células de mamíferos tales como células CHO y por vectores tales como el neo-vector pcDNA3 o las células HEK293 y el vector CMV, que son adecuados para las células de los mamíferos. Sin embargo entran también en consideración los sistemas de expresión *in vitro*, exentos de células.

También entran en consideración, como huéspedes, de conformidad con la invención, para la expresión de los ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, tejidos de mamíferos, órganos de mamíferos o bien mamíferos transgénicos no humanos. Los huéspedes citados se diferencian del tipo silvestre preferentemente en que contienen una cantidad modificada de la proteína de conformidad con la invención en comparación con el tipo silvestre o bien en una nueva variante proteínica de la proteína-cinasa, de conformidad con la invención. Sin embargo quedan abarcados también los organismos huésped, en los cuales se haya retirado bien por completo o bien en parte el ácido nucleico, de origen natural, que codifican una proteína de conformidad con la invención o que hayan sido modificados de tal manera, que sean inactivos a la transcripción.

De manera preferente, los citados organismos contienen el ácido nucleico, de conformidad con la invención, o bien el constructo, de conformidad con la invención, integrado en un punto del genoma, que no corresponda a su posición natural, como se presenta en el tipo silvestre.

Como mamíferos transgénicos no humanos entran en consideración, de manera preferente, los ratones, las ratas, los corderos, las terneras o los cerdos, entrando en consideración, sin embargo, como receptores de las secuencias, de conformidad con la invención, también los organismos no mamíferos, tales como las plantas. Los organismos transgénicos pueden estar constituidos también por los denominados animales transgénicos (Knock-Out). En este caso, los animales transgénicos pueden contener una secuencia de ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, funcional o no funcional o pueden contener un constructo de ácidos nucleicos funcional o no funcional. Otra configuración, de conformidad con la invención, de los animales transgénicos, precedentemente descritos, está constituida por animales transgénicos no humanos, en cuyas células germinales o en la totalidad o en una parte de las células somáticas; o en cuya célula germinal y en la totalidad o en una parte de las células somáticas se haya modificado la secuencia de nucleótidos, de conformidad con la invención, por medio de procedimientos de ingeniería genética o se haya interrumpido mediante la inserción de elementos de ADN. Otra posibilidad para el empleo de la secuencia de nucleótidos o de

partes de la misma consiste en la generación de animales transgénicos o knock-out o de animales transgénicos knock-out condicionales o regioespecíficos o de mutaciones específicas en animales genéticamente modificados (Ausubel *et al.* (eds.) 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York y Torres *et al.*, (eds.) 1997, Laboratory protocols for conditional gene targeting, Oxford University Press, Oxford). Pueden generarse modelos animales mediante sobreexpresión transgénica o mediante mutación genética (mutación nula o deleciones, inserciones o modificaciones específicas) mediante recombinación homóloga en células madres embrionales, cuyos modelos animales puedan proporcionar otras informaciones valiosas sobre la patogénesis de la apoplejía. Los modelos animales preparados de esta manera pueden representar sistemas de ensayo esenciales para la evaluación productos terapéuticos novedosos.

Las proteínas, de conformidad con la invención, pueden ser obtenidas mediante la expresión de uno de los ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, en un sistema de expresión adecuado, entrando en consideración, de manera preferente, células intactas que abarquen sistemas de expresión. De manera preferente, la proteína de conformidad con la invención, es una proteína elegida entre una proteína con una de las secuencias según las SEQ ID Nr. 5 - 8 o una proteína, que sea idéntica con respecto a las secuencias citadas al menos en un 70%, de manera especialmente preferente al menos en un 90%. En este caso el “% de identidad” se calcula con respecto a las secuencias según las SEQ ID Nr. 5 - 8 según el algoritmo de Altschul *et al.*, J. Mol. Biol, 250, 403 - 410, 1990. Sin embargo, la proteína, de conformidad con la invención, y las variantes funcionales de la misma pueden aislarse también a partir del cerebro de los mamíferos tales como el *Homo sapiens*, el *Rattus norvegicus* o el *Mus musculus*. Las proteínas, de conformidad con la invención, son también aquellas que se deriven de una proteína según una de las SEQ ID Nr. 5 - 8 mediante intercambio de aminoácidos, permaneciendo esencialmente sin modificaciones la actividad de la proteína-cinasa. A título de ejemplo pueden reemplazarse los aminoácidos en la proteína de partida según las SEQ ID Nr. 5 - 8 por aquellas con propiedades fisicoquímicas similares (ocupación especial, basicidad, hidrofobicidad, etc.). A título de ejemplo pueden intercambiarse restos de arginina por restos de lisina, restos de valina por restos de isoleucina o restos de ácido asparagínico por restos de ácido glutamínico. Sin embargo pueden intercambiarse también uno o varios aminoácidos con respecto a su orden, pueden ser insertados o eliminados, o pueden combinarse entre sí varias de las medidas citadas. El técnico en la materia conoce las medidas para la modificación de una secuencia dada de aminoácidos para dar una secuencia deseada.

La obtención de los anticuerpos, de conformidad con la invención, que reaccionan con una proteína, de conformidad con la invención, es conocida por el técnico en la materia. Con esta finalidad, el técnico en la materia puede recurrir, por ejemplo, de la obtención de antisueros policlonales o bien puede recurrir la tecnología del hibridoma para la obtención de anticuerpos monoclonales.

Los inhibidores, de conformidad con la invención, son aquellas sustancias de bajo peso molecular o bien aquellas sustancias de tipo proteína, que inhiban de manera selectiva la actividad de la proteína-cinasa de la proteína de conformidad con la invención o bien que la puedan interrumpir por completo. Es posible, sin mayores problemas, que el técnico en la materia identifique y prepare inhibidores adecuados mediante el empleo de los ensayos tradicionales de proteína-cinasa para el cribado de sustancias. Los procedimientos de cribado adecuados y los ensayos de proteína-cinasa se describen más adelante. De igual modo pueden identificarse sustancias adecuadas con una afinidad de enlace deseada mediante el empleo del desarrollo de productos activos con ayuda del ordenador (CAD) (véase por ejemplo la publicación de Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg). Los inhibidores de la proteína-cinasa, de conformidad con la invención, identificados de este modo, son adecuados, por ejemplo, para la profilaxis y/o para la terapia de la apoplejía y de otras enfermedades neurológicas (en particular neurodegenerativas) o neoplásicas. Como inhibidores para las sustancias de bajo peso molecular citadas entran en consideración también los péptidos y las proteínas, que puedan entrar en una interacción específica con el inhibidor de proteína-cinasa de conformidad con la invención. Tales inhibidores de péptidos o bien de proteínas pueden identificarse, por ejemplo, con ayuda del sistema de dos híbridos o también incluso con otros ensayos. Estos ensayos permiten la delimitación de los aminoácidos, que son responsables de una interacción específica con otros participantes en la interacción. De igual modo puede ensayarse la proteína de conformidad con la invención y su actividad de proteína-cinasa sencillamente en un sistema de ensayo, midiéndose la actividad de la proteína en presencia de la sustancia que debe ser ensayada. En este caso se trata, de manera preferente, de métodos de medición sencillos (técnicas calorimétricas, luminométricas, basadas en la fluorescencia o radioactiva), que permiten la rápida medición de una pluralidad de sustancias de ensayo (véase la publicación de Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg). Los sistemas de ensayo descritos permiten la exploración de bibliotecas químicas para encontrar sustancias, que tengan efectos inhibidores o bien incluso efectos activadores sobre las proteínas de conformidad con la invención. La cadena de transducción de señales puede inhibirse con estos inhibidores, cuya cadena es inducida en el caso de la isquemia y transcurre a través de la proteína de conformidad con la invención. Esto posibilita inhibir o bien impedir las secuelas isquémicas.

De igual modo pueden identificarse por medio del sistema de selección de dos híbridos, precedentemente citado, los participantes en la interacción, intracelulares, fisiológicos, de la proteína-cinasa de conformidad con la invención, tal como el sustrato de fosforilación, así como los participantes intracelulares en la interacción que regulan la actividad cinasa.

La cantidad proteínica puede determinarse con ayuda de anticuerpos y de igual modo puede determinarse la actividad (por ejemplo la fosforilación específica) de la proteína con las secuencias de las SEQ ID Nr. 5-8. Por lo tanto, otro objeto de la invención consiste en un procedimiento para la cuantificación de la actividad proteínica de una proteína

con una de las secuencias SEQ ID Nr. 5-8. A partir de las secuencias de los aminoácidos según las SEQ ID Nr. 5-8 pueden generarse péptidos sintéticos, que se utilizan como antígenos para la producción de anticuerpos. De igual modo es posible emplear el polipéptido o fragmentos del mismo para la generación de anticuerpos. Con el concepto de “anticuerpos” quieren indicarse tanto los anticuerpos policlonales, monoclonales, humanos o humanizados o recombinantes o fragmentos de los mismos, anticuerpos de cadena simple (single chain) o incluso anticuerpos sintéticos. Se entenderá por anticuerpos de conformidad con la invención o sus fragmentos, en principio, todas las clases de inmunoglobulina tales como la IgM, la IgG, la IgD, la IgE, la IgA o sus subclases tales como las subclases del IgG o sus mezclas. Son preferentes el IgG y sus subclases, tales como por ejemplo el IgG1, el IgG2, el IgG2a, el IgG2b, el IgG3 o el IgGM. Son especialmente preferentes los subtipos IgG1/k o IgG2b/k de IgG. Como fragmentos son citados todos los fragmentos de anticuerpos acortados o modificados con uno o dos puntos de enlace complementarios del antígeno, tales como partes de anticuerpos con un punto de enlace formado por cadenas ligeras y por cadenas pesadas, que corresponden a los anticuerpos, tales como fragmentos Fv, Fab o F(ab')₂ o fragmentos monocatenarios. Son preferentes los fragmentos bicatenarios acortados tales como Fv, Fab o F(ab')₂. Estos fragmentos pueden obtenerse, por ejemplo, por vía enzimática mediante la disociación de la parte Fc del anticuerpo con enzimas tales como papaína o pepsina, mediante oxidación química o mediante manipulación por ingeniería genética de los genes de los anticuerpos. De igual modo pueden emplearse, de manera ventajosa, los fragmentos no acortados, genéticamente manipulados. Los anticuerpos o los fragmentos pueden emplearse por sí solos o en mezclas. Los genes de los anticuerpos para las manipulaciones realizadas por ingeniería genética pueden aislarse en forma conocida por el técnico en la materia, por ejemplo a partir de las células hibridoma (Harlow, E. and Lane, D. 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; Ausubel *et al.*, (eds), 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York). Con esta finalidad se cultivan células productoras de anticuerpos y se aíslan de manera conocida a partir de las células los ARNm, cuando la densidad óptica de las células sea suficiente, mediante lisis celular con tiocianato de guanidinio, acidificación con acetato de sodio, extracción con fenol, cloroformo/alcohol isoamílico, precipitación con isopropanol y lavado con etanol. A continuación se sintetiza con ayuda de la transcriptasa inversa ADNc a partir del ARNm. El ADNc sintetizado puede insertarse directamente o tras manipulación genética por ejemplo mediante la mutagénesis localmente dirigida (“site directed mutagenesis”), el aporte de inserciones, inversiones, delecciones o intercambio de bases en vectores animales, fúngicos, bacterianos o virales adecuados y expresarse en los organismos huésped correspondientes. Serán preferentes los vectores bacterianos o los vectores de levaduras tales como pBR322, pUC18/19, pA-CYC184, los vectores lambda o los vectores mu de levadura para la clonación de los genes y para la expresión en bacterias tales como *E. coli* o bien en las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*. Los anticuerpos específicos contra las proteínas, de conformidad con la invención, pueden ser adecuados tanto como reactivos de diagnóstico así como también como productos terapéuticos para las enfermedades, en las cuales tenga un significado patofisiológico la proteína de conformidad con la invención.

El estuche de diagnóstico, de conformidad con la invención, contiene uno de los ácidos nucleicos de conformidad con la invención, o un constructo que lo contenga, una proteína de conformidad con la invención y/o un anticuerpo, que sea específico para la proteína de conformidad con la invención, así como los reactivos adicionales que, de manera usual, constituyen parte integrante del estuche para el diagnóstico. A éstos pertenecen las soluciones tampón, adecuadas, y otros reactivos de detección.

La muestra del paciente se pone en contacto, en el procedimiento de conformidad con la invención, para la diagnosis de un riesgo de apoplejía o para evaluar el desarrollo de un infarto cerebral, con un ácido nucleico de conformidad con la invención y se determina en la muestra del paciente el ácido nucleico hibridizado de este modo. Un nivel elevado en ácido nucleico, que hibridice con el ácido nucleico de conformidad con la invención, es un factor indicador de un riesgo elevado de la aparición de una apoplejía. De manera alternativa, para la detección del ácido nucleico en la muestra del paciente podrá determinarse también la cantidad de proteína, de conformidad con la invención, como factor indicador de un riesgo de apoplejía. Para la detección de la proteína pueden emplearse, por ejemplo, los anticuerpos de conformidad con la invención. Un nivel elevado en proteína en la muestra del paciente que debe ser ensayada es, igualmente, un factor indicador de un riesgo mayor de apoplejía. Estas determinaciones pueden llevarse a cabo también, sin otros problemas, de manera cuantitativa, siendo el control negativo el material de un paciente sano.

De igual modo pueden emplearse el ácido nucleico, de conformidad con la invención, así como la proteína codificada por el mismo o bien los oligonucleótidos y los péptidos de los mismos así como los anticuerpos dirigidos contra los anteriores, para el diagnóstico de otras enfermedades, especialmente de las enfermedades neurológicas o cardiovasculares o inmunológicas o tumorales. De igual modo, estos materiales pueden aplicarse para el diagnóstico de predisposiciones genéticas para determinadas enfermedades neurológicas, neoplásicas, cardiovasculares e inmunológicas. De igual modo, puede llevarse a cabo con estos materiales una monitorización del tratamiento de las enfermedades citadas.

Un procedimiento para la detección cualitativa y cuantitativa de un ácido nucleico, de conformidad con la invención, en una muestra biológica, comprende las etapas siguientes: a) la incubación de una muestra biológica con una cantidad conocida de ácido nucleico de conformidad con la invención o con una cantidad conocida de oligonucleótidos, que sean adecuados como cebadores para una amplificación del ácido nucleico de conformidad con la invención, b) la detección del ácido nucleico de conformidad con la invención por medio de una hibridación específica o por medio de una amplificación por RCP, c) la comparación de la cantidad de ácido nucleico hibridizado o de ácido nucleico obtenido mediante la aplicación por RCP con un patrón cuantitativo. Un procedimiento para la detección cualitativa y cuantitativa de un heterómero proteínico de conformidad con la invención o de una proteína, de conformidad con la invención, en una muestra biológica, comprende las etapas siguientes: a) la incubación de una muestra biológica con

- un anticuerpo, que esté específicamente dirigido contra el heterómero proteínico o contra la proteína de conformidad con la invención, b) la detección del anticuerpo/del complejo antígeno, c) la comparación de la cantidad del anticuerpo/complejo antígeno con un patrón cuantitativo. Como patrón se tomará, usualmente, una muestra biológica de un organismo sano. De manera especial, en este caso puede aprovecharse la propiedad, indicada más adelante, del ácido nucleico según las SEQ ID Nr. 1 - 4 para elevar la regulación tras determinados estímulos patofisiológicos, tales como por ejemplo las isquemias cerebrales I. Esto se refiere, por ejemplo, a la evaluación del desarrollo de enfermedades (tal como por ejemplo de la apoplejía), a la evaluación de los éxitos conseguidos con la terapia, a la graduación de una enfermedad.
- La composición farmacéutica, de conformidad con la invención, contiene un ácido nucleico, de conformidad con la invención, un constructo que lo contiene, una célula huésped que contiene los objetos citados, una proteína de conformidad con la invención, un anticuerpo dirigido contra la anterior y/o un inhibidor de conformidad con la invención en caso dado junto con los productos auxiliares y excipientes usuales.
- Las aplicaciones terapéuticas de los objetos de conformidad con la invención se refieren a la modulación de los procesos, que dependen de la fosforilación de las proteínas fisiológicas. A éstos pertenecen también los siguientes acontecimientos fisiológicos o bien patofisiológicos: la influenciación de los procesos de activación inmunológicos (por ejemplo la activación de monocitos, de células T); la influenciación de los procesos de la muerte celular, por ejemplo cascadas, que conduzcan a la muerte celular, o de procesos que conduzcan a un crecimiento ilimitado. A los tipos celulares que pueden ser tratados pertenecen, de manera especial, las células neurales, las células tumorales y las células del sistema inmunitario. Finalmente pueden influenciarse con los materiales, de conformidad con la invención, las interacciones celulares, en las que participan las proteína-cinasas, por ejemplo la división celular, la diferenciación celular, la plasticidad y la regeneración.
- El ácido nucleico, de conformidad con la invención, así como el constructo que los contiene, las células huésped correspondientes así como la proteína, de conformidad con la invención, el anticuerpo de conformidad con la invención y/o el inhibidor de conformidad con la invención puede emplearse, de manera especial, para la profilaxis y/o para la terapia de las enfermedades neurológicas, especialmente de las enfermedades neurodegenerativas. A éstas pertenecen, de manera especial, la apoplejía, la esclerosis múltiple, el Morbus Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, las ataxias heterodegenerativas, el Morbus Huntington, las neuropatías y las epilepsias.
- De igual modo pueden diagnosticarse/terapiarse preferentemente con los mismos las enfermedades tumorales. Ejemplos de tales enfermedades tumorales son, por ejemplo, el carcinoma de colon, el rhabdiosarcoma, el carcinoma bronquial.
- Los ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, pueden emplearse también en el ámbito de la terapia génica en los mamíferos y, de manera especial, en los seres humanos. En la terapia génica pueden emplearse las secuencias, de conformidad con la invención, bien en el cuerpo o en partes del mismo o puede regularse la expresión de las secuencias fisiológicas, tal como, por ejemplo, por medio de la tecnología no codificante o antisentido. Con esta finalidad pueden utilizarse oligonucleótidos, por ejemplo con orientación antisentido o pueden utilizarse oligonucleótidos del híbrido de ARN-ADN, que contengan secuencias de conformidad con la invención. De igual modo pueden emplearse constructos virales, que contengan una secuencia de conformidad con la invención. Finalmente puede emplearse el ADN desnudo, que contenga un ácido nucleico de conformidad con la invención.
- Los SNP identificados en los ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, son aprovechables de igual modo en el diagnóstico con investigación de enfermedades hereditarias humanas. Los ácidos nucleicos, de conformidad con la invención, pueden utilizarse con objeto de aislar y de caracterizar otros genes para los ARNm homólogos en el genoma murino y en el genoma humano con métodos usuales mediante el cribado por homología y correlacionarse con las características ya conocidas de las enfermedades hereditarias humanas. Esto posibilita la identificación de otros genes como origen de determinadas enfermedades hereditarias.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra el principio del procedimiento de la representación diferencial por medio de la restricción (RMDD).

La figura 2 muestra la distribución tisular de la proteína, de conformidad con la invención, en la rata:

La figura superior muestra una transferencia de Northern que ha sido obtenida con una sonda murina a partir de la región 3' de la SEQ ID Nr. 1. La figura inferior muestra la coloración con bromuro de etidio del gel de ARN mostrado en la parte superior.

Se detecta una sola banda de la muestra. La expresión de mayor potencia de la proteína, de conformidad con la invención, se presenta en el cerebro; de igual modo se encuentra todavía claramente también en los testículos y en el pulmón la transcriptasa, mientras que los otros tejidos únicamente presentan una banda débil.

La figura 3 muestra la distribución tisular de la proteína de conformidad con la invención en los seres humanos.

Se ha representado una RCP cuantitativa con ayuda del sistema ciclador de luz (Light-Cycler) y el aprovechamiento del estuche MTC (ADNc tisular múltiple) de la firma Clontech. La expresión máxima se encuentra en el cerebro y en los pulmones y en los órganos intestinales.

La figura 4 muestra la inducción de la proteína, de conformidad con la invención, por medio de la isquemia cerebral focal.

Se ha mostrado la cuantificación de la 9B5 ARNm con ayuda del sistema ciclador de luz tras inducción de una isquemia cerebral focal en ratones. El ácido nucleico, de conformidad con la invención, se regula por incremento al cabo de dos horas desde un episodio isquémico. Al cabo de seis horas desde la isquemia ya no puede detectarse esta inducción.

La figura 5 muestra la inducción de la proteína, de conformidad con la invención, por medio de isquemia cerebral focal (hibridación *in situ* de cerebro de ratón).

Se ha mostrado una hibridación *in situ* de la 9B5 tras inducción de una isquemia cerebral focal en ratones. El ácido nucleico, de conformidad con la invención, se regula por incremento al cabo de dos horas desde un episodio isquémico (lado izquierdo = isquémico = inducido). De igual modo puede verse que la 9B5 se expresa en neuronas. Se encuentra una inducción especial en la corteza y en la región del hipocampo.

La figura 6 muestra la región catalítica de la SEQ ID Nr. 7. En este caso los símbolos tienen el siguiente significado: I = fijador de fosfato, VIb = región catalítica, VII - VIII = bucle de activación, V-XI = dominio catalítico con subdominios (según Hanks und Hunter, 1995, FASEB J., 9, 576-596); * = puntos de activación, A = puntos de enlace de ATP; C = centro activo

La figura 7 muestra la construcción fisiológica de las proteína-cinasas homólogas. La H9B5 es la proteína filogenética más joven y más emparentada con la P78/c-TAK 1. También se ha mostrado claramente la disociación incipiente de la proteína C.elegans Par-1.

La figura 8 muestra la formación de los dominios de la 9B5.

La figura 9 es un trazado de la hidrofobicidad según Kyte-Doolittle.

La figura 10 muestra la estructura genómica de la 9B5 en los seres humanos.

Se han mostrado los 18 exones del gen de la 9B5. El exon 16 está sometido a empalmes diferenciales. La variante de la 9B5 se forma sin exon 16; la variante de la 9B5A contiene el exon 16.

Secuencia de proteínas de la 9B5

Las secuencias de proteínas murinas (SEQ ID Nr. 5 y 6) son incompletas en el extremo 5'. En el caso de las secuencias humanas según las SEQ ID Nr. 7 y 8 se trata de clones de longitud completa. Esto se produce también como consecuencia del alineamiento con proteína-cinasas homólogas.

Para h9B5 (SEQ ID Nr. 7) se produce una pauta de lectura abierta, que codifica una proteína con 752 aminoácidos (peso molecular 82,5 kD; punto isoeléctrico a pH 9,7). El programa PSORT II no proporciona secuencias de señal significativas, y no predice ninguna región transmembranal. Un trazado de la hidrofobicidad de Kyte-Doolittle (figura 9) presenta, igualmente, una elevada proporción en regiones hidrófilas y únicamente una gran región hidrófoba (aproximadamente AS 240-255), que, sin embargo, no parece ser suficientemente hidrófoba para una región transmembranal (índice > -3). Sin embargo, es interesante en este contexto la localización protocolizada, asociada con la membrana, de algunas proteínas emparentadas (p78/c-TAK1, par1).

Para la secuencia h9B5_b (SEQ ID Nr. 8) se produce una pauta de lectura abierta de 688 aminoácidos con un peso molecular de 75,3 kD y un punto isoeléctrico a pH 9,8. Mediante la inserción del exon 16 tiene lugar un desplazamiento de la pauta, que conduce a un bucle de traducción precoz.

Clasificación de la 9B5

Una comparación con las proteína-cinasas conocidas permite la asignación de la proteína, de conformidad con la invención, al subgrupo "CaMK grupo II" según Hanks http://www.sdsc.edu/Kinases/pkr/pk_catalytic/pk_hanks_seq_align_long.html, (véase la publicación de Hanks and Lindberg, Methods Enzymol, 200, 525-32, (1991); Hanks and Hunter, Faseb J, 9, 576-96, (1995)). Drewes *et al.* (Drewes, *et al.*, Cell, 89, 297-308, (1997)) postularon ya para MARK1/MARK2 y p78 un nuevo subgrupo en el subgrupo SNF1/AMPK, ya definido, del grupo CaMKII. Tras el alineamiento de la proteína más homóloga (9B5, Par1, cTAK1/p78, MARK1, EMK) y la construcción filogenética (figura 7) existe la posibilidad de que la 9B5 defina un nuevo subgrupo. La 9B5 se diferencia en gran medida en el extremo carboxi de las otras proteína-cinasas. Las cinasas, que se encuentran en este grupo, se caracterizan por un dominio carboxiterminal fuertemente conservado, que termina con la secuencia "ELKL". Por lo tanto se designó la EMK también como "cinasa con motivo ELKL". Se supone que existen todavía proteína-cinasas que son similares en

el extremo carboxi a la 9B5 y que pueden identificarse mediante cribado por homología. Una busca con el programa “tblastn” frente al banco de datos de nucleótidos EMBL no ha proporcionado hasta ahora ninguna indicación sobre homólogos ya conocidos en la región del extremo carboxi.

- 5 De igual modo se conoce por la publicación WO9801756 la proteína cinasa TcAK1 con una identidad del 67% aproximadamente en la región codificante con la 9b5 (SEQ ID NO:1).

El sustrato fisiológico de la proteína, de conformidad con la invención, puede estar constituido por proteínas con secuencias diana KXGS y/o KVGs. Por lo tanto, la tauproteína o las proteínas MAP1 y 2 pueden representar un
10 sustrato fisiológico de las proteína-cinasas de conformidad con la invención.

Subdominios del dominio catalítico: la 9B5 es una serina-treonina-proteína-cinasa

Los subdominios catalíticos importantes pueden definirse claramente mediante la comparación con otras proteína-cinasas (véase la figura 6). Del mismo modo pueden mostrarse los puntos de activación (una treonina y una serina
15 que pueden ser fosforiladas; pos. 211 y 215 en h9B5, figura 6). Una mutación de estos aminoácidos por ejemplo para dar alanina conduce a una inactivación constitutiva. De igual modo la mutación del resto lisina (enlace ATP) en el subdominio II (véase la figura 6) conduce a una inactivación. Estos conocimientos pueden ser aprovechados para otros experimentos, por ejemplo con aprovechamiento de efectos negativos dominantes. Una mutación de Pos. 211 (Ser) y
20 de 215 (Thr) para dar glutamato o aspartato debería conducir a la activación constitutiva puesto que el grupo cargado negativamente puede imitar una fosforilación (Huang and Erikson, Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 8960-3, (1994). Estos mutantes pueden aprovecharse para la sobreexpresión de la actividad específica cinasa en células o en animales transgénicos.

25 Se sabe que el subdominio I actúa a modo de corchete, que fija los grupos fosfatos que no pueden ser transferidos del ATP. En este caso la secuencia péptida GKGNFAKV en la 9B5 se adapta perfectamente al motivo de consenso GXGXXGXV (Hanks and Hunter, Faseb J, 9, 576-96, (1995)). En el subdominio II es importante ante todo la lisina (marcada con “A” en la figura 6); ésta fija y orienta a los alfa-fosfatos y a los beta-fosfatos del ATP y es esencial para la función enzimática. El subdominio VIb está caracterizado porque la secuencia de consenso HRDLKXXN. Ésta está
30 perfectamente conservada también en la 9B5: HRDLKAEN.

En este caso, probablemente el aspartato (D) es el aceptor de los protones para el grupo hidroxilo atacante durante la reacción de transferencia del fósforo (Hanks and Hunter, Faseb J, 9, 576-96, (1995)). El subdominio VII forma con los iones Mg²⁺ un complejo quelato, que incluye el gama-fosfato y, por lo tanto, orienta a este grupo para la
35 transferencia. La secuencia DFG es prácticamente invariable. De igual modo se mantiene la secuencia APE conservada en el subdominio VIII. Este dominio es el encargado del reconocimiento del péptido. En este caso, pueden enlazarse también péptidos inhibidores. Muchas proteína-cinasas son activadas dentro de este subdominio por medio de la fosforilación. Este dominio está completamente conservado en EMK, p78 y MARK1. En MARK1 se mostró ya, mediante la secuenciación directa, que la treonina (T) y que la serina (S) pueden ser fosforiladas, y que, de este modo,
40 se activa la MARK1. Puede partirse con la máxima probabilidad, debido a esta conservación, de que la 9B5 puede ser fosforilada en este punto y, de este modo, puede ser regulada. Probablemente tiene lugar una autofosforilación, pudiendo ser imaginable también una activación por medio otra cinasa. Probablemente, en este dominio la tirosina (Y) es un punto de fosforilación (tal como por ejemplo en el caso de Erk1/2). De igual modo, el subdominio IX participa en el enlace peptídico (interacción hidrófoba).

45 Como consecuencia de este desarrollo estructural puede partirse con seguridad de la base de que la 9B5 es una proteína-cinasa activa (serina-treonina-cinasa).

Expresión tisular de la 9B5

50 La expresión tisular de la 9B5 se ensayó en el caso del ratón y en el caso de los seres humanos. En el caso del ratón se llevó a cabo una “transferencia tisular múltiple” (“multiple tissue northern”) con diversos tejidos (figura 2). Como muestra se utilizó un fragmento procedente de la región 3’ del ADNc del ratón. En este caso se encuentra la expresión en el cerebro, en los testículos y en los pulmones.

55 En el caso de los seres humanos se llevó a cabo inicialmente una “transferencia tisular múltiple” (“multiple tissue northern”) (Clontech) con 2 sondas diferentes (a partir de la región 3’ y a partir de la región 5’). Sin embargo no se obtuvo ningún tipo de señal clara, lo cual se consideró que se debía a la pequeña presencia de la 9B5 en los seres humanos. Por lo tanto se llevó a cabo una RCP cuantitativa con ayuda del ciclador de luz (Light-Cyclers (Roche
60 Diagnostics, Mannheim)). Se emplearon muestras de ADNc de 8 tejidos humanos, que están ya cuantitativamente normalizados con respecto a 4 genes constitutivos diferentes (firma Clontech). Como control se empleó el plásmido h9B5-663, que contiene un fragmento amplificado de 9B5-ADNc humano. Como programa para la RCP se utilizó un protocolo de acceso (touchdown). En todas las muestras de tejido tuvo lugar una amplificación de un producto con el punto de fusión de 90°C, el cual coincide con la RCP de control. Un análisis de gel subsiguiente de los fragmentos
65 proporcionó un producto de 660 bp aproximadamente, es decir con el tamaño esperado. La 9B5 en el caso de los seres humanos realmente no está expresada de una manera muy pronunciada, la amplificación es visible en el ciclador de luz (LightCycler) solamente hacia el ciclo 32. Se utilizaron los siguientes cebadores:

seq_h9b5_s1 GTTGCCATCAAGATTATC (en el exon 3)

seq_h9b5_a4 CATGATTTGCTCGAGAGTAC (en el exon 9)

5

El análisis cuantitativo (figura 3) muestra una distribución tisular relativamente ubicuitaria con puntos esenciales en el cerebro y en los pulmones, en el hígado, en los riñones y en el páncreas.

10 Regulación mediante isquemia cerebral focal de un modelo de apoplejía

La serina-treonina-cinasa 9B5, de conformidad con la invención, se identificó por medio de un procedimiento para la clonación de genes diferencialmente regulados (RMDD) en el hemisferio isquémico del ratón tras isquemia cerebral focal. El modelo animal de la isquemia cerebral focal representa un modelo válido para la apoplejía isquémica humana. Para provocar la isquemia cerebral focal se utilizó el modelo denominado filamentoso, según el cual se hace avanzar un hilo de nylon recubierto a través de A. carotis interna hasta la salida de la A. cerebri media y se induce una apoplejía isquémica (Clark, *et al.*, Neurol. Res., 19, 641-648, (1997)). La regulación de la expresión génica juega un papel decisivo en la isquemia cerebral para el desarrollo y la magnitud de la lesión de las neuronas (Koistinaho and Hokfelt, *Neuroreport*, 8, i-viii, (1997), Schneider, *et al.*, Nat Med, 5, 554-9, (1999)). De manera especial los genes "inmediatamente primigenios" ("immediate early") juegan aquí un papel (Atkins, *et al.*, Stroke, 27, 1682-1687, (1996)), tal como por ejemplo cox-2, (Nogawa, *et al.*, J. Neurosci., 17, 2746-2755, (1997)).

La expresión de la 9B5 se investigó en tres períodos de tiempo tras una isquemia cerebral focal: por un lado en una isquemia pasajera al cabo de dos períodos de perfusión (90 minutos de isquemia, 2 horas y 6 horas de perfusión), y, por otro lado, en una isquemia permanente de 24 horas (figura 4). Se obtuvo ARN a partir de ambas mitades hemisféricas de 3-4 cerebros sin tronco encefálico y sin cerebelo (Fasttrack kit, Invitrogen). Con ayuda del sistema ciclador de luz (LightCycler™) (Roche Diagnostics, Mannheim) se llevó a cabo una RCP cuantitativa. El contenido en ADNc de las muestras se normalizó a la expresión de la ciclofilina y de S20 (Schneider, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 4447-51, (1995)). Los cebadores empleados para la amplificación de la ciclofilina fueron:

30

cyc5 ACCCCACCGTGTCTTCGAC

35

acyc300 CATTTGCCATGGACAAGATG

y para la amplificación de la 9B5 del ratón:

40

9_B5_(1)_1s TATGATCGAACCTCCTTCATGCC

9_B5_(1)_1a ATGTCCAGAACTGGGCCTAGCG (Estos cebadores amplifican un amplímero de 556 bp, que se encuentra en el extremo 3' del ADNc del ratón).

45

En realidad, se muestra una clara regulación por incremento en un factor de 7-8 del 9B5-ARN sobre el semicerebro (izquierdo) isquémico al cabo de 2 horas desde el episodio isquémico (middle cerebral artery occlusion de 90 minutos y 2 horas de perfusión; figura 4); las barras de fallos muestran desviaciones normalizadas, que se producen a partir de las mediciones con diluciones en serie, realizadas 3 veces, de muestras de ADNc y de este modo representa la fiabilidad de los resultados de la medición). Sin embargo, al cabo de 24 horas (en un modelo permanente) no pudo detectarse ya ninguna diferencia.

55

De igual modo se llevó a cabo una hibridación *in-situ* con una sonda con una longitud de 1,6 kb a partir de la región 3' del 9B5-ADNc de ratón (respectivamente codificante y no codificante). En este caso se procedió esencialmente según el protocolo de la firma Roche Diagnostics (sistema de digoxigenina) según las modificaciones de Rossner *et al.* (Mol Cell Neurosci, 9, 460-475, (1997)). Se observó una clara inducción sobre el lado isquémico (izquierdo), especialmente en neuronas de la región del hipocampo y de la corteza, en menor proporción en el tálamo (figura 5).

60

De igual modo se pone de manifiesto que la 9B5 es expresada preponderantemente en neuronas y que en las mismas sufre una regulación.

65

Esto muestra que la 9B5 juega un papel importante en la patogénesis de la apoplejía. La regulación por incremento de la 9B5 tiene en este caso un papel similar por ejemplo al de las serina-treonina-cinasas conocidas (por ejemplo JNK, p38).

En los procesos de la muerte celular participa una pluralidad de serina-treonina-cinasas (por ejemplo ASK1 (To-biume, *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 239, 905-10, (1997), Berestetskaya, *et al.*, J Biol Chem, 273, 27816-23, (1998), Chen, *et al.*, Oncogene, 18, 173-80, (1999)), DAP (Inbal, *et al.*, Nature, 390, 180-4, (1997), Levy-Strumpf and

Kimchi, *Oncogene*, 17, 3331-40, (1998)), DRAKs (Sanjo, *et al.*, *J Biol Chem*, 273, 29066-71, (1998)), ZIP (Kawai, *et al.*, *Mol Cell Biol*, 18, 1642-51, (1998), DRP-1 (Inbal, *et al.*, *Mol Cell Biol*, 20, 1044-54, (2000))).

Esta regulación por incremento es una prueba de un nuevo mecanismo transcripcional de regulación en las proteína-cinasas, y hasta el presente es el único ejemplo conocido a este respecto en el sistema animal con mamíferos. De manera interesante se encontró sólo recientemente la regulación por incremento de varias MAP-cinasas en una investigación sistemática del transcriptoma de la levadura (Roberts, *et al.*, *Science*, 287, 873-80, (2000)). Esto podría representar un nuevo mecanismo general para la regulación de las proteína-cinasas.

Significado farmacológico de la 9B5 en las enfermedades neurodegenerativas, neoplásicas y de otro tipo

En los últimos tiempos, han adquirido cada vez mayor significado, en la investigación farmacológica, los postulados relativos a la inhibición de/ a la influenciación sobre, las vías de transducción de señal en el sentido 3' "downstream" de un receptor situado en la membrana. Estos postulados tendrán en el futuro, probablemente, una participación importante en la terapia de las enfermedades humanas, especialmente en el caso de las enfermedades que, hasta el presente, son difícilmente terapiables o que no son terapiables (Kletsas and Papavassiliou, *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 8, 737-746, (1999)). Las ventajas de estos postulados consisten, en primer lugar, en que pueden influenciar resultados, que pueden ser provocados por varios estímulos y en que tienen un recorrido terminal común; en segundo lugar consisten en que se presentan resultados celulares en el tiempo tras el estímulo generador y, por lo tanto, son accesibles durante un mayor tiempo para una intervención.

Ejemplos de ataques con éxito en tales cascadas de señales son, por ejemplo, los inhibidores para el caspaseno, que pueden bloquear los procesos de apoptosis incluso mucho tiempo después desde un estímulo generador. De igual modo ha recibido una atención especial el factor de transcripción NF-kappaB y los procesos que lo activan. A título de ejemplo se siguió la clonación de las 1-kappaB-cinasas con el objeto de encontrar inhibidores específicos para la transcripción génica inducida por la NF-kappaB. Los perfiles diferenciales de transcripción han alcanzado en los últimos tiempos un gran significado en la investigación farmacológica para la identificación de posibles nuevos puntos de partida para productos farmacéuticos. La regulación transcripcional, es decir la regulación de la cantidad de ARNm de un gen en la célula, es un paso esencial para la reacción de la célula al estímulo, además de las fosforilaciones de proteínas, la degradación de proteínas, etc. Evidentemente la 9B5 está sometida a una regulación muy rápida por medio de activación transcripcional, como se ha mostrado precedentemente. De manera frecuente, tales genes, rápidamente regulados, participan en posiciones clave, críticas, para los procesos celulares.

Una influenciación farmacológica de la 9B5 es posible de la manera siguiente: 1° una influenciación de la cantidad de transcrito en la célula, por ejemplo la supresión de la rápida regulación por incremento tras procesos patológicos (por ejemplo mediante la tecnología no codificante o de antisentido); 2° la inhibición de la actividad enzimática de la 9B5, en particular la actividad cinasa (por ejemplo por medio de un inhibidor de la cinasa; 3° la inhibición de una interacción con una o con varias moléculas diferentes, por ejemplo proteína cinasa que se encuentra en el sentido 3' (downstream), o adaptadores.

Recientemente se han desarrollado inhibidores específicos contra algunas MAP-proteína cinasas. Un ejemplo a este respecto es el PD98059, que es un inhibidor de MEK1. Éste impide la fosforilación de Tau mediante la estimulación con beta-amiloide. Esto tiene posiblemente significado para la terapia de la enfermedad de Alzheimer.

La sustancia antitumoral UCN-01 es un inhibidor de la cdc25c-fosforilación (Graves, *et al.*, *J Biol Chem*, 275, 5600-5, (2000)).

Los inhibidores de la proteína-cinasa de conformidad con la invención pueden identificarse simplemente con los ensayos tradicionales de la proteína-cinasa y representan un medio eficaz para la lucha contra las secuelas de la isquemia cerebral.

Los datos experimentales sobre la 9B5 demuestran su participación central en los procesos que dependen de la muerte celular neuronal, de la excitación, de la plasticidad y de la neurogénesis. La proteína, de conformidad con la invención, representa una molécula diana importante para la inhibición o bien para la disminución de las secuelas de una isquemia focal. Además de este papel central en la génesis de la apoplejía como consecuencia de la isquemia focal, la proteína, de conformidad con la invención, podría representar, también, una molécula diana importante para el tratamiento de las enfermedades neoplásicas, tales como el cáncer. De igual modo, la proteína, de conformidad con la invención, o bien su gen, podría representar en este caso la molécula diana para agentes contra el cáncer. De igual modo, el gen podría tener un papel importante para el diagnóstico y para la terapia de las enfermedades cardiovasculares puesto que existen algunos mecanismos comunes con las enfermedades condicionadas de manera isquémica.

En una forma de realización especialmente preferente, de conformidad con la invención, se reduce el nivel o bien la actividad de la proteína-cinasa, de conformidad con la invención, para la profilaxis y para la terapia de la apoplejía. Esto puede verificarse, por ejemplo, en el plano de la expresión, inhibiéndose o reduciéndose la expresión/ traducción de los ácidos nucleicos correspondientes, o puede llevarse a cabo en el plano de la actividad proteínica, reduciéndose o inhibiéndose la actividad proteína-cinasa por medio de inhibidores adecuados.

El ácido nucleico, de conformidad con la invención, y la proteína codificada por el mismo abren nuevos postulados para la terapia. De este modo puede influenciarse, por ejemplo, el nivel del ácido nucleico endógeno, ejerciéndose bien un influjo directo sobre su transcripción o bien ejerciéndose un influjo sobre su traducción para dar la proteína de conformidad con la invención. Con esta finalidad entran en consideración, por ejemplo, postulados de terapéutica

5 génica, en los que se reduce la traducción de los transcritos endógenos mediante la co-supresión o mediante la tecnología no codificante o de antisentido. De igual modo se ofrecen nuevos postulados en el plano de la actividad proteica, representando la proteína, de conformidad con la invención, por ejemplo la molécula diana de los productos activos farmacéuticos. De este modo puede modificarse la actividad de la proteína-cinasa, de conformidad con la invención, por medio de productos activos farmacéuticos, para actuar de manera reguladora en los mecanismos de

10 la apoplejía. Los inhibidores de la proteína-cinasa, que han sido citados precedentemente, representan una clase de productos activos farmacéuticos de este tipo. Básicamente, la preparación del ácido nucleico, de conformidad con la invención, o bien de la proteína, de conformidad con la invención, posibilita vías completamente nuevas para la profilaxis o bien para la terapia de la apoplejía.

15 Los ejemplos siguientes explican la invención:

Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación molecular de la 9B5

Génesis del modelo filamentosos en ratones

25 Para originar una isquemia cerebral focal en ratones c57/bl6 se utilizaron ratones con una edad de 3 meses. Una vez provocada una narcosis por inhalación (70% N₂O, 30% O₂, 0,8 - 1% de halotano) se hizo avanzar un hilo de Prolene 5-0 (firma Ethicon), que estaba recubierto con un 0,1% de poli-L-lisina, a través de la A. carotis externa hasta la A. carotis interna hasta la salida de la A. cerebri media. La posición correcta del hilo está indicada por medio de una caída de la señal Doppler de láser (firma Perimed) en un 10 hasta un 20% de la señal de partida. Tras la realización

30 de esta operación y, en caso dado, tras la determinación de los parámetros fisiológicos adicionales (presión sanguínea, pulso, gases sanguíneos, glucosa en sangre) despertaron los ratones de la narcosis. Al cabo de determinados tiempos de oclusión se someten los ratones nuevamente a una narcosis y se retiraron los hilos. De este modo tiene lugar una reperusión del tejido. Al cabo de determinados tiempos de reperusión se sacrificaron los ratones mediante fractura de la nuca, y los cerebros se prepararon inmediatamente y se inactivaron por congelación sobre hielo seco.

35 En el caso presente no se llevó a cabo ninguna reperusión, sino que únicamente se efectuó una oclusión de 90 minutos o bien de 24 horas.

Preparación de ARNm a partir de los cerebros

40 Con esta finalidad se empleó el estuche de preparación de ARNm de la firma Invitrogen (Fasttrack).

Realización del protocolo RMDD (véase también la figura 1)

45 En este caso se procedió esencialmente según las patentes Nr. EP 0 743 367 A2; US 5,876,932, con la diferencia de que se emplearon 2 µg de poliA-ARN para la síntesis de la primera cadena. Tras la realización de la síntesis de la primera cadena, de la segunda cadena, de la restricción Mbol, se lleva a cabo un ligamiento con adaptadores. A continuación se llevan a cabo dos reacciones RCP sucesivas con subconjuntos de combinaciones de cebadores. Las reacciones RCP se cargan a continuación sobre un gel de poliacrilamida desnaturalizante y someten a un análisis por

50 transferencia sobre una membrana de nylon (firma GATC). Las bandas marcadas con biotina se visualizan con ayuda de una reacción usual de estreptavidina-peroxidasa. Sobre el gel se aplicaron conjuntamente, de manera respectiva, las muestras de la RCP de los hemisferios isquémicos y contralaterales (24 horas MCAO derecho e izquierdo y 90 minutos MCAO derecho e izquierdo). Se cortan las bandas de intensidad diferente en el hemisferio derecho o izquierdo, y se lleva a cabo una reamplificación del producto de la RCP correspondiente. Los productos amplificados, obtenidos se

55 clonan en el vector TOPO TA ADNpc 2.1 (firma Invitrogen) y se secuencian con T7 y con cebadores M13rev (ABI 3700 secuenciador por electroforesis capilar).

Clonación de la 9B5

60 Cuando se realiza este procedimiento se advierte una secuencia que aparece regulada por incremento al cabo de 90 minutos sobre el lado isquémico. Ésta se denominó 9B5. Un análisis con el cicladador de luz (Lightcycler) confirmó una regulación rápida según MCAO (90 minutos MCAO y 2 horas de reperusión) (figura 4).

65 El fragmento RCP aislado, situado en 3', se utilizó para la hibridación de un banco de cerebros de ratón. En el mismo se encontraban varios clones, que contenían las partes de secuencia de la SEQ ID Nr. 1 y de la SEQ ID Nr. 2. Se utilizó una muestra de ratón procedente de la región 5' para cribar un banco de cerebros fetales humanos en el lambdaZapII (Stratagene). En este caso se produjeron a partir de varios clones, de igual modo, 2 secuencias

diferentes, que probablemente representan variantes de empalme del mismo gen (SEQ ID Nr. 3 y 4). A continuación se ha indicado la obtención detallada de la biblioteca, empleada, de los ADNc humanos:

Obtención de la biblioteca de los ADNc humanos

Se prepararon con el estuche de síntesis de los ADNc de la firma Stratagene las bibliotecas de ADNc correspondientes a partir de 2 µg de ARNm cerebral de feto humano (firma Clontech) y de 5 µg de ARNm procedente de cerebros de ratones adultos. En este caso se procedió esencialmente de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para la síntesis de la primera cadena de ADNc se empleó un cebador oligodT según las indicaciones del fabricante. Los fragmentos de ADNc de cadena doble compatibles con la clonación (E-coRI/XhoI) se seleccionaron en cuanto a su tamaño (según las indicaciones del fabricante/firma Stratagene) y se enlazaron en el vector plásmido pBluescript SKII (Stratagene). El ligamiento se transformó mediante electroporación en *E.coli* (DH10B, Gibco) y se amplificó sobre placas de agar LB-ampicilina. El ADN plásmido se aisló mediante lisis alcalina y mediante cromatografía con intercambio de iones (estuche QIAfilter, firma Qiagen). La complejidad de los componentes individuales fue de 4 millones para el banco de ADNc cerebral humano fetal. Se analizaron de manera estadística 24 clones individuales de cada banco de ADNc según los tamaños de los insertos, que mostraban una distribución del tamaño comprendida entre 800 bp y 4,5 kB inclusive, siendo la longitud media del inserto de ADNc para el banco humano de 1,2 kB aproximadamente.

Ejemplo 2

Realización de un ensayo de gen indicador

La secuencia obtenida de la 9B5 puede utilizarse para obtener conclusiones sobre la ordenación de la proteína en cascadas de transducción de señal. Con esta finalidad se clona la pauta de lectura abierta del gen en un vector de expresión usual (por ejemplo pCMV-tag, firma Stratagene). Este constructo puede transfectarse junto con otros constructos en células eucariotas (por ejemplo con el método del fosfato de calcio, véase la publicación de Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, New York, 1997). Éstos pueden ser constructos indicadores, por ejemplo un gen de luciferasa bajo el control de un promotor mínimo con varios puntos de enlace por ejemplo para el factor de transcripción NF-kappaB o AP-1. Entonces pueden someterse los extractos procedentes de las células a una medición en el luminómetro (por ejemplo firma Bertold). Un aumento del valor de la luciferasa indica una influenciación sobre la vía de transducción de señal, que desemboca en la activación de un determinado factor de transcripción. Las combinaciones con constructos de expresión para otros genes (por ejemplo MAP-cinasas) pueden proporcionar conclusiones sobre la posición exacta de la 9B5 en cascadas de señal. Estos ensayos indicadores pueden llevarse a cabo también con otros sistemas, por ejemplo lacZ o cloroanfenicoltransferasa (ensayo CAT), sin que quede influenciado el principio del ensayo.

De igual modo, pueden aprovecharse también estuches prefabricados (por ejemplo estuche de Mercury *in vivo* kinase assay, firma Clontech). En este caso se expresa el represor Tet en fusión con el dominio del transactivador de una diana de fosforilación (factores de transcripción, por ejemplo Jun). La activación de un constructo de luciferasa bajo el control de un elemento represor Tet tiene lugar únicamente cuando se verifique una fosforilación específica del dominio del transactivador por medio de una cinasa (por ejemplo la 9B5). De este modo es posible la ordenación en una vía celular de transducción de señal.

Ejemplo 3

Ensayos de cinasa

Las proteína-cinasas están perfectamente caracterizadas desde el punto de vista bioquímico. La actividad cinasa de la 9B5 puede demostrarse por clonación de la pauta de lectura abierta de la 9B5 en un vector de expresión con un epitopo-Tag (por ejemplo pcDNA-myc-his), y efectuándose la transfección en células eucariotas (por ejemplo células Cos). Al cabo de 48 horas pueden obtenerse extractos a partir de estas células y llevarse a cabo una inmunoprecipitación con un anticuerpo myc-específico y perlas de proteína A. Se lleva a cabo una reacción de cinasa en un tampón de cinasa en presencia de γ -³²P-ATP. Las proteínas se desnaturalizan a continuación y se separan sobre un gel SDS-PAGE. A continuación se lleva a cabo una autorradiografía. Las bandas marcadas proporcionan una indicación sobre la actividad cinasa de la 9B5. Frecuentemente se encuentra también una autofosforilación de la propia cinasa. De igual modo las cotransfecciones con dianas potenciales proporcionan una indicación de posibles dianas de fosforilación, por ejemplo diversas MAP-cinasas, que igualmente pueden ser dotadas con un marcador y que pueden ser inmunoprecipitadas.

Los ensayos de cinasa pueden llevarse a cabo también con la 9B5, que haya sido transcrita/traducida *in vitro* (por ejemplo el sistema T7-reticulocitos de la firma Promega). De igual modo puede utilizarse proteína que haya sido expresada en *E. coli*, por ejemplo como proteína de fusión GST o como constructo marcado con HIS. Los marcadores pueden utilizarse en este caso para la purificación de la proteína. Las proteínas purificadas pueden incubarse a continuación en el tampón de cinasa con sustratos potenciales. De manera frecuente se utilizará con esta finalidad MBP (proteína básica de mielina -myelin basic protein-), que se fosforila frecuentemente de manera inespecífica por las Ser-Thr-cinasas.

El dominio de cinasa de las proteína-cinasas está perfectamente definido. Frecuentemente es suficiente la mutación de aminoácidos individuales en el dominio de la transferencia de fosfato para la pérdida de la función de la proteína (por ejemplo K709M en la ASK1 (Chang, *et al.*, Science, 281, 1860-3, (1998)); K90A en DRAK 1, K62A en DRAK2 (Sanjo, *et al.*, J Biol Chem, 273, 29066-71, (1998)); KK429-430AA en NIK (Sanjo, *et al.*, J Biol Chem, 273, 29066-71, (1998)); K63W en TAK1 (Ninomiya-Tsuji, *et al.*, Nature, 398, 252-6, (1999)). Estas cinasas inactivas tienen un gran significado, frecuentemente para la evaluación de la vía del metabolismo celular, a título de inhibidores dominante-negativos, por ejemplo en los experimentos de cotransfección y en ensayos de cinasa (Ninomiya-Tsuji, *et al.*, Nature, 398, 252-6, (1999)). Una mutación de este tipo puede llevarse a cabo también en el caso de la 9B5.

La fosforilación específica de la proteína diana puede demostrarse también con anticuerpos específicos para la fosforilación, por ejemplo Phospho-SerThr/Tyr monoclonal antibody, mouse IgG2b, firma Clontech.

Otros ejemplos de ensayos de cinasa, que se encuentra a disposición de los especialistas, pueden verse, por ejemplo, en el libro titulado Protein Phosphorylation, A practical approach, ed. D.G.Hardie, 2nd ed., Oxford, 1999, especialmente en los capítulos 9 y 10.

Ejemplo 4

Identificación de la diana de fosforilación de la 9B5

La identificación de la diana de fosforilación de la 9B5 puede llevarse a cabo por ejemplo mediante cribado por interacción. En este caso pueden utilizarse, por un lado, los bancos para la expresión de péptidos en bacteriofagos lambda, que son bastante clásicos, (el sistema más utilizado es el vector lambda-gt11, véase la publicación de Ausubel *et al.*, Current protocols in molecular biology, New York, 1997). Un postulado es la clonación de la 9B5 en un vector de expresión bacteriano mediante la intervención de un marcador de purificación (por ejemplo poli-histidina o GST) y de un punto de fosforilación de consenso para la proteína-cinasa A (secuencia RRASV). La 9B5 puede expresarse y purificarse por lo tanto en bacterias según los procedimientos establecidos. De este modo la 9B5 puede marcarse como captador con ³³P o con ³²P mediante incubación con proteína-cinasaA. El banco de expresión puede incubarse entonces con la 9B5 marcada. Tras exposición sobre autorradiogramas pueden identificarse los clones positivos y pueden aislarse y secuenciarse según procedimientos establecidos. Este procedimiento puede aplicarse también de la manera siguiente: puede aprovecharse la propiedad de autofosforilación de la 9B5 para marcar la 9B5 con ³³P-γATP mediante simple incubación. El procedimiento puede modificarse también de tal manera que el banco de expresión sea incubado con la 9B5 purificada y con la ³³P-γATP bajo condiciones de fosforilación (tampón de fosforilación, etc.), y los péptidos expresados son marcados de manera activa por la 9B5. Desde luego este procedimiento es más inestable que el que ha sido descrito precedentemente. Los péptidos secuenciados pueden utilizarse para la obtención de una secuencia de reconocimiento de consenso y de una secuencia de fosforilación de consenso. Esto posibilita la localización de substratos potenciales por medio de los métodos bioinformáticos. Los candidatos pueden verificarse mediante expresión e incubación con la 9B5. Se encuentran ejemplos para la realización con éxito de estas formas del cribado de expresión en las publicaciones de Mochly-Rosen and Gordon, Faseb J, 12, 35-42, (1998), Blunar and Rutter, Science, 256, 1014-8, (1992), Chapline, *et al.*, J Biol Chem, 268, 6858-61, (1993), Chapline, *et al.*, J Biol Chem, 271, 6417-22, (1996), Kaelin, *et al.*, Cell, 70, 351-64, (1992), Songyang, *et al.*, Curr Biol, 4, 973-82, (1994).

La diana de fosforilación de la 9B5 puede cribarse también en un híbrido de dos levaduras - yeast-two-hybrid - (Fields and Song, Nature, 340, 245-6, (1989)). De este modo se descubrió, por ejemplo, la interacción de Ras y de c-Raf (una Ser-Thr-cinasa) en un sistema y2h (Fields and Song, Nature, 340, 245-6, (1989)). De igual modo, precisamente la interacción de la Ser-Thr-cinasa SNF1 con SNF4 es un prototipo para el sistema y2h (Fields and Song, Nature, 340, 245-6, (1989)). De igual modo, pueden emplearse sistemas de animales mamíferos con un principio equivalente al del cribado de las levaduras (Fields and Song, Nature, 340, 245-6, (1989)). Para un cribado y2h se clona la pauta de lectura abierta de la 9B5 en un denominado "vector cebo (vector bait)" con el dominio de enlace GAL4 (por ejemplo pGBT10, firma Clontech). De este modo puede explorarse una biblioteca denominada de presa "librería prey" en una cepa de levadura según varios de los protocolos usuales con respecto a las proteínas interactuantes. En este caso puede ser frecuentemente útil el empleo de mutantes cinasa-negativos, puesto que éstos interaccionan, con frecuencia, de una manera más estable con las dianas de fosforilación. Las serina-treonina-cinasas en una vía de síntesis pueden disponerse en la proximidad espacial por medio de moléculas adaptadoras para poder llevar a cabo mejor las fosforilaciones específicas (Chang, *et al.*, Science, 281, 1860-3, (1998)), (Yasuda, *et al.*, Mol Cell Biol, 19, 7245-54, (1999), Whitmarsh and Davis, Trends Biochem Sci, 23, 481-5, (1998), Whitmarsh, *et al.*, Science, 281, 1671-4, (1998)). Por lo tanto, es posible también encontrar las dianas de fosforilación a través de dos etapas en el sistema híbrido de dos levaduras (yeast-two-hybrid), clonándose en primer lugar una proteína adaptadora y encontrándose con ésta la molécula diana específica a título de "cebo" ("bait"). En conjunto pueden llevarse a cabo también experimentos de mapeado para dominios de interacción con el sistema y2h.

De igual modo es posible aprovechar co-inmunoprecipitaciones procedentes de células transfectadas con vectores de expresión de la 9B5 para purificar las proteínas enlazadas sobre las mismas y para identificar los genes por medio de métodos de secuenciación de proteínas (por ejemplo MALDI).

De igual modo, es posible purificar las bandas fosforiladas tras una inmunoprecipitación con subsiguiente ensayo de cinasa a partir de un extracto celular, y llevar a cabo la secuenciación de las mismas.

Otros ejemplos para la identificación de los sustratos de proteína-cinasa, que son usuales para los especialistas, pueden verse, por ejemplo, en el libro titulado *Protein Phosphorylation, A practical approach*, ed. D.G.Hardie, 2nd ed., Oxford, 1999.

5 Ejemplo 5

Ensayo de apoptosis

Un gran número de las serina-treonina-cinasas, identificadas hasta el presente, participa en los procesos de apoptosis, por ejemplo la ASK1 (Zhang, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8511-5, (1999)), (Ichijo, *et al.*, Science, 275, 90-4, (1997)), DRAKs (Zhang, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8511-5, (1999)), (Ichijo, *et al.*, Science, 275, 90-4, (1997)). La participación de la 9B5 en la cascada de apoptosis puede investigarse además verificando la transfección de constructos de expresión con la 9B5 en células eucariotas y ensayándose a continuación la inducción de la apoptosis. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la coloración con anexina (firma Roche Diagnostics), mediante anticuerpos que reconocen la forma activa de la Caspase-3 (firma New England Biolabs), o incluso mediante los ensayos ELISA, que reconocen los fragmentos de histona de ADN (cell-death elisa, Roche Diagnostics). Esta inducción de la apoptosis puede ser específica del tipo celular, con lo cual tienen que ensayarse varias líneas celulares y varias células primarias. La inducción de la apoptosis puede ser igualmente específica del estímulo, con lo cual pueden ser de ayuda varias situaciones de estrés para la respuesta de esta pregunta, por ejemplo un choque térmico, condiciones de hipoxia, tratamientos con citoquinas (por ejemplo IL-1, IL-6, TNF α), tratamiento con H₂O₂. Con relación a los tipos de células entran en consideración varias líneas aplicables, por ejemplo las células Cos, las células HEK, las células PC12, las células THP-1 y las células primarias tales como por ejemplo las neuronas, los astrocitos, así como otras líneas celulares inmortalizadas y primarias, según las necesidades.

25 Ejemplo 6

Ensayos de cribado químico ultrarrápidos (high-throughput screening assays) para la identificación de inhibidores de la 9B5

La 9B5 puede emplearse para encontrar inhibidores de la interacción con sus socios en la interacción (por ejemplo moléculas adaptadoras). Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, con el sistema FRET (transferencia de energía de frecuencia de resonancia -frequency resonance energy transfer-), expresándose en fusión la 9B5 con GFP (proteína fluorescente verde -green fluorescent protein-) y su socio de interacción con BFP (proteína de fluorescencia azul -blue fluorescent protein-) y efectuándose su purificación. En un sistema exento de células puede utilizarse la disminución de la emisión de BFP como indicador de la presencia de un inhibidor cuando se exploren bancos químicos complejos.

El objetivo principal, en el aprovechamiento terapéutico de las proteínacinasas descubiertas consiste sin embargo, en primer lugar en la desconexión de la función de la proteínacinasas, puesto que esto puede ser llevado a cabo de la manera más sencilla. Las proteína-cinasas se ofrecen, en principio, para la realización de ensayos químicos ultrarrápidos para la identificación de inhibidores (inhibidores de molécula pequeña -small-molecule-inhibitors-) de las propiedades de cinasa de la proteína, puesto que la propiedad enzimática propiamente dicha puede emplearse fácilmente como factor indicador (véase también el ejemplo 3, ensayo de cinasa).

Una implementación sencilla de un sistema HTS para la 9B5 puede llevarse a cabo según el método de ensayo en filtro de los autores Reuter *et al.* (Reuter *et al.*, Methods in Enzymology, 255: 245 (1995)). En este caso se aprovecha el MBP como sustrato inespecífico. Éste se aplica sobre placas con 96 pocillos, que son adecuadas para el ensayo ELISA (por ejemplo FlashPlates, NEN Life Science Products, o NUNC). Se añade tampón de reacción cinasa que contiene: 60 mM HEPES (pH 7,5), 30 mM MgAc, 0,15 mM gammaATP, 3 mM DTT, 0,03 mM Na-Orthovanadat), 0,25 μ Ci 33P-Gamma-ATP y la cinasa descrita se añaden con una concentración no mayor que 1 μ g/ml (en primer lugar debería llevarse a cabo una titulación). En presencia del inhibidor potencial (por ejemplo moléculas pequeñas procedentes de un banco químico) (por ejemplo 10 μ M) se incuba la reacción durante 1 hora a 30°C. Todo el volumen de la reacción es de 100 μ l. La reacción se detiene mediante la adición de EDTA (pH 7) hasta una concentración final de 80 mM. Las muestras se centrifugan a continuación y se aplican 50 μ l del sobrenadante sobre un papel intercambiador de cationes p81 (firma Whatman). Los filtros se lavan a continuación 3 veces en 200 ml de ácido fosfórico 180 mM (respectivamente 5 minutos), y una vez en 200 ml de etanol al 96%. Tras secado al aire se determina la radioactividad de los filtros mediante recuento de las escintilaciones. Los materiales, que reducen la actividad cinasa en una proporción $\geq$ 50% (con 10 μ M) se destacan por una reducción de la incorporación $>$ 50%. La especificidad y la sensibilidad de los posibles inhibidores se determinan mediante titulación para la determinación del IC₅₀, y mediante la sustitución de otras cinasas en el ensayo. La comparación relativa del efecto inhibidor sobre otras cinasas permite así una magnitud de la especificidad.

Para la realización del cribado con respecto a los inhibidores de cinasa se ofrecen también sistemas modernos con el ensayo de proximidad por escintilación (SPA) (firma Amersham Life Science, MAP kinase SPA; (Zhang, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8511-5, (1999)), (Ichijo, *et al.*, Science, 275, 90-4, (1997))). El autor McDonald describe una montaje para el análisis destinado a la cascada Raf/MEK/ERK, que pueden identificar los inhibidores de las cascadas completa. Como sustrato se utiliza en este caso un péptido biotinilizado, que puede formarse tras fosforilación con ³³P sobre perlas de SPA recubiertas con avidina. La cascada de MAP se reconstruye en este caso *in vitro*, se expresa en *E. coli* con los componentes individuales como proteína de expresión GST o, en el caso de cRAF1

se prepara con el sistema de baculovirus. El primer elemento de la cascada (MAP-KKK) tiene que activarse en este caso permanentemente de manera homogénea, con el fin de poder cribar los inhibidores de manera fiable. Esto se consiguió, en este caso, mediante la coexpresión de src en el sistema de baculovirus. De este modo se consigue una activación rac-análoga del cRaf. De igual modo puede imaginarse, en principio, otra forma de activación de una MAP-cinasa mediante fosforilación. Otra posibilidad de activación constitutiva de una MAP-cinasa consiste en la mutación de los aminoácidos que deben ser fosforilados. Esto fue posible, en el caso de MEK1, por ejemplo, mediante el intercambio de las serinas Ser218 y Ser222 por glutamato (Zhang, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8591-5, (1999)), (Ichijo, *et al.*, Science, 275, 90-4, (1997)). En el caso de la 9B5 puede llevarse a cabo, en primer lugar, un cribado por interacción (por ejemplo sistema y2h), para identificar una diana de fosforilación, o puede emplearse directamente la MBP (proteína básica de mielina -myelin basic protein-) como sustrato. A continuación puede sintetizarse un péptido a partir de la secuencia objetivo con un marcador de biotina. Éste puede enlazarse sobre perlas de SPA acopladas con avidina de la firma Amersham. En la reacción se añade, además, 9B5-proteína purificada (por ejemplo producida por vía bacteriana) y gamma-32P-ATP. Esto puede llevarse a cabo a escala de microtitulación. Bajo condiciones normales se fosforila el péptido diana y se genera una contestación por escintilación. Ahora se lleva a cabo una incubación previa, a partir de una biblioteca de sustancias químicas, de aquellas con la reacción, como paso previo a la adición del péptido diana. Tras la adición del péptido diana puede medirse entonces la respuesta por escintilación. Una disminución de la respuesta significa la presencia de un inhibidor potencial. La biblioteca explorada debería ser tan compleja como fuera posible y debería contener un gran número de clases diferentes de sustancias. Ejemplos de una clase de sustancias de inhibidores específicos para una proteínacinasas (p38) se encuentra, por ejemplo, en la patente norteamericana Nr. 5,945,418. Otras clases de sustancias que pueden inhibir las proteínacinasas incluyen, por ejemplo, los arilcompuestos monocíclicos, bicíclicos o heterocíclicos (WO 92/20642), los derivados de vinilen-azaindol (WO 94/14808), la 1-ciclopropil-4-piridil-quinolona (patente norteamericana Nr. 5,330,992), los compuestos de estirilo (patente norteamericana Nr. 5,217,999), los compuestos de piridilo substituidos por estirilo (patente norteamericana Nr. 5,302,606), determinados derivados de quinazolina (solicitud EP Nr. 0 566 266 A1), los seleoindoles y los seleniuros (WO 94/03427), los compuestos polihidroxílicos tricíclicos (WO 92/21660), y los ácidos bencilfosfónicos (WO 91/15495).

Lo específico del ensayo está determinado únicamente por la identidad de la Ser-Thr-cinasa descrita. Pueden utilizarse diversos sustratos. Éstos pueden emplearse en diversas configuraciones del principio de ensayo anteriormente indicado. En este caso, el punto esencial consiste, sin embargo, en la utilización de la actividad cinasa de la 9B5 con finalidades de cribado. A título de ejemplo el sustrato puede presentarse en solución libre, así como también acoplado sobre una fase, tal como se ha indicado precedentemente. Sin embargo, el sustrato puede estar soportado también sobre una superficie celular, o incluso puede ofrecerse de manera intracelular. Esto no tiene ningún efecto sobre el fundamento del principio del ensayo.

Ejemplo 7

Obtención de ratones transgénicos y con genes inactivos (knock-out)

El conocimiento de la secuencia de la 9B5 puede aprovecharse para la preparación de ratones genéticamente modificados (u otros animales). Con esta finalidad se expresará, por ejemplo, un mutante inactivo constitutivo de la 9B5 en ratones transgénicos, por ejemplo bajo un promotor NSE en neuronas, con un promotor MBP en oligodendrocitos, etc. Esto debería tener un efecto dominante negativo, y, de este modo, debería imitarse una inhibición de la 9B5. Esto puede tener valiosas indicaciones sobre posibles efectos farmacológicos de los inhibidores *in vivo*. De igual modo puede expresarse una cinasa activa constitutiva.

De igual modo, la obtención de animales con genes inactivos (knock-out) puede tener indicaciones sobre los efectos de los inhibidores. La obtención de estos ratones genéticamente modificados o de otros animales se lleva a cabo según procedimientos usuales, que son conocidos por el técnico en la materia.

Los animales, genéticamente modificados, pueden investigarse a continuación en diversos modelos de enfermedades (por ejemplo en la apoplejía provocada de manera experimental, MCAO), o en modelos tumorales.

Ejemplo 8

Ensayos de proliferación

Muchas de las serina-treonina-cinasas conocidas hasta ahora participan en procesos neoplásicos. La participación de la 9B5 en el crecimiento de las células, en el ciclo celular, en la transformación tumorigénica puede ensayarse adicionalmente efectuando la transfección de constructo de expresión con la 9B5 en células eucariotas, y ensayándose a continuación la inducción de la tumorigenicidad, por ejemplo en un ensayo de agar blando (Soft-Agar-Test (Zhang, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8511-5, (1999)), (Ichijo, *et al.*, Science, 275, 90-4, (1997))). Como tipos celulares entran en consideración varias líneas usuales, por ejemplo células Cos, células HEK, células PC12, células THP-1 y células primarias, por ejemplo neuronas, astrocitos, así como otras líneas celulares inmortalizadas y primarias, según las necesidades.

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico, que codifica una serina-treonina-proteína-cinasa neuronal, elegido entre

- a) el ácido nucleico, con una de las secuencias según SEQ ID Nr. 1 - 4 y el ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia según una de las SEQ ID Nr. 5 - 8;
- b) el ácido nucleico, que codifica una proteína, que presente al menos una identidad del 70% con respecto a una proteína según una de las SEQ ID Nr. 5 - 8, y cuya expresión pueda ser inducida por medio de isquemia cerebral focal y por reperfusión.

2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, **caracterizado** porque codifica una secuencia proteínica según una de las SEQ ID Nr. 5-8.

3. Ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque es un ADN.

4. Constructo, que contiene un ácido nucleico, según una de las reivindicaciones 1 a 3, preferentemente bajo el control de la expresión de elementos reguladores.

5. Constructo, que contiene un ácido nucleico, según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el ácido nucleico se encuentra en orientación antisentido con respecto al elemento regulador.

6. Constructo según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque está presente en un plásmido.

7. Célula huésped, que contiene un constructo según una de las reivindicaciones 4 a 5.

8. Célula huésped según la reivindicación 7, **caracterizada** porque se elige entre bacterias, células de levadura y células de mamíferos.

9. Tejido, órgano de mamífero y/o de mamífero transgénico no humano, aislado, que contiene un constructo según una de las reivindicaciones 4 a 5.

10. Célula huésped y/o tejido de mamífero y/o órgano de mamífero y/o mamífero transgénico no humano según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizados** porque el ácido nucleico o bien el constructo está integrado en un punto del genoma, que no corresponde a su posición natural.

11. Proteína, que puede ser obtenida mediante la expresión de un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, en un sistema de expresión, preferentemente en una célula huésped.

12. Proteína, cuya expresión puede ser inducida mediante isquemia cerebral focal y reperfusión, que puede ser obtenida mediante la expresión de un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, en un sistema de expresión, preferentemente en una célula huésped.

13. Proteína según la reivindicación 11 o 12, **caracterizada** porque se elige entre una proteína con una de las secuencias según las SEQ ID Nr. 5 hasta 8 y entre proteínas que tengan una identidad del 70% como mínimo con respecto a las proteínas citadas y cuya expresión pueda ser inducida mediante isquemia cerebral focal y reperfusión.

14. Anticuerpo, que reacciona de manera específica con una proteína según una de las reivindicaciones 11 a 13.

15. Estuche para diagnóstico, que contiene un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3 y/o un constructo según una de las reivindicaciones 4 a 5 y/o una proteína según una de las reivindicaciones 11 a 13 y/o un anticuerpo según la reivindicación 14.

16. Procedimiento para el diagnóstico de un riesgo de apoplejía, que comprende las etapas formadas por: la determinación del nivel de expresión de un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3 o de la cantidad de proteína según una de las reivindicaciones 11 a 13, en una muestra del paciente.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la muestra del paciente se pone en contacto con un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3 y/o con un anticuerpo según la reivindicación 14.

18. Procedimiento para la identificación y/o para el aislamiento de un inhibidor de proteína-cinasa, **caracterizado** porque se determina la actividad de proteína-cinasa de una proteína según una de las reivindicaciones 11 a 13 en presencia y en ausencia de la sustancia de ensayo y se aísla la sustancia identificada de este modo como adecuada.

19. Ensayo de proteína-cinasa, **caracterizado** porque la proteína-cinasa a ser ensayada comprende una proteína según una de las reivindicaciones 11 a 13.

ES 2 305 077 T3

20. Composición farmacéutica, que contiene un ácido nucleico, un constructo, una célula huésped, una proteína y/o un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 14.

21. Empleo de un ácido nucleico, de un constructo, de una célula huésped, de una proteína y/o de un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 14 para la obtención de un medicamento para la profilaxis y/o para la terapia de enfermedades neurológicas, con inclusión de la apoplejía, de la esclerosis múltiple, del Morbus Parkinson, de la esclerosis lateral amiotrófica; de las ataxias heterodegenerativas, del Morbus Huntington, de las neuropatías y de las epilepsias y/o de las enfermedades tumorales, especialmente de los carcinomas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

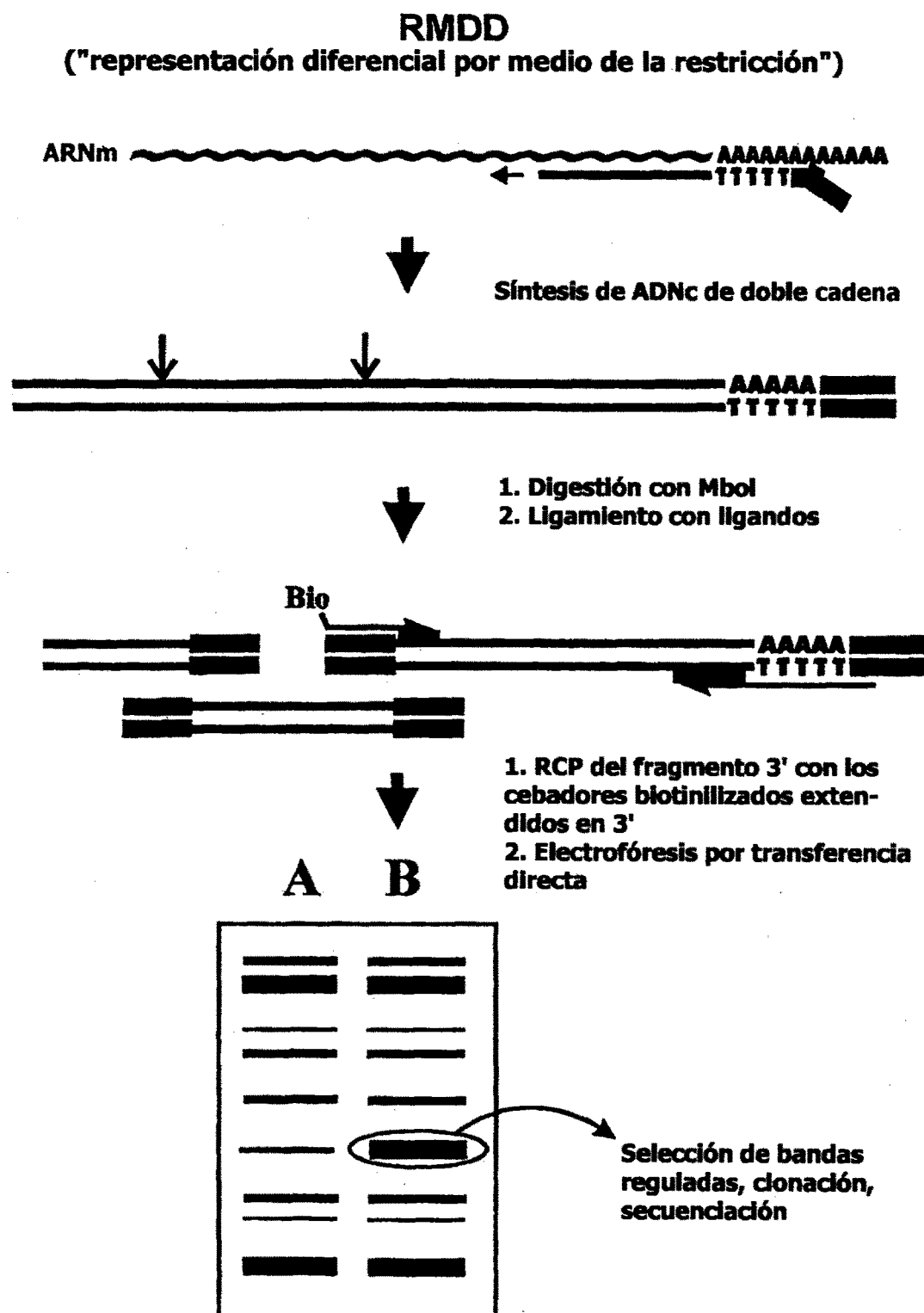
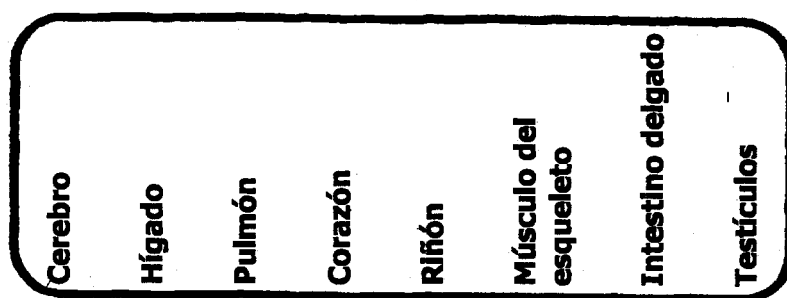


Figura 1: Principio del procedimiento RMDD



- 9B5

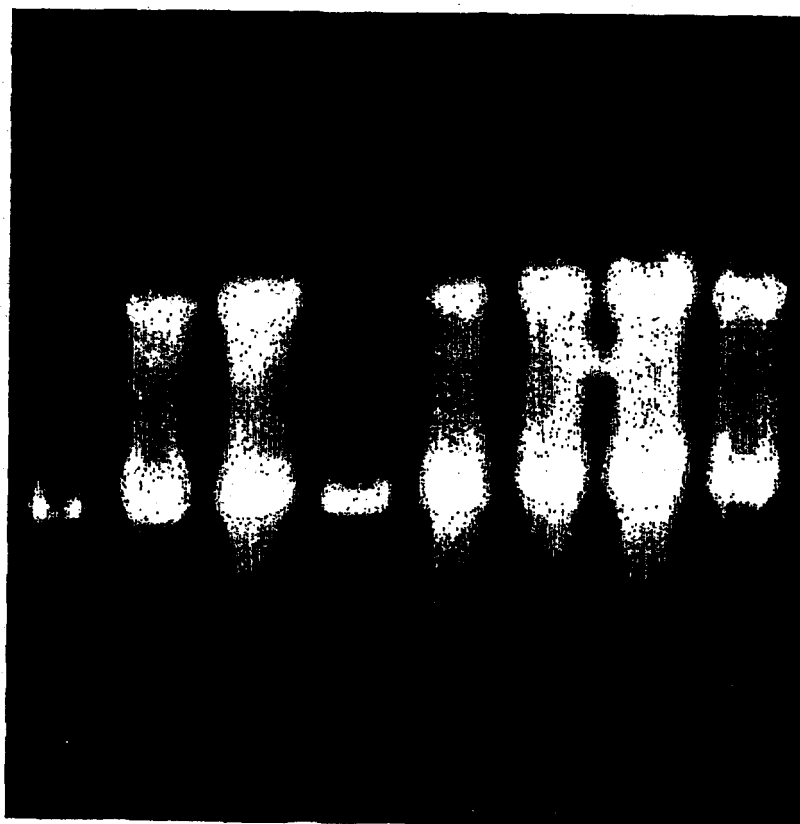


Figura 2: Distribución tisular de la 9B5 en la rata

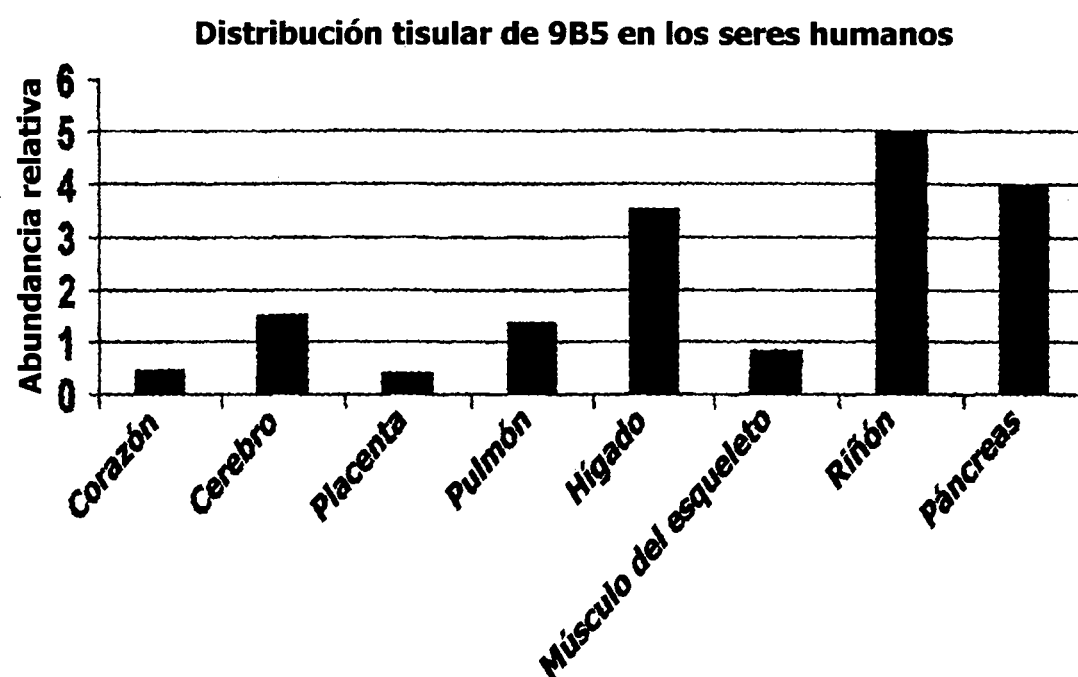
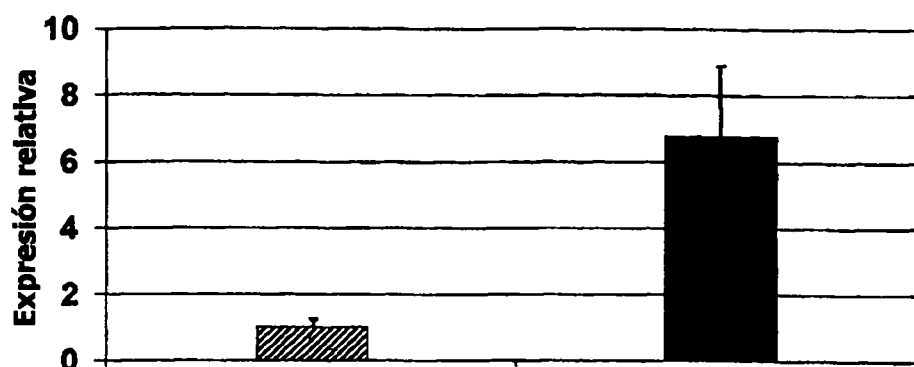
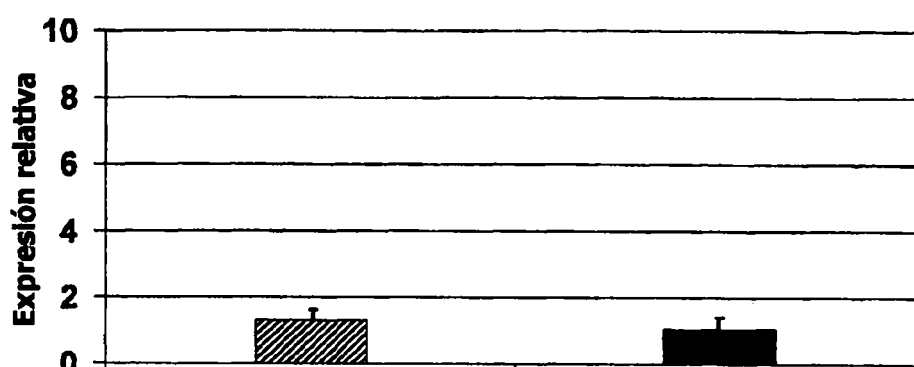


Figura 3: Distribución tisular de la 9B5 en los seres humanos

**Expresión de la 9B5 al cabo de 90 minutos con MCAO y reperfusión
durante 2 horas**



**Expresión de la 9B5 al cabo de 90 minutos con MCAO y reperfusión
durante 6 horas**



Expresión de la 9B5 al cabo de 24 horas con MCAO

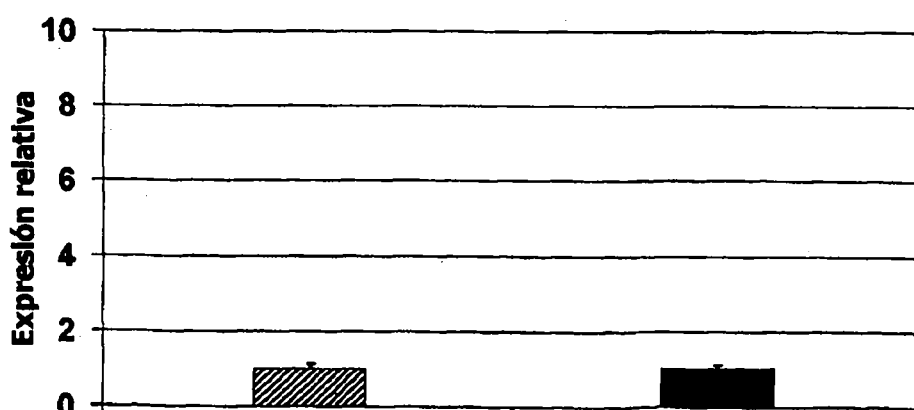


Figura 4: Inducción de la 9B5 mediante isquemia cerebral focal

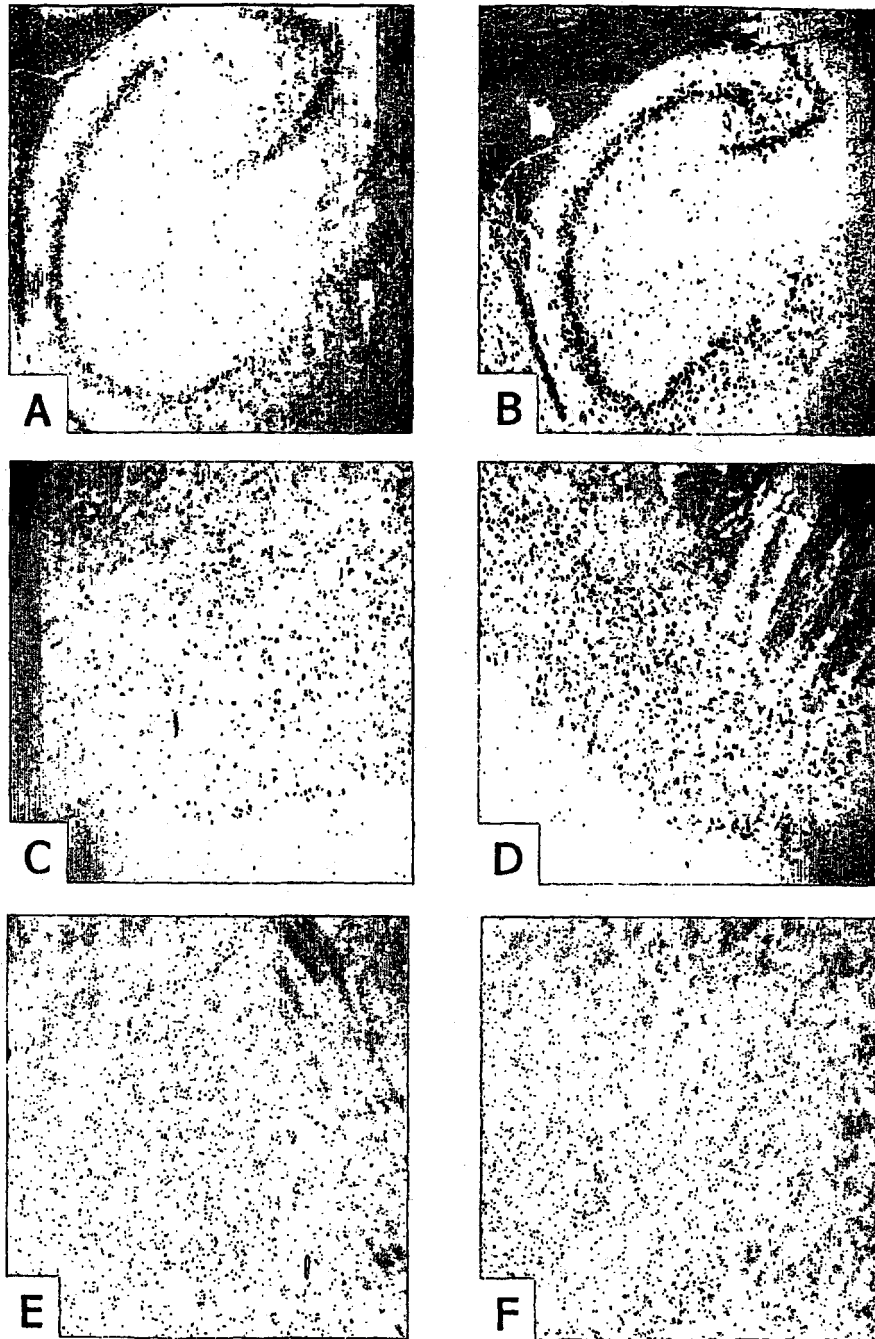


Figura 5: Hibridación in situ de cerebros de ratones tras isquemia focal: A, B hipocampo, respectivamente lado contralateral frente al lado isquémico; C, D corteza; E, F tálamo

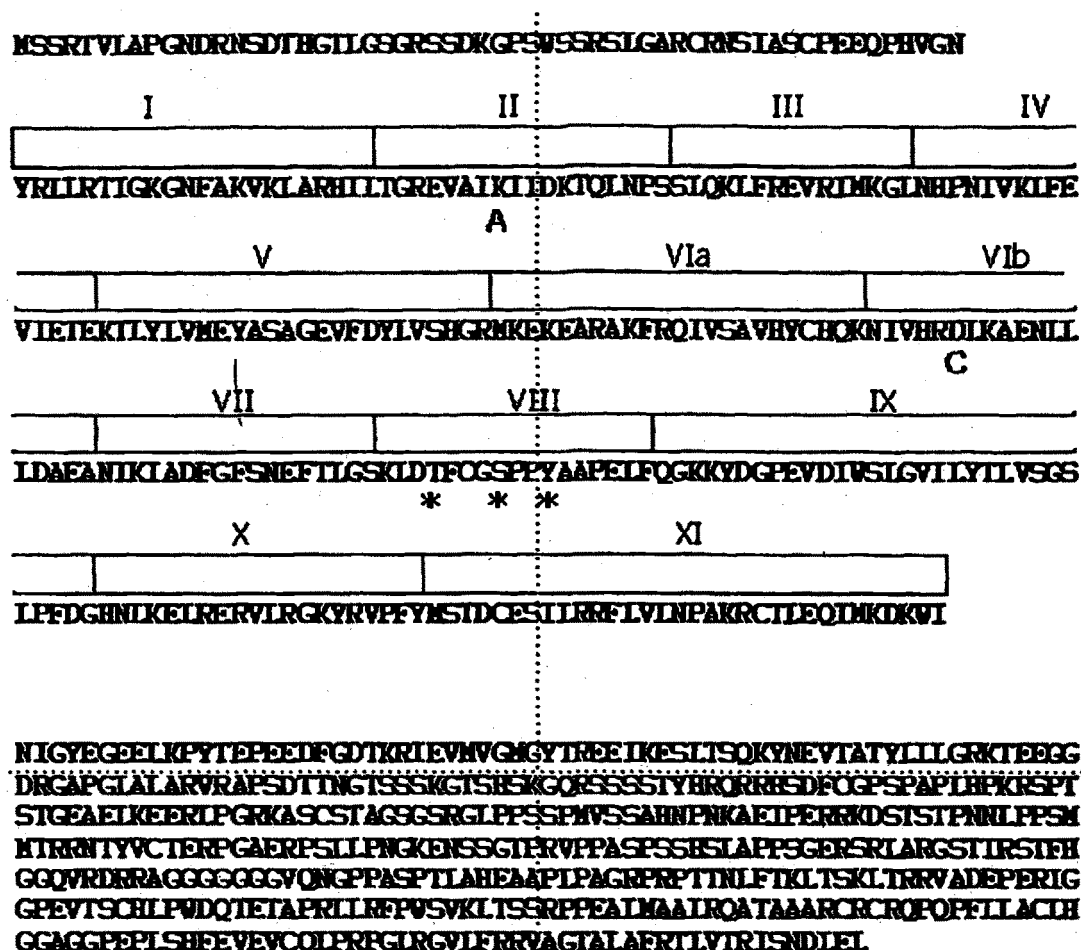


Figura 6: Región catalítica de la 9B5

I = fijador del fosfato, VIb = región catalítica, VII-VIII = bucle de activación, I-XI = subdominios de la región catalítica (según Hanks and Hunter, 1995),

* = puntos de activación, A = puntos enlazadores de ATP, C = centro activo

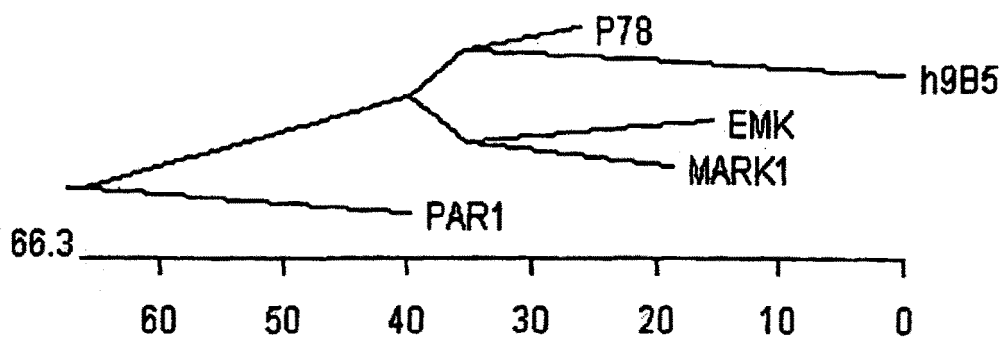


Figura 7: Construcción filogenética de los homólogos

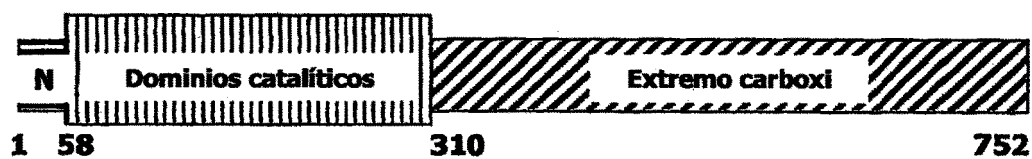


Figura 8: Formación de los dominios de la 9B5

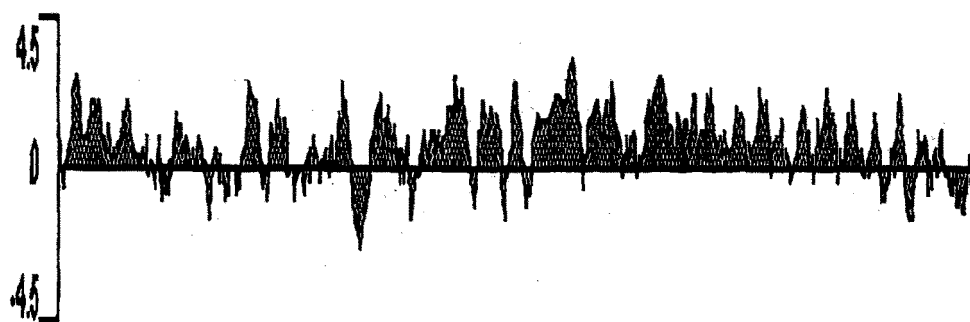


Figura 9: Trazado de la hidrofobicidad según Kyte-Doolittle

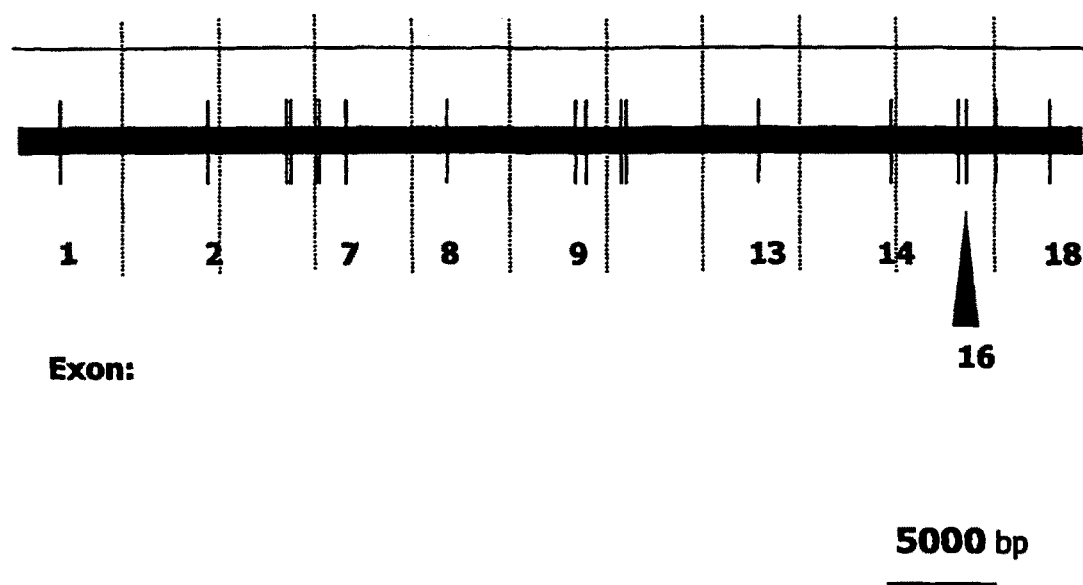


Figura 10: Estructura genómica de la 9B5 en los seres humanos

ES 2 305 077 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BASF-LYNX Bioscience
5 <120> Neuronale Serin-Threonin-Proteinkinase
<130> p31560
<140>
<141>
10 <160> 8
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 3170
15 <212> DNA
<213> *Mus musculus*
<220>
20 <221> polyA_signal
<222> (3094)..(3099)
<220>
<223> Secuencia codificante: (1)...(2172)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 305 077 T3

<400> 1

```

5   aaagggccgt cctgggtccag cegttccctg ggtgcccgtt gccggaactc taticgttcc 60
    tgccctgagg aacaacccca tgtgggcaac tataggctgc taaggaccat cgggaagggc 120
    aacttcgcca aagtcaagct ggctcgcat atcctcacgg gccgggaggt cgctattaag 180
    atcattgata agaccagct gaacccagct agcttgacga agctgttcag agaagtccga 240
    attatgaagg gactcaaaca cccaacatc gtgaagcttt ttgagggtgat agagacggag 300
    aagacgctat acctgggtgat ggaatacgt agcgacaggag aagtgtttga ctacctcgtg 360
    tcgcacggcc gcatgaagga gaaggaggct cgagccaagt tgcggcagat cgtgtcagcc 420
10  gtgcactact gtcatacagaa gaacattgta cacaggatc taaaggctga aaacctgttg 480
    ctggatgccg aggccaaat caaaatcgcc gacttcggct tcagcaatga gttcacgctg 540
    ggctccaagc tggacacctt ctgtgggagc ccccatatcg ccgcccaga gctgttccag 600
    ggcaagaagt atgatgggccc agaggtggac atctggagcc tgggtgtcat cctgtacacg 660
    ctggtcagcg gctccctgcc cttcgatggg cacaacctca aggagctcgc ggagcgaatc 720
    ctacagggaa agtacgggt ccccttctac atgtctacag actgcgagag cattctcggg 780
15  agatttctgg tgtgaaccc cgcacaaacg tgtactctgg agcaaatcat gaaagacaaa 840
    tggatcaaca tcggctatga ggtgaggag ctgaagccat acacggagcc tgaggaggac 900
    ttcggggaca ccaagagaat tgaggtgatg gtgggtatgg gctacacacg ggaagaaatc 960
    aaagaggcct tgaccaacca gaagtacaac gaggtgaccg ccacctacct cctgctgggc 1020
    aggaagactg atgaggggtg ggaccgggtt gccccagggc tggccctggc acgggtgcgg 1080
20  gcgccagcgc acaccaccaa cgggacaagc tccagcaaag gcagcagcca caacaaaggg 1140
    caacgggctt cttcctccac ctaccaccgc cagcgccgtc acagtgactt ctgtggcccg 1200
    tcccttgccc cgctgcaccc gaagcgcacg ccaaccagca cgggagacac ggagctcaaa 1260
    gaagagcggg tgccgggtcg gaaagcgagc tgcagtgcag tgggcagtgg aagtgcaggc 1320
    ttgccccctt ccagccccct ggtcagcagt gccacaacc ccaataaggc agagatccct 1380
25  gagcggcgga aggcacgac tagcacccct aacaacctcc ccccagcat gatgaccga 1440
    agaaacacct atgtgtgcac agagcgacca ggatctgaac gccctcctt gttgcaaat 1500
    ggcaagaaa atagctccgg tacctcgcg gtgcccctg cctcgccctc cagtcatagc 1560
    ctggtcctcc cgctcaggcg gcggagccgc ctggctcggg gctccaccat ccgacgacc 1620
    ttccatgggg gccaggtcgc agacggcgcg gcaggagcg ggagtggcgg ggtgtgcag 1680
    aatggacccc cagcctcacc cagccttgcc cagcaggccg caccctgcc ctccggcgcg 1740
30  cctcgcccca ccaccaacct cttcaccaa ctgacctcca aactgacccg aagggtcaca 1800
    gacgaacctg agagaatcgg gggacctgag gtcacaagt gccatctacc ttgggataaa 1860
    acggaaaccg ccccaggtc gctccgatt ccctggagt tgaagctgac cagctcgcga 1920
    cctcctgagg ccctgatggc tgccatgcga caggccacag cggccgcccg ctgcccgtgc 1980
35  cgccagccgc agccgttcct gctggcctgc ctgcacgggg gtgcggggcg gcccgagccc 2040

    ctgtcccatt tcgaagtgga ggtgtgccag ctgcccggc cgggcctcag gggcgtcctc 2100
    ttccgcccgt tggcgggca cgccttggtt ttccgcaccc togtcaccgc catctccaac 2160
    gacctcgaac tctgagccac cgcaccact accaccgcca cagccaccat cacagcccgg 2220
    gtcccttctt tctctggttc ctttcaactt cccaagagg gaagaggaca gaggagaggg 2280
    tgccctgtgt catgactgaa gtttccctgg attagattgg tggacagaga cagtgtgggg 2340
45  acacatgaca tgataagagg gctcagcagg gggagctggc accctcctag ggcctctggt 2400
    gggaccccc tccccacaat cttgttcttc tgcagggcac ctgaggagac tttggggaca 2460
    ggagtgagaa gggaaactga ggaattctc ccattcaggg agagctgcca ggattaatga 2520
    ctggagacag acttgggggg ttcagggagt tgggggagtc acagacagaa accttcccc 2580
    cactccccct tatgatcgaa cctccttcat gcccaggct ggcgcggggc actttgtaca 2640
    aatccgtgta tatactcctg tccctctgca gaggtctctc ggggagctgc tgcgtccgcc 2700
50  tccgattttt aagttattgc ccgcccctt ctgtcagctc ctcatctgca gcctgttact 2760
    caataaacag taggagtccc tccaacccc acctcctccc tggccgacct ggggtttccc 2820
    ttctcagccc ttggcctgca ggtgagccag ggagctgggg acttgacccc aacctgtggt 2880
    tctgcttgct gagcctttgt tatctcatct tcagaatggg aacagtgggg ttggaggatg 2940
    ggtcaaggat gactatggaa gagggcagaa cagagctcag cctcttccac gaggccccag 3000
55  ccttctgtga caccctctc ttggcactc actccctct gccatattac actggaccca 3060
    gagcctcttc ctattccagt aatacatgta ttcaataaac aatcaacgac tgggtccgac 3120
    tccacgctag gccagttct ggacataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3170

```

<210> 2

60 <211> 3250

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

65 <221> polyA_signal

<222> (3174)..(3179)

ES 2 305 077 T3

<220>

<223> Secuencia codificante: (1)...(1980)

5 <400> 2

	aaagggccgt	cctgggtccag	ccgttccctg	ggtgcccgtt	gccggaactc	tatcgcttcc	60
	tgccctgagg	aacaacccca	tgtgggcaac	tataggctgc	taaggaccat	cgggaagggc	120
	aacttcgcca	aagtcaagct	ggctcggcat	atcctcacgg	gccgggaggt	cgctattaag	180
	atcattgata	agacccagct	gaaccccagt	agcttgcaga	agctgttcag	agaagtccga	240
10	attatgaagg	gactcaacca	ccccaacatc	gtgaagcttt	ttgaggtgat	agagacggag	300
	aagacgctat	acctgggtgat	ggaatacgct	agcgcaggag	aagtgtttga	ctacctcgctg	360
	tcgcacggcc	gcatgaagga	gaaggaggct	cgagccaaat	tgccgagat	cgtgtcagcc	420
	gtgcactact	gtcatcagaa	gaacattgta	cacagggatc	taaaggctga	aaacctgttg	480
	ctggatgccc	aggccaacat	caaaatcgcc	gacttcggct	tcagcaatga	gttcacgctg	540
15	ggctccaagc	tggacacctt	ctgtgggagc	ccccatacgc	ccgccccaga	gctgttccag	600
	ggcaagaagt	atgatggggc	agaggtggac	atctggagcc	tgggtgtcat	cctgtacacg	660
	ctggctcagc	gtccctgccc	cttcgatggg	cacaacctca	aggagctgcg	ggagcgaatc	720
	ctcagaggaa	agtaccgggt	ccccctctac	atgtctacag	actgcgagag	cattctgcgg	780
	agatttctgg	tgtgaaccc	cgcaaacgc	tgtactctgg	agcaaatcat	gaaagacaaa	840
20	tggatcaaca	tgggtatga	gggtgaggag	ctgaagccat	acacgggagc	tgaggaggac	900
	ttcggggaca	ccaagagaat	tgaggtgatg	gtgggtatgg	gctacacacg	ggaagaaatc	960
	aaagaggcct	tgaccaacca	gaagtacaac	gaggtgaccg	ccacctacct	cctgctgggc	1020
	aggaagactg	atgagggtgg	ggaccggggg	gccccagggc	tggccctggc	acgggtgcgg	1080
	gcgcccagcg	acaccacca	cgggacaagc	tccagcaaag	gcagcagcca	caacaaaggg	1140
25	caacgggctt	cttcctccac	ctaccaccgc	cagcgccgtc	acagtgactt	ctgtggcccg	1200
	tcccctgccc	cgctgcaccc	gaagcgcagc	ccaaccagca	cgggagacac	ggagctcaaa	1260
	gaagagcgga	tgccgggtcg	gaaagcgagc	tgagtgagc	tgggcagtg	aagtcgaggc	1320
	ttgccccctt	ccagccccat	ggtcagcagt	gcccacaacc	ccaataaggc	agagatccct	1380
	gagcggcgga	aggacagcac	tagcaccctt	aacaacctcc	ccccagcat	gatgaccgca	1440
30	agaaaacact	atgtgtgcac	agacgacca	ggatctgaac	gcccgtctct	gttgccaaat	1500
	ggcaaagaaa	atagctccgg	tacctcgcg	gtgccccctg	cctcgccctc	cagtcatagc	1560
	ctggctcccc	cgtcaggcga	gcggagccgc	ctggctcggg	gctccaccat	ccgcagcacc	1620
	ttccatgggg	gccaggtccg	agaccggcgg	gcagggagcg	ggagtggcgg	gggtgtgcag	1680
	aatggacccc	cagcctcacc	cacgcttgcc	cacgaggccg	cacccctgcc	ctccgggcgg	1740
35	cctcgcccc	ccaccaacct	cttcaccaag	ctgacctcca	aactgaccgg	aagggttacc	1800
	ctcgatccct	ctaaacggca	gaactctaac	cgctgtgtct	cgggcgcctc	tctgccccag	1860
	ggatccaaaa	tcaggtcaca	gacgaacctg	agagaatcgg	gggacctgag	gtcacaagtt	1920
	gccatctacc	ttgggataaa	acggaaaccg	ccccaggct	gctccgattc	ccctggagtg	1980
	tgaagctgac	cagctcgcga	cctcctgagg	ccctgatggc	tgccatgcga	caggccacag	2040
40	cggccgcccc	gtcgggtg	cgccagccgc	agccgttctt	gctggcctgc	ctgacagggg	2100
	gtgcggggcg	gcccagcccc	ctgtcccat	tcgaagtggg	ggtgtgccag	ctgccccggc	2160
	ccggcctcag	gggcgtcttc	ttccgcccgt	tggcgggcac	cgccctggcc	ttccgcaccc	2220
	tcgtcaccgg	catctccaac	gacctcgaac	tctgagccac	cgccaccact	accaccgcca	2280
	cagccacccat	cacagccccg	gtcccttctt	tctctggttc	ctttcacttc	ccaagagggg	2340
45	gaagaggaca	gaggagagg	tgccctgtgt	catgactgaa	gtttccctgg	attagattgg	2400
	tggacagaga	cagtgtgggg	acacatgaca	tgataagagg	gctcagcagg	gggagctggc	2460
	accctcctag	ggcctctggt	gggaccccc	tccccacaat	ctgtgtcttc	tgaggggcac	2520
	ctgaggagac	tttggggaca	ggagtggaga	gggaaactga	ggaaattctc	ccattcaggg	2580
	agagctgcc	ggattaatga	ctggagacag	acttgggggg	ttcagggagt	tgggggagtc	2640
50	acagacagaa	accttcccc	cactccccct	tatgatcgaa	cctccttcat	gccccaggct	2700
	ggcgcggggc	actttgtaca	aatccgtgta	tatactcctg	tccctctgca	gaggtctctc	2760
	ggggagctgc	tgttgcggcc	tccgattttt	aagttattgc	cccgcctctt	ctgtcagctc	2820
	ctcatctgca	gcctgttact	caataaacag	taggagtcct	tccaaccccg	acctcctccc	2880
	tggccgacct	gggggtttcc	ttctcagccc	ttggcctgca	ggtgagccag	ggagctgggg	2940
55	acttgacccc	aacctgtggt	tctgcttgct	gagcctttgt	tatctcatct	tcagaatggg	3000
	aacagtgggg	ttggaggatg	ggtcaaggat	gactatggaa	gagggcagaa	cagagctcag	3060
	cctcttccac	gaggccccag	ccttctgtga	caccctcttc	ttggccactc	actccctctg	3120
	gccatattac	actggaccca	gagcctcttc	ctattccagt	aatacatgta	ttcaataaac	3180
	aatcaacgac	tgggtgccgac	tccacgctag	gcccagttct	ggacataaaa	aaaaaaaaaa	3240
60	aaaaaaaaaa						3250

<210> 3

<211> 3312

<212> DNA

65 <213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 305 077 T3

<221> polyA_signal

<222> (3275)..(3280)

<220>

5 <223> Secuencia codificante: (64)...(2319)

<400> 3

```

10  aggggaccct gggacccccg cccccccac cgggccgccc ctgccccccg ggaccgagg 60
    aagatgtctt cgcggacggt gctggccccg ggcaacgata ggaactcga cactgaggc 120
    accttgaggc gtggccgctc ctcgacaaa ggcccgctct ggtccagccg ctactgggt 180
    gcccggtgcc ggaactccat cgctcctgt cccgaggagc agccccagt gggcaactac 240
    cgcctgctga ggaccattgg gaagggcaac tttgccaaag tcaagctggc tcggcacatc 300
15  ctactggctc gggagggttc catcaagatt atcgacaaa cccagctgaa tcccgagcgc 360
    ctgcagaagc tgttccgaga agtccgcatc atgaagggcc taaaccaccc caacatcgtg 420
    aagctctttg aggtgattga gactgagaag acgctgtacc tggatgagg gtacgcaagt 480
    gctggagaag tgtttgacta cctcgtgtcg catggccgca tgaaggagaa ggaagctcga 540
    gccaaagtcc gacagattgt ttcggtgtg cactattgtc accagaaaaa tattgtacac 600
20  agggacctga aggtgagaa cctcttgctg gatgccgagg ccaacatcaa gattgctgac 660
    tttggcttca gcaacgagtt cacgctggga tcgaagctgg acacgttctg cgggagcccc 720
    ccatatgccg ccccgagact gtttcagggc aagaagtacg acgggcccga ggtggacatc 780
    tggagcctgg gactcatcct gtacaccctc gtcagcggct ccctgccctt cgacgggcac 840
    aacctcaagg agctgcggga gcgagtactc agagggaagt accgggtccc tttctacatg 900
25  tcaacagact gtgagagcat cctgaggaga tttttggtc tgaaccagc taaacgctgt 960
    actctcgagc aaatcatgaa agacaaatgg atcaacatcg gctatgaggg tgaggagtgt 1020
    aagccataca cagagcccg gaggacttc ggggacacca agagaattga ggtgatgggt 1080
    ggtatgggct acacacggga agaaatcaaa gactcctga ccagccagaa gtacaacgaa 1140
    gtgaccgcca cctacctcct gctgggcagg aagactgagg aggggtggga ccggggcgcc 1200
30  ccagggctgg cctggcacg ggtgcgggcg cccagcgaca ccaccaacgg acaagttcc 1260
    agcaaaggca ccagccacag caaagggcag cggagtctct cttccacctc ccaccgccag 1320

35  cgcaggcata gcgatttctg tggcccatcc cctgcacccc tgcaccccaa acgcagccc 1380
    acgagcacgg gggaggcgga gctgaaggag gagcggtgc caggccgga ggcgagctgc 1440
    agcaccgcgg ggagtgggag tgcagggctc cccccctcca gcccatggt cagcagcgcc 1500
    cacaaccca acaaggcaga gatccagag cggcggaagg acagcacgag ccccccaac 1560
    aacctccctc ctgcatgat gaccgcaga aacacctacg tttgcacaga accccgggg 1620
40  gctgagcgc cgctactgtt gccaaatggg aaagaaaaca gctcaggcac cccaggggtg 1680
    cccctgcct cccctccag tcacagcctg gcaccccat caggggagcg gagccgctg 1740
    gcacgtggtt ccaccatccg cagcaccttc catggtggcc aggtccggga ccggcgggca 1800
    ggggggtggg gtgtggggg tgtgcagaat gggccccctg cctctccac actggccat 1860
    gaggtgcac ccctgccgc cggggcgccc cgccccacca ccaacctctt caccaagctg 1920
45  acctccaaac tgaccgaag ggtcgcagac gaacctgaga gaatcggggg acctgaggtc 1980
    acaagtggc attaccttg gatatcaacg cccggctgct ccgattcccc 2040
    tggagtgtga agctgaccag ctgcgcctc cctgaggccc tgatggcagc tctgcgccag 2100
    gccacagcag ccgcccgtg ccgctgccgc cagccacagc cgttccctgt ggcctgctg 2160
    caggggggtg cggcggggc cgagcccctg tcccacttcg aagtggaggt ctgccagctg 2220
50  ccccgccag gcttgcgggg agttctcttc cgcgtgtgg cgggcaaccg cctggccttc 2280
    cgcaccctcg tcaccgcat ctccaacgac ctcgagctct gagccaccac ggtcccagtg 2340
    ccctactct tcctctccct tgtcgccttc acttctacag gaggggaagg ggccaggag 2400
    gggattctcc ctttatcatc acctcagttt ccctgaatta tatttggggg caaagattgt 2460
    cccctctgct gttctctggg gccgctcagc acagaagaag gatgaggggg ctgagcgggg 2520
55  ggagctggca ccttccctga gcctccagcc agtccgtgcc tccctcgccc taccaagagg 2580
    gcacctgagg agactttggg gacagggcag gggcaggag ggaactgag gaaatcttcc 2640
    attcctccca acagctcaa attagccctt gggcagggc agggagagct gctgagccta 2700
    aagactggag aatctggggg actgggagtg ggggtcagag aggcagattc cttccctcc 2760
    cgtccccca cgtcaaac ccacttccct gccccaggct ggcgcggggc actttgtaca 2820
    aatccttgta aataccccac accctccctc ctgcaaaggt ctcttgagga gctgccgtg 2880
60  tcacctcagg tttttaagtt attacccc gacctcctc ctgtcagccc cctcacctgc 2940
    agcctgttg ccaataaatt taggagagtc cccccctccc caatgctgac cctaggattt 3000
    tccttccctg ccctcacctg caaatgagtt aaagaagagg cgtgggaatc caggcagtg 3060
    tttttcctt cggagcctcg gttttctcat ctgcagaatg ggagcgggtg ggggtgggag 3120
    gtaaggatgg tcgtggaaga aggcaggatg gaactcggcc tcatccccga ggccccagtt 3180
65  cctatatcgg gcccccatt catccactca cactccagc caccatgtta cactggactc 3240
    taagccactt cttactccag tagtaaatat attcaataaa caatcattga ccatgccta 3300
    aaaaaaaaaa aa 3312

```

ES 2 305 077 T3

<210> 4
 <211> 3392
 <212> DNA
 5 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> polyA_signal
 10 <222> (3355)..(3360)
 <220>
 <223> Secuencia codificante: (64)...(2127)
 15 <400> 4

```

    aggggaccct gggacccccg ccccccac cgggcgccc ctgcccccg ggaccggag 60
    aagatgtctt cgcggacggt gctggccccg ggcaacgatc ggaactcgga cacgcatggc 120
    accttgggca gtggcgcgtc ctcggaacaa ggcccgtcct ggtccagccg ctactgggt 180
    20 gcccgttgcc ggaactccat cgcctcctgt cccgaggagc agcccacgt gggcaactac 240
    cgctgctga ggaccattgg gaagggaac tttgccaaag tcaagctggc tcggcacatc 300
    ctactggtc gggaggttgc catcaagatt atcgacaaa cccagctgaa tcccagcagc 360
    ctgcagaagc tgtccgaga agtccgcatc atgaagggcc taaaccacc caacatcgtg 420
    aagctctttg aggtgattga gactgagaag acgctgtacc tggatgga gtacgaagt 480
    25 gctggagaag tgttgacta cctcgtgtcg catggccgca tgaaggagaa ggaagctcga 540
    gccaaagtcc gacagattgt ttcggctgtg cactattgtc accagaaaa tattgtacac 600
    agggacctga aggctgagaa cctcttgctg gatgccgagg ccaacatcaa gattgctgac 660
    tttggcttca gcaacgagtt cacgctggga tcgaagctgg acacgttctg cgggagcccc 720
    ccatatgccg ccccgagct gtttcagggc aagaagtacg acgggcccga ggtggacatc 780
    30 tggagcctgg gagtcacctc gtacaccctc gtcagcgct ccctgccctt cgacgggcac 840
  
```

35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 305 077 T3

aacctcaagg agctgcggga gcgagtactc agaggggaagt accgggtccc tttctacatg 900
 tcaacagact gtgagagcat cctgcggaga tttttggtgc tgaaccagc taaacgctgt 960
 actctcgagc aaatcatgaa agacaaatgg atcaacatcg gctatgaggg tgaggagttg 1020
 aagccataca cagagcccgga ggaggacttc ggggacacca agagaattga ggtgatgggtg 1080
 ggtatgggct acacacggga agaaatcaaa gagtccctga ccagccagaa gtacaacgaa 1140
 gtgaccgcca cctacctcct gctgggcagg aagactgagg aggggtgggga ccggggcgcc 1200
 ccagggtggt ccttggcacg ggtgcgggcg cccagcgaca ccaccaacgg aacaagttcc 1260
 agcaaaggca ccagccacag caaaggggcag cggagttcct ctccaccta ccaccgcccag 1320
 cgcaggcata gcgatttctg tggcccatcc cctgcacccc tgcaccccaa acgcagcccg 1380
 acgagcacgg gggagggcga gctgaaggag gagcggtgc caggccggaa ggcgagctgc 1440
 agcaccgctg ggagtgaggag tgcagggctg cccccctcca gccccatggt cagcagcgcc 1500
 cacaacccca acaaggcaga gatccagag cggcggaagg acagcacgag ccccccaac 1560
 aacctccctc ctgacatgat gaccgcaga aacacctacg tttgcacaga acgcccgggg 1620
 gctgagcgcc cgtcactggt gccaaatggg aaagaaaaca gctcaggcac cccacgggtg 1680
 cccccctgct cccccctcag tcacagcctg gcacccccat caggggagcg gagccgctg 1740
 gcacgtggtt ccaccatccg cagcaccttc catggtggcc aggtccggga ccggcgggca 1800
 ggggggtggg gtggtggggg tgtgcagaat gggccccctg cctctccac actggccat 1860
 gaggctgcac cctgcccgc cgggcgggcc cgccccacca ccaacctctt caccaagctg 1920
 acctccaaac tgaccggaag ggtaccctc gatccctcta aacggcagaa ctctaaccg 1980
 tgtgtttcgg ggcctctct gccccaggga tccaagatca ggtcgcagac gaacctgaga 2040
 gaatcggggg acctgaggtc acaagttgcc atctacctg ggatcaaacg gaaaccgccc 2100
 cccggtgct cagattcccc tggagtgtga agctgaccag ctgcgcccct cctgagggcc 2160
 tgatggcagc tctgcgccag gccacagcag ccgcccgtg ccgctgccg cagccacagc 2220
 cgttcctgct ggcctgcctg caggggggtg cgggcgggcc cgagcccctg tcccacttcg 2280
 aagtggaggt ctgccagctg ccccgccag gcttgcggg agttctcttc cgccgtgtgg 2340
 cgggcacgc cctggccttc cgacccctc tcacccgcat ctccaacgac ctcgagctct 2400
 gagccaccac ggtcccaggg cccttactct tcctctccct tgtcgccttc acttctacag 2460
 gagggggaagg ggccagggag gggattctcc ctttatcatc acctcagttt ccctgaatta 2520
 tatttggggg caaagattgt cccctctgct gttctctggg gccgctcagc acagaagaag 2580
 gatgaggggg ctacgcgggg ggagctggca ccttccctga gcctccagcc agtccgtgtc 2640
 tccctcgccc taccaagagg gcacctgagg agactttggg gacagggcag gggcagggag 2700
 ggaaactgag gaaatcttcc attcctccca acagctcaaa attaggcctt gggcaggggc 2760
 agggagagct gctgagccta aagactggag aatctgggg actgggagtg ggggtcagag 2820
 aggcagattc cttcccctcc cgtcccctca cgctcaaac cccacttct gccccaggct 2880
 ggcgcggggc actttgtaca aatccttgta aataccccc acctccctct ctgcaaagg 2940
 ctcttgagga gctgcgctg tcacctacgg tttttaagtt attacacccc gacctctc 3000
 ctgtcagccc cctcacctgc agcctgttgc ccaataaatt taggagagtc cccccctccc 3060
 caatgctgac cctaggattt tccttccctg ccctcacctg caaatgagtt aaagaagagg 3120
 cgtgggaatc caggcagtg ttttccctt cggagcctcg gttttctcat ctgcagaatg 3180
 ggagcggtgg ggggtgggag gtaaggatgg tcgtggaaga aggcaggatg gaactcgcc 3240
 tcatccccga ggcccagtt cctatatcgg gccccccatt catccactca cactcccagc 3300
 caccatgtta cactggactc taagccaatt ctactccag tagtaaattt attcaataaa 3360
 caatcattga cccatgccta aaaaaaaaaa aa 3392

<210> 5
 <211> 724
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 5

Lys Gly Pro Ser Trp Ser Ser Arg Ser Leu Gly Ala Arg Cys Arg Asn
 1 5 10 15
 Ser Ile Ala Ser Cys Pro Glu Glu Gln Pro His Val Gly Asn Tyr Arg
 20 25 30
 Leu Leu Arg Thr Ile Gly Lys Gly Asn Phe Ala Lys Val Lys Leu Ala
 35 40 45
 Arg His Ile Leu Thr Gly Arg Glu Val Ala Ile Lys Ile Ile Asp Lys
 50 55 60

ES 2 305 077 T3

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

ES 2 305 077 T3

Ser Pro Ala Pro Leu His Pro Lys Arg Thr Pro Thr Ser Thr Gly Asp
 405 410 415
 Thr Glu Leu Lys Glu Glu Arg Met Pro Gly Arg Lys Ala Ser Cys Ser
 420 425 430
 Ala Val Gly Ser Gly Ser Arg Gly Leu Pro Pro Ser Ser Pro Met Val
 435 440 445
 Ser Ser Ala His Asn Pro Asn Lys Ala Glu Ile Pro Glu Arg Arg Lys
 450 455 460
 Asp Ser Thr Ser Thr Pro Asn Asn Leu Pro Pro Ser Met Met Thr Arg
 465 470 475 480
 Arg Asn Thr Tyr Val Cys Thr Glu Arg Pro Gly Ser Glu Arg Pro Ser
 485 490 495
 Leu Leu Pro Asn Gly Lys Glu Asn Ser Ser Gly Thr Ser Arg Val Pro
 500 505 510
 Pro Ala Ser Pro Ser Ser His Ser Leu Ala Pro Pro Ser Gly Glu Arg
 515 520 525
 Ser Arg Leu Ala Arg Gly Ser Thr Ile Arg Ser Thr Phe His Gly Gly
 530 535 540
 Gln Val Arg Asp Arg Arg Ala Gly Ser Gly Ser Gly Gly Val Gln
 545 550 555 560
 Asn Gly Pro Pro Ala Ser Pro Thr Leu Ala His Glu Ala Ala Pro Leu
 565 570 575
 Pro Ser Gly Arg Pro Arg Pro Thr Thr Asn Leu Phe Thr Lys Leu Thr
 580 585 590
 Ser Lys Leu Thr Arg Arg Val Thr Asp Glu Pro Glu Arg Ile Gly Gly
 595 600 605
 Pro Glu Val Thr Ser Cys His Leu Pro Trp Asp Lys Thr Glu Thr Ala
 610 615 620
 Pro Arg Leu Leu Arg Phe Pro Trp Ser Val Lys Leu Thr Ser Ser Arg
 625 630 635 640
 Pro Pro Glu Ala Leu Met Ala Ala Met Arg Gln Ala Thr Ala Ala Ala
 645 650 655
 Arg Cys Arg Cys Arg Gln Pro Gln Pro Phe Leu Leu Ala Cys Leu His
 660 665 670
 Gly Gly Ala Gly Gly Pro Glu Pro Leu Ser His Phe Glu Val Glu Val
 675 680 685
 Cys Gln Leu Pro Arg Pro Gly Leu Arg Gly Val Leu Phe Arg Arg Val
 690 695 700
 Ala Gly Thr Ala Leu Ala Phe Arg Thr Leu Val Thr Arg Ile Ser Asn
 705 710 715 720
 Asp Leu Glu Leu

<210> 6

<211> 660

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 305 077 T3

<400> 6

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

ES 2 305 077 T3

	Glu Glu Leu Lys Pro Tyr Thr Glu Pro Glu Glu Asp Phe Gly Asp Thr	
	290	295 300
5	Lys Arg Ile Glu Val Met Val Gly Met Gly Tyr Thr Arg Glu Glu Ile	
	305	310 315 320
	Lys Glu Ala Leu Thr Asn Gln Lys Tyr Asn Glu Val Thr Ala Thr Tyr	
		325 330 335
10	Leu Leu Leu Gly Arg Lys Thr Asp Glu Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro	
		340 345 350
	Gly Leu Ala Leu Ala Arg Val Arg Ala Pro Ser Asp Thr Thr Asn Gly	
		355 360 365
15	Thr Ser Ser Ser Lys Gly Ser Ser His Asn Lys Gly Gln Arg Ala Ser	
		370 375 380
	Ser Ser Thr Tyr His Arg Gln Arg Arg His Ser Asp Phe Cys Gly Pro	
		385 390 395 400
20	Ser Pro Ala Pro Leu His Pro Lys Arg Ser Pro Thr Ser Thr Gly Asp	
		405 410 415
	Thr Glu Leu Lys Glu Glu Arg Met Pro Gly Arg Lys Ala Ser Cys Ser	
		420 425 430
25	Ala Val Gly Ser Gly Ser Arg Gly Leu Pro Pro Ser Ser Pro Met Val	
		435 440 445
	Ser Ser Ala His Asn Pro Asn Lys Ala Glu Ile Pro Glu Arg Arg Lys	
		450 455 460
30	Asp Ser Thr Ser Thr Pro Asn Asn Leu Pro Pro Ser Met Met Thr Arg	
		465 470 475 480
	Arg Asn Thr Tyr Val Cys Thr Glu Arg Pro Gly Ser Glu Arg Pro Ser	
		485 490 495
35	Leu Leu Pro Asn Gly Lys Glu Asn Ser Ser Gly Thr Ser Arg Val Pro	
		500 505 510
	Pro Ala Ser Pro Ser Ser His Ser Leu Ala Pro Pro Ser Gly Glu Arg	
		515 520 525
40	Ser Arg Leu Ala Arg Gly Ser Thr Ile Arg Ser Thr Phe His Gly Gly	
		530 535 540
	Gln Val Arg Asp Arg Arg Ala Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Val Gln	
		545 550 555 560
45	Asn Gly Pro Pro Ala Ser Pro Thr Leu Ala His Glu Ala Ala Pro Leu	
		565 570 575
	Pro Ser Gly Arg Pro Arg Pro Thr Thr Asn Leu Phe Thr Lys Leu Thr	
		580 585 590
50	Ser Lys Leu Thr Arg Arg Val Thr Leu Asp Pro Ser Lys Arg Gln Asn	
		595 600 605
55	Ser Asn Arg Cys Val Ser Gly Ala Ser Leu Pro Gln Gly Ser Lys Ile	
	610	615 620
60	Arg Ser Gln Thr Asn Leu Arg Glu Ser Gly Asp Leu Arg Ser Gln Val	
		625 630 635 640
	Ala Ile Tyr Leu Gly Ile Lys Arg Lys Pro Pro Pro Gly Cys Ser Asp	
		645 650 655
65	Ser Pro Gly Val	
		660

ES 2 305 077 T3

<210> 7

<211> 752

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

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

55

60

65

ES 2 305 077 T3

Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Thr Leu Val Ser Gly Ser Leu Pro Phe
 245 250 255
 Asp Gly His Asn Leu Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Leu Arg Gly Lys
 260 265 270
 Tyr Arg Val Pro Phe Tyr Met Ser Thr Asp Cys Glu Ser Ile Leu Arg
 275 280 285
 Arg Phe Leu Val Leu Asn Pro Ala Lys Arg Cys Thr Leu Glu Gln Ile
 290 295 300
 Met Lys Asp Lys Trp Ile Asn Ile Gly Tyr Glu Gly Glu Glu Leu Lys
 305 310 315 320
 Pro Tyr Thr Glu Pro Glu Glu Asp Phe Gly Asp Thr Lys Arg Ile Glu
 325 330 335
 Val Met Val Gly Met Gly Tyr Thr Arg Glu Glu Ile Lys Glu Ser Leu
 340 345 350
 Thr Ser Gln Lys Tyr Asn Glu Val Thr Ala Thr Tyr Leu Leu Leu Gly
 355 360 365
 Arg Lys Thr Glu Glu Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Gly Leu Ala Leu
 370 375 380
 Ala Arg Val Arg Ala Pro Ser Asp Thr Thr Asn Gly Thr Ser Ser Ser
 385 390 395 400
 Lys Gly Thr Ser His Ser Lys Gly Gln Arg Ser Ser Ser Ser Thr Tyr
 405 410 415
 His Arg Gln Arg Arg His Ser Asp Phe Cys Gly Pro Ser Pro Ala Pro
 420 425 430
 Leu His Pro Lys Arg Ser Pro Thr Ser Thr Gly Glu Ala Glu Leu Lys
 435 440 445
 Glu Glu Arg Leu Pro Gly Arg Lys Ala Ser Cys Ser Thr Ala Gly Ser
 450 455 460
 Gly Ser Arg Gly Leu Pro Pro Ser Ser Pro Met Val Ser Ser Ala His
 465 470 475 480
 Asn Pro Asn Lys Ala Glu Ile Pro Glu Arg Arg Lys Asp Ser Thr Ser
 485 490 495
 Thr Pro Asn Asn Leu Pro Pro Ser Met Met Thr Arg Arg Asn Thr Tyr
 500 505 510
 Val Cys Thr Glu Arg Pro Gly Ala Glu Arg Pro Ser Leu Leu Pro Asn
 515 520 525
 Gly Lys Glu Asn Ser Ser Gly Thr Pro Arg Val Pro Pro Ala Ser Pro
 530 535 540
 Ser Ser His Ser Leu Ala Pro Pro Ser Gly Glu Arg Ser Arg Leu Ala
 545 550 555 560
 Arg Gly Ser Thr Ile Arg Ser Thr Phe His Gly Gly Gln Val Arg Asp

ES 2 305 077 T3

	565	570	575
5	Arg Arg Ala Gly 580	Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val 585	Gln Asn Gly Pro Pro 590
	Ala Ser Pro Thr 595	Leu Ala His Glu Ala Ala Pro 600	Leu Pro Ala Gly Arg 605
10	Pro Arg Pro Thr 610	Thr Thr Asn Leu Phe Thr Lys 615	Leu Thr Ser Lys Leu Thr 620
	Arg Arg Val Ala Asp 625	Glu Pro Glu Arg Ile Gly Gly Pro 635	Glu Val Thr 640
15	Ser Cys His Leu 645	Pro Trp Asp Gln Thr Glu Thr Ala Pro 650	Arg Leu Leu 655
	Arg Phe Pro Trp 660	Ser Val Lys Leu Thr Ser Ser Arg Pro 665	Pro Glu Ala 670
20	Leu Met Ala Ala 675	Leu Arg Gln Ala Thr Ala Ala Arg Cys Arg Cys 680	
	Arg Gln Pro Gln 690	Pro Phe Leu Leu Ala Cys Leu His Gly Gly Ala Gly 700	
25	Gly Pro Glu Pro 705	Leu Ser His Phe Glu Val Glu Val Cys Gln Leu Pro 710	
	Arg Pro Gly Leu 725	Arg Gly Val Leu Phe Arg Arg Val Ala Gly Thr Ala 730	
30	Leu Ala Phe Arg 740	Thr Leu Val Thr Arg Ile Ser Asn Asp 745	Leu Glu Leu 750
35	<210> 8		
	<211> 688		
	<212> PRT		
40	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 8		
45	Met Ser Ser Arg Thr 1	Val Leu Ala Pro Gly 5	Asn Asp Arg Asn Ser Asp 10 15
	Thr His Gly Thr 20	Leu Gly Ser Gly Arg 25	Ser Ser Asp Lys Gly Pro Ser 30
50	Trp Ser Ser Arg 35	Ser Leu Gly Ala Arg 40	Cys Arg Asn Ser Ile Ala Ser 45
	Cys Pro Glu Glu Gln 50	Pro His Val Gly Asn Tyr Arg 55	Leu Leu Arg Thr 60
55	Ile Gly Lys Gly 65	Asn Phe Ala Lys Val 70	Lys Leu Ala Arg His Ile Leu 75 80
60	Thr Gly Arg Glu Val 85	Ala Ile Lys Ile Ile Asp Lys Thr 90	Gln Leu Asn 95
65			

ES 2 305 077 T3

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

ES 2 305 077 T3

	420	425	430
5	Leu His Pro Lys Arg Ser Pro Thr Ser Thr Gly Glu Ala Glu Leu Lys 435 440 445		
	Glu Glu Arg Leu Pro Gly Arg Lys Ala Ser Cys Ser Thr Ala Gly Ser 450 455 460		
10	Gly Ser Arg Gly Leu Pro Pro Ser Ser Pro Met Val Ser Ser Ala His 465 470 475 480		
	Asn Pro Asn Lys Ala Glu Ile Pro Glu Arg Arg Lys Asp Ser Thr Ser 485 490 495		
15	Thr Pro Asn Asn Leu Pro Pro Ser Met Met Thr Arg Arg Asn Thr Tyr 500 505 510		
	Val Cys Thr Glu Arg Pro Gly Ala Glu Arg Pro Ser Leu Leu Pro Asn 515 520 525		
20	Gly Lys Glu Asn Ser Ser Gly Thr Pro Arg Val Pro Pro Ala Ser Pro 530 535 540		
	Ser Ser His Ser Leu Ala Pro Pro Ser Gly Glu Arg Ser Arg Leu Ala 545 550 555 560		
25	Arg Gly Ser Thr Ile Arg Ser Thr Phe His Gly Gly Gln Val Arg Asp 565 570 575		
	Arg Arg Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val Gln Asn Gly Pro Pro 580 585 590		
30	Ala Ser Pro Thr Leu Ala His Glu Ala Ala Pro Leu Pro Ala Gly Arg 595 600 605		
	Pro Arg Pro Thr Thr Asn Leu Phe Thr Lys Leu Thr Ser Lys Leu Thr 610 615 620		
35	Arg Arg Val Thr Leu Asp Pro Ser Lys Arg Gln Asn Ser Asn Arg Cys 625 630 635 640		
	Val Ser Gly Ala Ser Leu Pro Gln Gly Ser Lys Ile Arg Ser Gln Thr 645 650 655		
40	Asn Leu Arg Glu Ser Gly Asp Leu Arg Ser Gln Val Ala Ile Tyr Leu 660 665 670		
45	Gly Ile Lys Arg Lys Pro Pro Pro Gly Cys Ser Asp Ser Pro Gly Val 675 680 685		
50			
55			
60			
65			