(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 274 656**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **99968001 .0**
(86) Fecha de presentación : **23.11.1999**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1131434**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2001**

(54) Título: **Factor inductor de apoptosis.**

(30) Prioridad: **23.11.1998 US 109595 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **16.05.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **16.05.2007**

(73) Titular/es:
Centre National de la Recherche Scientifique
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR

(72) Inventor/es: **Penninger, Josef, M.;**
Kroemer, Guido, Peter;
Siderovski, David, Peter;
Zamzami, Naoufal;
Susin, Santos, A. y
Snow, Bryan E. L.

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 274 656 T3

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Factor inductor de apoptosis.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a nuevos polipéptidos con factor inductor de apoptosis (AIF) de mamífero, a los ADN que codifican los polipéptidos con AIF y a sus utilizaciones.

Tecnología relacionada

La apoptosis es esencial para el mantenimiento de las dimensiones del tejido y de la homeostasis del número de células de los organismos pluricelulares, y se cree que las anomalías apoptósicas desempeñan una función importante en el desarrollo de varias enfermedades neoplásicas así como de numerosas enfermedades neurodegenerativas.

Las mitocondrias desempeñan una función clave en la regulación de la apoptosis. Una variedad de fenómenos clave en la apoptosis involucran a las mitocondrias, incluyendo la liberación de activadores de caspasa (como por ejemplo el citocromo c), cambios en el transporte de electrones, pérdida del potencial de transmembrana de las mitocondrias (permitiendo de este modo que varias proteínas que se encuentren en el espacio de la intermembrana mitocondrial se liberen a través de la membrana de la mitocondria externa, participando por esta razón en la fase de degradación apoptósica), oxidación-reducción celular alterada y que involucra a la familia de proteínas Bcl-2 pro- y anti-apoptósica. Las diferentes señales que convergen en las mitocondrias para activar o inhibir estos fenómenos y sus efectos corriente abajo esbozan varias de las series de reacciones principales en la muerte celular fisiológica.

Debido a que la apoptosis y su regulación desempeñan una función crítica en el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular, existe necesidad de desarrollar el material y los métodos para estimular o inhibir la apoptosis así como para proporcionar sistemas para el cribado de sustancias experimentales adicionales que estimulen o inhiban la apoptosis.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a los polinucleótidos aislados que codifican un factor inductor de apoptosis de mamífero. Los polinucleótidos se seleccionan de entre el grupo constituido por ADNc y ADN sintetizado químicamente, en el que el factor inductor de apoptosis de mamífero es el factor inductor de apoptosis murino o isoformas del mismo. La invención se refiere también al factor inductor de apoptosis humano que codifica polinucleótidos aislados o a isoformas del mismo. Todavía como otro aspecto, la presente invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido que presenta por lo menos del 70 al 95 por ciento de identidad con los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEC. ID nº: 2, nº 3, nº 5, nº 6, nº 8, nº 9, nº 11, nº 12, nº 14, y nº 15.

La presente invención se refiere también a polinucleótidos aislados que codifican un factor inductor de apoptosis de mamífero, seleccionándose el polinucleótido de entre el grupo constituido por: (a) las moléculas de ADN indicadas en las SEC. ID nº: 1, nº 4, nº 7, nº 10, y nº 13; (b) las moléculas de ADN que se hibridan, en condiciones de alta severidad, con las moléculas de ADN definidas en (a); y (c) las moléculas de ADN que codifican una expresión para los aminoácidos codificados por cualquiera de las moléculas de ADN anteriores.

En otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a vectores de expresión o vectores de clonación que comprenden cualquiera de los polinucleótidos que codifican a AIF descrito así como a las células huésped transformadas con cualquiera de los polinucleótidos descritos que codifican a AIF.

La presente invención se refiere también a células de mamífero que contienen un factor inductor de apoptosis de mamífero que codifica un ADN modificado de modo que permite una expresión mayor del factor inductor de apoptosis por medio de un fenómeno recombinatorio homólogo consistente en insertar una secuencia reguladora de la expresión en proximidad operativa al ADN que codifica el factor inductor de apoptosis, en la que la secuencia reguladora de la expresión insertada no es una secuencia reguladora de la expresión del factor inductor de apoptosis natural.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a los métodos para la producción de un polipéptido del factor inductor de apoptosis codificado por el polinucleótido según la presente invención, comprendiendo el método las etapas siguientes: (a) cultivar una célula huésped según las reivindicaciones 18 ó 21 en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido del factor inductor de apoptosis; y (b) recuperar el polipéptido del factor inductor de apoptosis expresado.

La presente invención se refiere asimismo a un factor inductor de apoptosis purificado de mamífero codificado por el polinucleótido según la presente invención, más particularmente a un factor inductor de apoptosis murino aislado y purificado y a las isoformas del mismo. La presente invención se refiere además a un factor inductor de apoptosis humano aislado y purificado y a las isoformas del mismo.

Todavía un aspecto más de la presente invención se refiere a las sustancias del anticuerpo que se unen específicamente a los factores estimulantes de apoptosis descritos anteriormente.

La presente invención se refiere también a los derivados de los factores estimulantes de apoptosis, descritos, que presentan una o más fracciones químicas unidas a éstos opcionalmente en un vehículo aceptable.

La presente invención se refiere asimismo a los métodos para la determinación de la presencia del factor inductor de apoptosis de mamífero en una muestra biológica que comprende las etapas siguientes: (a) obtener una muestra biológica; (b) exponer dicha muestra biológica a un anticuerpo específico para el factor inductor de apoptosis de mamífero según la presente invención; y (c) detectar la unión del anticuerpo específico para el factor inductor de apoptosis de mamífero en dicha muestra biológica. La presente invención se refiere también a los procedimiento para determinar la presencia de moléculas de polinucleótido específicas para el factor inductor de apoptosis del mamífero en una muestra biológica que comprende las etapas siguientes: (a) recoger una muestra biológica; (b) aislar las moléculas de polinucleótido de dicha muestra biológica; (c) hibridar a dichas moléculas de polinucleótido un reactivo de diagnóstico según la reivindicación 39 ó 40; y (d) detectar la unión de las moléculas de polinucleótido específicas para el factor inductor de apoptosis de mamífero en dichas muestras biológicas.

La presente invención se refiere asimismo a los métodos para determinar la presencia de una molécula de polinucleótido específica para el factor inductor de apoptosis de mamífero en una muestra de tejido o celular que comprende las etapas siguientes: (a) tomar una muestra de tejido o celular; (b) hibridar dicha muestra de tejido o celular con un reactivo de diagnóstico según la reivindicación 39 ó 40; y (c) detectar la unión de las moléculas de polinucleótido específicas para el factor inductor de apoptosis de mamífero en la muestra de tejido o celular a dicho reactivo de diagnóstico.

La presente invención se refiere asimismo a una composición que comprende un factor inductor de apoptosis de mamífero aislado y purificado según la presente invención y a un vehículo aceptable, diluyente y/o adyuvante, siendo el factor inductor de apoptosis de mamífero aislado un factor inductor de apoptosis murino o las isoformas del mismo o un factor inductor de apoptosis humano o las isoformas del mismo.

Todavía otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de la composición descrita, a la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación celular.

Otros objetivos y ventajas de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción detallada siguiente, que hace referencia a los dibujos, así como las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A a 1E presentan la estructura primaria y la distribución en el tejido de la proteína AIF. Específicamente, la Fig. 1A describe la alineación de la secuencia de aminoácidos del AIF de ratón y humana con el sistema ferredoxina NADH reductasa de benceno 1,2 dioxigenasa en *Pseudomonas putida* (BDSF). La secuencia subrayada en el AIF de ratón (mAIF) iguala los datos de la espectroscopía de masas obtenidos con el mAIF purificado digerido con tripsina. Los guiones indican la identidad del aminoácido; las casillas rayadas señalan la similitud de los aminoácidos; las casillas negras destacan las secuencias con localización de mitocondrias (MLS) y las supuestas secuencias con localización nuclear (NLS). Los números de registro en el GenBank para AIF de ratón y humana son It232169 (AF100927) e It232173 (AF100928), respectivamente.

La Fig. 1B presenta la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de la sonda de ADN del AIF (fluorescencia roja) en un cariograma de ratón macho teñido por contraste con DAP1 (fluorescencia azul). La posición detallada del gen del AIF fue cartografiada para la zona A6 del cromosoma X (10 determinaciones con resultados idénticos).

La Fig. 1C presenta el modelo de la expresión de ARNm tisular del AIF. Se hibridó una sonda de ADNc del AIF con una transferencia Northern de ARN poliadenilado de páncreas humano (1), riñón (2), músculo esquelético (3), hígado (4), cerebro (6), placenta (5) y corazón (7).

La Fig. 1D presenta el modelo de escisión proteica del AIF. Un antisuero producido contra los aminoácidos nº 151 a 200 de AIF de ratón (mAIF) se utilizó para detectar la proteína AIF contenida en las mitocondrias del hígado (1), riñón (2), corazón (3), cerebro (5) o bazo (6) de ratón. Las transferencias de referencia realizadas en presencia de péptidos inmunógenos que comprenden los aminoácidos nº 151 a 200 proporcionaron resultados negativos para las mitocondrias del hígado.

La Fig. 1E presenta la importación de mitocondrias de AIF. Se realizó la transcripción y la traducción *in vitro* utilizando el kit de transcripción/traducción acoplado al lisado de TNT (Promega) y [^{35}S]metionina en ausencia (1) o presencia (2) de ADNc con mAIF. Se midió la retención de este producto utilizando las mitocondrias que se dejaron sin tratar (3), se digirieron con proteinasa K para eliminar la proteína unida en la superficie (4) se desenergizaron con CCCP 100 μM (5) o se trataron tanto con proteinasa K como CCCP (6). Obsérvese la maduración de AIF en una proteína de 57 kDa que está retenida por las mitocondrias de un modo que puede ser inhibido por CCCP y que está protegido contra la proteólisis.

Las Figs. 2A a 2F presentan la distribución submitocondrial y subcelular en AIF en células normales y apoptósicas. Específicamente, la Fig. 2A presenta la localización submitocondrial de AIF, de la liberación de AIF por apertura de poros de PT y neutralización mediada por anticuerpos de la bioactividad de AIF contenida en el espacio de la intermembrana mitocondrial. Se realizaron transferencias Western en el lisado de mitocondrias de hígado de ratón (1), proteínas de la matriz (2), membrana interna (3), espacio de la intermembrana (4), membrana externa (5), el sobrenadante de las mitocondrias no tratadas (6) o el de las mitocondrias tratadas con atractilosida 5 mM (7), Ca^{2+} 200 μM (8), ciclosporina A 1 μM (9), atractilosida +CsA (10) o Ca^{2+} + ciclosporina A (11). Además, el sobrenadante de las mitocondrias tratadas con atractilosida se pseudoinmunosuprimió utilizando un suero preinmune (12), o AIF inmunosuprimido en ausencia (13) o presencia (14) de péptidos inmunógenos derivados de AIF (véase el Ejemplo 2, a continuación) capaz de bloquear el antisuero de AIF. Se determinó la capacidad de las alícuotas de cada preparación para estimular la hipoploidia nuclear en núcleos aislados de HeLa.

La Fig. 2B presenta la localización subcelular de AIF en comparación con citocromo *c*. El hibridoma 2B4,11 de linfocito T que expresa un vector de referencia (Neo) o Bcl-2 humano se cultivaron durante 12 horas en ausencia o presencia del análogo de dexametasona (DEX, 1 μM) de glucocorticoide sintético, seguido de la detección por inmunotransferencia de AIF o de citocroma *c* en los lisados de células completas o de fracciones subcelulares diferentes (anticuerpo contra citocromo *c* está disponible en el mercado; véase el Ejemplo 2 a continuación para anticuerpos contra AIF).

La Fig. 2C presenta la detección por inmunofluorescencia de AIF en fibroblastos de rata-1 transfectados con un vector de referencia (Neo) o Bcl-2 y tratados con estaurosporina (Stauro, 1 μM, 2 h.) o sin tratar. Se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con un anticuerpo anti-AIF (véase el Ejemplo 2) revelado mediante un conjugado marcado con FITC secundario. En las células Neo, el tratamiento con estaurosporina conduce a la generación de dos fenotipos, uno con condensación parcial de cromatina (~80% de células, etapa I) y otro con condensación más avanzada de cromatina y fragmentación nuclear (~20% de células, etapa II), identificada por microscopía en contraste de fase o contador-tinción con Hoechst 33342 (no mostrado). Las puntas de flecha están colocadas en el centro del núcleo.

La Fig. 2D presenta la detección por inmunofluorescencia del citocromo *c*. El citocromo *c* se detectó mediante un anticuerpo monoclonal específico puesto de manifiesto con un anticuerpo marcado con PE secundario. Se trataron las células y se clasificaron como en la Fig. 2C.

La Fig. 2E presenta la morfología nuclear y DY_m. Se tiñeron células de hígado con el colorante Hoechst 33342 (fluorescencia azul) intercalador de ADN o el colorante CMXRos (fluorescencia roja) sensible a DY_m. Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes.

La Fig. 2F presenta la microscopía inmunoelectrónica de localización de AIF en células de linfoma de linfocitos T de Jurkat normales (referencia) y en células tratadas con ceramida (25 μM, 16 horas) que ponen de manifiesto el esponjamiento de mitocondrias y la condensación de cromatina. Se detectó el AIF utilizando antisuero específico revelado mediante un anticuerpo marcado con partículas de Immunogold (5 nm) secundario (flechas blancas). Se presentan las secciones representativas de mitocondrias (mito, M) o de los núcleos (N) cerca de la envoltura (e).

Las Figs. 3A a 3G presentan los efectos del AIF en núcleos aislados y mitocondrias. Específicamente, la Fig. 3A presenta los efectos de la pérdida de ADN estimulada por AIF y la condensación de cromatina en núcleos aislados. Se cultivaron núcleos de HeLa a 37ºC en ausencia (referencia) o presencia de 100 ng/ml de AIF recombinante durante 90 min., seguido de tinción con un colorante de yoduro de propidio (PI) intercalador de ADN y análisis citométrico de flujo del contenido de ADN nuclear. Las inserciones demuestran las fotografías típicas obtenidas mediante tinción con DAPI.

La Fig. 3B presenta la determinación por microscopía electrónica de la condensación de cromatina de las células tratadas como en A y fijadas con tetróxido de osmio.

La Fig. 3C presenta la concentración y la dependencia del tiempo de los efectos de AIF en núcleos aislados. Se cultivaron núcleos de HeLa durante 90 min. con la concentración indicada de AIF rec. o de varios mutantes por delección de AIF (panel izquierdo). Alternativamente, se trataron los núcleos en diferentes periodos con la dosis indicada de AIF (panel derecho). Se determinó la hipoploidia nuclear mediante tinción con PI y citometría de flujo como en A.

La Fig. 3D presenta la electroforesis en gel de campo pulsado de los núcleos de HeLa que se dejaron sin tratar (banda 1) o se cultivaron durante 5 min. (2), 15 min. (3), 30 min. (4), 60 min. (5) o 90 min. (6) con 100 ng/ml de AIF sola, 90 min. con 100 ng/ml de AIFD1-377 (7) o 90 min. con 100 ng de AIF (8-11) en presencia de 200 μM de ácido *p*-cloromercurifenil-sulfónico (8), 200 μM del inhibidor caspasa de amplio espectro, Z-VAD.fmk (9), EDTA 5 mM (10) o EGTA 5 mM (11). Además, en cada preparación nuclear se evaluó la frecuencia de núcleos hipoploides como en A.

La Fig. 3E presenta el esponjamiento mitocondrial estimulado por AIF. Se controlaron en continuo mitocondrias de hígado de rata purificados para esponjamiento de gran amplitud. Las flechas indican la adición de Ca^{2+} (200 μM; referencia positiva), AIF (100 ng/ml), citosol (100 μg de proteína por ml) y/o Z-VAD.fmk (100 μM, añadido previamente a la mezcla citosol/AIF). Obsérvese que únicamente la adición combinada de AIF más citosol (panel derecho)

produce esponjamiento mitocondrial. Las mutaciones (D180-638, D1-377, D563-638) por deleción de AIF fueron inactivas en este ensayo.

La Fig. 3F presenta la liberación inducida por AIF del citocromo *c* y caspasa-9 de mitocondrias. Se sometieron mitocondrias aisladas a lisis osmótica (1) o se trataron como en A (15 min.) solamente con tampón (2), AIF rec. (3), citosol (4), AIF rec. + citosol (5), o AIF rec. + citosol + Z-VAD.fmk (6) y sus sobrenadantes se sometieron a análisis por inmunotransferencia de citocromo *c* y caspasa-9. Obsérvese que Z-VAD.fmk no inhibe la liberación de caspasa-9 pero interfiere algo con su activación proteolítica.

La Fig. 3G presenta la activación estimulada por AIF de una caspasa. Se determinó la capacidad de los mismos sobrenadantes mitocondriales que en la Fig. 3F para escindir el sustrato Z-VAD.afc de caspasa, que conduce a la generación del fluorocromo afc. El valor 100% se refiere a la activación enzimática obtenida por lisis osmótica de las mitocondrias.

Las Figs. 4A a 4D presentan los efectos del AIF en células sanas. Específicamente, la Fig. 4A presenta el efecto de la microinyección de AIF en las células. Se inyectó tampón solamente o AIF recombinante (10 μM) en el citoplasma de células Rat-1, que se cultivaron durante 90 min. en ausencia o presencia de Z-VAD.fmk 100 μM (añadida 15 min. antes de la inyección). Las células microinyectadas pudieron identificarse porque el inyectado contenía dextrano con FITC (fluorescencia verde no mostrada). Microfotografías representativas (tres experimentos independientes, 100 a 200 células microinyectadas por sesión) de células viables teñidas con el colorante CMXRos sensible a DY_m y Hoechst 33342 (como en la Fig. 2E, paneles superiores) o Anexina-V, que marca los restos de fosfatidilserina expuestos en superficie (fluorescencia roja en los paneles inferiores).

La Fig. 4B presenta la apoptosis estimulada por la sobreexpresión de AIF reforzada por transfección. Se transfectaron transitoriamente células de Jurkat con vector pcADN3.1 solamente (referencia) o ADNc con AIF de ratón (bajo la referencia de un activador de citomegalovirus (véase el vector pcADN3.1 de Invitrogen). Tras de 24 horas de cultivo, las células se tiñeron con los fluorocromos indicados para determinar la frecuencia y alteraciones asociadas a la apoptosis: pérdida de DY_m (fluorocromo: $DiOC_{(6)}3$), exposición a fosfatidilserina (fluorocromo: Anexina V-FITC) o pérdida del ADN nuclear (fluorocromo: yoduro de propidio, PI, tras permeabilización con etanol). Los números se refieren al porcentaje de células con características apoptósicas. Los resultados son representativos de 3 experimentos diferentes.

La Fig. 4C presenta la cuantificación de la apoptosis nuclear estimulada por microinyección (100 células mínimo, 2 a 3 determinaciones, X±SEM) de AIF recombinante, un mutante de AIF inactivo por deleción, citocromo *c* o atractilosida en células Neo o Rat-1 transfectadas con Bcl-2.

La Fig. 4D presenta la inhibición de la apoptosis nuclear estimulada por atractilosida y estaurosporina mediante microinyección de un antisuero anti-AIF. Se microinyectaron células Rat-1 con atractilosida (ATR, 50 μM) sola o atractilosida diluida en suero de referencia, antisuero anti-AIF y/o péptidos inmunógenos derivados de AIF 100 μM. 180 min. después de la microinyección, se tiñeron las células con Hoechst 33342 y CMXRos (como en la Fig. 4A, panel superior). Alternativamente, se cultivaron las células durante 120 min. con estaurosporina (1 μM, como en las Figs. 2C-2E), se añadieron al medio de cultivo tras la microinyección de antisuero de referencia o anti-AIF. Obsérvese que las células inyectadas con atractilosida y tratadas con estaurosporina no conservan el colorante CMXRos sensible a DY_m.

Descripción detallada de la invención

Tanto la muerte celular fisiológica (apoptosis) como, en algunos casos, la muerte celular accidental (necrosis) entrañan un procedimiento en dos etapas. En el primer nivel, numerosos estímulos fisiológicos y algunos patológicos desencadenan un aumento de permeabilidad de la membrana mitocondrial. Las mitocondrias liberan factores apoptógenos a través de la membrana externa y disipan el gradiente electroquímico de la membrana interna. La transición de la permeabilidad mitocondrial (PT) implica un complejo dinámico de multiproteína formado en el punto de contacto entre las membranas mitocondriales interna y externa. El complejo PT puede funcionar como un detector de tensión y lesión, así como para determinadas señales conectadas con los receptores. La inhibición de PT por intervención farmacológica en las estructuras mitocondriales o en la expresión mitocondrial de la oncoproteína BcI-2 inhibidora de apoptosis impide la muerte celular, lo que sugiere que PT es un fenómeno limitativo de velocidad del proceso de muerte. En un segundo nivel, las consecuencias de la disfunción mitocondrial (colapso del potencial de la transmembrana interna mitocondrial, desacoplamiento de la cadena respiratoria, hiperproducción de aniones superóxido, destrucción de la biogénesis mitocondrial, pérdida del calcio y del glutatión de la matriz y liberación de proteínas de la intermembrana solubles) entraña una catástrofe bioenergética que culmina en la destrucción de la integridad de la membrana plasmática (necrosis) y/o la activación de la proteasa apoptógena específica (caspasa) por las proteínas mitocondriales que se filtran en el citosol (citocromo *c*, factor inductor de apoptosis) con la activación de endonucleasa secundaria (apoptosis). La velocidad relativa de estos dos procesos (catástrofe bioenergética frente a activación de la proteasa y de la endonucleasa) determina si una célula experimentará necrosis primaria o apoptosis. La adquisición de las propiedades bioquímicas ultraestructurales de la apoptosis se basa críticamente en la liberación de proteasas apoptógenas o de activadores de proteasa en las mitocondrias. El hecho de que los fenómenos mitocondriales controlan la muerte celular presenta mayores implicaciones para el desarrollo de fármacos citoprotectores y citotóxicos.

La apertura del poro de transición de permeabilidad (PT) mitocondrial, que está bajo el control de los miembros de la familia Be1-2, es uno de los fenómenos decisivos del proceso apoptósico [Kroemer, *Nature Medicine*, **3**:614-620 (1997); Green *et al*., *Science* **281** (28 de agosto, 1998)]. La apertura del poro de PT puede producir la destrucción física de la membrana mitocondrial externa (vander Heiden *et al., Cell* **91**:627-637 (1997)], que conduce a la liberación de proteínas solubles del espacio de la intermembrana. La fracción de intermembrana mitocondrial contiene numerosos factores diferentes, potencialmente apoptógenos que incluyen el citocromo *c* [Liu *et al., Cell* **86**:147-157 (1996); Kluck *et al., Science* **275**:1132-1136 (1997)], procaspasas 2, 3 y 9 [Mancini *et al., J. Cell Biol*. **140**:1485-1495 (1998); Susin *et al., J. Exp. Med*., en imprenta], y un factor inductor de apoptosis (AIF) que basta para forzar a los núcleos aislados para que adopten una morfología apoptósica [Zamzami *et al., J. Exp. Med*. **183**; 1533-1544 (1996); Susin *et al., J. Exp. Med*. **184**; 1331-1342 (1996)]. Una actividad de AIF que mantiene su bioactividad en presencia del inhibidor Z-VAD.fmk de caspasa [Susin *et al., J. Exp. Med*., en imprenta] se purificó a partir del sobrenadante de mitocondrias de hígado de ratón sometidas a apertura de poros de PT. Los datos espectrométricos de masas en serie obtenidos en la digestión tríptica de una sola banda de SDS-PAGE teñida con plata [Ducret *et al., Protein Sci*. **7**:706-719 (1998)] se utilizó para identificar una etiqueta de la secuencia expresada (EST GenBank nº: 1595214; secuencia de aminoácidos (aa) subrayada en la Fig. 1A), que permite la clonación del clon de los ADNc completos correspondientes de ratón y de hombre (Fig. 1A). El AIF se conserva muy bien entre las dos especies de mamífero (92% de identidad de aminoácidos) y lleva una homología muy significativa con varias ferredoxinas eurobacterianas y arqueobacterianas u oxidorreductasas de NADH en su parte del terminal C (aminoácidos nº 128 a nº 613 para mAIF), lo que sugiere firmemente que AIF se conserva a través de todas las especies de mamífero. Su porción del terminal N no presenta dicha homología con las oxidorreductasas y en su lugar lleva una secuencia de direccionamiento mitocondrial (encasillada en la Fig. 1A) [Claros *et al., Eur. J. Biochem*. **241**:779-786 (1996)]. Solamente un cromosoma de ratón se hibrida con el ADNc con AIF *in situ* (Fig. 1B). Este gen está situado en la zona A6 del cromosoma X de ratón, que es sinténica con la zona Xq25-26 del cromosoma X humano, donde está localizado el gen AIF humano (número de registro en EMBL nº Z81364). Basada en el análisis por transferencia Northern, una especie de ARNm del AIF de 2,4 kb se expresa de modo omnipresente en el tejido humano (Fig. 1C). Este descubrimiento fue confirmado en el contexto proteico para los tejidos de ratón que utilizan un anticuerpo producido contra los aminoácidos nº 151 a 200 de AIF, que reconocen una proteína única de ~57 kDa (Fig. 1D).

El producto principal de la transcripción/traducción de ADNc de AIF obtenido *in vitro* presenta un peso molecular aparente próximo al esperado de 66,8 kDa. Cuando se importa en mitocondrias *in vivo*, da lugar a una proteína más corta correspondiente al AIF maduro (Fig. 1E). La bioactividad e inmunorreactividad del AIF se encuentra exclusivamente en el espacio de la intermembrana mitocondrial, como se puso de manifiesto por fraccionamiento submitocondrial (Fig. 2A). La proteína AIF de 57 kDa se libera en la apertura de poros de PT por agentes tales como actilosida (ATR), calcio o terc-butilhidroperóxido, y esta liberación es evitada por el inhibidor ciclosporina A del poro PT (Fig. 2A). La inmunorreducción del AIF del grupo completo de proteínas de la intermembrana mitocondrial también elimina la actividad biológica que estimula la apoptosis nuclear *in vitro*, lo que indica que el AIF es el principal factor mitocondrial que produce apoptosis nuclear (Fig. 2A). El fraccionamiento subcelular (Fig. 2B), el análisis de inmunofluorescencia (Fig. 2C) y la microscopía inmunoelectrónica (Fig. 2F) confirman que el AIF se encuentra exclusivamente en las mitocondrias de las células normales no tratadas. Tras la estimulación de la apoptosis por estaurosporina, el AIF se traslada por lo menos parcialmente al citosol y al núcleo (Fig. 2C) al mismo tiempo que la DY_m se reduce y los núcleos se vuelven traslúcidos con DAPI o tinción con Hoechst 33342 y manifiestan la condensación de cromatina periférica (etapa I en la Fig. 2C-2E). En las células Rat I, la liberación total de citocromo *c* de la mitocondria al citosol es únicamente visible en una etapa posterior, a saber cuando se produce la condensación avanzada de cromatina y la fermentación nuclear (cariorexis) (etapa II en la Fig. 2C a 2E) y el AIF aparece concentrado en el núcleo (Fig. 2C). La localización nuclear del AIF es compatible con la composición global de aminoácidos [Cedano *et al., J. Mol. Biol*. **266** (1997)] y la presencia de varias señales supuestas de localización nuclear (Fig. 1A) [Boulikas, *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression* **3**:193-227 (1993)]. La sobreexpresión de Bcl-2 impide la liberación mitocondrial activada por estaurosporina de AIF y el citocromo *c* y estabiliza la DY_m (Fig. 2C a 2E) de acuerdo con las observaciones anteriores [Zamzami *et al., J. Exp. Med*. **183**:1533-1544 (1996); Liu *et al., Cell* **86**:147-157 (1996); Susin *et al., J. Exp. Med*. **184**:1331-1342 (1996); Kluck *et al., Science* **275**:1132-1136 (1997); vander Heiden *et al., Cell* **91**; 627-637 (1997); Susin *et al., J. Exp. Med*., en imprenta; y Shimizu *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1455-1459 (1998)]. La relocalización diferencial de las dos proteínas de la intermembrana citocromo *c* y AIF, que se trasladan al citosol y al núcleo, respectivamente, se ha confirmado para otros tipos de células y en respuesta a otros estimulantes de apoptosis, por ejemplo para las células del hibridoma de linfocitos T tratadas con un agonista receptor de grupo corticoide (Fig. 2B). La sobreexpresión de Bcl-2 impide asimismo la liberación mitocondrial del AIF en esta línea celular (Fig. 2B). La inmunoelectromicroscopía confirma la redistribución del AIF aún en otro modelo de apoptosis, a saber las células de linfoma de Jurkat tratadas con ceramida y pone de manifiesto un enriquecimiento particular de AIF en áreas de densidad electrónica de la condensación de cromatina periférica (Fig. 2F). En conjunto, estos datos indican una transposición mitocondrio-nuclear del AIF durante la apoptosis.

Cuando se añade a los núcleos purificados de las células HeLa, la proteína AIF recombinante estimula la pérdida de ADN (es decir, escisión en bruto de 50 kbp, que conduce a la pérdida de ADN), medida por citometría de flujo (Fig. 3A). Además, el AIF provoca la condensación de cromatina periférica, determinada mediante tinción con Hoechst 33342 (Fig. 3A) o por microscopía electrónica (Fig. 3B). Estos efectos de AIF se observan para la proteína completa pero no para varias mutaciones por deleción (D180 a 638, D1-377, D563-638) (Fig. 3C). Es probable que sean independientes de su supuesta función de oxidorreductasa, por lo que la AIF recombinante carece de los grupos prostéticos FAD y NAD y no pone de manifiesto ninguna actividad de oxidorreductasa en los análisis enzimáticos normales (no mostrados). El efecto de AIF en los núcleos aislados no requiere factores citoplásmicos adicionales, es

dependiente de la dosis y es rápido, con efectos en tan poco como 1 min. (Fig. 3C). Está acompañado por la digestión de cromatina en fragmentos de ~50 kbp (Fig. 3D). Esta fragmentación del ADN a gran escala está inhibida por el EDTA quelante del Ca^{2+} y por el ácido p-cloromercurifenilsulfónico pero no por el inhibidor Z-VAD.fmk de caspasa de amplio espectro (Fig. 3D). La AIF recombinante añadida a los núcleos purificados no produce la fragmentación del ADN oligonucleosómico (es decir, "escalonamiento" del ADN de los fragmentos de 120 kbp, independientemente de la pérdida de ADN observada anteriormente con los fragmentos en bruto de 50 kbp) ni escinde el ADN del plásmido purificado (no mostrado). Además de sus efectos nucleares, el AIF recombinante actúa en las mitocondrias. En presencia de citosol, el AIF produce mitocondrias purificadas que experimentan esponjamiento de gran amplitud indicativo de la permeabilización de la membrana mitocondrial (Fig. 3D). Este efecto mitocondrial del AIF está acompañado de la liberación de citocromo *c* y de caspasa-9 (Fig. 3F). Ninguno de estos efectos del AIF, en los núcleos aislados o en los mitocondrias, es impedido por el inhibidor Z-VAD.fmk de caspasa de amplio espectro (Fig. 3D a 3F), lo que sugiere que son independientes de la caspasa. Sin embargo, el sobrenadante de mitocondrias tratado con AIF más citosol contiene una actividad enzimática inhibible por Z-VAD.fmk que escinde el sustrato Z-VAD.fmk de caspasa (Fig. 3E). Esta actividad es por lo menos debida en parte a la presencia de caspasa-9 activada (Fig. 3G y Susin *et al., J. Exp. Med.*, en imprenta). Por lo tanto, AIF puede activar la caspasa-9 (y supuestamente otras caspasas) mediante un mecanismo indirecto, dependiente de la mitocondria.

En una serie más de experimentos, se determinó si la localización ectópica (extramitocondrial) del AIF estimularía la apoptosis *in vivo*. En la microinyección de AIF recombinante en el citoplasma de las células vivas, el AIF estimula rápidamente (60 a 90 min.) varias marcas de apoptosis: condensación de cromatina nuclear y pérdida de ADN, disipación del DY_m y exposición de fosfatidilserina en la hojilla externa de la membrana plasmática (Fig. 4A). La sobreexpresión reforzada por transfección de AIF natural también estimula el colapso de DY_m, la exposición de fosfatidilserina y la hipoploidia (Fig. 4B). Ninguno de los efectos mediados por el AIF microinyectado es inhibido por Z-VAD.fmk (Fig. 4A y 4C), aunque Z-VAD.fmk logró prevenir la apoptosis dependiente de caspasa, estimulada por citocromo *c* (Fig. 4C) [Kluck *et al., Science* **275**:1132-1136 (1997); Li *et al., Cell* **91**:479-489 (1997)]. Además, la valoración cuidadosa del AIF puso de manifiesto una diferencia no significativa en su eficacia para estimular la apoptosis en las células de referencia y en las células transfectadas con Bc1-2 (Fig. 4C). Como referencia interna para su efecto citoprotector, Bcl-2 impide la pérdida de DY_m [Zamzami *et al., J. Exp. Med.* **183**:1533-1544 (1996); Susin *et al., J. Exp. Med.* **184**:1331-1342 (1996); y datos no mostrados] y la apoptosis nuclear estimulada por microinyección del agente atractilosida de apertura del poro de PT (Fig. 4C). La microinyección del antisuero específico para el AIF elimina los signos morfológicos de la apoptosis nuclear estimulada por atractilosida, aunque no impide la disipación de DY_m estimulada por atractilosida (Fig. 4D). Ninguno de dichos efectos inhibidores se observa cuando el anticuerpo específico para AIF es neutralizado mediante la inyección conjunta de un exceso de péptidos inmunógenos (véase el Ejemplo 2 a continuación). El antisuero anti-AIF no presenta tampoco ningún efecto sobre el colapso de DY_m estimulado por estaurosporina, aunque impide los cambios nucleares estimulados por estaurosporina (Fig. 4D), puntuando por defecto de nuevo la contribución del AIF a la apoptosis nuclear.

Los datos publicados en la presente memoria demuestran que AIF es una proteína de la intermembrana mitocondrial apoptógena. Como el citocromo *c*, es probable que el AIF sea una proteína bifuncional, filogenéticamente vieja, con una función de aceptor/donante de electrones (oxidorreductasa) y una segunda función apoptógena independiente [Kluck *et al., EMBO J.* **16**:4639-4649 (1997)]. El citocromo *c* se redistribuye desde la mitocondria al citosol y estimula la apoptosis nuclear con ayuda de varios factores adicionales (Apaf-1, ATP y procaspasa-9), que activan conjuntamente la caspasa-3, permitiendo la activación de todavía otro factor, DFF/CAD, que activa la fragmentación del ADN oligonucleosómico [Li *et al., Cell* **91**:479-489 (1997); Liu *et al., Cell* **89**:175-184 (1997); y Enari *et al., Nature* **391**:43-50 (1998)]. Aunque se ha considerado a DFF/ICAD como el principal efector citoplasmático responsable de la apoptosis nuclear [Liu *et al., Cell* **89**:175-184 (1997); y Enari *et al., Nature* **391**:43-50 (1998)], no es el único factor que estimula la condensación de la cromatina apoptósica [Samejima *et al., J. Cell. Biol.* **143**:225-239 (1998)]. En estricto contraste con el citocromo *c*, el AIF presenta un efecto directo sobre los núcleos aislados en los que se desencadena la condensación de cromatina así como la fragmentación de cromatina a gran escala. Este tipo de fragmentación de ADN precede a la degradación del ADN oligonucleosómico en varios modelos celulares de apoptosis [Oberhammer *et al., EMBO J.* **12**:3679-3684 (1993); Lagarkova *et al., J. Biol. Chem.* **270**:20239-20241 (1995)] y puede ser independiente de la caspasa (Fig. 3D y ref. 22). Además, el AIF afecta la función barrera de las membranas mitocondriales (Fig. 3E, 3F), lo que sugiere que puede involucrarse en un bucle de autoampliación en el que el AIF liberado de algunos mitocondrias actúa en otros mitocondrias para comprometer su función de membrana [Susin, *et al., J. Exp. Med.* **186**:25-37 (1997)]. Bcl-2 inhibe la liberación mitocondrial de AIF (Fig. 2C y 2F) pero no presenta ningún efecto citoprotector, una vez que el AIF está presente en el citosol (Fig. 4C). Por lo tanto, es probable que el AIF actúe más allá o independientemente del Bc1-2 y de los puntos de comprobación de la caspasa del procedimiento de muerte celular. Por lo tanto, el AIF proporciona una nueva conexión molecular entre la permeabilización de la membrana mitocondrial y la muerte celular apoptósica.

La presente invención se refiere al descubrimiento y la caracterización de un polipéptido, denominado factores estimulantes de la apoptosis mitocondrial (AIF). Se dan a conocer asimismo los AIF de mamíferos que codifican los ADN, que desempeñan una función crítica en la estimulación de la apoptosis.

En un aspecto, la presente invención se refiere a la identificación de materiales que funcionan como estimulantes de apoptosis. En particular, la invención se refiere al aislamiento, purificación y secuenciado de determinados ácidos nucleicos que corresponden al gen del AIF de mamífero, así como a los polipéptidos correspondientes codificados por estos ácidos nucleicos. La invención por lo tanto comprende los polinucleótidos con las secuencias indicadas en

la SEC. ID nº: 1 (ADN que codifica el AIF de ratón) y SEC. ID nº: 7 (ADN que codifica el AIF humano) y a los polinucleótidos que codifican el AIF, mediante codones degenerados, variantes degeneradas, variantes conservadas, variantes alélicas y fragmentos de los mismos, que poseen todos una actividad asignada a AIF, incluyendo pero sin limitarse a, la apoptosis por estimulación (por ejemplo, pero no limitada a la isoforma de ratón: SEC. ID. nº: 4; isoformas humanas: SEC. ID. nº: 10 y nº 13). Los polinucleótidos y polipéptidos de AIF de la invención son útiles en condiciones relacionadas con la pérdida de estimulación de apoptosis (por ejemplo varias enfermedades neoplásicas) en condiciones relacionadas con el aumento de estimulación de la apoptosis (por ejemplo varias enfermedades neurodegenerativas), así como otras enfermedades y disfunciones que están relacionadas con las anomalías en el control de la apoptosis. La invención se refiere asimismo a los polipéptidos expresados por los polinucleótidos descritos, y particularmente a los polipéptidos descritos en la SEC. ID. nº: 2 (completa de ratón), nº 3 (madura de ratón), nº 8 (completa humana) y 9 (madura humana), así como a las variantes conservadas, a los fragmentos apoptósicamente activos (con una actividad asignada a AIF), a moléculas pequeñas homólogas, a las isoformas de los polipéptidos descritos [por ejemplo la isoforma de ratón: SEC. ID. nº: 5 y nº 6 (maduras); a una primera isoforma humana SEC. ID. nº: 11 y nº 12 (maduras) y a una segunda isoforma humana SEC. ID. nº: 14 y nº 15 (maduras) y a los fragmentos inmunológicamente activos de cualquiera de los polipéptidos dados a conocer en la presente memoria (por ejemplo véase el Ejemplo 2 a continuación).

Polipéptidos inductores de apoptosis (AIF)

Los términos "proteína" que se refiere al polipéptido natural y "polipéptido" se utilizan en la presente memoria indistintamente con respecto al producto génico AIF y a las variantes del mismo. La expresión "proteína madura" o "polipéptido maduro" se refiere particularmente al producto génico AIF con la secuencia señal (o una proteína de fusión asociada) eliminada.

Como se indicó anteriormente, en las formas de realización específicas de los polipéptidos del AIF de la invención se incluyen las que presentan las secuencias de aminoácidos publicadas en la presente memoria por ejemplo las SEC. ID nº: 2 (ratón), nº: 3 (madura de ratón), nº: 8 (humana) y nº: 9 (madura humana), incluyendo el polipéptido de AIF modificado con las secuencias conservadoras de aminoácidos, así como los fragmentos, análogos y derivados de los mismos biológicamente activos (incluyendo las isoformas expuestas anteriormente). La expresión "biológicamente activo", se utiliza en la presente memoria para referirse a un efecto específico del polipéptido, que incluye pero no se limita a la unión específica, por ejemplo, a un compañero del enlace, anticuerpo u otra molécula de reconocimiento; a la activación de la serie de reacciones de transducción de señal en un contexto molecular; y/o a la producción (o inhibición por antagonistas) de los efectos fisiológicos mediados por el polipéptido de AIF natural *in vivo*. Los polipéptidos del AIF, incluyendo los fragmentos, análogos y derivados, pueden prepararse por síntesis, por ejemplo, utilizando técnicas bien conocidas de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase solución. Alternativamente, los polipéptidos de AIF de la invención pueden prepararse utilizando técnicas de ingeniería genética bien conocidas, como las descritas anteriormente. En otra forma de realización todavía, el polipéptido de AIF puede purificarse, por ejemplo, mediante purificación por inmunoafinidad, a partir de un fluido biológico, tal como pero no limitado al plasma, suero u orina, preferentemente plasma, suero u orina humanos, y más preferentemente de un paciente que sobreexprese el polipéptido, tal como un individuo que padezca por ejemplo de una variedad de enfermedades neurodegenerativas.

Fragmentos del polipéptido del AIF

En una forma de realización determinada, la presente invención contempla que los fragmentos naturales del polipéptido del AIF pueden ser importantes. La secuencia peptídica incluye numerosos puntos que frecuentemente son el objetivo de la escisión proteolítica, por ejemplo, restos de arginina. Es posible que el polipéptido completo pueda escindirse en uno o más de dichos puntos para formar fragmentos biológicamente activos (que incluirían necesariamente las partes del polipéptido que permitirían al fragmento permanecer activo). Dichos fragmentos biológicamente activos pueden agonizar o antagonizar la actividad operativa del polipéptido del AIF para estimular o impedir la estimulación de la apoptosis, respectivamente.

Como se describe en la presente memoria, determinadas zonas de la molécula del AIF, que son importantes para una o más de las actividades del AIF han sido identificadas y por lo tanto esta información proporciona a una persona experta en la materia instrucciones para el diseño de fragmentos, análogos y derivados, que son útiles para la puesta en práctica de la invención [véase a continuación para los mutantes BamH1 (D180-638), NcoI (D1-377) o HindIII (D563-638) por deleción del AIF así como las Figs. 3 y 4 para los datos que entrañan los mutantes siguientes].

Análogos del polipéptido del AIF

La presente invención contempla específicamente la preparación de análogos del polipéptido del AIF, que se caracterizan porque son capaces de una actividad biológica del polipéptido del AIF, por ejemplo de enlace al compañero del enlace específico del polipéptido del AIF (por ejemplo, una enzima o efectores similares). En una forma de realización, el análogo agoniza la actividad del AIF, es decir, opera de manera similar al polipéptido del AIF. Preferentemente, un agonista del AIF es más eficaz que la proteína natural. Por ejemplo, un análogo del agonista del AIF puede fijarse al compañero de enlace del AIF específico con mayor afinidad o demostrar una vida media más prolongada *in vivo*, o ambas. No obstante, también se contemplan los análogos agonistas del polipéptido del AIF que son menos eficaces que la proteína natural.

En otra forma de realización, el análogo antagoniza la actividad del AIF. Por ejemplo, un análogo del AIF que se fija al compañero del enlace del AIF específico pero no produce transducción de señal puede inhibir competitivamente el enlace el AIF natural a su compañero de enlace, disminuyendo de este modo la actividad del AIF *in vivo*. Dicho análogo antagonista del AIF puede también demostrar diferentes propiedades del polipéptido AIF, por ejemplo, vida media más prolongada (o más corta) *in vivo*, mayor (o menor) afinidad de enlace para el compañero de enlace del AIF específico, o ambas.

En una forma de realización, un análogo del polipéptido del AIF es un polipéptido del AIF modificado por la sustitución de aminoácidos en las posiciones en el polipéptido que no son esenciales para la estructura o el funcionamiento. Por ejemplo, la sustitución de restos divergentes de aminoácidos en la secuencia humana en comparación con la secuencia de aminoácidos murina (y viceversa) proporcionará probablemente análogos útiles del polipéptido del AIF (es decir intercambios de aminoácidos entre el ratón y el hombre). Por ejemplo, alineando la secuencia madura de aminoácidos del AIF de ratón (SEC. ID nº: 3) con la secuencia madura de aminoácidos del AIF humana (SEC. ID nº: 9), comenzando en la posición 1 (uno), que pone de manifiesto diferencias de aminoácidos en las siguientes posiciones: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 140, 141, 143, 144, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 3115, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 435, 436, 437, 438, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 451, 452, 453, 455, 456, 457, 458, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 5569, 570, 571, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611 y 612.

Asimismo se contemplan las sustituciones de aminoácidos conservadoras entre los polipéptidos del AIF de ratón y humano como se determina por determinadas propiedades químicas o físicas compartidas en común entre las especies, hidrofobia de carga y/o aminoácidos ácidos frente a aminoácidos básicos.

Los análogos, tales como los fragmentos, pueden producirse, por ejemplo, por digestión en pepsina del polipéptido del AIF. Otros análogos, tales como las muteínas, pueden ser producidos por mutagénesis normal dirigida al punto de las secuencias de codificación del polipéptido de AIF. Los análogos que presentan actividad estimulante de apoptosis tales como pequeñas moléculas, si funcionan como activadores o inhibidores, pueden ser identificados por una variedad conocida de análisis *in vitro* descritos en la presente memoria y otros que son bien conocidos en la materia.

Análogos de pequeñas moléculas y peptidomiméticos del polipéptido del AIF

La estructura del polipéptido del AIF, se analiza por varios procedimientos conocidos en la materia. La secuencia de la proteína puede ser caracterizada por un análisis de hidrofilia [por ejemplo, Hopp *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:3824 (1981)]. Un perfil de hidrofilia se utiliza para identificar las zonas hidrófoba e hidrófila del polipéptido del AIF, que pueden indicar las zonas ocultas en el interior del polipéptido plegado, y las zonas accesibles en el exterior del polipéptido. Además, puede emprenderse también el análisis estructural secundario [por ejemplo, Chou *et al., Biochem.*, **13**:222 (1974)], para identificar las zonas del polipéptido del AIF que adoptan estructuras secundarias específicas. La manipulación de la estructura prevista o determinada, que incluye la predicción de la estructura secundaria, puede ser realizada utilizando programas informáticos fácilmente disponibles en la técnica.

Al proporcionar una fuente abundante de polipéptido del AIF recombinante, la presente invención permite la determinación estructural cuantitativa del polipéptido. En particular, se proporciona suficiente material para la resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR), Raman y ultravioleta (UV) y dicroísmo circular (CD), análisis espectroscópico. En particular la RMN proporciona análisis estructurales muy potentes de moléculas en solución, que se aproxima más estrechamente a su media natural [Marion *et al., Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **113**:967-974 (1983); Bar *et al., J. Magn. Reson.*, **65**:355-360 (1985); Kimura *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:1681-1685 (1980)]. Pueden emplearse también otros métodos de análisis estructural. Éstos incluyen pero no se limitan a la cristalografía de rayos X [Engstom, *Biochem. Exp. Biol.*, **11**:7-13 (1974)].

Todavía en una forma de realización adicional, puede probarse un polipéptido análogo del AIF para determinar si interreacciona con un anticuerpo específico para el polipéptido del AIF natural o los fragmentos específicos del mismo. El grado de interreactividad proporciona información acerca de la homología estructural o similitud de proteínas, o acerca de la accesibilidad de las zonas correspondientes a los fragmentos del polipéptido que se utilizaron para generar anticuerpos específicos para el fragmento.

Cribado para los análogos del AIF

Se conocen varias técnicas de cribado en la materia para el cribado de análogos de polipéptidos. Están disponibles varios bancos de productos químicos. Por consiguiente, la presente invención contempla el cribado de dichos bancos, por ejemplo, bancos de compuestos sintéticos generados durante años de investigación, bancos de compuestos naturales y bancos combinatorios, como los descritos con mayor detalle, anteriormente, para los análogos del polipéptido del AIF. En una forma de realización, la invención contempla el cribado de dichos bancos para los compuestos que se unen a anticuerpos del polipéptido anti-AIF. En otro aspecto, una vez se identifica el compañero de enlace del AIF (véase anteriormente), puede utilizarse cualquier técnica de cribado conocida en la materia para cribar agonistas o antagonistas del compañero de enlace del AIF. La presente invención contempla cribados para pequeñas moléculas de ligandos o análogos de ligando y mímicos, así como cribados para ligandos naturales que se unen para activar y agonizar o antagonizar el compañero de enlace del AIF *in vivo*.

El conocimiento de la estructura primaria del compañero de enlace del AIF y la similitud de esta secuencia con las proteínas de función conocida, pueden proporcionar una indicación inicial como agonistas o antagonistas de la proteína. La identificación y cribado de los antagonistas se facilita además determinando las propiedades estructurales de la proteína, por ejemplo, utilizando cristalografía de rayos X, difracción de neutrones, espectrometría de resonancia magnética nuclear y otras técnicas para la determinación de estructuras. Estas técnicas proporcionan el diseño racional o la identificación de agonistas y antagonistas.

Otro método utiliza un bacteriófago recombinante para producir grandes bancos. Utilizando el "método del fago" [Scott *et al., Science*, **249**:386-390 (1990); Cwirla *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:6378-6382 (1990); Devlin *et al., Science*, **249**:404-406 (1990)], pueden construirse bancos muy grandes (entidades químicas de 10^6 a 10^8). Un segundo método utiliza métodos químicos primarios, del cual son ejemplos el método Geysen [Geysen *et al., Molecular Immunology*, **23**:709-715 (1986); Geysen *et al., J. Immunologic Method*, **102**:259-274 (1987)] y el reciente método de Fodor *et al., Science*, **251**:767-773 (1991). Furka *et al*., 14th International Congress of Biochemistry, volumen 5, resumen FR:013 (1988); Furka, Int. *J. Peptide Protein Res*., **37**:487-493 (1991); Houghton (patente US nº 4.631.211, publicada en diciembre de 1986); y Rutter *et al*. (patente US nº 5.010.175, publicada el 23 de abril de 1991) describen métodos para producir una mezcla de péptidos que pueden ser probados como agonistas o antagonistas. En otro aspecto, los bancos sintéticos [Needels *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:10700-10704 (1993); Lam *et al*., publicación de la patente internacional nº WO 92/00252, cada una de las cuales está incorporada a la presente memoria en su totalidad como referencia] y similares pueden utilizarse para cribar los ligandos del compañero de enlace del AIF según la presente invención. Con dichos bancos, pueden detectarse los antagonistas del compañero de enlace utilizando células que expresan el o los compañero(s) de enlace sin clonar realmente el compañero de enlace del AIF.

En otro aspecto todavía, los análogos del polipéptido del AIF pueden cribarse mediante la utilización de un sistema químico combinatorio como el dado a conocer en la patente US nº 5.723.232 de Kauffman y Ballivet.

Derivados de polipéptidos del AIF

Los polipéptidos dados a conocer en la presente memoria pueden modificarse mediante el acoplamiento de una o más fracciones químicas a la fracción de la proteína. Los derivados verificados químicamente pueden formularse además para las vías de administración intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intravenosa, oral, nasal, rectal, bucal, sublingual, pulmonar, tópica, transdérmica u otras. Se ha observado que la modificación química de las proteínas biológicamente activas aporta ventajas adicionales en determinadas circunstancias, tales como el aumento de estabilidad y de tiempo de circulación de la proteína terapéutica y la disminución de inmunogenicidad [patente US nº 4.179.337; Abuchowski *et al*., "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", en *Enzymes as Drugs*, págs. 367-383, Holcenberg y Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nueva York, NY, (1981); Francis, *Focus on Growth Factors*, 3:4-10 (1992)].

Fracciones químicas para modificación

Las fracciones químicas adecuadas para la modificación pueden seleccionarse de entre los polímeros solubles en agua. El polímero seleccionado debería ser soluble en agua de modo que la proteína a la que se acopla no precipite en un medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Preferentemente, el polímero será farmacéuticamente aceptable para la utilización terapéutica de la preparación del producto final. Un experto en la materia será capaz de seleccionar el polímero deseado basándose en consideraciones tales como si el conjugado polímero/polipéptido se utilizará terapéuticamente y si es así, la dosificación deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones. Para las presentes proteínas y polipéptidos, éstas pueden determinarse utilizando los análisis proporcionados en la presente memoria.

Moléculas de polímero

El polímero soluble en agua puede seleccionarse de entre el grupo constituido, por ejemplo, por polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados y alcohol polivinílico. El propionaldehído de polietilenglicol puede aportar ventajas en la preparación debido a su estabilidad en agua.

El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. Para el polietilenglicol, el peso molecular preferido está comprendido entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular estipulado) para su facilidad de manejo y preparación. Pueden utilizarse otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración de la liberación lenta deseada, los efectos, si existen sobre la actividad biológica, la facilidad de manipulación, el grado de falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol para una proteína o análogo terapéutico).

Relación polímero/proteína

El número de moléculas de polímero unidas de este modo puede variar, y un experto en la materia será capaz de determinar el efecto sobre la función. Una puede monoderivarse, o se puede proporcionar una o alguna combinación di-, tri-, tetra- de modificación, con la misma o diferentes fracciones químicas (por ejemplo, polímeros, tales como diferentes pesos de polietilenglicoles). La proporción de moléculas de polímero a moléculas de proteína (o péptido) variará, como sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la relación óptima (desde el punto de vista de eficacia de la reacción en la que no existe ningún exceso de proteína o polímero sin reaccionar) se determinará mediante factores tales como el grado de modificación deseado (por ejemplo, mono, di-, tri-, etc.), el peso molecular del polímero seleccionado, si el polímero está ramificado o no ramificado y las condiciones de la reacción.

Acoplamiento de la fracción química a la proteína

Las moléculas de polietilenglicol (u otras fracciones químicas) deberían acoplarse a la proteína en consideración de los efectos sobre los dominios operativos o antigénicos de la proteína. Existen numerosos procedimientos de acoplamiento disponibles para los expertos en la materia, por ejemplo el documento EP 0 401 384 (que acopla PEG a G-CSF); Malik *et al., Exp. Hematol*., **20**:1028-1035 (1992) (que describe la pegilación de GM-CSF utilizando cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede estar unido por enlaces covalentes mediante restos de aminoácidos por un grupo reactivo, tal como un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son a los que puede unirse una molécula activada de polietilenglicol. Los restos de aminoácido con un grupo amino libre pueden incluir restos de lisina y restos de aminoácidos N-terminal, que tienen un grupo carboxilo libre, pueden incluir restos de ácido aspártico y restos de ácido glutámico y el resto aminoácido C-terminal. Pueden utilizarse también grupos sulfhidrilo como grupo reactivo para el acoplamiento de molécula(s) de polietilenglicol. Con fines terapéuticos se prefiere el acoplamiento a un grupo amino, tal como el acoplamiento al terminal N o al grupo lisina. Debería evitarse el acoplamiento a restos importantes para la fijación al receptor si se desea la fijación al receptor.

Proteínas modificadas químicamente en el terminal N

Se puede desear específicamente la proteína modificada químicamente en el terminal N. Utilizando polietilenglicol como ilustración de las presentes composiciones, se puede seleccionar de entre una variedad de moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilenglicol a moléculas de proteína (o péptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación que debe realizarse y el procedimiento de obtención de la proteína pegilada seleccionada en el terminal N. El procedimiento de obtención de la preparación pegilada en el terminal N (es decir, la separación de esta fracción de otras fracciones monopegiladas si es necesario) puede realizarse mediante la purificación del material pegilado en el terminal N de una población de moléculas de proteína pegiladas. La modificación química del terminal N selectiva puede realizarse mediante la alquilación reductora que aprovecha la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al terminal N) disponibles para la modificación en una determinada proteína. En las condiciones de reacción apropiadas, se consigue la modificación sustancialmente selectiva de la proteína en el terminal N con un grupo carbonilo que contiene polímero. Por ejemplo, se puede pegilar selectivamente en el terminal N la proteína realizando la reacción a un pH que permita aprovecharse de las diferencias de pK_a entre los grupos ε-amino de los restos de lisina y las del grupo α-amina del resto N-terminal de la proteína. Mediante dicha modificación selectiva se controla el acoplamiento de un polímero soluble en agua a una proteína: la conjugación con el polímero tiene lugar principalmente en el terminal N de la proteína y no se produce ninguna modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino con cadena lateral de lisina. Utilizando la alquilación reductora, el polímero soluble en agua puede ser del tipo descrito anteriormente, y debería tener un único aldehído reactivo para el acoplamiento a la proteína. Puede utilizarse el propionaldehído de polietilenglicol, que contiene un único aldehído reactivo.

Ácidos nucleicos asociados a polipéptidos del AIF

Como se indicó anteriormente, la presente invención se refiere a los ADN que codifican los polipéptidos del AIF así como a los ADN que se hibridan a los ADN que codifican a los polipéptidos del AIF (véanse a continuación las condiciones de solubilidad). Por lo tanto, según la presente invención pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante dentro de la experiencia en la materia. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía científica [por ejemplo, Sambrook *et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); Glover ed., *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. (1985); Gait ed., Oligonucleotide Synthesis, Oxford University Press (1984); Hames *et al*., eds., *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag (1985); Hames *et al*., eds. *Transcription And Translation*, Oxford University Press (1984)]; Freshney ed., *Animal Cell Culture*, Oxford University Press (1986); *Immobilized Cell And Enzymes*, IRL Press (1986)]; Perbal, A *Practical Guide to Molecular Cloning*, Wiley, Nueva York (1984)]. De particular importancia en la presente invención son las estrategias para el aislamiento, clonación, secuenciado, análisis y caracterización de un gen o ácido nucleico basadas en las técnicas bien conocidas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para los fines de esta exposición, son importantes las siguientes definiciones. Un "replicón" es cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, cromosoma, virus) que opere como una unidad autónoma de replicación del ADN *in vivo*, es decir, capaz de replicación bajo su propio control.

Un "vector" es un replicón, como por ejemplo un plásmido, fago o cósmido, al que puede acoplarse otro segmento de ADN con el fin de que lleve aproximadamente la replicación del segmento acoplado.

Un "casete" se refiere a un segmento de ADN que puede insertarse en un vector en las secuencias de restricción específicas. El segmento de ADN codifica un polipéptido de interés, y el casete y las secuencias de restricción se diseñan para asegurar la inserción del casete en el propio marco de lectura para la transcripción y traducción.

ADN "heterólogo" se refiere al ADN no situado de forma natural en la célula, o en un punto cromosómico de la célula. Preferentemente el ADN heterólogo comprende un gen extraño a la célula.

Una célula ha sido "transfectada" por ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN ha sido introducido en el interior de la célula. Una célula ha sido "transformada" por ADN exógeno o heterólogo cuando el ADN transfectado efectúa un cambio fenotípico. Preferentemente, el ADN transformante estará integrado (ligado por enlace covalente) en el ADN cromosómico construyendo el genoma de la célula.

Un "clon" es una población de células procedente de una sola célula o de un antecesor común por mitosis.

Un "polinucleótido" se refiere a un ADN de una sola cadena, ARN, o ADN modificado o ARN. Este término también incluye el ADN de doble cadena encontrado, entre otras, en las moléculas de ADN lineales o circulares (por ejemplo, fragmentos de restricción), plásmidos y cromosomas. Al exponer la estructura de determinadas moléculas de ADN de doble cadena, pueden describirse las secuencias en la presente memoria según el acuerdo normal de proporcionar solamente la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN no transcrita (es decir, la cadena con una secuencia homóloga al ARNm). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha experimentado una manipulación biológica molecular.

Una molécula de ácido nucleico es "hibridable" con otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, un ADN genómico o un ARN, cuando la forma de cadena única de la molécula de ácido nucleico puede hibridarse con otra molécula de ácido nucleico en condiciones apropiadas de temperatura y de fuerza iónica de la solución (Sambrook *et al*., 1989, *supra*). Las condiciones de temperatura y de fuerza iónica determinan la "severidad" de la hibridación. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la severidad de la hibridación, son posibles incompatibilidades entre las bases. La severidad apropiada para los ácidos nucleicos hibridantes depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementariedad, variables bien conocidas en la materia. Cuanto mayor es el grado de similitud o de homología entre dos secuencias nucleotídicas, mayor es el valor de T_m para los híbridos de los ácidos nucleicos con estas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a la T_m mayor) de las hibridaciones del ácido nucleico disminuye en el orden siguiente: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para los híbridos mayores de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado las ecuaciones para calcular la T_m (Sambrook *et al*., 1989, *supra*, 9.50-0.51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de las incompatibilidades se hace más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (Sambrook *et al*., 1989, *supra*, 11.7-11.8). Preferentemente, una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es de por lo menos aproximadamente 10 nucleótidos; más preferentemente de por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos; todavía más preferentemente la longitud es de por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos.

"Recombinación homóloga" se refiere a la inserción de una secuencia de ADN extraña de un vector en un cromosoma. Preferentemente, el vector se dirige a un punto cromosómico específico para la recombinación homóloga. Para la recombinación homóloga específica, el vector contendrá zonas suficientemente largas de homología con las secuencias del cromosoma para permitir la unión e incorporación complementarias del vector en el cromosoma. Las zonas más largas de homología y los grados mayores de similitud de secuencia, pueden aumentar la eficacia de la recombinación homóloga.

Una "secuencia de codificación" de ADN es una secuencia de ADN que está transcrita y traducida en un polipéptido en una célula *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación se determinan mediante un codón de inicio en el terminal 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el terminal 3' (carboxilo). Una secuencia de codificación puede incluir, pero no se limita a, secuencias procarióticas, ADNc del ARNm eucariótico, secuencias del ADN genómico del ADN eucariótico (por ejemplo, mamífero) e incluso secuencias de ADN sintético. Si la secuencia de codificación se desea para la expresión en una célula eucariótica, una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción estará situada normalmente en 3' con respecto a la secuencia de codificación.

Aislamiento de secuencias de codificación y flanqueantes del AIF

Tal como se utiliza en la presente memoria, el termino "AIF" (factor inductor de apoptosis) de mamífero cuando se utiliza para describir una molécula de ácido nucleico se refiere a una molécula de ácido nucleico o a un fragmento de la misma que (a) presenta la secuencia nucleotídica indicada en la SEC. ID nº: 1 (murina), SEC. ID nº: 4 (isoforma murina), SEC. ID nº: 7 (humana), SEC. ID nº: 10 (isoforma humana) y SEC. ID nº: 13 (isoforma humana); (b) presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es por lo menos 75 por ciento idéntico, pero puede ser mayor del 75 por ciento, es decir 80 por ciento, 85 por ciento, 90 por ciento, 95 por ciento, o incluso mayor del 95 por ciento idéntico, al polipéptido codificado por cualquiera de entre SEC. ID nº: 1 (murina), SEC. ID nº: 4 (isoforma murina), SEC. ID nº: 7 (humana), SEC. ID nº: 10 (isoforma humana) y SEC. ID nº: 13 (isoforma humana); (c) es una variante alélica natural de (a) o (b); (d) es una variante de ácido nucleico de (a)-(c) producida como se proporciona en la presente memoria; (e) presenta una secuencia que es complementaria de (a)-(d); y/o (f) se hibrida con cualquiera de (a)-(e) en condiciones de alta severidad. La expresión "condiciones de alta severidad" se refiere a la hibridación y el lavado en condiciones que permitan únicamente el enlace de una molécula de ácido nucleico tal como un oligonucleótido o una sonda molecular de ADNc con secuencias muy homólogas. Las condiciones de hibridación severas a título de ejemplo son las siguientes: hibridación a 65ºC en 3 × SSC, $NaPO_4$ 20 mm pH 6,8 seguido de lavado a 55ºC-65ºC y lavado con NaCl 0,015 M, CitratoNa 0,005 M y SDS al 0,1 por ciento. Resulta evidente para los expertos en la materia que la variación en estas condiciones tiene lugar basándose en la longitud y contenido nucleotídico de GC de las secuencias que deben hibridarse. Están disponibles fórmulas estándar en la materia para la determinación de las condiciones de hibridación exacta. Véase Sambrook *et al., supra*. Por ejemplo, otra solución de lavado severo es 0,2 × SSC y SDS al 0,1 por ciento utilizado a una temperatura comprendida entre 50ºC y 65ºC. Cuando se utilizan sondas de oligonucleótidos para cribar bancos de ADNc o genómicos, pueden utilizarse las siguientes condiciones severas de lavado. Un protocolo utiliza 6 × SSC con pirofosfato de sodio al 0,05 por ciento a una temperatura comprendida entre 35ºC y 62ºC, dependiendo de la longitud de la sonda de oligonucleótido. Por ejemplo, sondas de 14 pares de bases se lavan entre 35ºC y 40ºC, sondas de 17 pares de bases se lavan entre 45ºC y 50ºC, sondas de 20 pares de bases se lavan entre 52ºC y 57ºC, y sondas de 23 pares de bases se lavan entre 57ºC y 63ºC. La temperatura puede aumentarse 2 a 3ºC cuando el enlace no específico de fondo parece elevado. Un segundo protocolo utiliza cloruro de tetrametilamonio (TMAC) para lavar sondas de oligonucleótido. Una solución severa de lavado es TMAC 3 M, Tris-HCl 50 mm, pH 8,0 y SDS al 0,2 por ciento. La temperatura de lavado que utiliza esta solución es función de la longitud de la sonda. Se lava aproximadamente entre 45 y 50ºC. Los ácidos nucleicos que codifican el AIF de mamífero incluyen también secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido del AIF de mamífero o un fragmento del mismo, a modo de codones degenerados.

La identidad de secuencia por ciento puede determinarse mediante procedimientos normalizados que se utilizan habitualmente para comparar la similitud en la posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. A título de ejemplo, utilizando un programa informático tal como BLAST o FASTA, los dos polipéptidos para los cuales la identidad de secuencia por ciento debe determinarse están alineados para la compatibilidad óptima de sus respectivos aminoácidos (el "intervalo compatible", que puede incluir la longitud completa de una o ambas secuencias, o una parte predeterminada de una o ambas secuencias). Cada programa informático proporciona una penalización de apertura "por defecto" y una penalización de hueco "por defecto" y una matriz de puntuación tal como PAM 250. Puede utilizarse una matriz de puntuación patrón (véase Dayhoff *et al., Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, supl. 3 (1978)), junto con el programa informático. La identidad por cien puede calcularse a continuación utilizando un algoritmo contenido en un programa tal como FASTA como:

$$\frac{\text{Número total de emparejamientos idénticos}}{\text{[longitud de la secuencia más larga en el tramo emparejado] + [número de huecos introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias]}} \times 100$$

Los polipéptidos que son por lo menos 70 por ciento idénticos presentarán típicamente una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con el AIF natural. Normalmente, las sustituciones serán conservadoras de modo que ejerzan poco o ningún efecto sobre la carga global neta, la polaridad o la hidrofobia de la proteína pero opcionalmente pueden aumentar la actividad de AIF. En la Tabla I se publican las sustituciones conservadoras ejemplares a continuación.

TABLA I

Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Básicos:	arginina, lisina, histidina
Ácidos:	ácido glutámico, ácido aspártico
Polar:	glutamina, asparagina
Hidrófobos:	leucina, isoleucina, valina
Aromáticos:	fenilalanina, triptófano, tirosina
Pequeños:	glicina, alanina, serina, treonina, metionina

Pueden prepararse otras variantes del polipéptido alineando una secuencia del polipéptido del AIF humano con una secuencia de polipéptido del AIF murino (o del AIF de otras especies) e identificando los aminoácidos divergentes. Uno o más de los aminoácidos divergentes pueden sustituirse a continuación por el aminoácido divergente o por otros aminoácidos. Dichas variantes por consiguiente pueden ser un polipéptido compuesto que comprende secuencias de aminoácidos procedentes de polipéptidos del AIF, que proceden de dos o más especies.

Los ácidos nucleicos contemplados por la presente invención se extienden como se indica, a otros ácidos nucleicos que codifican la expresión de péptidos tales como los indicados en la SEC. ID nº: 2 (completa de ratón), nº: 3 (madura de ratón), nº: 8 (completa humana), nº: 9 (madura humana), así como algunas isoformas [isoforma murina: SEC. ID nº: 5 (completa), SEC. ID nº: 6 (completa); isoformas humanas: SEC. ID nº: 11 (completa), SEC. ID nº: 12 (madura), y SEC. ID nº: 14 (completa), SEC. ID nº: 15 (madura)] de los polipéptidos anteriores. Por consiguiente, aunque los ADN que codifican al AIF se han aislado y secuenciado debido a homologías demostradas, cualquier célula animal puede servir potencialmente como fuente de ácido nucleico para la clonación molecular de un polinucleótido que codifica los péptidos de la invención. El ADN puede obtenerse por procedimientos normalizados conocidos en la tecnología del ADN clonado (por ejemplo, un "banco" de ADN), por síntesis química, por clonación de ADNc o por clonación de ADN genómico, o fragmentos del mismo, purificados a partir de la célula deseada [Sambrook *et al*., 1989, *supra*; Glover, 1985, *supra*]. Los clones procedentes del ADN genómico pueden contener zonas de ADN reguladoras e intrónicas además de zonas de codificación. Los clones procedentes del ADNc no contendrán secuencias de introns. Cualquiera que sea la procedencia, el gen debería estar molecularmente clonado en un vector adecuado para la propagación del gen.

En la clonación molecular del gen del ADN genómico, el ADN genómico puede ampliarse utilizando cebadores seleccionados de entre las secuencias de ADNc. Alternativamente, se generan fragmentos de ADN, algunos de los cuales codificarán el gen deseado. El ADN puede escindirse en puntos específicos utilizando varias enzimas de restricción. Se puede utilizar también desoxirribonucleasa en presencia de manganeso para fragmentar el ADN, o el ADN puede cizallarse físicamente, como por ejemplo, mediante tratamiento con ultrasonidos. Los fragmentos del ADN lineal pueden separarse a continuación por tamaño mediante técnicas normalizadas, que incluyen pero no se limitan a, electroforesis en gel de agarosa y poliacrilamida y cromatografía en columna.

Una vez generados los fragmentos de ADN, la identificación del fragmento de ADN específico que contiene el AIF o el gen similar al AIF deseado puede realizarse de numerosas maneras. Por ejemplo, si una cantidad de un fragmento de un AIF o de un gen similar al AIF o de su ARN específico, o de un fragmento del mismo, está disponible y puede purificarse y marcarse, los fragmentos de ADN generados pueden cribarse mediante hibridación del ácido nucleico con una sonda marcada [Benton *et al., Science*, **196**:180 (1977); Grunstein *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**:3961 (1975)]. La presente invención proporciona dichas sondas de ácido nucleico, que pueden prepararse convenientemente a partir de las secuencias específicas dadas a conocer en la presente memoria, por ejemplo, una sonda hibridable con una secuencia de nucleótidos correspondiente por lo menos a 10, y preferentemente a 15, fragmentos nucleotídicos de las secuencias descritas por las SEC. ID nº: 1 y nº: 7, así como el ADN (dado a conocer en la presente memoria) que codifica las isoformas de los presentes polipéptidos del AIF. Preferentemente se selecciona un fragmento que es muy exclusivo para los polipéptidos del AIF de la invención. Los fragmentos de ADN con homología sustancial a la sonda se hibridarán. Como se indicó anteriormente, cuanto mayor sea el grado de homología, más severas serán las condiciones de hibridación que pueden utilizarse. En una forma de realización, se utilizan condiciones de hibridación de baja severidad para identificar un péptido de AIF homólogo. Sin embargo, en un aspecto preferido, y como se demuestra experimentalmente en la presente memoria, un ácido nucleico que codifica un péptido del AIF de la invención se hibridará con un ácido nucleico que presenta una secuencia de nucleótidos tal como la representada en la SEC. ID nº: 1 y nº: 7, así como el ADN (dado a conocer en la presente memoria) que codifica las isoformas de los presentes polipéptidos del AIF o un fragmento hibridable de los mismos, en condiciones moderadamente severas; más preferentemente, se hibridará en condiciones de alta severidad.

Alternativamente, la presencia del gen puede detectarse mediante ensayos basados en las propiedades físicas, químicas o inmunológicas de su producto expresado. Por ejemplo, los clones de ADNc o los clones de ADN que hibridan o seleccionan los ARNm propios, pueden seleccionarse para que produzcan una proteína que, por ejemplo, presente migración electroforética, comportamiento de enfoque isoeléctrico, cartografía de digestión proteolítica, actividad de tirosina fosfatasa o propiedades antigénicas similares o idénticas a las conocidas para los presentes polipéptidos del

AIF. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse convenientemente para cribar homólogos de los polipéptidos del AIF de otras procedencias.

Un gen que codifica un polipéptido del AIF de la invención puede también identificarse por selección del ARNm, es decir, mediante hibridación del ácido nucleico seguida de traducción *in vitro*. En este procedimiento, se utilizan fragmentos para aislar los ARNm complementarios por hibridación. Dichos fragmentos de ADN pueden representar ADN modulador purificado, disponible. El análisis por inmunoprecipitación o el análisis funcional (por ejemplo, actividad de tirosina fosfatasa) de los productos de traducción *in vitro* de los productos de los ARNm aislados identifica el ARNm y, por consiguiente, los fragmentos de ADN complementarios, que contienen las secuencias deseadas. Además, pueden seleccionarse ARNm específicos por adsorción de polisomas aislados de las células para los anticuerpos inmovilizados específicamente dirigidos contra un polipéptido del AIF.

Un ADNc del polipéptido del AIF radiomarcado puede sintetizarse utilizando el ARNm seleccionado (procedente de los polisomas adsorbidos) como plantilla. El ARNm o el ADNc radiomarcado puede utilizarse a continuación como sonda para identificar fragmentos de ADN del polipéptido del AIF homólogos entre otros fragmentos de ADN genómicos.

Tal como se mencionó anteriormente, una secuencia de ADN que codifica péptidos del AIF como los dados a conocer en la presente memoria puede prepararse sintéticamente en lugar de clonarse. La secuencia de ADN puede diseñarse con los codones apropiados para las secuencias de aminoácidos del polipéptido del AIF. En general, si la secuencia se utilizase para la expresión se seleccionarán codones preferidos para el huésped deseado. La secuencia completa se monta en oligonucleótidos superpuestos preparados por métodos normalizados y montados en una secuencia de codificación completa [por ejemplo, Edge, *Nature*, **292**:756 (1981); Nambair *et al., Science*, **223**:1299 (1984); Jay *et al., J. Biol. Chem.*, **259**:6311 (1984)].

Las secuencias del ADN sintético permiten la construcción conveniente de genes que expresen análogos de AIF, tal como se describió anteriormente. Alternativamente, el ADN que codifica análogos puede prepararse por mutagénesis dirigida al sitio de genes del AIF o de los ADNc, y los análogos pueden prepararse directamente utilizando síntesis de polipéptidos convencional.

Un método general para la incorporación específica en el sitio de aminoácidos no naturales en proteínas se describe en Noren *et al., Science*, **244**:182-188 (1989). Este método puede utilizarse para crear análogos del polipéptido del AIF con aminoácidos no naturales.

Ácidos nucleicos no codificantes

La presente invención se extiende a la preparación de nucleótidos de cadena complementaria y ribozimas que pueden utilizarse para interferir con la expresión de las proteínas del AIF en el contexto de la traducción. Este método entraña que el ácido nucleico de cadena complementaria y los ribozimas bloqueen la traducción de un ARNm específico, ya sea enmascarando este ARNm con un ácido nucleico de cadena complementaria o escindiéndolo con una ribozima.

Los ácidos nucleicos de cadena complementaria son las moléculas de ADN o de ARN que son complementarias con por lo menos una fracción de una molécula de ARNm específico [Weintraub, *Sci. Am.*, **262**:40-46 (1990); Marcus-Sekura, *Anal. Biochem.*, **172**:289-295 (1988)]. En la célula, se hibridan con este ARNm, formando una molécula de doble cadena no traducible. Por consiguiente, los ácidos nucleicos de cadena complementaria interfieren con la expresión de ARNm en la proteína. Los oligómeros de aproximadamente quince nucleótidos y las moléculas que se hibridan con el codón de iniciación AUG serán particularmente eficaces, ya que son fáciles de sintetizar y son probablemente las que plantean menos problemas cuando las introducen en las células productoras del péptido del AIF. Se han utilizado métodos de cadena complementaria para inhibir la expresión de muchos genes *in vitro* [(Marcus-Sekura, 1988 *supra*; Hambor *et al., J. Exp. Med.*, **168**:1237-1245 (1988)].

Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otras moléculas de ARN de una sola cadena de manera algo análoga a las endonucleasas de restricción del ADN. Las ribozimas se descubrieron a partir de la observación de que determinados ARNm tienen capacidad para escindir sus propios intrones. Al modificar la secuencia nucleotídica de estos ARN, los investigadores han podido modificar genéticamente las moléculas que reconocen las secuencias específicas nucleotídicas en una molécula de ARN y escindirla [Cech, *J. Am. Med. Assoc.*, **260**:3030-3034 (1988)]. Debido a que son específicas de la secuencia, únicamente los ARNm con determinadas secuencias se inactivan.

Los investigadores han identificado dos tipos de ribozimas, el tipo *Tetrahymena* y el tipo "cabeza de martillo". Las ribozimas del tipo *Tetrahymena* reconocen secuencias de cuatro bases, mientras que las de tipo "cabeza de martillo" reconocen secuencias de once a dieciocho bases. Cuanto más larga sea la secuencia de reconocimiento, más probablemente tendrá lugar exclusivamente en la especie de ARNm diana. Por consiguiente, las ribozimas del tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas del tipo *Tetrahymena* para inactivar una especie de ARNm específico, y las secuencias de reconocimiento de dieciocho bases son preferibles a las secuencias de reconocimiento más cortas.

Las secuencias de ADN descritas en la presente memoria pueden utilizarse por lo tanto para preparar moléculas de cadena complementaria en contraste y las ribozimas que escinden los ARNm para los polipéptidos del AIF y sus ligandos, inhibiendo de este modo la expresión del gen del AIF y conduciendo a una menor estimulación de apoptosis.

En otra forma de realización, la presente invención aporta los oligonucleótidos cortos complementarios con las cadenas de codificación y complementarias del ácido nucleico del AIF, o con las zonas no codificantes del gen del AIF 5', 3' o interna (intrónica) a la zona de codificación. Dichos ácidos nucleicos son útiles como sondas, ya sea sondas oligonucleotídicas marcadas directamente o como cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa, para evaluar la presencia de mutaciones en el gen del AIF o el nivel de expresión de ARNm del AIF. En una forma de realización específica, los ácidos nucleicos no codificantes proporcionan la recombinación homóloga para la integración de un gen ampliable y/o otras secuencias reguladoras en proximidad al gen del AIF, por ejemplo, para proporcionar mayores niveles de expresión del polipéptido del AIF o para superar una mutación en las secuencias reguladoras del gen del AIF que eviten niveles apropiados de expresión del polipéptido del AIF (publicación de patente internacional WO 91/06666, por Skoultchi; publicación de patente internacional nº WO 91/09955, publicada el 11 de julio de 1991 por Chappel; publicación de patente internacional nº WO 90/14092, por Kucherlapati y Campbell).

Producción de polipéptidos de AIF: Expresión y síntesis

Las secuencias de control de transcripción y traducción son secuencias reguladoras del ADN, tales como activadores, potenciadores, terminadores y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia de codificación en una célula huésped. En las células eucarióticas, las señales de poliadenilación son secuencias de control.

Para los objetivos de esta exposición, son importantes las siguientes definiciones. Una secuencia de codificación está "bajo control" de las secuencias de transcripción y de traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia de codificación en el ARNm, que es a continuación el ARN-trans cortado y empalmado transportado a la proteína codificada por la secuencia de codificación.

Una "secuencia señal" está incluida al principio de la secuencia de codificación de una proteína que debe ser expresada en la superficie de una célula. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal en el polipéptido maduro, que se dirige a la célula huésped para trasladar el polipéptido. La expresión "secuencia señal de transposición" se utiliza también en la presente memoria para referirse a esta especie de secuencia señal. Las secuencias señal de transposición pueden encontrarse asociadas con una variedad de proteínas naturales con eucariotas y procariotas, y con frecuencia son operativas en ambos tipos de organismos.

Una secuencia de ADN está "operativamente ligada" a una secuencia de control de expresión cuando la secuencia de control de expresión controla y regula la transcripción y la traducción de esta secuencia de ADN. La expresión "operativamente ligada" comprende las que presentan una señal de iniciación apropiada (por ejemplo, ATG) frente a la secuencia de ADN que debe expresar y mantener el marco de lectura correcto que permita la expresión de la secuencia de ADN bajo el control de la secuencia de control de expresión y la producción del producto deseado codificado por la secuencia de ADN. Si un gen que se desea insertar en una molécula de ADN recombinante no contiene una señal de iniciación apropiada, dicha señal inicial puede insertarse corriente arriba (5') del marco de lectura y en éste con el gen.

Una "secuencia activadora" es una zona reguladora del ADN capaz de unir la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia de codificación corriente abajo (dirección 3'). Para los objetivos de definición de la presente invención, la secuencia activadora está unida en su terminal 3' mediante la secuencia de iniciación de la transcripción y se prolonga corriente arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción en los niveles de fondo detectables anteriores. En la secuencia activadora se encontrará una secuencia de iniciación de la transcripción (convenientemente definida por ejemplo, por cartografía con la nucleasa S1), así como los dominios de fijación de la proteína (secuencias de consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa.

Otra característica de la presente invención consiste en la expresión de las secuencias de ADN dadas a conocer en la presente memoria. Como es bien conocido en la materia, las secuencias de ADN pueden ser expresadas ligándolas operativamente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión apropiado y empleando este vector de expresión para transformar un huésped unicelular apropiado.

Dicho enlace operativo de una secuencia de ADN de la presente invención a una secuencia de control de la expresión, desde luego, incluye, si no ya parte de la secuencia del ADN, el aporte de un codón de iniciación, ATG, en el marco de lectura correcto corriente arriba de la secuencia del ADN.

Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones huésped/vector de expresión para expresar las secuencias del ADN de la presente invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden estar constituidos por segmentos de secuencias cromosómicas, no cromosómicas y de ADN sintético. Los vectores adecuados comprenden derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, derivados plasmídicos co1 E1, pCR1, pBR322, pMB9, pUC o pUC de los plásmidos de *E. coli*, por ejemplo, vectores de pGEX, vectores de pET, pmal-c, pFLAG, etc., y sus derivados, plásmidos tal como RP4; los ADN del fago, por ejemplo, los numerosos derivados del fago λ, por ejemplo NM989, y otro ADN del fago, por ejemplo, M13 y el ADN filamentoso del fago de una sola cadena, plás-

midos de levaduras tal como el plásmido 2 μ o derivados del mismo; vectores útiles en las células eucarióticas, tales como los vectores útiles en células de insecto o de mamífero; vectores procedentes de combinaciones de plásmidos y de los ADN del fago, tales como los plásmidos que han sido modificados para emplear ADN del fago u otras secuencias de control de la expresión; y similares. Asimismo puede conseguirse la expresión del AIF en levadura metilótrofa, por ejemplo, levadura de *Pichia pastoris* (por ejemplo, publicación de la patente internacional nº WO 90/03431, de Brierley *et al*.; publicación de la patente internacional nº WO 90/10697, por Siegel *et al*.).

Cualquier variedad amplia de las secuencias de control de la expresión (secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN operativamente ligada a ella) puede utilizarse en estos vectores para expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Dichas secuencias útiles de control de expresión comprenden, por ejemplo, los activadores precoces o tardíos de SV40, CMV, vacunas, poliomas o adenovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, el sistema *LTR*, el operador principal y las zonas activadoras del fago λ, las zonas de control de la proteína de recubrimiento fd, el activador de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los activadores de la fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), el activador AOX 1 de la levadura metilótrofa, los activadores de los factores de α-emparejamiento de levaduras y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de los genes de células procarióticas o eucarióticas o sus virus y varias combinaciones de las mismas.

Una amplia variedad de células huésped unicelulares son también útiles para expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucarióticos y procarióticos bien conocidos, tales como las cepas de *E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces*; hongos tales como las levaduras (*Saccharomyces*, y levadura metilótrofa tal como *Pichia, Candida, Hansenula* y *Torulopsis*); células animales, tales como las células CHO, R11, B-W y LM, células de riñón del mono verde africano (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 y BMT10), células de insecto (por ejemplo, S*f*9) y células humanas y células vegetales en cultivo tisular.

Debe entenderse que no todos los vectores, las secuencias de control de la expresión y los huéspedes funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Ni todos los huéspedes funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la materia podrá seleccionar los vectores, las secuencias de control de la expresión y los huéspedes apropiados sin experimentación indebida para realizar la expresión deseada sin apartarse del alcance de la presente invención. Por ejemplo, al seleccionar un vector, puede considerarse el huésped porque el vector debe operar en él. El número de copias del vector, la capacidad para controlar este número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como los marcadores de antibióticos, se considerarán también.

Al seleccionar una secuencia de control de la expresión, se considerará normalmente una variedad de factores. Éstos comprenden, por ejemplo, la resistencia relativa del sistema, su capacidad de control y su compatibilidad con la secuencia de ADN determinada o del gen para expresarse, particularmente con respecto a las estructuras secundarias potenciales. Los huéspedes unicelulares adecuados se seleccionarán en consideración, por ejemplo, a su compatibilidad con el vector seleccionado, a sus características de secreción, a su capacidad para plegar las proteínas correctamente y a sus requisitos de fermentación, así como a la toxicidad para el huésped del producto codificado por las secuencias de ADN que deben expresarse, y a la facilidad de purificación de los productos de la expresión.

Considerando estos y otros factores, un experto en la materia podrá construir una variedad de combinaciones vector/secuencia de control de la expresión/puente que expresarán las secuencias del ADN de la presente invención en la fermentación o en cultivo animal a gran escala.

En una forma de realización específica, puede expresarse una proteína de fusión del AIF. Una proteína de fusión del AIF comprende por lo menos una fracción operativamente activa de un polipéptido del AIF. Las secuencias que no son del AIF pueden ser secuencias con terminal carboxi del AIF. Además, para la expresión estable de una proteína de fusión del AIF proteolíticamente inactiva, la fracción de la proteína de fusión que no es del AIF se une mediante un enlace peptídico al terminal amino de la proteína del AIF. Una molécula de ADN recombinante que codifica dicha proteína de fusión comprende una secuencia que codifica por lo menos una fracción operativamente activa de una proteína que no es del AIF unida en la estructura a la secuencia de codificación del AIF y codifica preferentemente una secuencia de escisión para una proteasa específica, por ejemplo, trombina o factor Xa, preferentemente en la unión AIF-no AIF.

Con respecto a las proteínas de fusión del AIF, un aspecto adicional incluye la fusión del polipéptido del AIF o un fragmento biológicamente activo del mismo con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, F_c, S_cF_v). Dicho montaje sería útil para dirigir el AIF a las células que expresan antígenos que se unen a anticuerpos o a fragmentos de los mismos acoplados al AIF (es decir, la proteína de fusión).

En otro aspecto, puede utilizarse el vector pGEX [Smith *et al., Gene* 67:31-40 (1988)]. Este vector fusiona el ADNc de la glutatión S-transferasa de *Schistosoma japonicum* con la secuencia de interés. Las proteínas bacterianas se recogen y las proteínas recombinantes pueden purificarse rápidamente en una columna de afinidad de glutatión reducido. El transportador de GST puede escindirse posteriormente de las proteínas de fijación por digestión con proteasas específicas para la secuencia. Después de la escisión, el transportador y la proteína de fusión no escindida puede eliminarse por absorción en glutatión agarosa. Ocasionalmente aparecen dificultades con el sistema cuando la proteína codificada es insoluble en soluciones acuosas.

La expresión de proteínas recombinantes de sistemas bacterianos puede producir el plegamiento incorrecto de la proteína expresada, lo que requiere replegamiento. La proteína recombinante puede replegarse antes o después de la escisión para formar un polipéptido del AIF operativamente activo. El polipéptido del AIF puede replegarse mediante las etapas de (i) incubación de la proteína en un tampón desnaturalizado que contiene un agente reductor, y a continuación (ii) incubación de la proteína en un tampón que contiene un agente oxidante, y preferentemente contiene además un agente estabilizante de la proteína o un agente caótropo o ambos. Las parejas de agentes redox (reductor/oxidante) adecuadas comprenden, pero no se limitan a, glutatión reducido/disulfuro de glutatión, cistina/cisteína, cistamina/cisteamina y 2-mercaptoetanol/disulfuro de 2-hidroxieltilo. En un aspecto particular, la proteína de fusión puede solubilizarse en un desnaturalizante, tal como la urea, antes de intercambiar en el tampón de reducción. En una forma de realización preferida, la proteína se purifica también, por ejemplo, por intercambio iónico o cromatografía de quelación con Ni, antes de intercambiar en el tampón de reducción. Los agentes desnaturalizantes comprenden pero no se limitan a la urea y a la guanidina-HCl^-. La proteína recombinante se diluye a continuación aproximadamente por lo menos 10 veces, más preferentemente aproximadamente 100 veces, en un tampón de oxidación que contiene un agente oxidante, tal como, pero no limitado a Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,15 M, glutatión oxidado 0,3 M. La proteína de fusión se incuba a continuación durante aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas, preferentemente aproximadamente 2 a aproximadamente 16 horas, a temperatura ambiente en el tampón oxidante. El tampón oxidante puede comprender un agente estabilizante de proteínas, por ejemplo, un azúcar, un alcohol o un sulfato amónico. El tampón oxidante puede comprender además un agente caótropo a baja concentración, para desestabilizar las interacciones intermoleculares incorrectas y favorecer de este modo el plegamiento apropiado. Los agentes caótropos adecuados incluyen pero no se limitan a un detergente, un poliol, L-arginina, guanidina-HCl y polietilenglicol (PEG). Es importante utilizar una concentración suficientemente baja del agente caótropo para impedir la desnaturalización de la proteína. La proteína replegada puede concentrarse por lo menos unas 10 veces, más preferentemente en la cantidad en que se diluyó en el tampón oxidante.

Pueden producirse asimismo procesos de fermentación bacteriana en una preparación de proteínas recombinantes que contenga niveles inaceptables de endotoxinas. Por ejemplo, la invención contempla la eliminación de dichas endotoxinas, por ejemplo, utilizando anticuerpos específicos para la endotoxina u otras moléculas de unión a la endotoxina. La presencia de endotoxinas puede ser determinada mediante técnicas normalizadas, tales como las que emplean reactivos E-TOXATE (Sigma, St. Louis, Missouri), o con bioanálisis.

Además del ejemplo específico, los presentes inventores contemplan la utilización de sistemas de expresión de baculovirus, mamíferos y levaduras para expresar los polipéptidos del AIF. Por ejemplo, en los sistemas de expresión de baculovirus, ambos vectores de transferencia sin fusión, tales como pero no limitados a pVL941 (secuencia de clonación de *Bam*H1); pVL1393 (secuencia de clonación de *Bam*H1, *Sma*I, *Xba*I, *Eco*R1, *Not*I, *Xma*III, *Bgl*II y *Pst*1; Invitrogen), pVL1392 (secuencia de clonación de *Bgl*II, *Pst*I, *Not*I, *Xma*III, *Eco*RI, X*ba*I, *Sma*I y *Bam*H1; Summers e Invitrogen) y pBlue*Bac*III (secuencia de clonación de *Bam*H1, *Bgl*II, *Ps*tI, *Nco*I y *Hind*III, con posible cribado recombinante azul/blanco; Invitrogen) y vectores de transferencia de fusión, tales como pero no limitados a pAc700 (secuencia de clonación de *Bam*H1 y *Kpn*I, en la que la secuencia del reconocimiento *Bam*H1 comienza en el codón de iniciación; Summers), pAc701 y pAc702 (igual que pAc700, con diferentes marcos de lectura), pAc360 (36 pares de bases de la secuencia de clonación *Bam*H1 corriente abajo de un codón de iniciación de polihedrina; Invitrogen) y pBlueBacHisA, B, C (tres marcos de lectura diferentes, con secuencia de clonación de *Bam*H1, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I y *Hind*III, un péptido N-terminal para la purificación de ProBond y el cribado recombinante azul/blanco de placas; Invitrogen).

Los vectores de expresión de mamífero contemplados para su utilización en la invención comprenden vectores con activadores inducibles, tales como el activador de dihidrofolato reductasa (DHRF), por ejemplo, cualquier vector de expresión con un vector de expresión *DHFR*, o *DHFR*/metotrexato, tal como pED (secuencia de clonación de *Pst*I, *Sal*I, *Sba*I, *Sma*I y *Eco*RI, con el vector que expresa tanto al gen clonado como a *DHFR*; Kaufman, *Current Protocols in Molecular Biology*, **16**:12 (1991). Alternativamente, un vector de coampliación de glutamina sintetasa/metionina sulfoximina, tal como pEE14 (secuencia de clonación de *Hind*III, *Xba*I, *Sma*I, *Sba*I, *Eco*RI y *Bcl*I, en la que el vector expresa la glutamina sintetasa y el gen clonado; Celltech). En otra forma de realización, puede utilizarse un vector que dirige la expresión episómica bajo el control del virus de Epstein Barr (EBV), tales como pREP4 (secuencia de clonación de *Bam*H1, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II y *Kpn*I, el activador constitutivo de RSV-LTR, el marcador seleccionable de higromicina, Invitrogen), pCEP4 (secuencia de clonación de *Bam*H1, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II y *Kpn*I, el gen precoz inmediato de hCMV constitutivo, el marcador seleccionable de higromicina; Invitrogen), pMEP4 (secuencia de clonación de *Kpn*I, *Pvu*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, *Bam*H1, el activador inducible del gen IIa de metalotioneína, el marcador seleccionable de higromicina; Invitrogen), pREP8 (secuencia de clonación de *Bam*H1, *Xho*I, *Not*I, *Hind*III, *Nhe*I y *Kpn*I, activador de RSV-LTR, marcador seleccionable de histidinol; Invitrogen), pREP9 (secuencia de clonación de *Kpn*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I y *Bam*H1, activador de RSV-LTR, marcador seleccionable de G418; Invitrogen) y pEBVHis (activador de RSV-LTR, marcador seleccionable de higromicina, péptido N-terminal purificable por la resina ProBond y escindido por enterocinasa; Invitrogen). Los vectores de expresión de mamífero seleccionables para su utilización en la invención comprenden pRc/CMV (secuencia de clonación de *Hind*III, *Bst*XI, *Not*I, *Sba*I y *Apa*I, selección G418; Invitrogen), pRc/RSV (secuencia de clonación de *Hind*III, *Spe*I, *Bst*XI, *Not*I, *Xba*I, selección G418; Invitrogen) y otros. Los vectores de expresión de mamífero del virus de la vacuna (Kaufman, 1991, *supra*) para su utilización según la invención comprenden pero no se limitan a pSC11 (secuencia de clonación *Sma*I, selección TK y β-gal), pMJ601 (secuencia de clonación de *Sal*I, *Sma*I, *Afl*I, *Nar*I, *Bsp*MII, *Bam*HI, *Apa*I, *Nhe*I, *Sca*II, *Kpn*I y *Hind*III; selección TK y β-gal) y pTKgptF1S (secuencia de clonación de *Eco*RI, *Pst*I, *Sal*I, *Acc*I, *Hind*II, *Sba*I, *Bam*HI y Hpa, selección TK o XPRT).

Pueden utilizarse asimismo sistemas de expresión de levadura según la invención para expresar polipéptidos del AIF. Por ejemplo, el vector pYES2 no de fusión (secuencia de clonación de *Xba*I, *Sph*I, *Sho*I, *Not*I, *Gst*XI, *Eco*RI, *Bst*XI, *Bam*H1, *Sac*I, *Kpn*I y *Hind*III; Invitrogen) o la fusión pYESHisA, B, C (secuencia de clonación de *Xba*I, *Sph*I, *Sho*I, *Not*I, *Bst*XI, *Eco*RI, *Bam*H1, *Sac*I, *Kpn*I y *Hind*III, péptido N-terminal purificado con la resina ProBond y escindido con enterocinasa; Invitrogen) por mencionar sólo dos, pueden emplearse según la invención.

Es más deseable que los análogos del AIF puedan prepararse a partir de las secuencias nucleotídicas derivadas del alcance de la presente invención.

Además de la expresión recombinante del polipéptido del AIF, la presente invención contempla y permite totalmente la preparación del polipéptido del AIF, o de fragmentos del mismo, utilizando las técnicas bien conocidas y muy desarrolladas de la síntesis de péptidos en fase sólida. La invención contempla utilizar tanto el Boc ocular como el Fmoc, así como otras estrategias de grupos protectores, para preparar el polipéptido del AIF o fragmentos del mismo. Varias técnicas de replegamiento y oxidación de las cadenas laterales de cisteína para formar un enlace disulfuro son también bien conocidas en la materia.

Anticuerpos contra el polipéptido del AIF

Según la invención, el polipéptido del AIF producido de manera recombinante o por síntesis química y los fragmentos u otros derivados o análogos del mismo, incluyendo las proteínas de fusión, pueden utilizarse como inmunógeno para generar anticuerpos que reconozcan el polipéptido del AIF. Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab de una sola cadena, híbridos, policlonales o monoclonales y un banco de expresión de Fab.

Para los objetivos de esta exposición, son importantes las siguientes definiciones. Una molécula es "antigénica" cuando es capaz de interactuar de manera específica con una molécula de reconocimiento del antígeno del sistema inmunitario, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o un receptor del antígeno de linfocito T. Un polipéptido antigénico contiene por lo menos aproximadamente 5, y preferentemente por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos. Un fragmento antigénico de una molécula puede ser esa parte que es inmunodominante para el reconocimiento del receptor del anticuerpo o del linfocito T, o puede ser un fragmento utilizado para generar un anticuerpo contra la molécula conjugando el fragmento antigénico con una molécula portadora para la inmunización. Una molécula que es antigénica no necesita ser la propia inmunógena, es decir, capaz de provocar una respuesta inmunitaria sin un portador.

Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo los anticuerpos y los fragmentos de los mismos, que se unen a un epítopo específico. El término comprende los anticuerpos policlonales, monoclonales e híbridos, mencionados últimamente descritos con más detalle en las patentes US nº 4.816.397 y nº 4.816.567, así como los fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos, incluyendo Fab, $F(ab')_2$ y F(v) (incluyendo los anticuerpos con una sola cadena). Por consiguiente, la frase "molécula de anticuerpo" en sus varias formas gramaticales tal como se utiliza en la presente memoria contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina que contiene la secuencia de combinación del anticuerpo. Una "secuencia de combinación del anticuerpo" es la parte de la estructura de una molécula de anticuerpo compuesta por zonas variables e hipervariables con cadena pesada y ligera que se unen específicamente al antígeno.

A título de ejemplo las moléculas de anticuerpo son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y las partes de una molécula de inmunoglobulina que contienen el paratopo, incluyendo las fracciones conocidas en la materia como Fab, Fab', $F(ab')_2$ y F(v) cuyas fracciones son preferidas para su utilización en los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria.

Las fracciones Fab y $F(ab')_2$ de moléculas de anticuerpo se preparan mediante la reacción proteolítica de la papaína y pepsina, respectivamente, en las moléculas de anticuerpo intactas en gran parte por métodos que son bien conocidos. Véase por ejemplo, la patente US nº 4.342.566 de Theofilopoulos *et al*. Son asimismo bien conocidos los fragmentos de molécula de anticuerpo Fab' y se producen a partir de los fragmentos $F(ab')_2$ seguido de reducción de los enlaces disulfuro que unen las dos partes de la cadena pesada como en el mercaptoetanol, y seguido de alquilación de mercaptano de la proteína resultante con un reactivo tal como yodoacetamida. En la presente memoria se prefiere un anticuerpo que contiene moléculas intactas del anticuerpo.

La frase "anticuerpo monoclonal" en sus varias formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que presenta únicamente una especie de secuencia de combinación del anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un antígeno determinado. Un anticuerpo monoclonal por lo tanto presenta típicamente una sola afinidad de unión para cualquier antígeno con el que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal puede contener por consiguiente una molécula de anticuerpo con muchas secuencias de combinación del anticuerpo, cada una inmunoespecífica para un antígeno diferente; por ejemplo, un anticuerpo monoclonal bioespecífico (híbrido).

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o a una mezcla que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno. Un adyuvante puede servir como depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también como activador del sistema linfoide que potencia la respuesta inmunitaria de manera no específica [Hood *et al*., en *Immunology*, pág. 384, segunda ed., Benjamín/Cummings, Menlo Park, California (1984)]. Con frecuencia, una prueba de provocación primaria con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, no podrá provocar una respuesta inmunitaria humoral o celular. Los adyuvantes comprenden, pero no se limitan a, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de

Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos, hemocianinas de la lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tal como BCG (*bacilo Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Preferentemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

Pueden utilizarse varios procedimientos conocidos en la materia para la producción de anticuerpos policlonales contra el polipéptido del AIF, o el fragmento, derivado o análogo del mismo. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse varios animales huésped mediante la inyección con el polipéptido del AIF, o un derivado (por ejemplo, fragmento o proteína de fusión) del mismo, incluyendo pero sin limitarse a conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. En una forma de realización, el polipéptido del AIF o un fragmento del mismo puede conjugarse con un portador inmunógeno, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de la lapa californiana (KLH). Pueden utilizarse varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie del huésped, incluyendo pero sin limitarse a adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de la lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tal como BCG (*bacilo Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido del AIF o el fragmento, análogo o derivado del mismo, puede utilizarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Éstas comprenden pero no se limitan a la técnica del hibridoma originalmente desarrollada por Kohler *et al. [Nature*, **256**:495-497 (1975)], así como la técnica del trioma, la técnica de hibridoma de linfocito B humano [Kozbor *et al., Immunology Today*, **4**:72 (1983)] y la técnica de EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole *et al., en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, págs. 77-96, Alan R. Liss, Inc., (1985)]. Pueden crearse líneas celulares inmortales que producen anticuerpos mediante técnicas distintas de la fusión, tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o la transfección con virus de Epstein-Barr, por ejemplo, M. Schreier *et al., Hybridoma Techniques* (1980); Hammerling *et al., Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas* (1981); Kennett *et al., Monoclonal Antibodies* (1980); también en las patentes US nº 4.341.761; nº 4.399.121; nº 4.427.783; nº 4.444.887; nº 4.451.570; nº 4.466.917; nº 4.472.500; nº 4.491.632 y nº 4.493.890.

En una forma de realización adicional de la invención, pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales exentos de gérmenes que utilizan tecnología reciente (solicitud internacional nº PCT/US 90/02545). Según la invención, pueden utilizarse anticuerpos humanos y pueden obtenerse utilizando hibridomas humanos [Cote *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**:2026-2030 (1983)] o transformando los linfocitos B humanos con virus EBV *in vitro* [Cole *et al*., 1985, *supra*]. De hecho, según la invención, pueden utilizarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos híbridos" [Morrison *et al., J. Bacteriol*., 159-870 (1984); Neuberger *et al., Nature*, **312**:604-608 (1984); Takeda *et al., Nature*, **314**:452-454 (1985)] mediante corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para un polipéptido del AIF junto con los genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada; dichos anticuerpos están comprendidos dentro el alcance de la presente invención. Dichos anticuerpos híbridos humanos o humanizados son preferidos para su utilización en la terapia de enfermedades o trastornos humanos (descritos a continuación), ya que los anticuerpos humanos o humanizados es mucho menos probable que los anticuerpos xenógenos produzcan una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta alérgica, ellos mismos.

Según la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena (patente US nº 4.946.778) pueden ser adaptadas para producir anticuerpos de cadena única específicos para el polipéptido del AIF. Una forma de realización adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de bancos de expresión de Fab [Huse *et al., Science*, **246**:1275-1281 (1989)] que permitan la identificación rápida y fácil de fragmentos monoclonales de Fab con la especificidad deseada para un polipéptido del AIF o sus derivados o análogos.

Pueden generarse por técnicas conocidas fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo de una molécula de anticuerpo. Por ejemplo, dichos fragmentos comprenden, pero no se limitan a: el fragmento $F(ab')_2$ que puede producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que pueden ser generados por reducción de los puentes disulfuro del fragmento $F(ab')_2$ y los fragmentos Fab que pueden generarse tratando la molécula de anticuerpo con papaína y agente reductor.

En la producción de anticuerpos, puede realizarse la identificación del anticuerpo deseado por técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, radioinmunoanálisis, ELISA (ensayo inmunosorbente con enzima ligada), inmunoanálisis "sándwich", análisis inmunorradiométricos, reacciones de precipitina con difusión en gel, análisis por inmunodifusión, inmunoanálisis *in situ* (utilizando oro coloidal, enzimas o marcadores radioisotópicos, por ejemplo), transferencias Western, reacciones de precipitación, análisis por aglutinación (por ejemplo, análisis por aglutinación en gel, análisis por hemoaglutinación), análisis por fijación del complemento, análisis de inmunofluorescencia, análisis con proteína A y análisis por inmunoelectroforesis, etc. En una forma de realización, el enlace al anticuerpo se detecta mediante la identificación de un marcador en el anticuerpo primario. En otra forma de realización, el anticuerpo primario se detecta identificando el enlace de un anticuerpo secundario o de un reactivo al anticuerpo primario. En otra forma de realización, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen muchos medios en la materia para detectar el enlace en un inmunoanálisis y están comprendidos en el alcance de la presente invención. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconozcan a un epítopo específico de un polipéptido del AIF, se pueden analizar los hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento del polipéptido del AIF que contiene dicho epítopo. Para la

selección de un anticuerpo específico contra un polipéptido del AIF de una especie determinada de animal, se puede seleccionar basándose en el enlace positivo con el polipéptido del AIF expresado por las células de la especie de animal o aislado de las mismas.

Con respecto a la localización y actividad del polipéptido del AIF pueden utilizarse los siguientes anticuerpos en los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, para la transferencia Western, detección por la imagen del polipéptido del AIF *in situ*, midiendo las concentraciones de éste en muestras fisiológicas apropiadas.

En una forma de realización específica, pueden generarse los anticuerpos que agonizan o antagonizan la actividad del polipéptido del AIF. Dichos anticuerpos pueden analizarse utilizando los análisis descritos a continuación para la identificación de los ligandos.

En una forma de realización específica, los anticuerpos se desarrollan inmunizando conejos con péptidos sintéticos previstos por la secuencia proteica o con proteínas recombinantes construidas utilizando vectores de expresión bacteriana. La selección de péptidos sintéticos se realiza tras un análisis minucioso de la estructura proteínica prevista, tal como se describió anteriormente. En particular, se seleccionan secuencias peptídicas entre las secuencias de escisión supuestas. Los péptidos sintéticos se conjugan con un portador tal como la hemocianina de KLH o BSA utilizando carbodiimida y se utilizan en adyuvantes de Freund para inmunizar conejos. Con el fin de preparar la proteína recombinante, puede utilizarse el vector pGEX para expresar el polipéptido [Smith *et al*., 1988, *supra*]. Alternativamente, se puede utilizar solamente dominios hidrófilos para generar la proteína de fusión. La proteína expresada se preparará en cantidad y se utilizará para inmunizar conejos en adyuvante de Freund.

En otra forma de realización específica, se utiliza polipéptido del AIF recombinante para inmunizar pollos y los anticuerpos del anti-AIF de pollo se recuperan de la yema del huevo, por ejemplo, por purificación por afinidad en una columna con AIF. Preferentemente, los pollos utilizados en la inmunización se mantienen en condiciones exentas de patógenos específicos (SPF).

Todavía en otra forma de realización, el polipéptido del AIF recombinante se utiliza para inmunizar conejos, y los anticuerpos policlonales se inmunopurifican antes de otra utilización. Los anticuerpos purificados son particularmente útiles para análisis semicuantitativos, particularmente para detectar la presencia del polipéptido del AIF circulante en suero o plasma.

En los anticuerpos monoclonales producidos contra polipéptidos del AIF pueden identificarse varias propiedades; es decir, isótopo, epítopo, afinidad, etc. Son de particular interés los anticuerpos monoclonales que neutralizan la actividad de los polipéptidos del AIF. Dichos anticuerpos monoclonales pueden ser fácilmente identificados en el análisis de actividad del AIF. Los anticuerpos de alta afinidad son también útiles cuando es posible la purificación por inmunoafinidad del modulador natural o recombinante.

Preferentemente, el anticuerpo antimodulador utilizado en los métodos de diagnóstico y terapéuticos de la presente invención es un anticuerpo policlonal purificado por afinidad. Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal (mAb). Además, es preferible que las moléculas del anticuerpo antimodulador utilizadas en la presente memoria estén en forma de fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ o F(v) de moléculas de anticuerpo completas.

Implicaciones del diagnóstico

La presente invención se refiere además a una variedad de aplicaciones para el diagnóstico, incluyendo los métodos para detectar la presencia de las condiciones y/o estímulos que impactan en las anomalías que implican la hipoestimulación o hiperestimulación de la apoptosis, en relación con su capacidad para producir las actividades que están mediadas por los presentes AIF. Como se mencionó al principio, el polipéptido del AIF puede utilizarse para producir anticuerpos contra ellos mismos mediante una variedad de técnicas conocidas, y dichos anticuerpos pueden aislarse a continuación y utilizarse en análisis para la presencia de determinada actividad de transcripción en células diana sospechosas. Alternativamente, los ácidos nucleicos de la invención pueden emplearse en diagnóstico.

Diagnósticos a base de anticuerpos

Como se sugirió al principio, un método de diagnóstico útil en la presente invención comprende el examen de una muestra o del medio celular por medio de un análisis incluyendo una cantidad eficaz de un antagonista contra una proteína moduladora, tal como un anticuerpo antimodulador, preferentemente un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, y más preferentemente un mAb. Además, es preferible que las moléculas de anticuerpo antimodulador utilizadas en la presente memoria estén en forma de fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ o F(v) o moléculas de anticuerpo completas. Los pacientes capaces de beneficiarse de este método comprenden los que padecen varias enfermedades neoplásicas, enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, pero sin limitarse a la neurodegeneración debida al ictus, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica) u otras enfermedades donde la estimulación anómala de la apoptosis (ya sea hipoestimulación o hiperestimulación) es una característica o factor [Science, 281(5381); 28 agosto 1998]. Los métodos para aislar el modulador y producir anticuerpos antimoduladores y para determinar y optimizar la capacidad de los anticuerpos antimoduladores para ayudar en el examen de las células diana son bien conocidos en la materia.

Asimismo, los anticuerpos que incluyen tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales y los fármacos que modulan la producción o actividad de los AIF y otros factores de reconocimiento y/o sus subunidades pueden poseer determinadas aplicaciones de diagnóstico y pueden, por ejemplo, ser utilizados para detectar y/o medir enfermedades donde las anomalías en la estimulación o falta de estimulación de la apoptosis es o puede ser probable que se desarrolle. Por ejemplo, los polipéptidos del AIF o sus fragmentos activos pueden utilizarse para producir anticuerpos tanto policlonales como monoclonales contra ellos mismos en una variedad de medios celulares, mediante técnicas conocidas, tales como la técnica del hibridoma que utiliza, por ejemplo, linfocitos de bazo de ratón y células de mieloma fusionadas. Estas técnicas se describen con detalle a continuación. Asimismo, las moléculas pequeñas que simulan o antagonizan la o las actividades de los factores de reconocimiento del receptor de la invención pueden ser descubiertas o sintetizadas y pueden ser utilizadas en los protocolos de diagnóstico y/o terapéuticos.

La presencia de los AIF en las células puede determinarse mediante procedimientos inmunológicos habituales aplicables a dichas determinaciones. Se conocen numerosos procedimientos útiles. Tres de dichos procedimientos que son especialmente útiles utilizan ya sea el factor de reconocimiento del receptor marcado con un marcador detectable, anticuerpo Ab_1 marcado con un marcador detectable o anticuerpo Ab_2 marcado con un marcador detectable. Los procedimientos pueden resumirse mediante las siguientes ecuaciones en las que el asterisco indica que la partícula está marcada y "AIF" se refiere al factor estimulador de la apoptosis:

$$\text{A. } AIF^* + Ab_1 = AIF^*Ab_1$$

$$\text{B. } AIF + Ab^*_1 = AIFAb_1^*$$

$$\text{C. } AIF + Ab_1 + Ab_2^* = Ab_1AIFAb_2^*$$

Todos los procedimientos y su aplicación son conocidos por los expertos en la materia y por consiguiente pueden utilizarse dentro del alcance de la presente invención. El procedimiento "competitivo", Procedimiento A, está descrito en las patentes US nº 3.654.090 y nº 3.850.752. El procedimiento B es representativo de técnicas de análisis competitivas muy conocidas. El procedimiento C, procedimiento "sándwich", está descrito en las patentes US nº RE 31.006 y nº 4.016.043. Todavía otros procedimientos son conocidos tales como el procedimiento de "doble anticuerpo" o "DASP".

En cada caso, los AIF forman complejos con uno o más anticuerpo(s) o compañeros de enlace y un miembro del complejo está marcado con un marcador detectable. El hecho de que se haya formado un complejo y, la cantidad del mismo, puede determinarse por métodos aplicables a la detección de marcadores.

De lo anterior se observará que una propiedad característica de Ab_2 es que reaccionará con Ab_1. Esto es debido a que Ab_1, producido en una especie de mamífero, se ha utilizado en otras especies como antígeno para producir el anticuerpo, Ab_2. Por ejemplo, Ab_2 puede ser producido en cabras utilizando anticuerpos de conejo como antígenos. Ab_2 por lo tanto sería el anticuerpo anticonejo producido en cabras. Para los fines de esta descripción y las reivindicaciones, Ab_1 se denominará anticuerpo primario o anti-AIF y Ab_2 se denominará anticuerpo secundario o anti-Ab_1.

Los marcadores más ampliamente empleados para estos estudios son los elementos radioactivos, enzimas, productos químicos que producen fluorescencia cuando se exponen a la luz ultravioleta y otros.

Se conocen numerosos materiales fluorescentes que pueden utilizarse como marcadores. Éstos comprenden, por ejemplo, fluoresceína, rodamina y auramina. Un determinado material de detección es el anticuerpo anti-conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína mediante un isotiocianato.

Los AIF o sus compañeros de enlace pueden estar marcados con un elemento radioactivo o con una enzima. El elemento radioactivo puede ser detectado por alguno de los procedimientos de recuento disponibles actualmente. El isótopo preferido puede seleccionarse de entre ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I y ^{186}Re.

Los marcadores enzimáticos son asimismo útiles, y pueden detectarse por cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas actualmente. La enzima conjugada con la partícula seleccionada mediante la reacción con las moléculas que forman puente tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Muchas enzimas que pueden utilizarse en estos procedimientos son conocidas y pueden utilizarse. Las preferidas son peroxidasa, β-glucuronidasa, β-D-glucosidasa, β-D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las patentes US nº 3.654.090; nº 3.850.752 y nº 4.016.043 se citan a título de ejemplo por su descripción del material y de los métodos de marcado alternativos.

En una forma de realización adicional de la presente invención, pueden prepararse kits de ensayo adecuados para su utilización por un médico especialista para determinar la presencia o ausencia de actividad de transcripción predeterminada o de la capacidad para la actividad de transcripción predeterminada en células diana sospechosas. Según las técnicas de experimentación expuestas anteriormente, una clase de dichos kits contendrá por lo menos el AIF marcado o su compañero de enlace, por ejemplo un anticuerpo específico para éste, y direcciones, desde luego, dependiendo

del método seleccionado, por ejemplo, “competitivo”, “sándwich”, “DASP” y similares. Los kits pueden contener también reactivos periféricos tales como tampones, estabilizantes, etc.

Por consiguiente, puede prepararse un kit de ensayo para la demostración de la presencia o capacidad de las células para la actividad predeterminada de la transcripción, que comprende:

(a) una cantidad predeterminada de por lo menos un componente reactivo marcado inmunoquímicamente obtenido mediante el acoplamiento directo e indirecto del presente AIF o un compañero de enlace específico a éste, para un marcador detectable;

(b) otros reactivos; y

(c) direcciones para la utilización de dicho kit.

Más específicamente, el kit de ensayo de diagnóstico puede comprender:

(a) una cantidad conocida del AIF descrito anteriormente (o de un compañero de enlace) generalmente ligado a una fase sólida para formar un inmunosorbente, o como alternativa, ligado a una etiqueta adecuada, o varios de dichos productos finales, etc. (o sus compañeros de enlace) uno de cada;

(b) si es necesario, otros reactivos; y

(c) direcciones para la utilización de dicho kit de ensayo.

En otra variación, el kit de ensayo puede prepararse y utilizarse para los fines estipulados anteriormente, el cual opera según un protocolo predeterminado (por ejemplo “competitivo”, “sándwich”, “anticuerpo doble”, etc.), y comprende:

(a) un componente marcado que ha sido obtenido por acoplamiento del AIF a un marcador detectable;

(b) uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales de los cuales por lo menos un reactivo es un ligando o un ligando inmovilizado, el cual se selecciona de entre el grupo constituido por:

(i) un ligando capaz de unirse con el componente (a) marcado;

(ii) un ligando capaz de unirse con un compañero de enlace del componente (a) marcado;

(iii) un ligando capaz de unirse con por lo menos uno de los componentes que han de determinarse; y

(iv) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los compañeros de enlace de por lo menos uno de los componentes que han de determinarse; y

(c) direcciones para el funcionamiento de un protocolo destinado a la detección y/o determinación de uno o más componentes de una reacción inmunoquímica entre el AIF y el compañero de enlace específico a éste.

Implicaciones terapéuticas

Los polipéptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos de la invención presentan un potencial terapéutico significativo. Opcionalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agente se administra en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Para los fines de esta descripción, son importantes las siguientes definiciones. La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a las entidades moleculares y a las composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción alérgica o igualmente desfavorable, tal como trastorno gástrico, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano y que preferentemente no interfieren en la administración de la proteína administrada. Preferentemente, tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listada en la *US Pharmacopeia* u otra farmacopea generalmente reconocida para su utilización en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos esterilizados, tal como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua o las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol se emplean preferentemente como portadores, particularmente para soluciones inyectables. Los portadores farmacéuticos adecuados están descritos en Martin, *Remington’s Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990).

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se utiliza en la presente memoria para significar una cantidad suficiente para reducir por lo menos aproximadamente el 15%, preferentemente por lo menos el 50%, más preferentemente por lo menos el 90% y lo más preferentemente impedir, una deficiencia clínicamente significativa de la

actividad, función y respuesta del huésped. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para producir una mejora en una enfermedad clínicamente significativa en el huésped.

La administración del polipéptido del AIF recombinante (o fragmentos, análogos u homólogos de AIF descritos anteriormente, que incorporan actividad de tipo AIF) a las células produce la estimulación de la apoptosis. Dicha administración podría ayudar en el tratamiento y control de numerosas enfermedades neoplásicas, por ejemplo, pero sin limitarse al linfoma, enfermedades neoplásicas del sistema nervioso central, sarcoma, melanoma, mesotelioma o cualquier enfermedad neoplásica de los demás órganos del cuerpo (por ejemplo, pero sin limitarse la próstata, pulmones, músculos, hígado, estómago, vejiga, útero). El polipéptido del AIF puede prepararse utilizando vectores de expresión normales de bacterias y/o mamíferos, sintéticamente, o purificado a partir del plasma o del suero, todo como se indica con detalle al principio en la presente memoria. Alternativamente, el aumento de expresión del polipéptido del AIF natural puede ser producido por técnicas de recombinación homóloga, como se describió anteriormente.

La reducción de la actividad del polipéptido del AIF (por desarrollo de antagonistas, inhibidores, utilización de anticuerpos neutralizantes o moléculas de cadena complementaria, producidas todas como se describe en la presente memoria) produciría una disminución de la apoptosis. Dicha actividad puede ser deseable para el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas que se han asociado a la estimulación de la apoptosis (a la neurodegeneración debida al ictus, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica). Por lo tanto, la modulación de la actividad del AIF puede servir para controlar o tratar enfermedades neoplásicas (aumentando su actividad) o para tratar enfermedades neurodegenerativas (disminuyendo su actividad).

Tratamiento terapéutico a base de polipéptidos

En el análisis más simple, el producto génico del AIF, y, consiguientemente, las moléculas homólogas, parecen formar parte de la serie de reacciones apoptósicas de señalización, en la que la apoptosis está estimulada por el AIF. El polipéptido del AIF, o un fragmento del mismo operativamente activo, o un antagonista del mismo, puede administrarse por vía oral o parenteral, preferentemente por vía parenteral. Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse utilizando una infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una forma de realización, puede utilizarse una bomba [Langer *et al., eds., Medical Applications of Controlled Release*, CRC Pres., Boca Ratón, Florida (1974); Sefton, CRC *Crit. Ref. Biomed. Eng*., **14**:201 (1987); Buchwald *et al., Surgery*, **88**:507 (1980); Saudek *et al., N. Engl. J. Med*., **321**:574 (1989)]. En otra forma de realización, pueden utilizarse materials poliméricos [Langer, 1974, *supra*; Sefton, 1987, *supra*; Smolen *et al*., eds., *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Wiley, Nueva York (1984); Ranger *et al., J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem*., **23**:61 (1983); Levy *et al., Science*, **228**:190 (1985); During *et al., Ann. Neurol*., **25**:351 (1989); Howard *et al., J. Neurosurg*., **71**:105 (1989)]. En otra forma de realización todavía, puede colocarse un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, necesitando de este modo únicamente una fracción de la dosis generalizada [por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, págs. 115-138 (1984)]. Otros sistemas de liberación controlada son expuestos en el estudio por Langer, *Science*, **249**:1527-1533 (1990). En otra forma de realización, el compuesto terapéutico puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (Langer, 1990 *supra*); Treat *et al*., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); López-Berestein, *ibid*., págs. 317-327).

En un aspecto adicional, las células recombinantes que han sido transformadas con el gen del AIF y que expresan grandes concentraciones de polipéptido pueden ser trasplantadas en un paciente que necesite del polipéptido del AIF. Preferentemente las células autólogas transformadas con el gen del AIF se trasplantan para impedir el rechace; alternativamente, está disponible la tecnología para proteger las células no autólogas que producen factores solubles dentro de una matriz polimérica que impide el reconocimiento y el rechace inmunitario.

El polipéptido del AIF puede administrarse por las vías de administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea. Alternativamente, el polipéptido del AIF, formulado apropiadamente, puede administrarse mediante administración nasal u oral. Un aporte constante de AIF puede acumularse proporcionando una dosis terapéuticamente eficaz (es decir, una dosis eficaz que estimule la apoptosis en el área objetivo) a intervalos necesarios, por ejemplo, a diario, cada 12 horas, etc. Estos parámetros dependerán de la gravedad de la enfermedad que se está tratando, de otras actuaciones, del peso, la edad y sexo del paciente y de otros criterios, que pueden determinarse fácilmente según las buenas prácticas médicas habituales por los expertos en la materia.

Composiciones/composiciones farmacéuticas

Todavía en otro aspecto de la presente invención se proporcionan composiciones y composiciones farmacéuticas de las anteriores. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser destinadas a la administración por inyectables o por vía oral, pulmonar, nasal u otras formas de administración. En general, las composiciones farmacéuticas están comprendidas por la invención las cuales comprenden cantidades eficaces de proteína (AIF) o de productos derivados (por ejemplo, fragmentos, homólogos, variantes de AIF) de la invención junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones comprenden diluyentes de varios contenidos en tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias para esponjamiento

(por ejemplo, lactosa, manitol); incorporación del material en preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o en liposomas. Puede utilizarse también el ácido hialurónico. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, ritmo de liberación *in vivo* y ritmo de eliminación *in vivo* de las presentes proteínas y derivados, por ejemplo, Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed. [1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042] páginas 1435-1712 que están incorporadas a la presente memoria como referencia. Las composiciones pueden prepararse en forma líquida o pueden estar en polvo seco, tal como en forma liofilizada.

Administración oral

Para su utilización en la presente memoria se contemplan las formas de dosificación sólidas orales, que están descritas generalmente en Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed. [1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042] en el Capítulo 89, que se incorpora en la presente memoria como referencia. Las formas de dosificación sólidas comprenden comprimidos, cápsulas, píldoras, grageas o pastillas, sellos o gránulos. Asimismo puede utilizarse la encapsulación liposómica o proteinoide para formular las presentes formulaciones (como, por ejemplo, microesferas proteinoides publicadas en la patente US nº 4.925.673). Puede utilizarse encapsulación liposómica y los liposomas pueden modificarse con varios polímeros (por ejemplo, patente US nº 5.013.556). Una descripción de las posibles formas de dosificación sólida para la terapia es proporcionada por Marshall, en *Modern Pharmaceutics*, Capítulo 10, Banker y Rhodes, ed., (1979), incorporada a la presente memoria como referencia. En general, la formulación incluirá la proteína (o la proteína modificada químicamente) e ingredientes inertes que permiten la protección contra el medio del estómago y la liberación del material biológicamente activo en el intestino.

Se contemplan también específicamente las formas de dosificación oral de las proteínas modificadas anteriormente. La proteína puede estar químicamente modificada de modo que sea eficaz la administración oral del derivado. Generalmente, la modificación química contemplada es el acoplamiento de por lo menos una fracción a la propia molécula de proteína (o péptido), donde dicha fracción permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la absorción en el torrente sanguíneo del estómago o intestino. También se desea el aumento de la estabilidad general de la proteína y el aumento del tiempo de circulación en el tiempo. Ejemplos de dichas fracciones comprenden: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina [Abuchowski *et al*., 1981, *supra*; Newmark *et al., J. Appl. Biochem*.,**4**:185-189 (1982)]. Otros polímeros que podrían utilizarse son el poli-1,3-dioxolano y el poli-1,3,6-tioxocano. Para la utilización farmacéutica se prefiere, como se indicó anteriormente las fracciones de polietilenglicol.

Para la proteína (o derivado) la posición de liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon) o el intestino grueso. Un experto en la materia tiene formulaciones disponibles que no se disolverán en el estómago, pero liberarán el material en el duodeno o en cualquier parte del intestino. Preferentemente, la liberación impedirá los efectos perjudiciales del medio estomacal, ya sea mediante la protección de la proteína (o derivados) o mediante la liberación del material biológicamente activo fuera del medio estomacal, tal como en el intestino.

Para asegurar la resistencia gástrica completa, es esencial un revestimiento impermeable a por lo menos pH 5,0. Ejemplos de los ingredientes inertes más frecuentes que se utilizan como revestimientos entéricos son el trimelitato acetato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, acetato ftalato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, acetato ftalato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y goma laca. Estos recubrimientos pueden utilizarse como películas mixtas.

Un revestimiento o mezcla de revestimientos puede también utilizarse en comprimidos, que no están destinados a la protección contra el estómago. Éste puede incluir revestimientos de azúcar o revestimientos que hacen que la tableta sea más fácil de ingerir. Las cápsulas pueden estar constituidas por una carcasa dura (tal como gelatina) para la administración del producto terapéutico seco, es decir, en polvo, para formas líquidas, puede utilizarse una carcasa blanda de gelatina. El material de la carcasa de los sellos podría ser almidón espeso u otro papel comestible. Para las píldoras, pastillas, comprimidos moldeados o triturados de comprimidos, pueden utilizarse técnicas de amasado húmedas.

El producto terapéutico puede estar incluido en la formulación como multipartículas finas en forma de gránulos o bolitas de tamaño de partícula aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de cápsula puede ser también en forma de polvo, tampones ligeramente comprimidos o incluso como comprimidos. El producto terapéutico podría ser preparado por compresión.

Todos los colorantes y agentes potenciadores de sabor pueden estar incluidos. Por ejemplo, la proteína (o derivados) puede formularse (tal como por encapsulación del liposoma o microesfera) y a continuación estar contenida después en un producto comestible, puede diluirse o aumentar el volumen del producto terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente manitol, α-lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. Determinadas sales inorgánicas pueden utilizarse también como cargas incluyendo el trifosfato cálcico, carbonato de magnesio y cloruro sódico. Algunos diluyentes disponibles en el mercado son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

Pueden estar incluidos en la formulación disgregadores del producto terapéutico en una forma galénica sólida. Los materiales utilizados como disgregadores comprenden pero no se limitan a almidón, incluyendo el disgregador comercial basado en almidón, Explotab. Pueden también utilizarse almidón glicolato sódico, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato sódico, gelatina, cáscara de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de disgregadores son las resinas insolubles de intercambio catiónico. Pueden utilizarse gomas en polvo como disgregadores y como aglutinantes y éstas pueden incluir las gomas en polvo tal como agar-agar, Karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal sódica sirven asimismo como disgregadores.

Pueden utilizarse aglomerantes para mantener el agente terapéutico unido para formar un comprimido duro o incluyen materiales procedentes de productos naturales tales como acacia, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). La polivinilpirrolidona (PVP) y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) podrían ser utilizadas ambas en soluciones alcohólicas para granular el producto terapéutico.

Puede incluirse un agente antifricción en la formulación del producto terapéutico para impedir la adherencia durante el proceso de formulación. Pueden utilizarse lubricantes como una capa entre el producto terapéutico y la pared del troquel, y éstos pueden incluir pero no se limitan a: ácido esteárico incluyendo sus sales de magnesio y de calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. Pueden utilizarse también lubricantes solubles tales como el lauril sulfato sódico, lauril sulfato de magnesio, polietilenglicol de varios pesos moleculares y Carbowax 4000 y 6000.

Pueden añadirse fluidificantes que pueden mejorar las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación y ayudar a la reordenación durante la compresión. Los fluidificantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirógena y silicoaluminato hidratado.

Para ayudar a la disolución del producto terapéutico en el medio acuoso, puede añadirse un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden comprender detergentes aniónicos tales como laurilsulfato sódico, sulfosuccinato de dioctilo sódico y sulfonato de dioctilo sódico. Pueden utilizarse detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetomio. La lista de detergentes potenciales no iónicos que podrían incluirse en la formulaciones como tensioactivos son lauromacrogol 400, estearato de polioxil 40, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso con sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos pueden estar presentes en la formulación de la proteína o derivado ya sean solos o en mezcla en diferentes proporciones.

Los aditivos que aumentan potencialmente la absorción de la proteína (o derivado) son por ejemplo los ácidos grasos: ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico.

Puede ser deseable una formulación de liberación controlada. La composición podría incorporarse en una matriz inerte que permita la liberación ya sea por mecanismos de difusión o percolación, es decir, gomas. Pueden incorporarse también en la formulación matrices que se degeneran lentamente. Otra forma de liberación controlada de este producto terapéutico es mediante un método basado en el sistema terapéutico Oros (Alza Corp.), es decir, el fármaco está ocluido en una membrana semipermeable que permite que entre el agua o impulse el fármaco a través de una pequeña abertura única debido a efectos osmóticos. Algunos recubrimientos entéricos también presentan un efecto de liberación retardada.

Pueden utilizarse otros recubrimientos para la formulación. Éstos comprenden una variedad de azúcares que podría aplicarse en un pan de recubrimiento. El agente terapéutico podría también administrarse en un comprimido recubierto de película; los materiales utilizados en este caso se dividen en dos grupos. El primero son los materiales no entéricos e incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, carboxi-metilcelulosa sódica, providona y los polietilenglicoles. El segundo grupo consiste en materiales entéricos que normalmente son ésteres del ácido ftálico.

Podría utilizarse una mezcla de materiales para proporcionar el revestimiento óptimo de la película. El revestimiento de la película puede realizarse en una capa de pan o en un lecho fluidizado o por revestimiento por compresión.

Administración pulmonar

Se contempla también en la presente memoria la administración pulmonar de la presente proteína (o de derivados de la misma). La proteína (o derivado) se administra a los pulmones de un mamífero mientras inhala y atraviesa el revestimiento epitelial del pulmón hasta el torrente sanguíneo. Otros informes sobre esto comprenden Adjei *et al., Pharmaceutical Research*, **7(6)**:565-569 (1990); Adjei *et al., International Journal of Pharmaceutics*, **63**:135-144 (1990) (acetato de leuprolida); Braquet *et al., Journal of Cardiovascular Pharmacology*; **13** (supl. 5):143-146 (1989) (endotelina-1); Hubbard *et al., Annals of Internal Medicine*, 3(3):206-212 (1989) (α-antitripsina); Smith *et al., J. Clin. Invest*., **84**:1145-1146 (1989) (α1-proteinasa); Oswein *et al*., "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, (marzo 1990) (hormona de crecimiento humano recombinante); Debs *et al., J. Immunol*., **140**:3482-3488 (1988) y Platz *et al*., patente US nº 5.284.656 (factor inductor de colonias de granulocito). Para su utilización en la puesta en práctica de la presente invención se contempla una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo pero sin

limitarse a nebulizadores, inhaladores de dosis medidas o inhaladores de polvo, todos los cuales son conocidos por los expertos en la materia.

Algunos ejemplos específicos de dispositivos disponibles en el mercado adecuados para la puesta en práctica de la presente invención son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medidas Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina del norte; y el inhalador de polvo Spinhaler, preparado por Fisons Corp., Bedford, Massachussets.

Todos estos dispositivos requieren la utilización de formulaciones adecuadas para la administración de la proteína (o derivado). Típicamente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede entrañar la utilización de un material propelente apropiado, además de los diluyentes, adyuvantes y/o portadores habituales útiles en terapia. Asimismo, se contempla la utilización de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de portadores. Puede prepararse también proteína modificada químicamente en diferentes formulaciones dependiendo del tipo de modificación química o del tipo de dispositivo empleado.

Las formulaciones adecuadas para su utilización con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, comprenden típicamente proteína (o derivado) disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de proteína biológicamente activa por ml de solución. La formulación puede también incluir un tampón y un azúcar sencillo (por ejemplo, para la estabilización de proteínas y regulación de la presión osmótica). La formulación del nebulizador puede contener también un tensioactivo, para reducir o impedir la agregación estimulada por la superficie de la proteína producida por atomización de la solución en la formación del aerosol.

Las formulaciones para su utilización con un dispositivo inhalador de dosis medidas comprenderán generalmente un polvo dividido finamente que contiene la proteína (o derivado) suspendido en un propelente con ayuda de un tensioactivo. El propelente puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tal como un clorofluorocarburo, un hidroclorofluorocarburo, un hidrofluorocarburo o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico puede ser útil también como tensioactivo.

Las formulaciones para la administración con un dispositivo inhalador de polvo comprenderán una proteína (o derivado) que contiene el polvo seco dividido finamente y puede también comprender un agente de esponjamiento, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol en cantidades que faciliten la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo, 50 a 90% en peso de la formulación. La proteína (o derivado) debería prepararse de manera más ventajosa en forma de partículas con un tamaño de partícula medio inferior a 10 μM (o micras), más preferentemente de 0,5 a 5 μM, para la administración más eficaz del pulmón distal.

Administración nasal

Se contempla asimismo la administración nasal de la proteína (o derivado). La administración nasal permite el paso de la proteína al torrente sanguíneo directamente tras la administración del producto terapéutico a la nariz, sin necesidad de deposición del producto en el pulmón. Las formulaciones para la administración nasal incluyen las que contienen dextrano o ciclodextrano.

Métodos de tratamiento, métodos de preparación del medicamento

Todavía en otro aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos de tratamiento y de preparación de un medicamento. Las enfermedades aliviadas o moduladas por la administración de los presentes derivados son las indicadas anteriormente.

Dosis

Para todas las moléculas anteriores, a medida que se realizan más estudios, la información aparecerá con respecto a las concentraciones de dosificación apropiadas para el tratamiento de varias enfermedades en varios pacientes, y el especialista ordinario, considerando el contexto terapéutico, la edad y la salud general del receptor, será capaz de determinar la dosis apropiada. Generalmente, para inyectables o infusión, la dosis estará comprendida entre 0,01 μg de proteína biológicamente activa/kg de peso corporal, (calculando la masa de la proteína sola, sin modificación química) y 10 mg/kg (referida a la misma). El programa de dosificación puede variar, dependiendo de la vida media en circulación de la proteína o derivado utilizado, si el polipéptido se administra en dosis en inyección directa o en infusión continua, y de la formulación utilizada.

Administración con otros compuestos/modalidades de tratamiento

Para la terapia asociada a anomalías relacionadas con la falta de estimulación de la apoptosis, se puede administrar la presente proteína (o derivados) junto con una o más composiciones farmacéuticas utilizadas para el tratamiento de la complicación clínica subyacente (es decir, cáncer: radioterapia y/o quimioterapia). La administración puede ser simultánea o *in seriatim*.

Tratamiento terapéutico a base de ácido nucleico

El polinucleótido del AIF puede introducirse en las células para desarrollar la terapia génica para las anomalías relacionadas con la falta de estimulación de la apoptosis (por ejemplo, enfermedades neoplásicas). Dicha terapia es de esperar que controle dichos cánceres. Por el contrario, la introducción de montajes con cadena complementaria en células humanas con cantidades anormalmente elevadas de apoptosis (por ejemplo, enfermedad neurodegenerativa) reducirían las concentraciones de polipéptido del AIF activo y serían predichas para aliviar los síntomas subyacentes.

En una forma de realización, un gen que codifica un polipéptido del AIF se introduce *in vivo* en un vector vírico. Dichos vectores comprende un ADN virus atenuado o defectuoso, tal como pero no limitado al virus del herpes simple (HSV), papilomavirus, virus de Epstein Barr (EBV), adenovirus, virus adenoasociado (AAV) y similares. Dichos virus no son infecciosos tras la introducción en una célula. La utilización de los vectores víricos anteriores permite la administración a células en un área específica, localizada, sin preocuparse de que el vector pueda infectar otras células. Por lo tanto, por ejemplo el tejido canceroso puede ser dirigido específicamente. Ejemplos de vectores concretos comprenden, pero no se limitan a vector del herpes virus 1 (HSV1) [Kaplitt *et al., Molec. Cell. Neurosci*., **2**:320-330 (1991)], véase la patente US nº 5.288.641 de Roizman, un vector de adenovirus atenuado, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet *et al., J. Clin. Invest*., **90**:626-630 (1992) y un vector adenoasociado defectuoso [Samulski *et al., J. Virol*., **61**:3096-3101 (1987); Samulski *et al., J. Virol*., **63**:3822-3828 (1989)].

En otra forma de realización, el gen puede introducirse en un vector retrovírico, por ejemplo, como se describe en Anderson *et al*., patente US nº 5.399.346; Mann *et al., Cell*, **33**:153 (1983); Temin *et al*., patente US nº 4.650.764; Temin *et al*., patente US nº 4.980.289; Markowitz *et al., J. Virol*., **62**:1120 (1988); Temin *et al*., patente US nº 5.124.263; publicación de patente internacional nº WO 95/07358, publicada el 16 de marzo de 1995, por Dougherty *et al*.; y Kuo *et al., Blood*, **82**:845 (1993).

Con respecto a la utilización de vectores víricos para administrar una terapia a base de genes, es preferible un polinucleótido del AIF o un fragmento del mismo bajo el control de un activador capaz de expresarse en las células diana (operativamente ligado a un activador que opera en el contexto de un genoma vírico), por ejemplo, montajes con cadena complementaria (véase anteriormente) para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o cualquier otra enfermedad caracterizada por la hiperestimulación de la apoptosis.

Alternativamente, el vector puede introducirse *in vivo* por lipofección. Durante la década pasada, se ha incrementado la utilización de liposomas para encapsulación y transfección de ácidos nucleicos *in vitro*. Los lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y riesgos encontrados con la transfección mediada por liposomas puede utilizarse para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador [Felgner *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**:7413-7417 (1987); Mackey *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:8027-8031 (1988)]. La utilización de lípidos catiónicos puede estimular la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente y también estimular la fusión con las membranas celulares cargadas negativamente [Felgner *et al., Science*, **337**:387-388 (1989)]. La utilización de lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* presenta determinadas ventajas prácticas. El direccionamiento molecular de los liposomas a células específicas representa un área de utilidad. Está claro que dirigir la transfección a determinados tipos de células presentaría particularmente ventajas en un tejido con heterogeneidad celular, tales como el páncreas, hígado, riñón y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas con fines de direccionamiento [Mackey *et al*., 1988, *supra*]. Los péptidos dirigidos, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como los anticuerpos o moléculas no peptídicas podrían acoplarse químicamente a los liposomas.

Es posible también introducir el vector *in vivo* como plásmido de ADN desprotegido. Los vectores de ADN desprotegidos para la terapia génica pueden introducirse en las célula huésped deseadas por los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, utilización de un acelerador de genes o utilización de un transportador del vector del ADN [Wu *et al., J. Biol. Chem*., **267**:963-967 (1992); Wu *et al., J. Biol. Chem*., **263**:14621-14624 (1988); Hartmut *et al*., solicitud de patente canadiense nº 2.012.311, presentada el 15 de marzo de 1990].

Compañero de enlace al AIF

El desarrollo de pequeñas moléculas agonistas y antagonistas del AIF se facilitará en gran medida mediante el aislamiento del o de los compañero(s) de enlace al AIF. Esto puede realizarse preparando el polipéptido activo del AIF y utilizándolo para identificar un banco de expresión que utiliza métodología habitual. La unión del enlace del compañero en el banco de expresión puede determinarse administrando polipéptido recombinante preparado que utiliza vectores de expresión bacterianos o de mamífero y observando los efectos a corto plazo y la administración continua del polipéptido recombinante en las células del banco de expresión.

Los bancos de ADNc procedentes de tejidos que se cree que contienen AIF pueden ser construidos en vectores de clonación de expresión normal. Estos clones de ADNc se introducirán a continuación en las células COS en grupos y los transformantes resultantes se determinarían con ligando activo para identificar las células COS que se expresan el compañero de enlace al AIF. Los clones positivos pueden aislarse a continuación con el fin de recuperar el compañero de enlace clonado. El compañero de enlace clonado se utilizaría junto con el ligando del AIF para desarrollar los componentes necesarios para la identificación de pequeñas moléculas de moduladores de AIF.

Un ensayo útil y complementado según la presente invención se conoce como ensayo "cis/trans". En resumen, este ensayo emplea dos montajes genéticos, uno de los cuales es típicamente un plásmido que expresa continuamente un compañero de enlace determinado de interés cuando se transfecta en una línea celular apropiada, y el segundo de los cuales es un plásmido que expresa un indicador tal como luciferasa, bajo el control de un complejo receptor/ligando. Por lo tanto, por ejemplo, si se desea evaluar un compuesto como ligando para un determinado compañero de enlace, uno de los plásmidos debería ser un montaje que produzca la expresión del compañero de enlace en la línea celular seleccionada, mientras que el segundo plásmido poseería un activador ligado al gen de luciferasa en el que el elemento de respuesta al compañero de enlace determinado está insertado. Si el compuesto en ensayo es un agonista para el compañero de enlace, el ligando se acomplejará con el receptor y el complejo resultante unirá el elemento de respuesta e iniciará la transcripción del gen de luciferasa. Se mide a continuación fotométricamente la quimioluminiscencia resultante, y se obtienen las curvas de respuesta a la dosis y se comparan con las de los ligandos conocidos. El protocolo anterior está descrito con detalle en la patente US nº 4.981.784 y en la publicación internacional PCT nº WO 88/03168, con cuya intención se cita al especialista. Una vez se identifica un recombinante que expresa la secuencia génica del compañero de enlace al AIF, puede analizarse el compañero de enlace al AIF recombinante. Esto se consigue mediante los ensayos basados en las propiedades físicas u operativas del compañero de enlace al AIF, incluyendo el marcado radioactivo del compañero de enlace seguido de análisis por electroforesis en gel, inmunoanálisis, fijación del ligando, etc. Además, pueden generarse anticuerpos contra el compañero de enlace al AIF como se describió anteriormente.

La estructura del compañero de enlace al AIF puede analizarse por varios métodos conocidos en la materia. Preferentemente, se analiza la estructura de varios dominios, particularmente la secuencia de enlace al AIF. El análisis estructural puede realizarse identificando la secuencia de manera similar con otras proteínas conocidas, determinadas hormonas y compañero de enlace a la proteína. El grado de similitud (u homología) puede aportar una base para predecir la estructura y función del compañero de enlace al AIF o un dominio del mismo. En una forma de realización específica, las comparaciones de la secuencia pueden realizarse con las secuencias halladas en el GenBank, utilizando, por ejemplo, los programas FASTA y FASTP [Pearson *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:2444-2448 (1988)].

La secuencia proteica puede caracterizarse más mediante un análisis de hidrofilia, por ejemplo, Hopp *et al*., 1981, *supra*. Puede utilizarse un perfil de hidrofilia para identificar las zonas hidrofóbica e hidrofílica del compañero de enlace al AIF, que a su vez puede indicar las zonas extracitoplásmicas, de enlace a la membrana o intracitoplásmicas.

Puede emprenderse asimismo el análisis estructural secundario, por ejemplo, Chou *et al*., 1974, *supra*, para identificar zonas del compañero de enlace al AIF que suponen estructuras secundarios específicas. La manipulación, traducción y producción de la estructura secundaria, así como la predicción y la representación del marco de lectura abierto, también pueden realizarse utilizando programas informáticos disponibles en la materia.

Al proporcionar una abundante fuente de polipéptido del AIF recombinante y la oportunidad de aislar el compañero de enlace al AIF, la presente invención permite la determinación estructural cuantitativa de la conformación activa del polipéptido del AIF y el compañero de enlace al AIF o los dominios del mismo. En particular, se aporta material suficiente para resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (RI), Raman y ultravioleta (UV), especialmente dicroísmo celular (CD), análisis espectroscópico. En particular la RMN proporciona análisis estructural muy potente de moléculas en solución, que se aproxima más estrechamente a su medio natural (Marion *et al*., 1983, *supra*; Bar *et al*., 1985, *supra*; Kimura *et al*., 1980, *supra*). Otros métodos de análisis estructural pueden emplearse también. Éstos incluyen pero no se limitan a la cristalografía por rayos X (Engstom, 1974, *supra*).

Más preferentemente, pueden estudiarse los cristales conjuntos de polipéptido del AIF y del compañero de enlace al AIF. El análisis de los cristales conjuntos proporciona información detallada acerca del enlace, que a su vez permite el diseño racional de agonistas y antagonistas del ligando. También puede utilizarse modelado informático, especialmente en relación con los métodos por RMN o por rayos X [Fletterick *et al*., eds., *Computer Graphics and Molecular Modeling, in Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (1986)].

La identificación y aislamiento de un gen que codifica un compañero de enlace al AIF de la invención proporciona la expresión del receptor en cantidades mayores que pueden aislarse de fuentes naturales o en las células indicadoras que están especialmente modificadas genéticamente para indicar la actividad del compañero de enlace expresada tras la transfección o transformación de las células. Por consiguiente, además del diseño racional de agonistas y antagonistas basado en la estructura del polipéptido del AIF, la presente invención contempla un método alternativo para la identificación de ligandos específicos del compañero de enlace al AIF utilizando varios ensayos de identificación conocidos en la materia.

La invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes, que no pretenden limitar el alcance de la invención tal como se describe en las reivindicaciones.

El Ejemplo 1 proporciona métodos para la clonación y expresión del AIF de ratón.

El Ejemplo 2 proporciona métodos para la producción de antisueros anti-AIF así como los métodos para los protocolos experimentales de inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica e inmunorreducción.

El Ejemplo 3 proporciona métodos para protocolos experimentales que entrañan el fraccionamiento subcelular y sistemas de apoptosis exentos de células.

El Ejemplo 4 proporciona métodos para la microinyección, transfección y cuantificación de la apoptosis.

El Ejemplo 5 describe las isoformas alternativas del AIF de ratón.

El Ejemplo 6 describe la clonación del AIF humano.

El Ejemplo 7 describe las isoformas alternativas del AIF humano.

El Ejemplo 8 proporciona métodos para la construcción del ADNc del AIF humano completo.

El Ejemplo 9 proporciona métodos para el cultivo de células huésped y la estimulación subsiguiente de la proteína recombinante (AIF).

El Ejemplo 10 describe la purificación de la proteína de fusión del AIF recombinante completa.

El Ejemplo 11 describe la utilización de un análisis híbrido de levadura para identificar los compañeros de enlace al AIF.

Ejemplo 1

Clonación del ADNC del AIF de ratón y producción recombinante del mismo

Con el fin de determinar la secuencia del ADN que codifica a mAIF, se sometió el polipéptido a purificación de proteínas, seguido de análisis de la secuencia de aminoácidos y alineamiento por análisis informático con los EST del GenBank. Después de la determinación tanto del inicio 5' como de la terminación 3' de mAIF, se emprendió el análisis RT-PCT para verificar que el cóntigo de mAIF obtenido formaba un marco de lectura abierto continuo (véase a continuación los métodos existentes).

Purificación de mAIF/alineación de EST

Se purificó el mAIF (AIF de ratón) a partir del sobrenadante de mitocondrias de hígado de ratón tratadas con atractilosida como se describió anteriormente [Wada *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:144-149 (1998)], se sometió a SDS-PAGE, tinción con plata, escisión de la banda de ~ 57 kDa, digestión *in situ* con tripsina, extracción del péptido, inyección en una columna HPLC microcapilar (50 micras i.d. × 10 cm.) rellena con C-18 (YMC ODS-AQ) e ionización por electroatomización en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Finnigan, San José, CA) durante la elución a gradiente lineal de péptidos con acetonitrilo.

Se analizaron los datos espectrométricos de masas con el ordenador SEQUEST de rutina, permitiendo la correlación de espectros de disociación producidos por colisiones de alta energía de péptidos con todas las secuencias en las bases de datos de proteínas públicas [Ducret *et al., Protein Sci.* **7**:706-719 (1998)]. En resumen (véase a continuación para detalles adicionales) una secuencia etiqueta expresada (GenBank EST nº 1.595.214) que es compatible con los datos de la electroatomización se alineó con varios otros EST de ratón en la base de datos NCBI (por ejemplo nº AA106466 y nº AA068609 de registro en el GenBank). Estos EST se obtuvieron del consorcio IMAGE (Research Genetics, Huntsville, AL) y se secuenciaron para generar un cóntigo del ADNc del AIF de ratón que se utilizó posteriormente para clonar el ADNc completo de ratón y AIF humano por RT-PCR. Se realizaron análisis por transferencia Northern utilizando el ADNc del mAIF completo como sonda.

Más específicamente, los EST de ratón siguientes se alinearon para formar el cóntigo del ADNc del AIF de ratón preliminar: GenBank nº AA106466 (el clon más 5' EST), GenBank nº AA572575, GenBank nº W77437, GenBank nº AA155062, GenBank nº AA516860, GenBank nº AA088093, GenBank nº AA073449 y GenBank nº AA134414.

Determinación del inicio 5' (ATG) de mAIF

La mayor parte del clon EST de ratón de 5' (GenBank nº AA106466) y dos EST humanos (GenBank nº AA337888 y dbj nº C03711), que se cree que corresponden a secuencias ortólogas de AIF, comienzan todos en similares posiciones. Este fenómeno con frecuencia es indicativo de los clones EST que representan el inicio de la transcripción.

La alineación de los EST del AIF de ratón (GenBank nº AA106466) y humano (obj nº C03711) pusieron de manifiesto que eran más divergentes en los terminales del extremo 5' y realmente contenían un hueco de 2 nucleótidos en la alineación en el extremo 5'. Debido a que este hueco en la alineación destruiría el marco de lectura, se sacó en conclusión que el área divergente de la secuencia representaba la zona 5' no traducida. La traducción de cada uno de estos EST en los 3 marcos puso de manifiesto que solamente un marco de lectura continuaba en la dirección de 3' a 5' sin codones de terminación y este marco era el mismo para los EST de AIF tanto de ratón (GenBank nº AA106466) como humano (GenBank nº AA337888 y dbj nº C03711). Además, las alineaciones de la especie de cruce permitieron la verificación de este mismo marco de lectura del extremo 5' de AIF porque las secuencias de AIF de ratón y humana

normalmente se diferenciaban en nucleótidos, que estaban localizados en muchos de los 3 nucleótidos alejados entre sí y estaban por lo tanto ocupando la posición "de oscilación" o el tercer nucleótido del codón de tres letras. La traducción de los EST del AIF de ratón y humano en este marco identificó el inicio de metionina. La presencia de la g en la posición -3 del codón de inicio (ATG) tanto en los clones EST de ratón como humano es coherente con el consenso de Kozak de una A o una g en la posición -3 de la metionina del inicio. Esto por consiguiente presta más apoyo a que ésta sea la verdadera metionina de inicio del AIF.

Determinación de la terminación 3' del ADNc del mAIF

La alineación del cóntigo del ADNc del mAIF con otros EST en la base de datos N.C.B.I. identificó un EST de ratón adicional (GenBank nº AA060609) que extendió el cóntigo del AIF de ratón aun más de 3'. Se cree que este clon EST de ratón se perdió supuestamente porque solamente se solapó con el cóntigo original en 37 nucleótidos.

Este clon EST de ratón adicional (GenBank nº AA068609) estaba disponible y por lo tanto se adquirió en el consorcio I.M.A.G.E. (ADNc ID nº 524752; situado en el vector pBlueScript SK; el ADNc de EST se clonó procedente de un melanoma M2 de ratón de Stratagene (nº 937312). Una vez obtenido, la bacteria que contiene el clon EST se sometió al siguiente protocolo.

Se utilizó un bucle esterilizado para inocular 3,5 ml de caldo de cultivo LB (que contiene 50 μg de carbenacilina/ml) y la bacteria se cultivó en un incubador con agitación a 37ºC durante 16 horas. Se utilizó a continuación un kit Plasmid Miniprep de Qiagen (Qiagen Inc. Mississauga, ON, catálogo nº 12125) para preparar el ADN del plásmido de este cultivo según las instrucciones del fabricante. El ADN del plásmido se puso en suspensión en 30 μl de 1 × tampón T.E. (pH 8,0) y se sometió a secuenciado de didesoxi-nucleótido fluorescente y detección automática (AB1/Perkin Elmer, Foster City, CA) con los cebadores T7 y T3.

El secuenciado de este clon EST que utiliza los cebadores T3 y T7 puso de manifiesto que este clon contenía la supuesta terminación 3' para AIF de ratón porque contenía terminaciones en los 3 marcos de lectura (Figs. 8A-8G).

Para determinar el marco de lectura correcto del extremo 3' del AIF de ratón, se realizó una búsqueda en BLAST frente a la base de datos N.C.B.I. de EST utilizando los datos de la secuencia recién generados. Estos nuevos datos de la secuencia alineados con los EST de rata (GenBank nº AA891591) y los EST de los tejidos humanos (por ejemplo GenBank nº AA570483). Las alineaciones de la especie de cruce permitieron a los investigadores terminar el marco de lectura del extremo 3' del AIF de ratón porque las secuencias se diferenciaban normalmente en los nucleótidos que estaban situados en múltiplos de 3 nucleótidos alejados entre sí y estaban por consiguiente ocupando la posición "de oscilación" o el tercer nucleótido del codón de tres letras (Figs. 5A-5H). Cuando se tradujo el EST del AIF de ratón en 3' en este marco fue posible la identificación del codón de terminación en 3'.

RT-PCR del marco de lectura abierto del ADNc del mAIF completo

Con el fin de comprobar que el cóntigo del mAIF obtenido anteriormente formaba un marco de lectura abierto continuo, se diseñaron cebadores al lado del marco de lectura abierto del ADNc del AIF de ratón utilizando el programa de diseño de oligonucleótidos que utiliza la versión Oligo 4.0. Específicamente, los cebadores fueron los siguientes:

Cebador transcrito:	5'-ACGGTGCGTGGAAGGAAAAGGAAGG-3'	(SEC. ID nº: 16)
Cebador complementario:	5'-CGCCAGGGATGGAAAAGTGCTTGTG-3'	(SEC. ID nº: 17).

Basadas en la información del cóntigo anterior, se predijo este conjunto de cebador para ampliar un fragmento de aproximadamente 1,9 kb.

Se realizaron las ampliaciones por RT-PCR en un volumen de 50 μl que contenía y los dNTP 200 μM, cada cebador de 0,5 μM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, 2 ng de ADNc de cerebro de ratón (ADNc del "clon rápido" de Clontech nº de catálogo 7130-1) y 5 unidades de Expand™ Hi-Fi ADN polimerasa (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Las reacciones por PCR se ampliaron utilizando un protocolo de temperatura de hibridación "Touch-down/Touch-up" (Snow *et al., Biochem. Biophy. Res. Comm.*, 233:770-777 (1997) y Snow *et al., Gene* 206:247-253 (1998)) en un ciclador térmico programable PTC-100 (MJ Research Inc.) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95ºC durante 40 s, 5 ciclos a 94ºC durante 20 s, 70ºC - 2º/ciclo durante 20 s, 72ºC durante 1 minuto y 19 s + 1 s/ciclo, seguido de 5 ciclos a 94ºC durante 25 s, 62ºC + 1ºC/ciclo durante 20 s, 72ºC durante 1 minuto y 30 s + 1 s/ciclo, seguido de 20 ciclos a 94ºC durante 25 s, 66ºC durante 20 s, 72ºC durante 1 minuto y 40 s + 1 s/ciclo y una incubación final de 72ºC durante 5 minutos. Los productos de PCR de ~1,9 kb resultantes se purificaron en gel a continuación a partir de un gel de agarosa al 1,0% utilizando el sistema de purificación en gel QiaQuick (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA), TA clonado en pCR2.1 utilizando el kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, San Diego, CA, nº de catálogo K4550-40) y se transformaron en células TOP10F' de *E. coli*. Se preparó ADN de plásmido utilizando el kit Plasmid Miniprep de Qiagen (Qiagen Inc. Mississauga, ON, nº de catálogo 12125). Se obtuvo la secuencia de la inserción utilizando el secuenciado del didesoxi-nucleótido fluorescente y detección automática (AB1/Perkin Elmer, Foster City, CA).

Se diseñaron también cuatro cebadores de secuenciado, que ayudarían a secuenciar el marco de lectura abierto del ADNc del AIF de ratón. Los cebadores de secuenciado fueron los siguientes:

Transcrito:	5' TCAGTTCCTCAGATCAGGGCACC-3'	(SEC. ID nº: 18)
Complementario:	5' AAAAACACCAACTGTGGGCAAAC-3'	(SEC. ID nº: 19)
Transcrito:	5' CATCGATAGGGCTGGAGCAGAGG-3'	(SEC. ID nº: 20)
Complementario:	5' TTTCCATGGTCCAGTTGCTGAGG-3'	(SEC. ID nº: 21)

El pCR2.1-mus-AIF.B1B (ADN nº 9.806.532) se secuenció y se determinó que era la secuencia perfecta al 100% por alineación con el cóntigo EST del AIF de ratón, que se había montado y por alineación con otro clon de AIF de cerebro de ratón por RT-PCR independiente: pCR2.1-musAIF.A1A (ADN nº 9.806.531). Se comprobaron todos los nucleótidos en el clon pCR2.1-musAIF.B1B debido a que estaban presentes en el cóntigo EST del AIF de ratón, que había sido montado o en el pCR2.1-musAIF.A1A que procedía de una reacción por RT-PCR independiente. Se predijo el pCR2.1-mus-AIF.B1B para codificar un polipéptido de 612 aminoácidos con un peso molecular previsto de 66.689 kDa. La secuencia del ADNc se indica en la SEC. ID nº: 1, mientras que la secuencia de aminoácidos prevista para el AIF de ratón en la SEC. ID nº: 2, con la secuencia de aminoácidos de la proteína madura indicada en la SEC. ID nº: 3.

Polipéptido del AIF recombinante

El mAIF activado por tiorredoxina, así como varios mutantes por deleción del AIF generados (con el fin de determinar la secuencia activa de la proteína) por escisión de las secuencias del ADN con BamH1 (aminoácidos nº D180-638), NcoI (aminoácidos nº D1-377) o HindIII (aminoácidos nº D563-638) se expresaron en un vector de expresión bacteriano pET32 de Novagen y se purificaron en cuerpos de inclusión de *E. coli* (véanse las Figs. 3 y 4 para los datos que implican la utilización de estos mutantes por deleción). Se replegaron las proteínas en la matriz de afinidad de Nickel NTA y se almacenaron en HEPES 50 mM, pH 7,9, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM y glicerol al 10%.

Ejemplo 2

Antisuero del AIF, inmunotransferencias, inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica e inmunorreducción

Con el fin de determinar la expresión en la proteína del AIF a través de una variedad de tejidos, se generaron antisueros de conejo contra una mezcla de los tres péptidos del AIF y se sometieron a los métodos de deleción indicados a continuación.

Específicamente, se generó antisuero de conejo contra una mezcla de 3 péptidos procedente de la secuencia de aminoácidos del mAIF (aminoácidos nº 151-170, 166-185, 181-200, acoplados a KLH). Este antisuero (título de ELISA ~10.000) se utilizó en inmunotransferencias (1/2.000) y en células 1 de rata (1/250) fijadas con paraformaldehído/ácido picrílico [Bossy-Wetzel *et al., EMBO J.* **17**:37-49 (1998)] y se revelaron con un IgG anticonejo de cabra conjugado con peroxidasa o FITC (fluorescencia verde), respectivamente. El citocromo *c* se detectó por inmunofluorescencia (mAb 6H2.B4 de Pharmingen) en células 1 de rata fijadas transfectadas con un vector de referencia (Neo) o con Bcl-2 humano [Zhu *et al., EMBO J.* **15**:4130-4141 (1996)] descrita [Bossy-Wetzel *et al., EMBO J.* **17**:37-49 (1998)], mientras que el colorante CMXRos sensible a DY_m (100 nM, fluorescencia roja) se utilizó en células vivas [Marzo *et al., Science* **281**, 2027-2031 (1998)]. Se tiñeron las células por contraste con el colorante Hoechst 33342 (1 μM, fluorescencia azul). Se realizó la microscopía inmunoelectrónica utilizando una Ig anti-conejo (5 nm) de Immunogold para revelar la presencia de proteínas que reaccionan con el antisuero anti-AIF. La inmunoeliminación de AIF se consiguió inmovilizando el antisuero (o un suero preinmune) en perlas de agarosa con proteína A y proteína g (Santa Cruz Biotechnology: 500 μl de antisuero por ml de perlas) e incubación durante la noche de proteínas de la intermembrana mitocondrial (100 μg/ml) con estas perlas (20 μl de fluido con 10 μl de perlas de relleno) en presencia o ausencia de péptidos inmunógenos (5 μM).

Ejemplo 3

Fraccionamiento subcelular y sistemas de apoptosis exentos de células

Se utilizaron los siguientes métodos en los estudios para determinar la localización subcelular del AIF, así como para la determinación del efecto de AIF sobre el orgánulo celular en un sistema exento de células.

Células de hibridoma de linfocitos T 2B4.11 transfectadas de manera estable con el vector SFFV.neo que contenía el gen bcl-2 humano o el gen con resistencia a la neomicina (Neo) solamente [Susin *et al., J. Exp. Med.* **184**:1331-1342 (1996)] se sometieron a lisis mecánica y centrifugación diferencial para la recuperación subsiguiente de núcleos, mitocondrias y citosoles exentos de orgánulos [Liu *et al., Cell* **86**:147-157 (1996)]. Se controló el fraccionamiento submitrocondrial de las mitocondrias de hígado de ratón mediante la determinación de enzimas marcadoras adecuadas [Susin *et al., J. Exp. Med.* **186**:25-37 (1997); Pedersen *et al., Meth. Cell Biol.* **20**:411-481 (1978)]. Los núcleos de las

células HeLa purificadas se expusieron a diferentes preparaciones de AIF, y se cuantificó la apoptosis nuclear mediante tinción con yoduro de propidio intercalando ADN y determinación citofluorométrica del contenido en ADN [Susin *et al., J. Exp. Med*. **186**:25-37 (1997)]. Alternativamente, los núcleos se tiñeron con colorante 33342 de Hoechst o se sometieron a extracción del ADN y electroforesis en gel con campo pulsado. Se expusieron mitocondrias de hígado de rata aislados (0,5 mg de proteína mitocondrial/ml) a citosol exentos de mitocondrias (100 μg de proteína/ml) [Susin *et al., J. Exp. Med*. **186**:25-37 (1997); Enari *et al., EMBO J*. **14**:5201-5208 (1995)] y/o AIF recombinante (100 ng/ml), mientras se controla la dilatación de gran amplitud a una DO_{540}. La liberación del citocromo *c* y de caspasa-9 en el sobrenadante se midió por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-citocromo *c* monoclonal (7H8.2C12, Pharmingen), o un anticuerpo de conejo dirigido contra la subunidad grande de caspasa (Hazelton Research Products Inc., Denver, PA).

Ejemplo 4

Microinyección, transfección y cuantificación de la apoptosis

Se microinyectaron células de fibroblasto 1 de rata (presión 150 hPa; 0,2 s; Marzo *et al., Science* **281**:2027-2031 (1998)) con tampón solamente, atractilosida (50 μM), antisuero dializado, péptidos derivados de AIF (100 μM), citocromo *c* de caballo (Sigma), o la dosis indicada de mAIF recombinante. Se añadió el inhibidor Z-VAD.fmk de caspasa (100 μM; Bachem, Basel, Suiza) al medio de cultivo 30 min. antes de la microinyección en el citoplasma (presión 150 hPa; 0,2 s). Tras la microinyección, se cultivaron las células durante 90-180 min. y se tiñeron durante 10 min. con colorante CMXRos, 33342 de Hoechst, o anexina V conjugada con biotina (Boehringer Mannheim) y se revelaron mediante un conjugado de avidina-ficoeritrina (Sigma). Las células viables microinyectadas (100 a 200 por sesión, dos a tres sesiones independientes de inyección) se identificaron mediante la inclusión del FITC-dextrano (fluorescencia verde) al 0,25% (p:v) en el inyectable. Únicamente se registró la fluorescencia azul o roja. La transfección de células de linfoma T de Jurkat se realizó utilizando AIF clonadas en el vector pcADN3.1 (Invitrogen) y Lipofectamina® (Gibco Life Technologies). Los análisis citofluorométricos de los parámetros asociados a la apoptosis se realizaron como se describe [Kroemer *et al*., "Detection of apoptosis and apoptosis associated alterations" *The Immunology Methods Manual* (Lefkovitz, R. ed.); Academic Press, capítulo 14.2, págs. 1111-1125 (1997)].

Ejemplo 5

Identificación de isoformas alternativas de mAIF

El análisis de la secuencia del otro clon EST del AIF de ratón [CR2.1-musAIF.A1A (ADN nº 9.806.531 de Amgen) y de otro clon parcial de AIF de ratón: pCR2.1-musAIF-ORF.B parcial (ADN nº 9.804.781 de Amgen) puso de manifiesto que el terminal N del AIF de ratón contiene una secuencia de codificación alternativa que se obtiene supuestamente por consumo de exón alternativo. El clon pCR2.1-musAIF-ORF.B parcial del AIF parcial de ratón (ADN nº 9.804.781 de Amgen) del AIF parcial de ratón se amplió en el ADNc de cerebro de ratón utilizando los cebadores:

cebador transcrito nº 1.874-21:

5'GAGCCACGTGGTCTGTTTGACCCGTTCG-3' (SEC. ID nº: 22)

cebador complementario nº 1.874-22:

5'GGAGTTCTGCATTTACCCGGAAGCCACC-3' (SEC. ID nº: 23)

Se realizaron las ampliaciones por RT-PCR en un volumen de 50 μl que contenía y los dNTP 200 μM, cada cebador de 0,5 μM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, 2 ng de ADNc de cerebro de ratón (ADNc del "clon rápido" de Clontech nº de catálogo 7130-1) y 5 unidades de Expand™ Hi-Fi ADN polimerasa (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Las reacciones por PCR se ampliaron utilizando un protocolo de temperatura de hibridación "Touch-down/Touch-up" (Snow *et al., Biochem. Biophy. Res. Comm*., 233:770-777 (1997) y Snow *et al., Gene* 206:247-253 (1998)) en un ciclador térmico programable PTC-100 (MJ Research Inc.) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95ºC durante 40 s, 5 ciclos a 94ºC durante 20 s, 67ºC - 2º/ciclo durante 20 s, 72ºC durante 59 segundos + 1 s/ciclo, seguido de 5 ciclos a 94ºC durante 25 s, 63ºC + 1ºC/ciclo durante 20 s, 72ºC durante 1 minuto y 20 s + 1 s/ciclo, seguido de 20 ciclos a 94ºC durante 25 s, 59ºC + 1ºC/ciclo durante 20 s, 72ºC durante 1 minuto y 7 s + 1 s/ciclo y una incubación final de 72ºC durante minutos. Los productos de PCR de ~1,35 kb resultantes se purificaron en gel a continuación a partir de un gel de agarosa al 1,0% utilizando el sistema de purificación en gel QiaQuick (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA), TA clonado en pCR2.1 utilizando el kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, San Diego, CA, nº de catálogo K4550-40) y se transformaron en células TOP10F' de *E. coli*. Se preparó ADN de plásmido utilizando el kit Plasmid Miniprep de Qiagen (Qiagen Inc. Mississauga, ON, nº de catálogo 12125). Se obtuvo la secuencia de la inserción utilizando el secuenciado del didesoxi-nucleótido fluorescente y detección automática (ABI/Perkin Elmer, Foster City, CA).

Aunque la función de este exón alternativo es desconocida en el momento presente, no se cree que sea producto artificial porque se obtuvieron dos clones de RT-PCR idénticos independientes de este exón alternativo. La codificación

del ADNc para esta isoforma se indica en la SEC. ID nº: 4 con el conjunto de aminoácidos previsto indicado en la SEC. ID nº: 5, mientras que la secuencia de aminoácidos de la proteína madura se indica en la SEC. ID nº: 6.

Ejemplo 6

Clonación molecular del AIFh

La búsqueda en BLAST de la base de datos no redundante NCBI con el marco de lectura abierto de AIFm puso de manifiesto que la secuencia de ADN genómica del AIF humano (AIFh) ortólogo estaba presente en la base de datos en PAC 179D3 (EMBL nº Z81364 y EMBL nº 81370). Utilizando la secuencia genómica como plantilla, se diseñaron los cebadores de AIF que flanqueaban el marco de lectura abierto y son los siguientes:

Cebador transcrito nº 1967-28:

5'-GAGAGGAAAGGGAAGGAGGAGGTC-3' (SEC. ID nº: 24)

Cebador complementario nº 1967-29:

5'-TTGCCAATTCCACTGTGGGGCTTC-3' (SEC. ID nº: 25)

Se clonó AIF humano del ADNc de la retina humana. Se disecaron retinas humanas de ojos humanos completos adquiridos en el banco de ojos de Canadá (Toronto, ON). Se preparó ARN completo procedente del tejido de retina humana utilizando el reactivo TRIzol™ de aislamiento del ARN total (Gibco BRL, Life Technologies Incorporated, nº de cat. 15596-018) según las instrucciones del fabricante. ADNc de la primera cadena procedente del ARN completo de la retina humana se preparó utilizando cebadores oligo-dT y el kit de síntesis SuperscriptII del ADNc de la primera cadena (Gibco BRL, Burlington, OH) según las instrucciones del fabricante. Se realizaron las ampliaciones por RT-PCR utilizando el sistema de PCR (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania nº de catalizador. 1732650) en un volumen de 50 μl que contenía los dNTP 200 μM, cada cebador de 0,5 μM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, 2 ng de oligo-dT cebador de ADNc de retina humana y 5 unidades de Expand™ Hi-Fi ADN polimerasa (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Las reacciones por PCR se ampliaron utilizando un protocolo de temperatura de hibridación "Touch-down/Touch-up" (Snow *et al., Biochem. Biophy. Res. Comm*., 233:770-777 (1997) y Snow *et al., Gene* 206:247-253 (1998)) en un ciclador térmico programable PTC-100 (MJ Research Inc.) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95ºC durante 40 s, 5 ciclos a 94ºC durante 20 s, 69ºC - 2º/ciclo durante 20 s, 72ºC durante 2 minutos + 1 s/ciclo, seguido de 5 ciclos a 94ºC durante 25 s, 61ºC + 1ºC/ciclo durante 20 s, 72ºC durante 2 minuto y 33 s + 1 s/ciclo, y una incubación final de 72ºC durante 5 minutos. Los productos de PCR de ~1,9 kb resultantes se purificaron en gel a continuación a partir de un gel de agarosa al 1,0% utilizando el sistema de purificación en gel QiaQuick (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA), TA clonado en pCR2.1 utilizando el kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, San Diego, CA, nº de catálogo K4550-40) y se transformaron en células TOP10F' de *E. coli*. Se obtuvo la secuencia de la inserción utilizando el secuenciado del didesoxi-nucleótido fluorescente y detección automática (ABI/Perkin Elmer, Foster City, CA).

Se secuenciaron dos clones de ADNc del AIF humano: pCR2.1-hAIF-G.inferior.14 (ADN nº 9.812.239) y pCR2.1-hAIF.E11 (ADN nº 9.812.238). La alineación de los clones del ADNc del AIFh (que procedían de reacciones RT-PCR independientes en la retina humana) con cada otro y con las secuencias genómicas del AIFh del cromosoma X (EMBL nº Z81364) permitió una determinación de la secuencia de consenso correcta para ADNc del AIF humano que comprende el marco de lectura abierto.

Se predijo que el ADNc del AIFh para codificar un polipéptido de 613 aminoácidos con un peso molecular previsto de 66.824 kDa. La alineación de los polipéptidos del AIF humano y de ratón puso de manifiesto que eran 92% idénticos. El ADNc que codifica el AIFh se indica en la SEC. ID nº: 7, con la secuencia de aminoácidos del AIFh prevista indicada en la SEC. ID nº: 8, mientras que la secuencia de aminoácidos de la proteína hAIF madura se indica en la SEC. ID nº: 9.

Ejemplo 7

Identificación de isoformas alternativas de AIFh

Una búsqueda en BLAST de la base de datos de EST N.C.B.I. con la zona del AIFm que contiene la secuencia exónica alternativa identificó un EST humano (GenBank nº H15605), que también contenía una zona de codificación alternativa. La codificación del ADNc para esta forma alternativa de AIFh se indica en la SEC. ID nº: 10, con la secuencia de aminoácidos prevista indicada en la SEC. ID nº: 11, mientras que la secuencia de aminoácidos de la forma madura se indica en la SEC. ID nº::12.

La alineación de los dos clones humanos del ADNc del AIF, que se secuenciaron, pCR2.1-AIFh-Ginferior.14 (ADN nº 9.812.239) y pCR2.1-AIFh.E11 (ADN nº 9.812.238), puso de manifiesto que era posible el salto del exón en pCR2.1-AIFh-Glower.14 (ADN nº 9.812.239). Esta zona del salto del exón corresponde exactamente a la zona donde tiene lugar el corte y empalme alternativo en los ADNc del AIF tanto de ratón como humano. Dicho descubrimiento

significaría que el exón se corta y empalma completamente o se corta y empalma alternativamente para contener una de las dos secuencias exónicas tanto en el ratón como en el hombre. El ADNc que codifica esta segunda forma alternativa de AIFh se indica en la SEC. ID nº: 13, con la secuencia de aminoácidos prevista indicada en la SEC. ID nº: 14, mientras que la secuencia de aminoácidos de la forma madura está indicada en la SEC. ID nº: 15.

Ejemplo 8

Construcción del ADNc del AIFh completo

La secuencia al 100% del ADNc del AIF humano perfecto se montó en los dos clones de RT-PCT independientes que se habían secuenciado como se describió en la presente memoria. pCR2.1-AIFh-G-inferior.14 (ADN nº 9.812.239), que mostraba el salto del exón del exón alternativo en el terminal N, se cortó con 20 unidades de BamH1 en 1 × tampón B (Boehringer Mannheim) durante 2 horas a 37ºC, liberando de este modo un fragmento con terminal C de 1447 bp. El pCR2.1-AIFh.E11, que contenía el terminal N de la secuencia verificado del AIF humano, se cortó con 20 unidades de BamH1 en 1 × tampón B (Boehringer Mannheim) durante 2 horas, se inactivó térmicamente durante 3 minutos a 85ºC, se enfrió a temperatura ambiente durante 20 minutos, se diluyó con 400 μl de 1 × tampón T.E. en una unidad de filtración UltraFree®-MC 30.000 NMWL (nº de cat. Millipore UFC3LTKNB) y se centrifugó a 1960 × g en una centrifugadora Eppendorf 5417C durante 6 minutos hasta que quedó un volumen de ~25 μl.

Los 25 μl del pCR2.1-AIFh.E11 cortado con BamH1 se desfosforilaron a continuación con 0,1 unidades de fosfatasa alcalina intestinal de ternera (Pharmacia Biotech Inc., nº de catálogo 27-0620) durante 30 minutos a 37ºC. Las reacciones se electroforizaron a continuación en un gel de agarosa al 1% y los productos apropiados se cortaron a continuación en el gel y se purificaron utilizando el sistema de purificación en gel de QiaQuick (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA). Se realizó la ligadura utilizando un kit de ligadura de ADN rápido (nº de cat. De Boehringer Mannheim 1.635.379) según las instrucciones del fabricante. 7 μl de la reacción de ligadura se transformaron en 80 μl de células XLI-Blue MR supercompetentes de Epicurian Coli® (Stratagene, La Jolla, CA, nº de catálogo 200.229) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 9

Células huésped de cultivo y producción de proteína recombinante

El vector de expresión pET32a (Novagen) que contenía el clon AIF de ratón se transformó en Ò BL21 (DE3) células huésped competentes de *Epicurian Coli (Escherichia coli*, Stratagene) descritas en el manual de instrucción de Stratagene. Se colocaron las células en placas con LB-agar-agar (placas de plástico de 9 mm) que contenían 50 μg de carbenicilina (Sigma, análogo de ampacilina) por ml de LB-agar-agar (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 ml de NaOH 1 N, 15 g de agar-agar, QS hasta 1 l) y se cultivaron durante la noche a 37ºC para seleccionar las células transformadas. Una única colonia de células transformadas se desechó de la placa y se cultivó en 50 ml de medio de agar-agar con LB (10 g de tristona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 ml de NaOH 1 N, QS hasta 1 l) que contenía 50 μg/ml de carbenicilina en (LB-carb) en un matraz Erlenmeyer tabicado de 500 ml, en agitación a 225 rpm durante la noche a 37ºC. Cuando las células alcanzaron una densidad óptica de 1,0 (a una longitud de onda de 600 nm, $D.O._{600}$) se añadió glicerol a la suspensión celular hasta una concentración final del 15% y las células se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80ºC. Una solución madre de glicerol se utilizó para inocular los medios para todos los cultivos de células huésped posteriores. Se inocularon 50 ml de medio LB-cab en un matraz Erlenmeyer tabicado de 500 ml con una pizca de la solución madre de glicerol y la suspensión celular se agitó a 225 rpm toda la noche a 37ºC. Se transfirió el 50 ml de cultivo a un matraz Erlenmeyer de vidrio de 6 l y se diluyó hasta 1,5 l de medio LB-carb y las células se cultivaron a 37ºC en agitación a 200 rpm en una incubadora con agitador. Se cultivaron las células hasta una $D.O._{600}$ = 0,60 ($D.O._{600}$ = 0,1 es equivalente a aproximadamente 10^8 células por ml de cultivo). A esta densidad la temperatura de la incubadora disminuyó hasta 22ºC y se dejaron enfriar los cultivos celulares a esta temperatura (con agitación) durante ½ hora. Después de 1 hora a la temperatura de cultivo inferior las células alcanzaron una $D.O._{600}$ = 0,8 y la expresión de T7 polimerasa se produjo añadiendo isopropil-b-D-tiogalactopiranósido (IPTG, Sigma) hasta una concentración final de 0,2 mM (el IPTG conduce al activador lacUV5 corriente arriba del gen de T7 polimerasa en el lisogen DE3, a su vez la polimerasa conduce a la expresión de la proteína de fusión tiorredoxina-AIF a través del activador de T7 potenciador lac en el vector pET32a). Las células estimuladas por IPTG se cultivaron durante 12 horas a 22ºC y se recogieron por centrifugación a 5.000 × g durante 15 minutos a 4ºC. El sedimento celular recogido (con un peso en número de aproximadamente 5,0 g) se lavó con 50 ml de PBS que contenía un comprimido de la mezcla inhibidora de proteasa disuelto (comprimidos exentos de EDTA completos de Boehringer Mannheim™) y pepstatina A (Boehringer Mannheim) a una concentración final de 2 μg/ml. Se volvieron a sedimentar las células y se congelaron en nieve carbónica.

Como referencia, el vector pET32a solo (menos el gen del AIF) se transformó en células huésped de *Escherichia coli* y la expresión de la etiqueta de tiorredoxina sola se produjo como se describió anteriormente para el AIF activado por tiorredoxina.

Ejemplo 10

Purificación de la proteína de fusión del AIF recombinante (completa)

Los sedimentos celulares congelados (que expresan la proteína de fusión tiorredoxina-AIF (trx-AIF) se volvieron a poner en suspensión en 50 ml (10 ml por g de peso en húmedo del sedimento) de tampón de lisis (HEPES-NaOH 25 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, imidazol 20 mM, 1 comprimido de la mezcla del inhibidor de proteasa disuelto por 50 ml de tampón, pepstatina A a 2 μg/ml y leupeptina a 2 μg/ml) y se homogeneizó con un homogeneizador de vidrio seguido de tratamiento con ultrasonidos utilizando una sonda de 1/4 de pulgada unida a un conjunto de procesador ultrasónico de 600 Watt (Vibro-cell) a una amplitud del 60%, pulsaciones de 5 segundos durante un tiempo total de 1 minuto en hielo. A menos que se indique de otro modo todas las etapas se realizaron a 4ºC o en hielo. El desecho celular insoluble se recogió por centrifugación a 16.800 × g durante 30 minutos. La proteína de fusión tiorredoxina-AIF quedó en el sedimento de centrifugación (únicamente una cantidad residual de trx-AIF se detectó en el sobrenadante mediante transferencia Western (utilizando un anticuerpo anti-trx monoclonal, véase a continuación para más detalles en SDS-PAGE y detalles de transferencia). Se aspiró el sobrenadante del sedimento y el sedimento se volvió a poner en suspensión en 50 ml de tampón de lisis guanidina-HCl (HEPES-NaOH 25 mM, pH 8,0, guanidina-HCl 6 M, Tris-HCl 10 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, imidazol 20 mM, 1 comprimido de la mezcla inhibidora de proteasa disuelta por 50 ml de tampón, pepstatina A a razón de 2 μg/ml y leupeptina a razón de 2 μg/ml). El sedimento se volvió a poner en suspensión en un tampón utilizando un homogeneizador Douce de vidrio y se mezcló el homogeneizado durante 15 minutos utilizando un Neutator (Clay Adams®). El material insoluble se sedimentó por centrifugación a 27.000 × g durante 30 minutos. El sobrenadante se pasó sobre una columna de afinidad superflow (QIAGEN) con NiNTA-agarosa de 1,5 × 3,0 cm equilibrada en tampón de lisis guanidina-HCl. Se cargó la columna y se resolvió a un caudal constante de 0,3 ml de solución por minuto. La columna cargada se lavó con 50 ml (10 volumenes de lecho de columna) de tampón de lavado de la columna NiNTA (HEPES-NaOH 25 mM, pH 8,0, guanidina-HCl 6 M, Tris-HCl 10 mM, β-mercaptoetanol 10 mM e imidazol 40 mM). Se utilizó un gradiente lineal de 50 ml para intercambiar el tampón de la columna desde el tampón de lavado guanidina-HCl hasta el tampón de urea (HEPES-NaOH 25 mM, pH 8,0, urea 6 M, Tris-HCl 10 mM, β-mercaptoetanol 10 mM e imidazol 50 mM).

La tiorredoxina-AIF se eluyó a continuación con NiNTA-agarosa pasando 50 ml de tampón de elución NiNTA (HEPES-NaOH 25 mM, pH 8,0, urea 6 M, Tris-HCl 10 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 50 mM, 1 comprimido de la mezcla inhibidora de proteasa disuelto por 50 ml de tampón, pepstatina A a razón de 2 μg/ml y leupeptina a razón de 2 μg/ml). La fracción de elución recogida se diluyó añadiendo 5 volúmenes (v/v) de tampón de dilución (HEPES-NaOH 25 mM, pH 8,0, urea 3 M, Tris-HCl 10 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, 1 comprimido de la mezcla inhibidora de proteasa disuelto por 50 ml de tampón, pepstatina A a razón de 2 μg/ml y leupeptina a razón de 2 μg/ml) y se dializó en 1 l de tampón de diálisis (HEPES-NaOH 25 mM, pH 7,0, β-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 1 mM y glicerol al 10%) utilizando entubado de membrana mwco Spectra/Por® 12-14. El tampón de diálisis se cambió cada 4 a 6 horas y se utilizó un total de 6 l de tampón de diálisis.

La muestra dializada se concentró por ultrafiltración utilizando una célula a presión de ultrafiltración Amicon y un filtro YM10 de Amicon bajo gas nitrógeno a 40 psi hasta una concentración final entre 1 y 4 mg/ml de proteína determinada utilizando el análisis BioRad de Bradford con IgG como referencia patrón (realizado como describe el fabricante).

Se identificó la proteína de fusión tiorredoxina-AIF como una banda de 98 kDa por SDS-PAGE y colorante azul de Coomassie que utiliza geles Tris/glicina con gradiente de archilamida del 10 al 20% de Novex y el aparato con gel de Novex. Para confirmar la identidad de la banda de 98 kDa, los geles resueltos se transfirieron a la membrana de PVDF (Boehringer Mannheim), la membrana se bloqueó con anticuerpos de tampón de bloqueo (crema de leche en polvo al 4%, Carnation, BSA al 1%, fracción V de Sigma, Tween 20 al 0,1% en solución salina tamponada con Tris) y proteína de fusión trx-AIF anti-trx (3H8-E11) de ratón o anti-AIF (J53) de conejo seguido de conjugados de IgG-HRP (peroxidasa de rábano picante) anti-ratón/conejo de asno/cabra (Amersham). Los conjugados de HRP se detectaron en película X-omatic Blue XB-1 de Kodak utilizando reactivos para detección de transferencia Western ECL como se esbozó por el fabricante (Amersham Life Sciences). Un total de 1,0 mg de proteína soluble replegada se recuperó por cada 1 l de cultivo celular.

Un polipéptido del factor inductor de la apoptosis de mamífero (AIF), que basta para estimular la apoptosis de núcleos aislados, se ha identificado y clonado. Este factor omnipresente con homología con las oxidorreductasas bacterianas está confinado normalmente con mitocondrias y se libera en la inducción de la apoptosis como una proteína de 57 kDa que se traslada al núcleo. El AIF recombinante produce núcleos aislados que experimentan condensación de cromatina y fragmentación del ADN a gran escala (~50 kbp). Además, produce mitocondrias purificadas que liberan citocromo *c* y caspasa-9. La microinyección de la proteína del AIF recombinante en las células sanas o la sobreexpresión forzada por transfección de AIF produce la condensación de cromatina, la disipación del potencial de transmembrana mitocondrial (DY_m) y la exposición a la fosfatidilserina de la membrana plasmática. Ninguno de estos efectos evita el inhibidor Z-VAD.fmk de caspasa de amplio espectro. La sobreexpresión de Bc1-2 impide la liberación de AIF de las mitocondrias, pero no tiene efecto sobre la capacidad de AIF para estimular la apoptosis nuclear. Estos datos, dados a conocer en la presente memoria, demuestran a AIF como un nuevo efector mitocondrial de la muerte celular apoptósica. En vista de la capacidad de AIF para estimular la apoptosis, la administración de AIF (o análogos, homólogos o variantes de los mismos que posee actividad similar a AIF) es de esperar que sea útil en el tratamiento y control de numerosas enfermedades neoplásicas. La reducción de la actividad del polipéptido del AIF (desarrollando

antagonistas, inhibidores, utilización de anticuerpos neutralizantes o moléculas complementarias, todas producidas como se describe en la presente memoria) debería dar como resultado la disminución de la apoptosis. Dicha actividad puede ser deseable para el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas que han sido relacionadas con la estimulación de la apoptosis.

Ejemplo 11

Identificación de compañeros de enlace para AIF

Para identificar compañeros de enlace destinados al AIF de mamífero, puede utilizarse un sistema de ensayo híbrido con dos levaduras. El ensayo híbrido con dos levaduras se basa en el hecho de que muchos activadores eucarióticos de transcripción se componen de dos dominios operativamente independientes, físicamente separables. La proteína activadora de transcripción de la levadura GAL4, por ejemplo, contiene un dominio de enlace al ADN (GAL4-DB) y un dominio activador de la transcripción (GAL4-TA). El GAL4-DB reconoce y se une a una secuencia (UAS), en las zonas corriente arriba de los genes sensibles a GAL4, mientras que GAL4-TA interactúa con otros componentes de la maquinaria de transcripción necesaria para iniciar la transcripción. Se requieren ambos dominios para activar un gen y, normalmente, los dos dominios son parte de la misma proteína. Sin embargo, si los dos dominios están físicamente separados (por ejemplo, por medio de la tecnología del ADN recombinante) y se expresan en la misma célula huésped, los péptidos GAL4-DB y TA no interactúan directamente entre sí y pueden activar genes sensibles (Ma *et al., Cell* **51**:443-446 (1988)):

En un sistema híbrido de dos levaduras, se utilizan dos vectores de clonación diferentes para generar fusiones independientes de estos dominios GAL4 que potencialmente interactúan entre sí. Las proteínas híbridas recombinantes (híbridas del dominio GAL4 y una proteína de unión potencial) se expresan conjuntamente en la levadura y se dirigen al núcleo de la levadura. Si los fragmentos que no son de GAL4 de los dos tipos de híbrido interactúan entre sí, el GAL4-DB estará ligado a GAL4-TA. Como resultado de esta interacción el activador de transcripción GAL4 se reconstituirá operativamente y activará la transcripción de los genes indicadores que presentan puntos de fijación a GAL4 corriente arriba haciendo detectable fenotípicamente la interacción proteína-proteína. El sistema híbrido de dos levaduras se ha utilizado ya sea para cribar bancos para un(os) gen(es) que codifica(n) una(s) proteína(s) nueva(s) que interactúa(n) con una proteína diana conocida o para analizar dos proteínas clonadas previamente, conocida para interacción (Chien *et al., Proc. Natl. Acad. Sci*. **88**:9578-9583 (1991), incorporada a la presente memoria como referencia).

Para utilizar el sistema de dos híbridos de levadura para aislar e identificar nuevas proteínas de unión al AIF, se clona un ADN del AIF de mamífero completo en el vector pAS-1 para generar una fusión entre la proteína diana, AIF, y el dominio de enlace al ADN de GAL4. Esto crea el "señuelo", la proteína de fusión híbrida GAL4-AIF. Esta cepa de levadura (Y153), (Bai y Elledge, Methods *in Enzymol*. **273**:331-347 (1996)) se utiliza para la transformación y contiene ambos genes indicadores HIS3 y lacZ dirigidos por activadores que contienen puntos de fijación a GAL4 y se elimina para GAL4 endógeno (Bai *et al., Methods in Enzymol*. **273**:331-347 (1996)). Los clones de levadura transformados con GAL4-AIF de pAS-1, son cribados para la expresión de la proteína de fusión GAL4-AIF mediante el análisis de transferencia Western de los lisados de levadura utilizando los anticuerpos anti-AIF monoclonales o policlonales (véase anteriormente). En los clones que expresan a GAL4-AIF se analiza la activación de la transcripción del gen HIS3 basándose en su capacidad para desarrollarse en el medio de His y se analiza la activación de la transcripción de *lacZ*, midiendo la actividad de b-gal utilizando un análisis colorimétrico. En un intento para cribar las moléculas que se unen al "señuelo" AIF-proteína, se obtiene un banco de ADNc del plásmido de los restantes linfocitos T murinos (Staudinger *et al., J. Biol. Chem*. **268**:4608-4611 (1993). En este banco, el ADNc obtenido de los linfocitos T restantes se fusiona con el dominio de activación de la transcripción de GAL4, GAL4-TA. Asimismo, se utiliza un banco de la fusión GAL4-TA de embrión de ratón (Clontech, Palo Alto, CA) para transformar los montajes de la fusión GAL4-AIF DB que llevan levadura. Los bancos de ADNc se transfectan en levaduras que llevan los montajes de la fusión AIF-GAL4 DB y se seleccionan los clones en medio His enriquecido con aminotriazol 20 mM. Tras 72 horas, se preparan las réplicas de nitrocelulosa de las colonias transfectadas y se analiza la actividad de b-galactosidasa directamente por un método bien conocido en la técnica. Sambrook *et al*., *supra*. De los 6×10^6 clones cribados del banco de linfocitos T y de los 3×10^6 clones cribados del banco de embrión de ratón, se seleccionaron cuarenta y dos clones positivos y los ADNc aislados. En los ADNc aislados se comprobó el tamaño de la inserción y se introdujeron en una segunda cepa de levadura (Y 187) (Bai y Elledge, *Methods in Enzymol*. **273**:331-347 (1996)). La finalidad de esta etapa es doble, en primer lugar en el ADNc aislado puede analizarse la actividad de b-gal sola, o cuando se cruza con una levadura que lleva GAL-AIF o GAL4 puede fusionarse con otras proteínas no relacionadas. Esto elimina cualquier falso positivo. Se analiza la actividad de b-gal en los cruzamientos entre Y153 que lleva el plásmido GAL4-AIF e Y187 que lleva la fusión GAL4-ADNc para confirmar los clones positivos. Después de este procedimiento, se eliminan los clones como falsos positivos. Los clones se clasifican en falsos positivos si eran positivos para la actividad de b-gal o de si mismos o cuando se cruzan con Y153 que lleva el dominio de enlace del ADN solo.

Los clones restantes aislados en esta primera ronda de cribado se clasifican interactuando específicamente con el AIF basándose en los siguientes criterios: 1) la levadura que expresa tanto al ADNc como a las proteínas híbridas de AIF son capaces de desarrollarse en el medio His y son positivas para la actividad de b-gal; 2) el ADNc aislado transformado en Y187 son negativos para la activación de HIS3 y *lacZ* cuando se cruzan con la levadura que lleva el dominio de enlace del ADN de GAL4 solo; y 3) cuando se cruzan con Y153, que contiene GAL4-AIF, se reestablece

la capacidad para transactivar ambos montajes indicadores, pero el cruce de los montajes de ADNc con otras fusiones de GAL4 no produjo la activación de la transcripción.

Se realiza también el cribado de un banco cebado al azar procedente de un embrión de ratón (día 11,5) (disponible en el mercado en Clontech). La utilización de un banco cebado aleatorio permite la detección de proteínas de enlace al AIF, que requieren las secuencias con amino terminal para el enlace. Asimismo, utilizando un banco de un tejido diferente, se detectaron los ADNc no representados en el banco de linfocitos T. Por último, el aislamiento con repetición de las moléculas relacionadas de dos bancos diferentes apoya la legitimidad de la interacción que se está detectando.

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido aislado que codifica un factor inductor de apoptosis de mamífero, seleccionándose dicho polinucleótido de entre el grupo constituido por ADNc y ADN sintetizado químicamente, en el que el factor inductor de apoptosis de mamífero es el factor inductor de apoptosis murino, y en el que el factor inductor de apoptosis murino comprende la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC. ID. nº: 2 o en la SEC. ID. nº: 3.

2. Polinucleótido aislado que codifica un factor inductor de apoptosis de mamífero, seleccionándose dicho polinucleótido de entre el grupo constituido por ADNc y ADN sintetizado químicamente, en el que el factor inductor de apoptosis de mamífero es una isoforma del factor inductor de apoptosis murino, y en el que dicha isoforma del factor inductor de apoptosis murino comprende la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC. ID. nº: 5 o en la SEC. ID. nº: 6.

3. Polinucleótido aislado que codifica un factor inductor de apoptosis de mamífero, seleccionándose dicho polinucleótido de entre el grupo constituido por ADNc y ADN sintetizado químicamente, en el que el factor inductor de apoptosis de mamífero es el factor inductor de apoptosis humano, y en el que el factor inductor de apoptosis humano comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEC. ID. nº: 8 o en la SEC. ID. nº: 9.

4. Polinucleótido aislado que codifica un factor inductor de apoptosis de mamífero, seleccionándose dicho polinucleótido de entre el grupo constituido por ADNc y ADN sintetizado químicamente, en el que el factor inductor de apoptosis de mamífero es una isoforma del factor inductor de apoptosis humano, y en el que dicha isoforma del factor inductor de apoptosis humano comprende la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC. ID. nº: 11 o en la SEC. ID. nº: 12.

5. Polinucleótido aislado que codifica un factor inductor de apoptosis de mamífero, seleccionándose dicho polinucleótido de entre el grupo constituido por ADNc y ADN sintetizado químicamente, en el que el factor inductor de apoptosis de mamífero es una isoforma del factor inductor de apoptosis humano y en el que dicha isoforma del factor inductor de apoptosis humano comprende la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC. ID. nº: 14 o en la SEC. ID. nº: 15.

6. Polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que presenta por lo menos 70 por ciento de identidad sobre la longitud total para los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en una de las SEC. ID nº: 2, nº 3, nº 5, nº 6, nº 8, nº 9, nº 11, nº 12, nº 14, y nº 15.

7. Polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que presenta por lo menos el 75 por ciento de identidad sobre la longitud total para los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en una de las SEC. ID nº: 2, nº 3, nº 5, nº 6, nº 8, nº 9, nº 11, nº 12, nº 14, y nº 15.

8. Polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que presenta por lo menos el 80 por ciento de identidad sobre la longitud total para los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en una de las SEC. ID nº: 2, nº 3, nº 5, nº 6, nº 8, nº 9, nº 11, nº 12, nº 14, y nº 15.

9. Polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que presenta por lo menos el 85 por ciento de identidad sobre la longitud total para los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en una de las SEC. ID nº: 2, nº 3, nº 5, nº 6, nº 8, nº 9, nº 11, nº 12, nº 14, y nº 15.

10. Polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que presenta por lo menos el 90 por ciento de identidad sobre la longitud total para los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en una de las SEC. ID nº: 2, nº 3, nº 5, nº 6, nº 8, nº 9, nº 11, nº 12, nº 14, y nº 15.

11. Polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que presenta por lo menos el 95 por ciento de identidad para los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en una de las SEC. ID nº: 2, nº 3, nº 5, nº 6, nº 8, nº 9, nº 11, nº 12, nº 14, y nº 15.

12. Polinucleótido aislado que codifica un factor inductor de apoptosis de mamífero, seleccionándose el polinucleótido de entre el grupo constituido por:

(a) las moléculas de ADN expuestas en las SEC. ID nº: 1, nº 4, nº 7, nº 10, y nº 13;

(b) las moléculas de ADN que se hibridan, en condiciones de alta severidad, con las moléculas de ADN definidas en (a); y

(c) las moléculas de ADN que codifican una expresión para los aminoácidos codificados por cualquiera de las moléculas de ADN anteriores.

13. Ácido nucleico hibridable marcado de manera detectable, en condiciones de alta severidad con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Vector de clonación que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

16. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, asociado operativamente a una secuencia de control de expresión.

17. Vector de expresión según la reivindicación 16, en el que dicha secuencia de control de expresión se selecciona de entre el grupo constituido por activadores precoces inmediatos de citomegalovirus humano (CMVh), activadores precoces de SV-40, activadores precoces de adenovirus, activadores precoces de polioma virus, activadores tardíos de SV-40, activadores tardíos de virus de la vacuna, activadores tardíos de polioma virus, LTR retrovírico, activadores inducibles, activadores del sistema *TAC*, activadores del sistema *trp*, activadores del sistema *TRC*, operadores principales y las zonas activadoras del fago lambda, zonas de control de la proteína de recubrimiento fd, activador de la 3-fosfoglicerato cinasa, activador de la fosfatasa ácida, activadores del factor de α-emparejamiento de levadura.

18. Célula huésped unicelular transformada con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

19. Huésped unicelular según la reivindicación 18, en el que la célula huésped se selecciona de entre el grupo constituido por *E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces*; levadura, y células CHO, R11, B-W, LM, CO5 1, CO5 7, BSC1, BSC40, BMT10 y SF9.

20. Huésped unicelular según la reivindicación 19, en el que el huésped unicelular es una levadura seleccionada de entre el grupo constituido por *Saccharomyces, Pichia, Candida, Hansenula y Torulopsis*.

21. Célula de mamífero que contiene un factor inductor de apoptosis de mamífero que codifica un ADN según las reivindicaciones 1 a 12, modificada con el fin de permitir la expresión superior de un factor inductor de apoptosis mediante un episodio recombinatorio homólogo que consiste en insertar una secuencia reguladora de la expresión en proximidad funcional al factor inductor de apoptosis de mamífero que codifica un ADN.

22. Célula de mamífero según la reivindicación 21, en la que la secuencia reguladora de la expresión insertada no es una secuencia reguladora de la expresión del factor inductor de apoptosis.

23. Procedimiento para la producción de un polipéptido del factor inductor de apoptosis codificado por el polinucleótido según las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

(a) cultivar una célula huésped según las reivindicaciones 18 ó 21 en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido del factor inductor de apoptosis; y

(b) recuperar el polipéptido del factor inductor de apoptosis expresado.

24. Ácido nucleico aislado que codifica un análogo de por lo menos el 70 por ciento de identidad con un factor inductor de apoptosis de mamífero que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC. ID. nº: 3 o SEC. ID. nº: 9, en el que uno o más aminoácidos, en las posiciones del polipéptido que no son esenciales para la estructura o función, se seleccionan de entre el grupo constituido por los aminoácidos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 140, 141, 143, 144, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 24, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 3115, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 451, 452, 453, 455, 456, 457, 458, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490,

491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611 y 612, se sustituye por otro aminoácido.

25. Factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado, codificado por el polinucleótido según la reivindicación 1.

26. Factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado, codificado por el polinucleótido según la reivindicación 2.

27. Factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado, codificado por el polinucleótido según la reivindicación 3.

28. Factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado, codificado por el polinucleótido según la reivindicación 4.

29. Factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado, codificado por el polinucleótido según la reivindicación 5.

30. Factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC. ID. nº: 9, en la que uno o más aminoácidos de entre las posiciones 1 a 612 se sustituye por el aminoácido en las posiciones 1 a 612 alineadas de la SEC. ID. nº: 3.

31. Anticuerpo que se une específicamente al factor inductor de apoptosis humano según las reivindicaciones 27, 28, 29 ó 30.

32. Anticuerpo que se une específicamente al factor inductor de apoptosis murino según las reivindicaciones 25 ó 26.

33. Anticuerpo según la reivindicación 31, que es un anticuerpo monoclonal.

34. Anticuerpo según la reivindicación 32, que es un anticuerpo monoclonal.

35. Derivado del factor inductor de apoptosis de mamífero según las reivindicaciones 25 a 30, que presenta una o más fracciones químicas unidas a éste opcionalmente en un vehículo aceptable.

36. Derivado según la reivindicación 35, en el que uno o más de dichas fracciones químicas es un polímero soluble en agua.

37. Derivado según la reivindicación 36, en el que pol soluble en agua se selecciona de entre el grupo constituido por polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, homolímeros de propilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, homopolímeros de poliaminoácidos, copopolímeros aleatorios de poliaminoácidos, poli(n-vinilpirrolidona)-polietilenglicol y alcohol polivinílico.

38. Procedimientos para la determinación de la presencia del factor inductor de apoptosis de mamífero según las reivindicaciones 25 a 30 en una muestra biológica que comprende las etapas siguientes:

(a) obtener una muestra biológica;

(b) exponer dicha muestra biológica a un anticuerpo específico para el factor inductor de apoptosis de mamífero según las reivindicaciones 31 a 34; y

(c) detectar el enlace del anticuerpo específico para el factor inductor de apoptosis de mamífero en dicha muestra biológica.

39. Reactivo de diagnóstico que comprende un polinucleótido marcado de manera detectable que codifica parte o la totalidad del factor estimulante de apoptosis humano según las reivindicaciones 27 a 29.

40. Reactivo de diagnóstico que comprende un polinucleótido marcado de manera detectable que codifica parte o la totalidad del factor estimulante de apoptosis murino según las reivindicaciones 25 y 26.

41. Reactivo para diagnóstico según la reivindicación 39 ó 40, en el que dicho polinucleótido marcado es un ADN.

42. Reactivo para diagnóstico según la reivindicación 39 ó 20, en el que dicho polinucleótido marcado es un ADN de primera cadena.

43. Procedimiento para la determinación de la presencia de una molécula de polinucleótido específica para el factor inductor de apoptosis de mamífero en una muestra biológica que comprende las etapas siguientes:

(a) recoger una muestra biológica;

(b) aislar las moléculas de polinucleótido de dicha muestra biológica;

(c) hibridar a dichas moléculas de polinucleótido un reactivo de diagnóstico según la reivindicación 39 ó 40; y

(d) detectar el enlace de las moléculas de polinucleótido específicas para el factor inductor de apoptosis de mamífero en dichas muestras biológicas.

44. Procedimiento para la determinación de la presencia de una molécula de polinucleótido específica para el factor inductor de apoptosis de mamífero en una muestra tisular o celular que comprende las etapas siguientes:

(a) recoger una muestra tisular o celular;

(b) hibridar dicha muestra tisular o celular con un reactivo de diagnóstico según la reivindicación 39 ó 40; y

(c) detectar el enlace de las moléculas de polinucleótido específicas para el factor inductor de apoptosis de mamífero en la muestra tisular o celular a dicho reactivo de diagnóstico.

45. Procedimiento según la reivindicación 43 ó 44, en el que dicha molécula de polinucleótido es el ADN.

46. Procedimiento según la reivindicación 43 ó 44, en el que dicha molécula de polinucleótido es el ARN.

47. Composición que comprende un factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado según la reivindicación 25 y un vehículo aceptable, diluyente y/o adyuvante.

48. Composición que comprende un factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado según la reivindicación 26 y un vehículo aceptable, diluyente y/o adyuvante.

49. Composición que comprende un factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado según la reivindicación 27 y un vehículo aceptable, diluyente y/o adyuvante.

50. Composición que comprende un factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado según la reivindicación 28 y un vehículo aceptable, diluyente y/o adyuvante.

51. Composición que comprende un factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado según la reivindicación 29 y un vehículo aceptable, diluyente y/o adyuvante.

52. Utilización de cualquiera de las composiciones según las reivindicaciones 47 a 51 como medicamento.

53. Utilización de cualquiera de las composiciones según las reivindicaciones 47 a 51 para la preparación de un medicamento destinado a inhibir la proliferación celular.

54. Utilización del factor inductor de apoptosis de mamífero purificado y aislado según las reivindicaciones 25 a 30 para la preparación de un medicamento destinado a inhibir la proliferación celular.

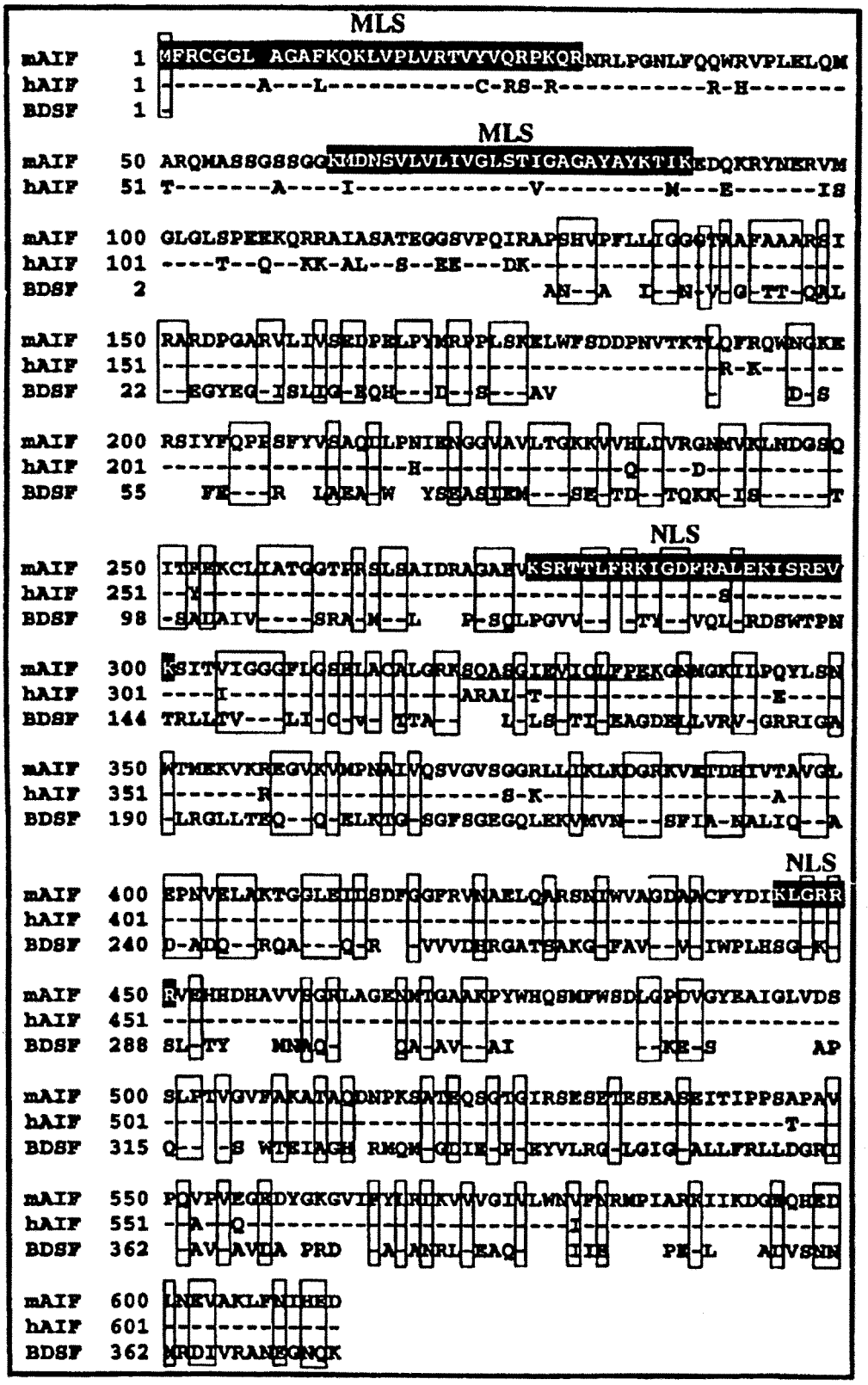

MLS
mAIF 1
hAIF 1
BDSF 1
MLS
mAIF 50
hAIF 51
mAIF 100
hAIF 101
BDSF 2
mAIF 150
hAIF 151
BDSF 22
mAIF 200
hAIF 201
BDSF 55
NLS
mAIF 250
hAIF 251
BDSF 98
mAIF 300
hAIF 301
BDSF 144
mAIF 350
hAIF 351
BDSF 190
NLS
mAIF 400
hAIF 401
BDSF 240
mAIF 450
hAIF 451
BDSF 288
mAIF 500
hAIF 501
BDSF 315
mAIF 550
hAIF 551
BDSF 362
mAIF 600
hAIF 601
BDSF 362

Fig. IA

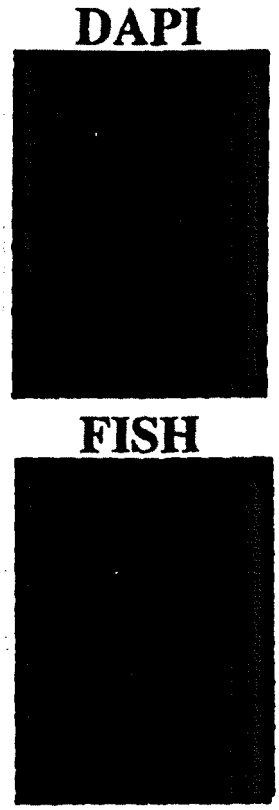
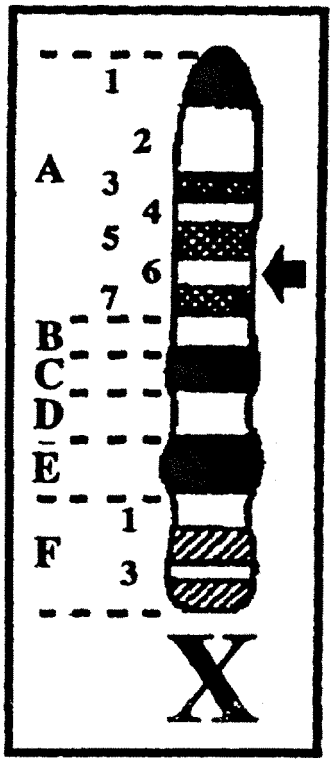


Fig. IB-1

Fig. IB-2



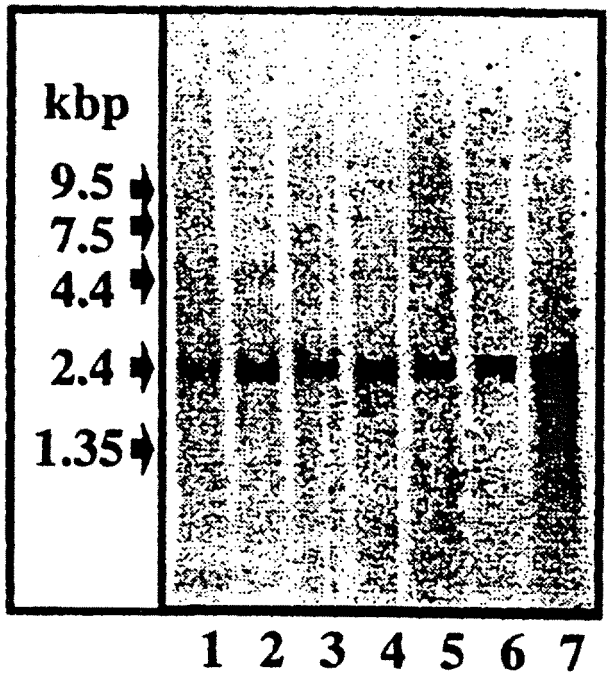


Fig. IC

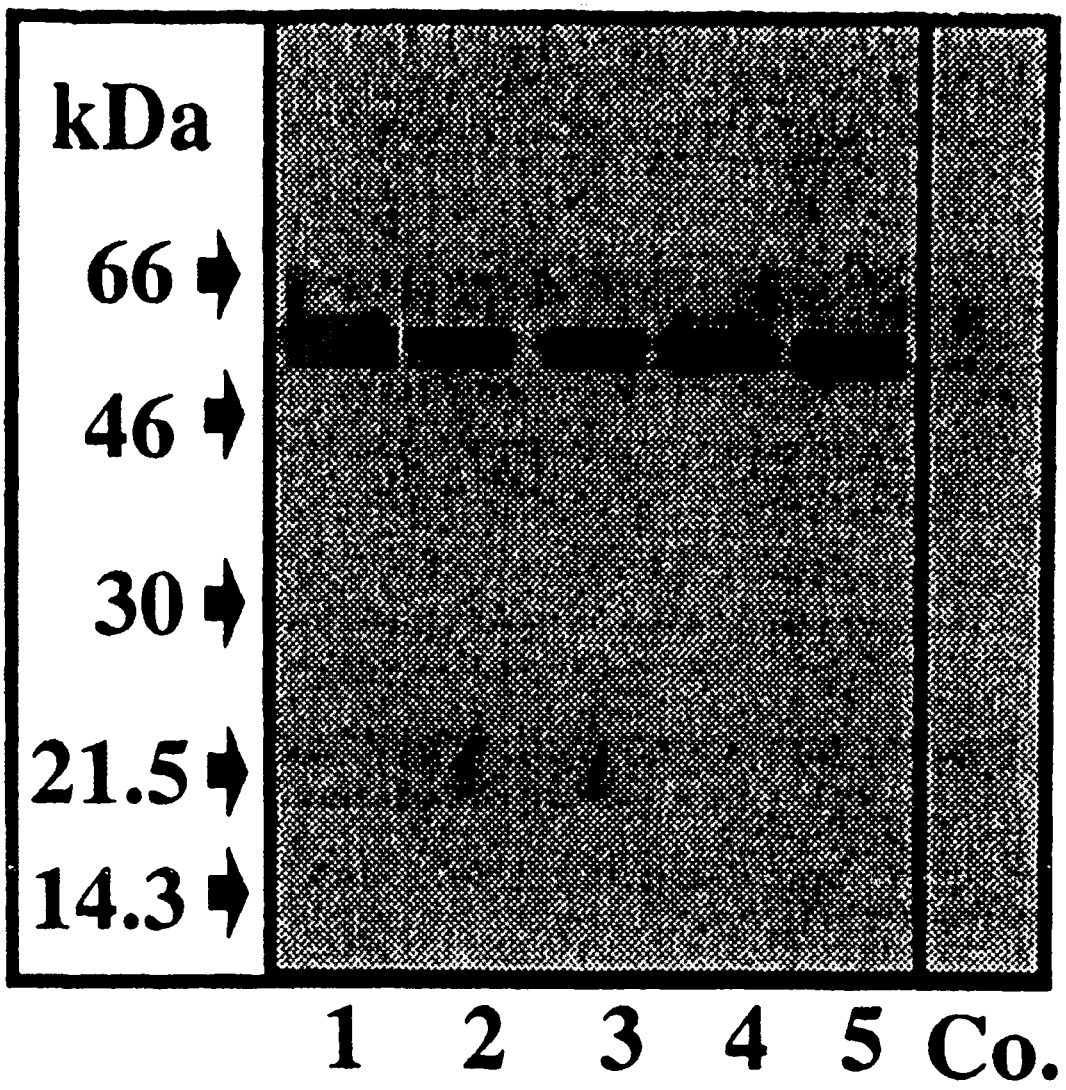


Fig. ID

Fig. IE

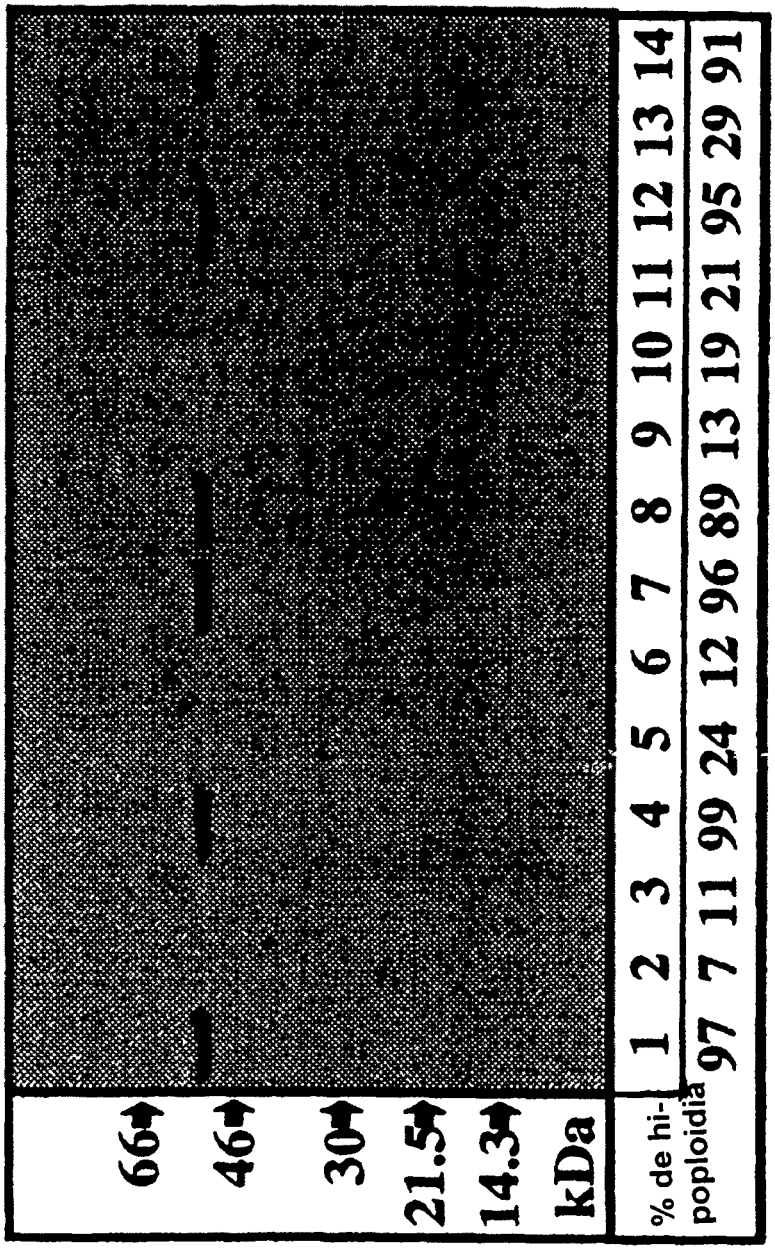

66
46
30
21.5
14.3
kDa
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
% de hi-poploidia
97 7 11 99 24 12 96 89 13 19 21 95 29 91

Fig. 2A

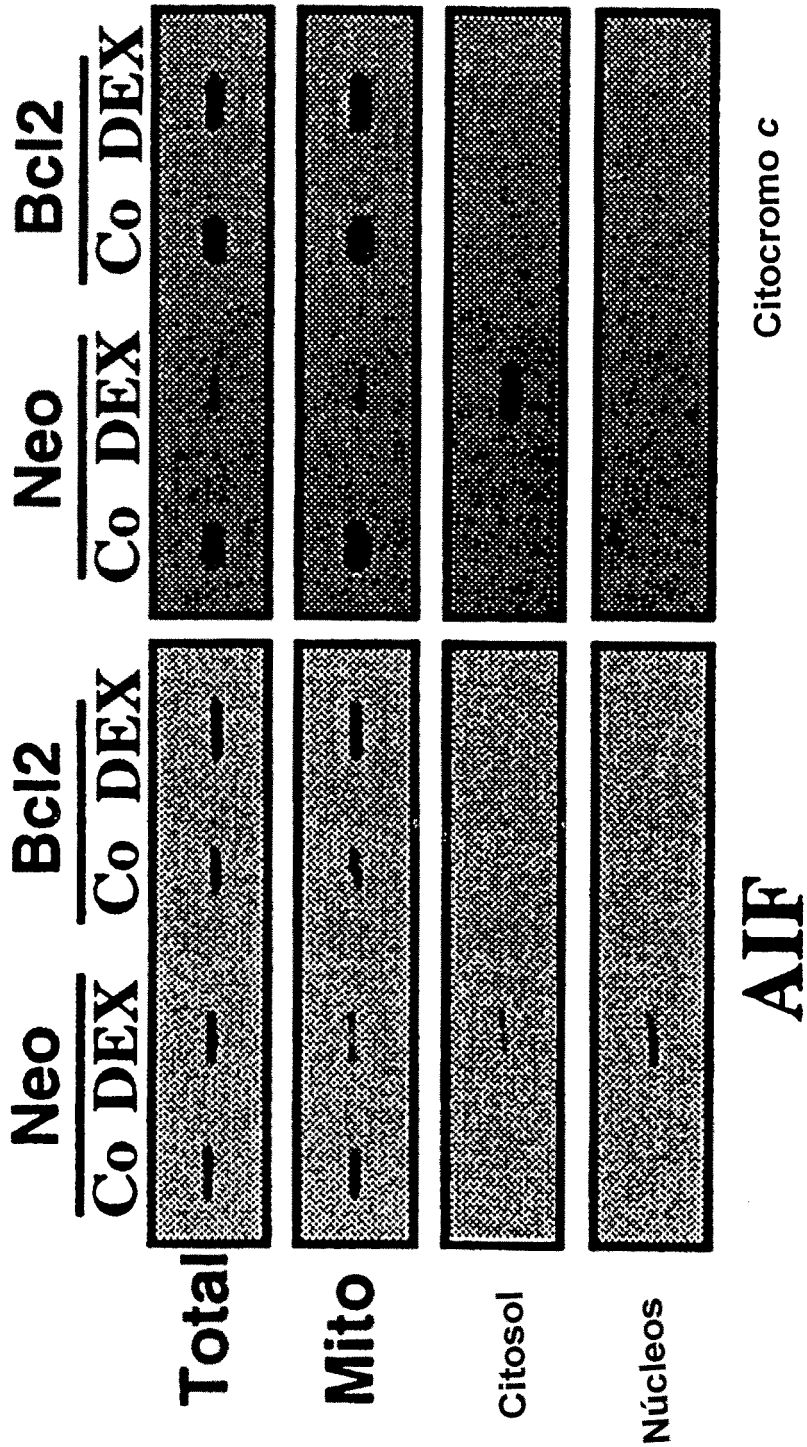

Neo
Bcl2
Co DEX
Co DEX
Total
Mito
Citosol
Núcleos
AIF
Neo
Bcl2
Co DEX
Co DEX
Citocromo c

Fig. 2B

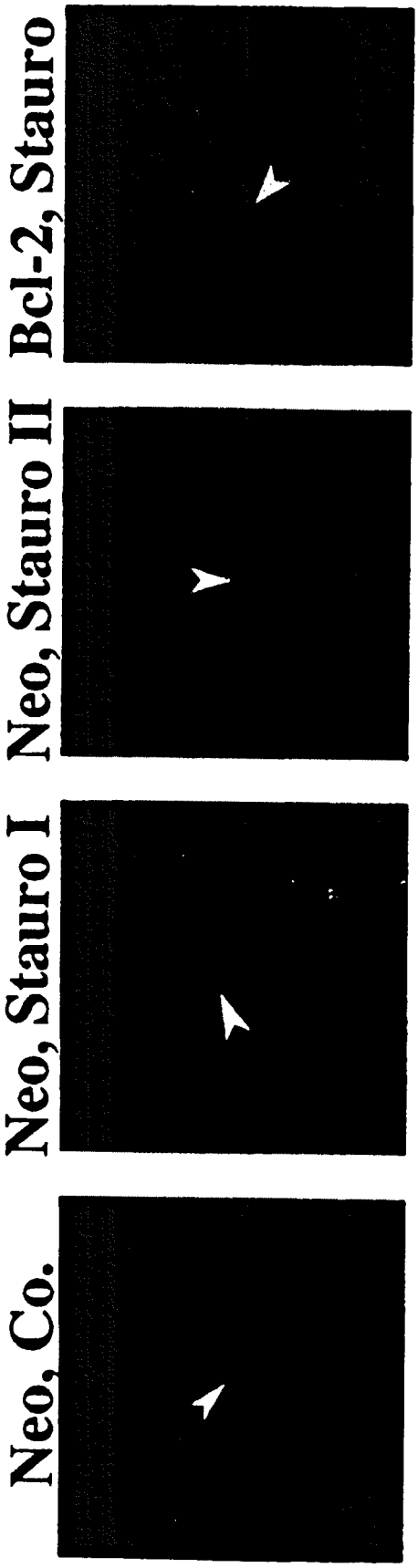


Fig. 2C

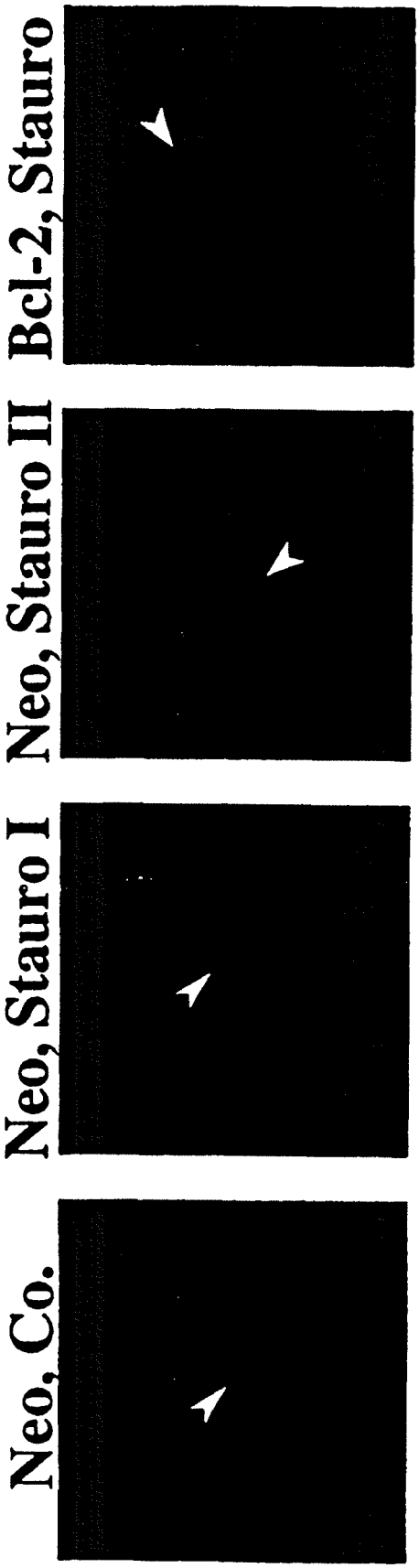


Fig. 2D

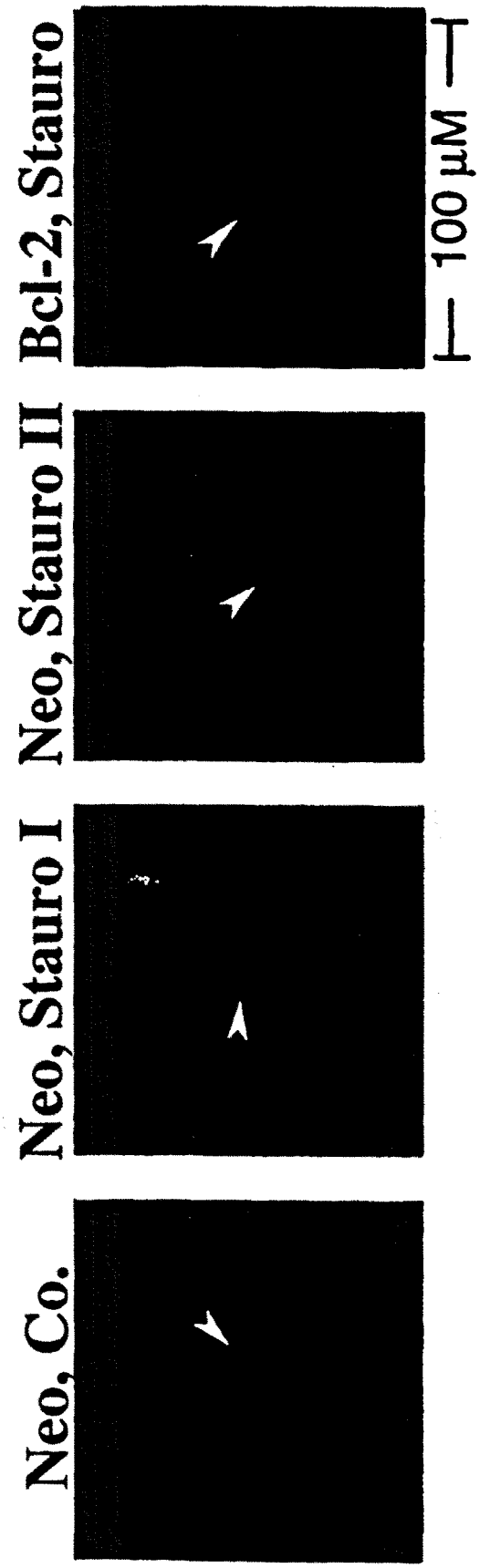


Fig. 2E

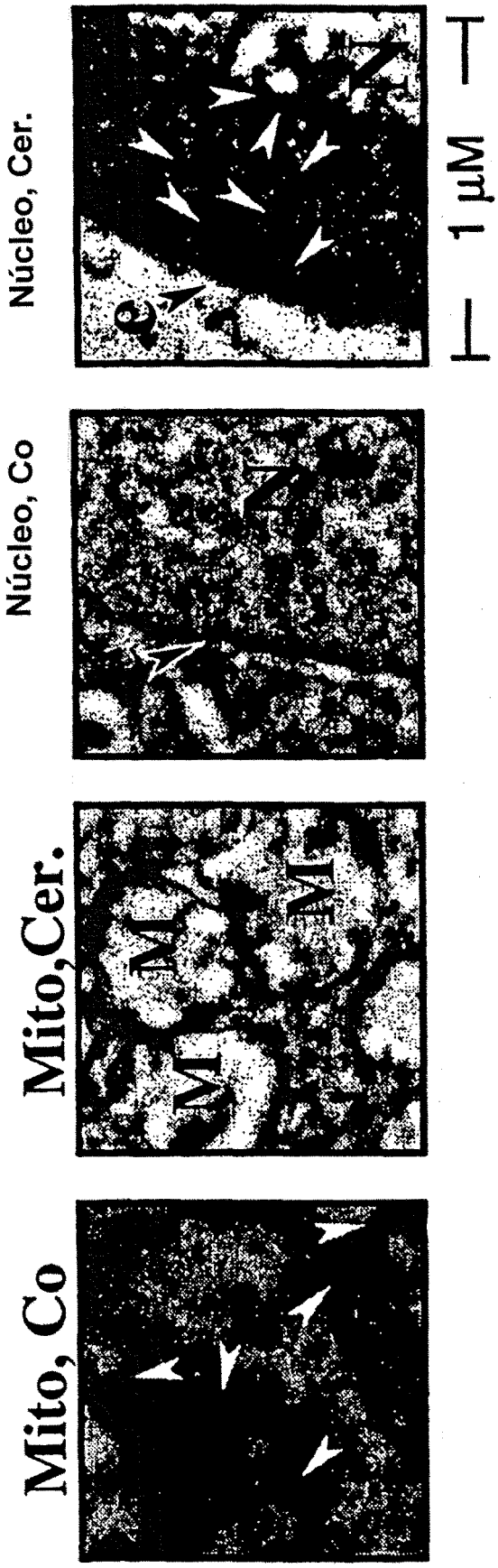


Fig. 2F

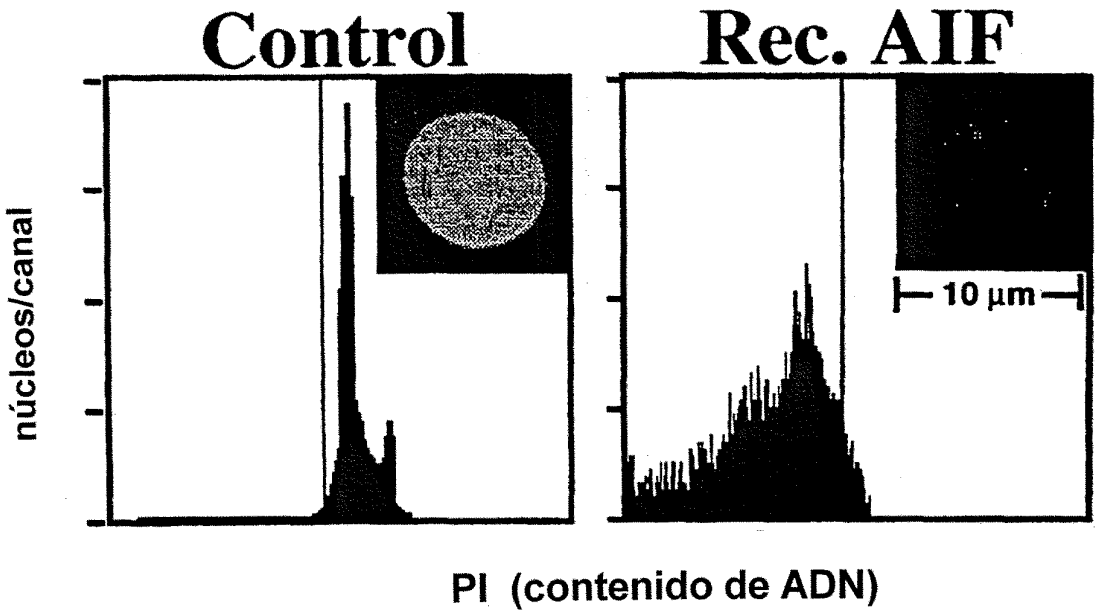

Control
Rec. AIF
núcleos/canal
10 µm
PI (contenido de ADN)

Fig. 3A

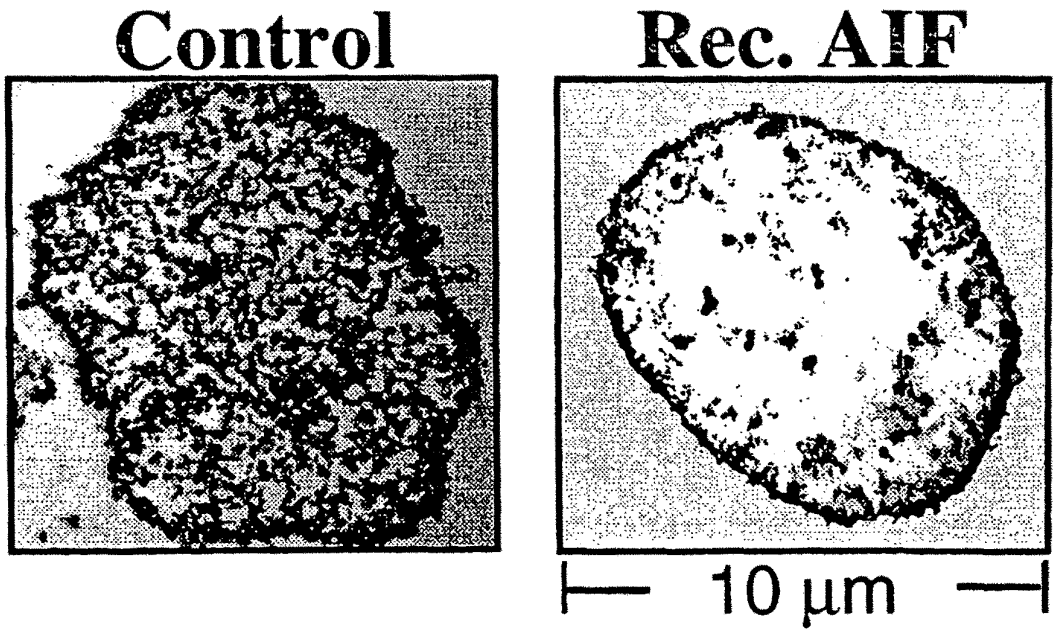

Control
Rec. AIF
10 µm

Fig. 3B

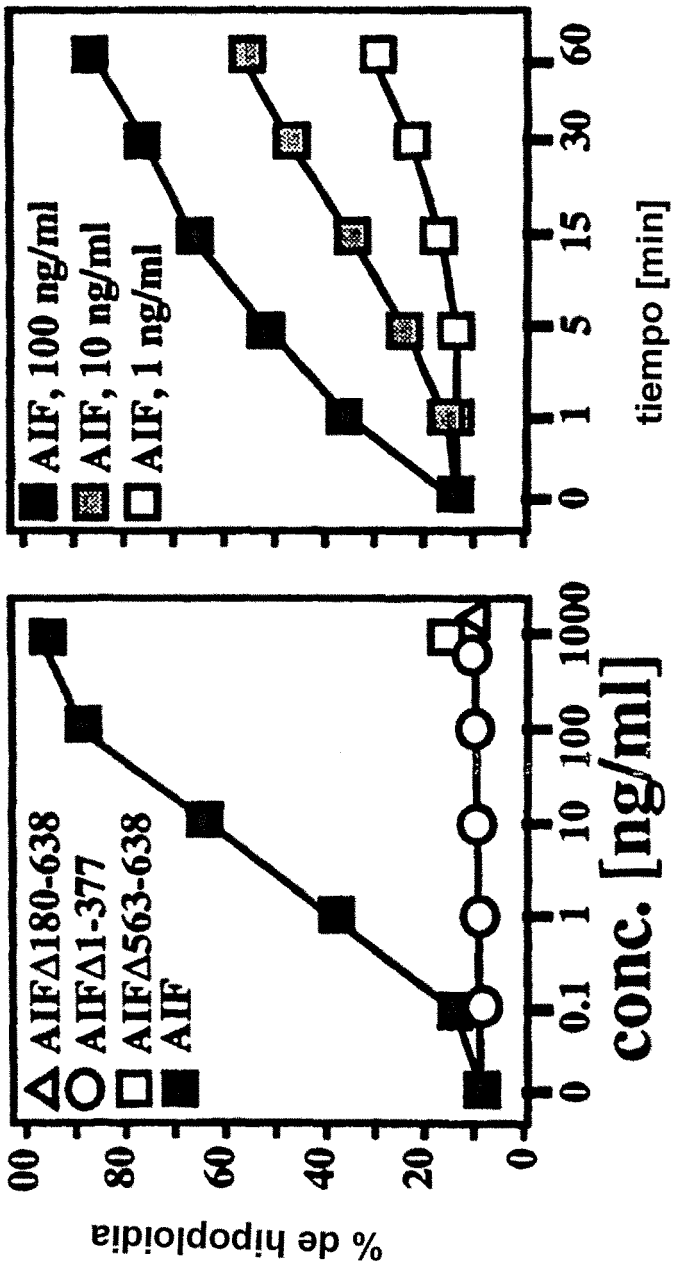

% de hipoplolia
00
80
60
40
20
0
AIFΔ180-638
AIFΔ1-377
AIFΔ563-638
AIF
0
0.1
1
10
100
1000
conc. [ng/ml]
AIF, 100 ng/ml
AIF, 10 ng/ml
AIF, 1 ng/ml
0
1
5
15
30
60
tiempo [min]

Fig. 3C

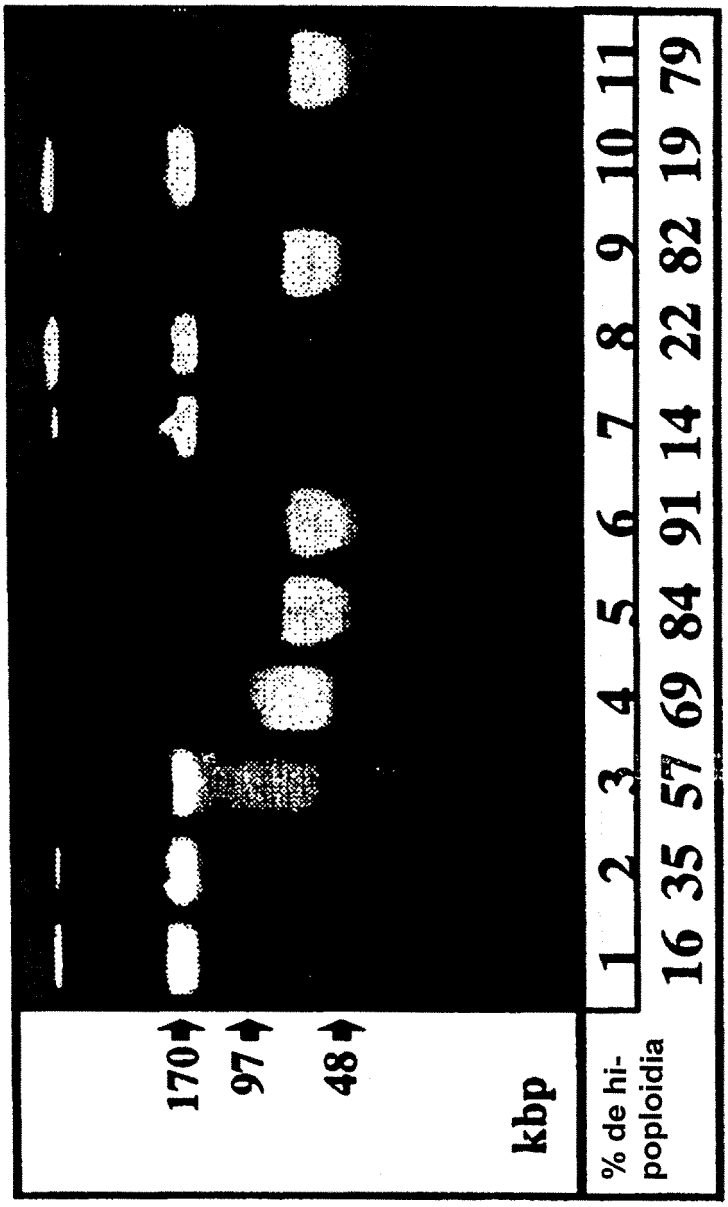


Fig. 3D

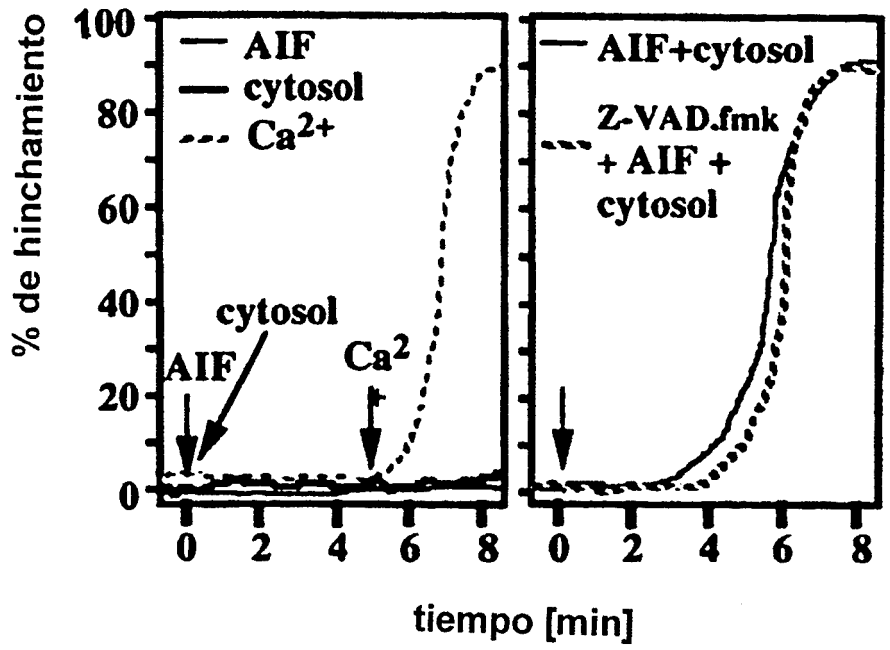

% de hinchamiento
100
80
60
40
20
0
AIF
cytosol
Ca2+
cytosol
AIF
Ca2
AIF+cytosol
Z-VAD.fmk
+ AIF +
cytosol
0 2 4 6 8 0 2 4 6 8
tiempo [min]

Fig. 3E

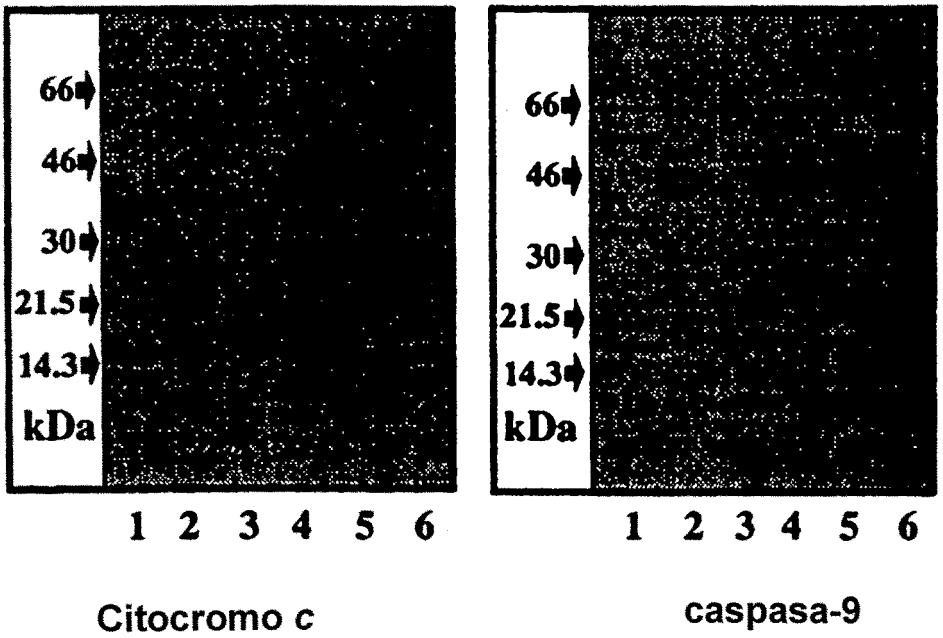

66
46
30
21.5
14.3
kDa
1 2 3 4 5 6
Citocromo c
66
46
30
21.5
14.3
kDa
1 2 3 4 5 6
caspasa-9

Fig. 3F

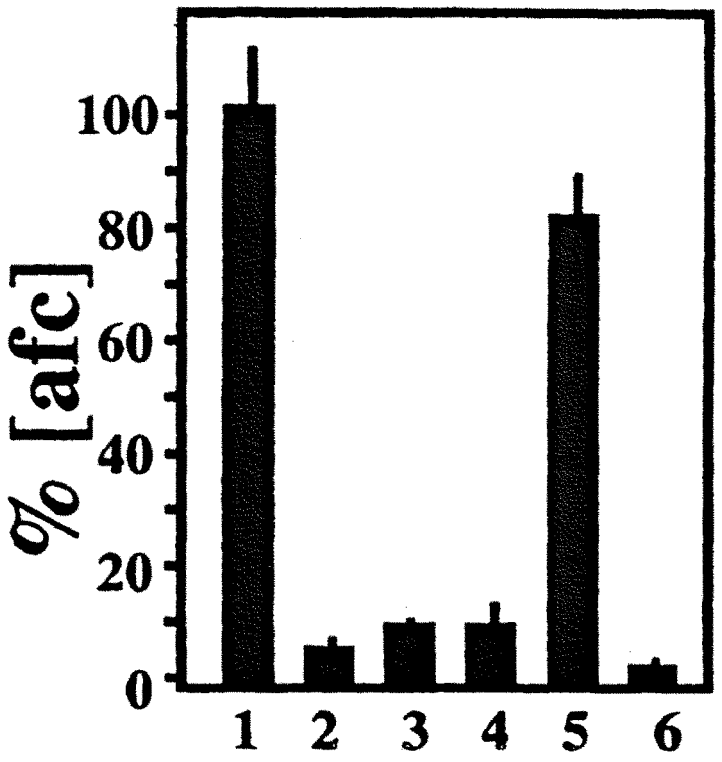


Fig. 3G

Fig. 4A-1

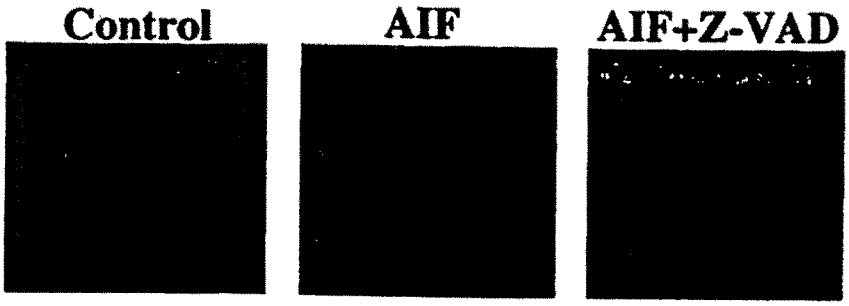


Fig. 4A-2

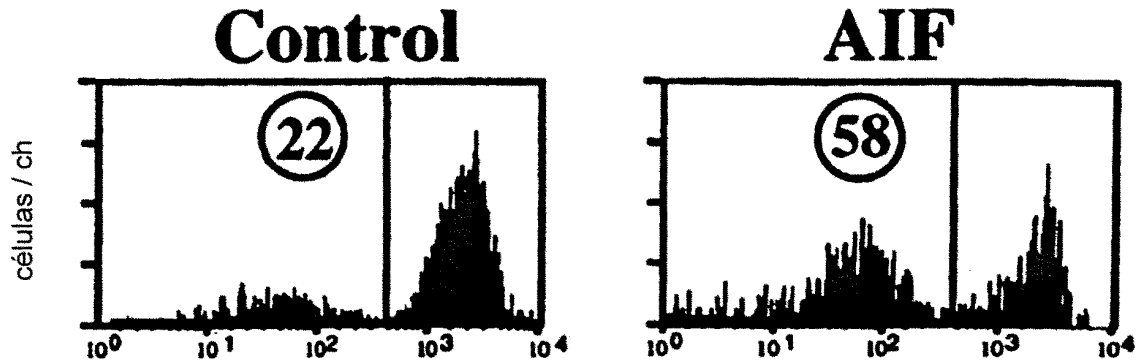


Fig. 4B-I

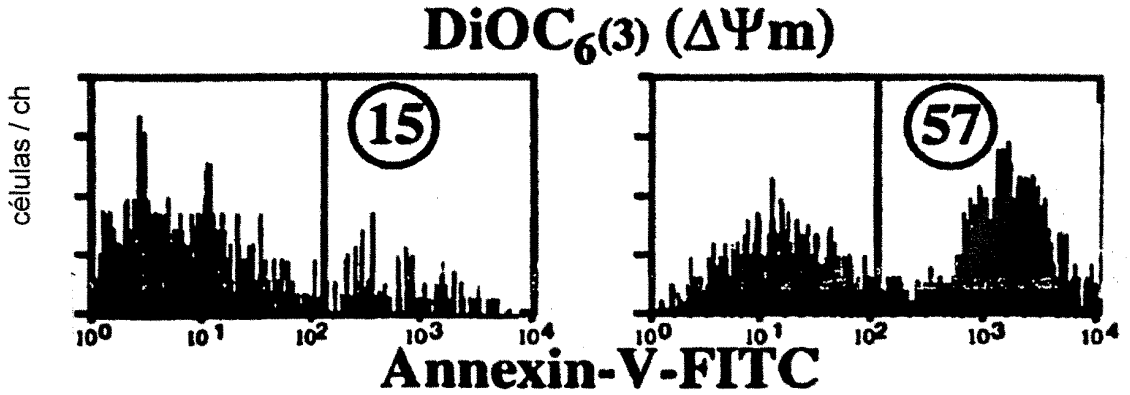


Fig. 4B-2

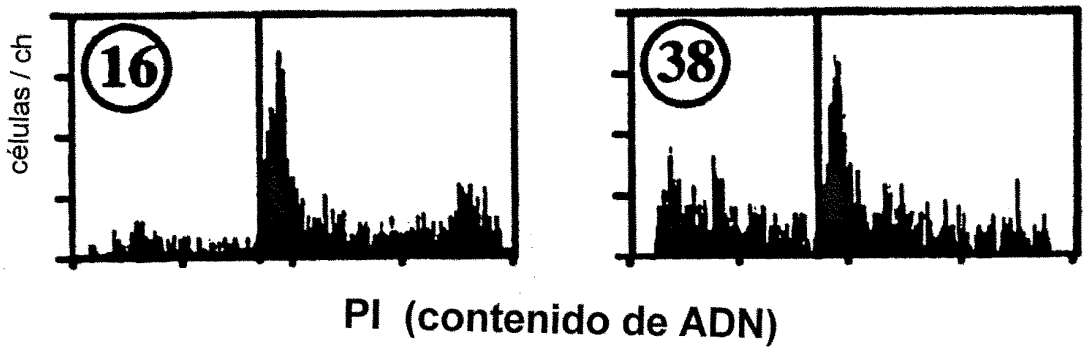


Fig. 4B-3

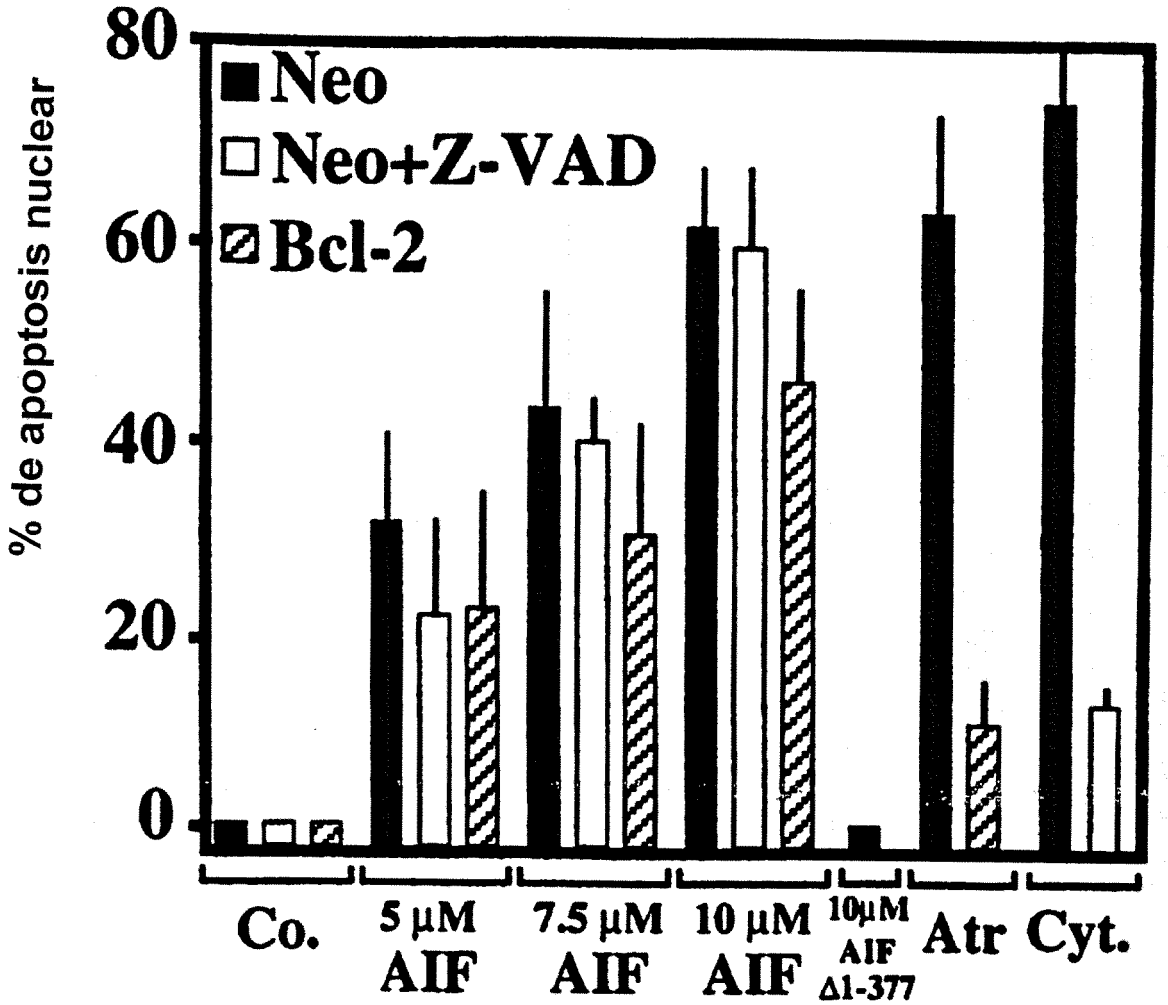

80
60
40
20
0
% de apoptosis nuclear
Neo
Neo+Z-VAD
Bcl-2
Co.
5 µM AIF
7.5 µM AIF
10 µM AIF
10µM AIF Δ1-377
Atr
Cyt.

Fig. 4C

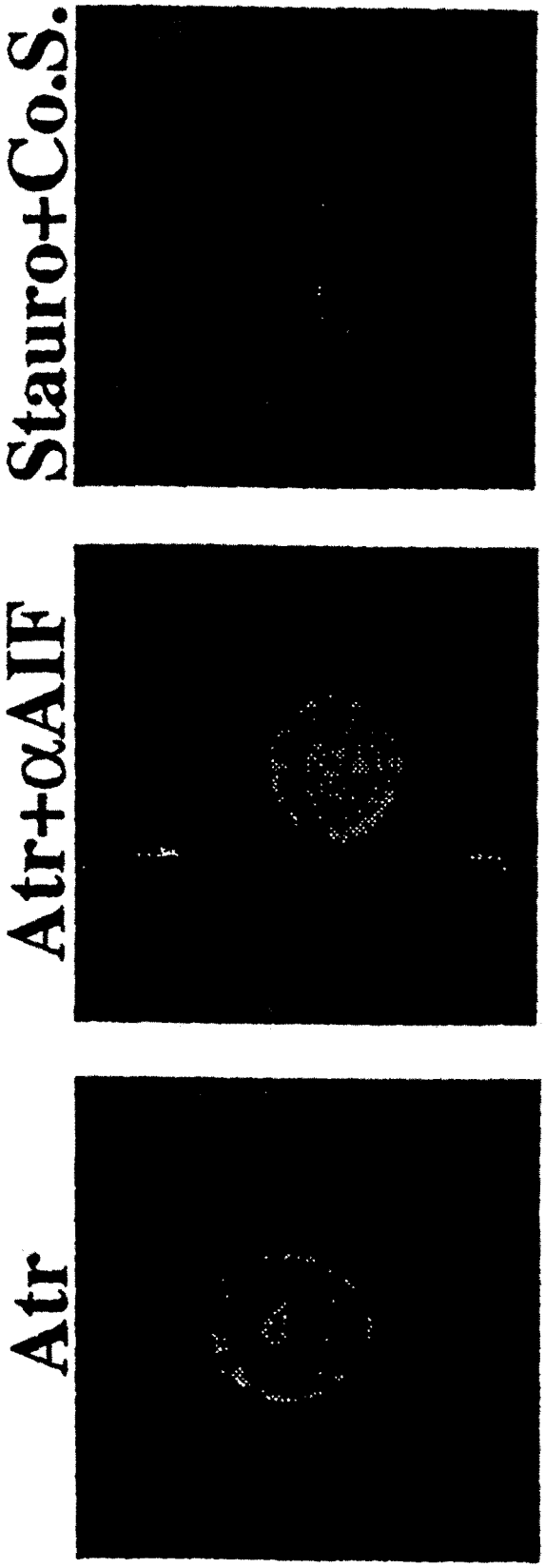


Fig. 4D-I

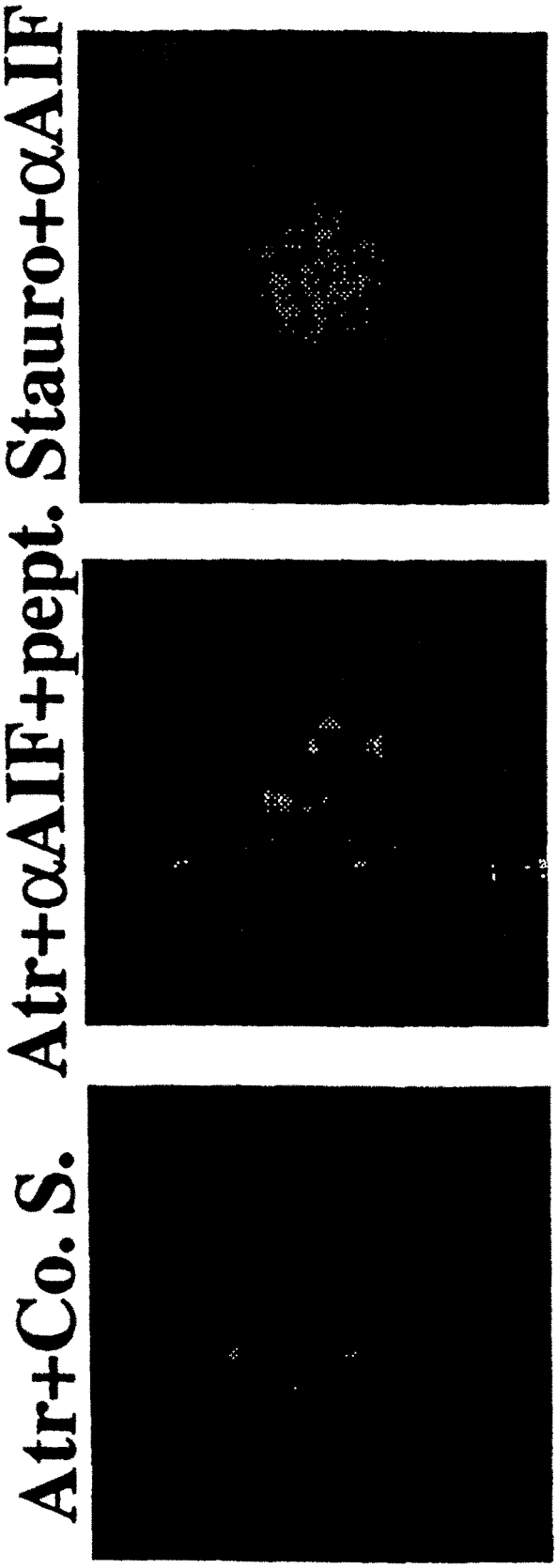


Fig. 4D-2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AMGEN CANADÁ, INC.
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

<120> FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS

<140>
<141>

<150> 60/109,595
<151> 1998-11-23

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1932
<212> ADN
<231> *Mus musculus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1887)

<220>
<223> factor inductor de apoptosis de ratón (AIFm);

<400> 1

```
tgc gtg gaa gga aaa gga agg agc ggg agc ttc cga gga gtg atc gcc    48
Cys Val Glu Gly Lys Gly Arg Ser Gly Ser Phe Arg Gly Val Ile Ala
  1               5                  10                  15

gaa atg ttc cgg tgt gga ggc ctg gcg ggt gct ttc aag cag aaa ctg    96
Glu Met Phe Arg Cys Gly Gly Leu Ala Gly Ala Phe Lys Gln Lys Leu
             20                  25                  30

gtg ccc ttg gtg cgg acg gtg tac gtc cag agg ccg aaa cag agg aac   144
Val Pro Leu Val Arg Thr Val Tyr Val Gln Arg Pro Lys Gln Arg Asn
         35                  40                  45

cgg ctt cca ggc aac ttg ttc cag caa tgg cgt gtt cct cta gaa ctc   192
Arg Leu Pro Gly Asn Leu Phe Gln Gln Trp Arg Val Pro Leu Glu Leu
     50                  55                  60

cag atg gca aga caa atg gct agc tct ggt tca tca ggg ggc aaa atg   240
Gln Met Ala Arg Gln Met Ala Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Lys Met
 65                  70                  75                  80
```

```
gat aat tct gtg tta gtc ctt att gtg ggc tta tca aca ata gga gct    288
Asp Asn Ser Val Leu Val Leu Ile Val Gly Leu Ser Thr Ile Gly Ala
                85                  90                  95

ggt gca tat gcc tac aaa act ata aaa gaa gac caa aaa aga tac aat    336
Gly Ala Tyr Ala Tyr Lys Thr Ile Lys Glu Asp Gln Lys Arg Tyr Asn
            100                 105                 110

gaa aga gtg atg gga tta gga ctg tcc cca gaa gag aaa cag aga aga    384
Glu Arg Val Met Gly Leu Gly Leu Ser Pro Glu Glu Lys Gln Arg Arg
        115                 120                 125

gcc att gcc tcc gct aca gag gga ggc tca gtt cct cag atc agg gca    432
Ala Ile Ala Ser Ala Thr Glu Gly Gly Ser Val Pro Gln Ile Arg Ala
    130                 135                 140

cca agt cac gtc cct ttc ctg ctg att ggt gga ggg act gct gct ttt    480
Pro Ser His Val Pro Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe
145                 150                 155                 160

gca gca gcc aga tcc atc cgg gct cgg gat cct ggg gcc agg gtc ctg    528
Ala Ala Ala Arg Ser Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu
                165                 170                 175

att gta tct gaa gac cct gaa ctg cca tac atg cga cct cct ctt tca    576
Ile Val Ser Glu Asp Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser
            180                 185                 190

aaa gaa ttg tgg ttt tca gat gat cca aat gtc aca aag aca ctg caa    624
Lys Glu Leu Trp Phe Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Gln
        195                 200                 205

ttc aga cag tgg aat gga aaa gag aga agc ata tat ttc cag cca cct    672
Phe Arg Gln Trp Asn Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro
    210                 215                 220

tct ttc tat gtc tct gct cag gac ctg cct aat att gag aac ggt ggt    720
Ser Phe Tyr Val Ser Ala Gln Asp Leu Pro Asn Ile Glu Asn Gly Gly
225                 230                 235                 240

gtg gct gtc ctc act ggg aaa aag gta gta cat ctg gat gta aga ggc    768
Val Ala Val Leu Thr Gly Lys Lys Val Val His Leu Asp Val Arg Gly
                245                 250                 255

aac atg gtg aaa ctt aat gat ggc tct cag att acc ttt gaa aag tgc    816
Asn Met Val Lys Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr Phe Glu Lys Cys
            260                 265                 270

ttg att gca acg gga ggc act cca aga agt ctg tct gcc atc gat agg    864
Leu Ile Ala Thr Gly Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg
        275                 280                 285

gct gga gca gag gtg aag agt aga aca aca ctt ttc agg aag att gga    912
Ala Gly Ala Glu Val Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly
    290                 295                 300
```

```
gat ttt aga gcc ttg gag aag atc tct cgg gag gtc aag tca att aca     960
Asp Phe Arg Ala Leu Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr
305                 310                 315                 320

gtt atc ggc ggg ggc ttc ctt ggg agt gag ctg gcc tgt gct ctt ggc     1008
Val Ile Gly Gly Gly Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly
                325                 330                 335

aga aag tct caa gcc tcg ggc ata gaa gtg atc cag ctg ttc cct gag     1056
Arg Lys Ser Gln Ala Ser Gly Ile Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu
            340                 345                 350

aaa gga aat atg ggg aag atc ctt cct caa tac ctc agc aac tgg acc     1104
Lys Gly Asn Met Gly Lys Ile Leu Pro Gln Tyr Leu Ser Asn Trp Thr
        355                 360                 365

atg gaa aaa gtc aaa cga gag gga gtg aaa gtg atg ccc aat gca att     1152
Met Glu Lys Val Lys Arg Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile
    370                 375                 380

gta caa tca gtt gga gtc agc ggt ggc agg tta ctc att aag ctg aaa     1200
Val Gln Ser Val Gly Val Ser Gly Gly Arg Leu Leu Ile Lys Leu Lys
385                 390                 395                 400

gat gga agg aag gta gaa act gac cac ata gtg aca gct gtg ggc cta     1248
Asp Gly Arg Lys Val Glu Thr Asp His Ile Val Thr Ala Val Gly Leu
                405                 410                 415

gag ccc aat gtt gag ttg gcc aag act ggc gga ctg gaa ata gat tcc     1296
Glu Pro Asn Val Glu Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser
            420                 425                 430

gat ttt ggt ggc ttc cgg gta aat gca gaa ctc caa gca cgt tct aac     1344
Asp Phe Gly Gly Phe Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn
        435                 440                 445

atc tgg gtg gca ggg gat gct gca tgc ttc tat gat ata aag ttg ggt     1392
Ile Trp Val Ala Gly Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly
    450                 455                 460

cga agg cga gta gag cat cat gat cat gct gtt gtg agt gga aga ctg     1440
Arg Arg Arg Val Glu His His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu
465                 470                 475                 480

gct gga gaa aac atg act gga gcc gct aag cca tac tgg cat cag tca     1488
Ala Gly Glu Asn Met Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser
                485                 490                 495

atg ttc tgg agt gat ttg ggt cct gat gtc ggc tat gaa gct att ggt     1536
Met Phe Trp Ser Asp Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly
            500                 505                 510

ctg gtg gat agt agt ttg ccc aca gtt ggt gtt ttt gca aaa gca act     1584
Leu Val Asp Ser Ser Leu Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr
        515                 520                 525
```

```
gca caa gac aac cca aaa tct gcc aca gag cag tca gga act ggt atc    1632
Ala Gln Asp Asn Pro Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile
    530                 535                 540

cgt tcg gag agt gag aca gag tca gaa gct tcg gaa atc aca att cct    1680
Arg Ser Glu Ser Glu Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro
545                 550                 555                 560

ccc agc gcc cct gca gtc cca cag gtc cct gtt gaa ggg gag gac tac    1728
Pro Ser Ala Pro Ala Val Pro Gln Val Pro Val Glu Gly Glu Asp Tyr
                565                 570                 575

ggc aaa ggt gtc atc ttc tac ctc agg gac aaa gtt gtg gtg ggg att    1776
Gly Lys Gly Val Ile Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile
            580                 585                 590

gtg cta tgg aac gtc ttt aac cga atg cca att gca agg aag atc att    1824
Val Leu Trp Asn Val Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile
        595                 600                 605

aag gac ggt gag caa cat gaa gat ctc aat gaa gta gct aaa ctc ttc    1872
Lys Asp Gly Glu Gln His Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe
    610                 615                 620

aac att cat gaa gat tgaatcccaa tcgtggaata cacaagcact tttccatccc    1927
Asn Ile His Glu Asp
625

tggcg                                                              1932
```

<210> 2
<211> 629
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 2

```
Cys Val Glu Gly Lys Gly Arg Ser Gly Ser Phe Arg Gly Val Ile Ala
1               5                   10                  15

Glu Met Phe Arg Cys Gly Gly Leu Ala Gly Ala Phe Lys Gln Lys Leu
            20                  25                  30

Val Pro Leu Val Arg Thr Val Tyr Val Gln Arg Pro Lys Gln Arg Asn
        35                  40                  45

Arg Leu Pro Gly Asn Leu Phe Gln Gln Trp Arg Val Pro Leu Glu Leu
    50                  55                  60

Gln Met Ala Arg Gln Met Ala Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Lys Met
65                  70                  75                  80

Asp Asn Ser Val Leu Val Leu Ile Val Gly Leu Ser Thr Ile Gly Ala
                85                  90                  95
```

Gly Ala Tyr Ala Tyr Lys Thr Ile Lys Glu Asp Gln Lys Arg Tyr Asn
100 105 110

Glu Arg Val Met Gly Leu Gly Leu Ser Pro Glu Glu Lys Gln Arg Arg
115 120 125

Ala Ile Ala Ser Ala Thr Glu Gly Gly Ser Val Pro Gln Ile Arg Ala
130 135 140

Pro Ser His Val Pro Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe
145 150 155 160

Ala Ala Ala Arg Ser Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu
165 170 175

Ile Val Ser Glu Asp Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser
180 185 190

Lys Glu Leu Trp Phe Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Gln
195 200 205

Phe Arg Gln Trp Asn Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro
210 215 220

Ser Phe Tyr Val Ser Ala Gln Asp Leu Pro Asn Ile Glu Asn Gly Gly
225 230 235 240

Val Ala Val Leu Thr Gly Lys Lys Val Val His Leu Asp Val Arg Gly
245 250 255

Asn Met Val Lys Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr Phe Glu Lys Cys
260 265 270

Leu Ile Ala Thr Gly Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg
275 280 285

Ala Gly Ala Glu Val Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly
290 295 300

Asp Phe Arg Ala Leu Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr
305 310 315 320

Val Ile Gly Gly Gly Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly
325 330 335

Arg Lys Ser Gln Ala Ser Gly Ile Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu
340 345 350

Lys Gly Asn Met Gly Lys Ile Leu Pro Gln Tyr Leu Ser Asn Trp Thr
355 360 365

Met Glu Lys Val Lys Arg Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile
370 375 380

Val Gln Ser Val Gly Val Ser Gly Gly Arg Leu Leu Ile Lys Leu Lys
385 390 395 400

Asp Gly Arg Lys Val Glu Thr Asp His Ile Val Thr Ala Val Gly Leu
405 410 415

Glu Pro Asn Val Glu Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser
420 425 430

Asp Phe Gly Gly Phe Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn
435 440 445

Ile Trp Val Ala Gly Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly
450 455 460

Arg Arg Arg Val Glu His His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu
465 470 475 480

Ala Gly Glu Asn Met Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser
485 490 495

Met Phe Trp Ser Asp Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly
500 505 510

Leu Val Asp Ser Ser Leu Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr
515 520 525

Ala Gln Asp Asn Pro Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile
530 535 540

Arg Ser Glu Ser Glu Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro
545 550 555 560

Pro Ser Ala Pro Ala Val Pro Gln Val Pro Val Glu Gly Glu Asp Tyr
565 570 575

Gly Lys Gly Val Ile Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile
580 585 590

Val Leu Trp Asn Val Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile
595 600 605

Lys Asp Gly Glu Gln His Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe
610 615 620

Asn Ile His Glu Asp
625

<210> 3
<211> 612
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<220>
<223> factor inductor de apoptosis en ratones (mAIF); mAIF-Gold.B1B; polipéptido maduro

<400> 3

Met Phe Arg Cys Gly Gly Leu Ala Gly Ala Phe Lys Gln Lys Leu Val
1 5 10 15

Pro Leu Val Arg Thr Val Tyr Val Gln Arg Pro Lys Gln Arg Asn Arg
20 25 30

Leu Pro Gly Asn Leu Phe Gln Gln Trp Arg Val Pro Leu Glu Leu Gln
35 40 45

Met Ala Arg Gln Met Ala Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Lys Met Asp
50 55 60

Asn Ser Val Leu Val Leu Ile Val Gly Leu Ser Thr Ile Gly Ala Gly
65 70 75 80

Ala Tyr Ala Tyr Lys Thr Ile Lys Glu Asp Gln Lys Arg Tyr Asn Glu
85 90 95

Arg Val Met Gly Leu Gly Leu Ser Pro Glu Glu Lys Gln Arg Arg Ala
100 105 110

Ile Ala Ser Ala Thr Glu Gly Gly Ser Val Pro Gln Ile Arg Ala Pro
115 120 125

Ser His Val Pro Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala
130 135 140

Ala Ala Arg Ser Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile
145 150 155 160

Val Ser Glu Asp Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys
165 170 175

Glu Leu Trp Phe Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Gln Phe
180 185 190

Arg Gln Trp Asn Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser
195 200 205

Phe Tyr Val Ser Ala Gln Asp Leu Pro Asn Ile Glu Asn Gly Gly Val
210 215 220

Ala Val Leu Thr Gly Lys Lys Val Val His Leu Asp Val Arg Gly Asn
225 230 235 240

Met Val Lys Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr Phe Glu Lys Cys Leu
245 250 255

Ile Ala Thr Gly Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala
260 265 270

Gly Ala Glu Val Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp
275 280 285

Phe Arg Ala Leu Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Val
290 295 300

Ile Gly Gly Gly Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg
305 310 315 320

Lys Ser Gln Ala Ser Gly Ile Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys
325 330 335

Gly Asn Met Gly Lys Ile Leu Pro Gln Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met
340 345 350

Glu Lys Val Lys Arg Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val
355 360 365

Gln Ser Val Gly Val Ser Gly Gly Arg Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp
370 375 380

Gly Arg Lys Val Glu Thr Asp His Ile Val Thr Ala Val Gly Leu Glu
385 390 395 400

Pro Asn Val Glu Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp
405 410 415

Phe Gly Gly Phe Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile
420 425 430

Trp Val Ala Gly Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg
435 440 445

Arg Arg Val Glu His His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala
450 455 460

Gly Glu Asn Met Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met
465 470 475 480

Phe Trp Ser Asp Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu
485 490 495

Val Asp Ser Ser Leu Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala
500 505 510

Gln Asp Asn Pro Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg
515 520 525

Ser Glu Ser Glu Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro
530 535 540

Ser Ala Pro Ala Val Pro Gln Val Pro Val Glu Gly Glu Asp Tyr Gly
545 550 555 560

```
Lys Gly Val Ile Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val
                565                 570                 575

Leu Trp Asn Val Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys
            580                 585                 590

Asp Gly Glu Gln His Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn
        595                 600                 605

Ile His Glu Asp
    610
```

<210> 4
<211> 1920
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1875)

<220>
<223> Factor inductor de apoptosis en ratones (isoforma mAIF); mAIF-alt-exon-Gold

<400> 4

```
tgc gtg gaa gga aaa gga agg agc ggg agc ttc cga gga gtg atc gcc    48
Cys Val Glu Gly Lys Gly Arg Ser Gly Ser Phe Arg Gly Val Ile Ala
  1               5                  10                  15

gaa atg ttc cgg tgt gga ggc ctg gcg ggt gct ttc aag cag aaa ctg    96
Glu Met Phe Arg Cys Gly Gly Leu Ala Gly Ala Phe Lys Gln Lys Leu
             20                  25                  30

gtg ccc ttg gtg cgg acg gtg tac gtc cag agg ccg aaa cag agg aac   144
Val Pro Leu Val Arg Thr Val Tyr Val Gln Arg Pro Lys Gln Arg Asn
         35                  40                  45

cgg ctt cca gtt gtg cag tgt cat ctc cta gga tcc cct tct aga aca   192
Arg Leu Pro Val Val Gln Cys His Leu Leu Gly Ser Pro Ser Arg Thr
     50                  55                  60

cta gcg tct gca ggt gct tct ggg aaa gat ggc agc agc cta gta tac   240
Leu Ala Ser Ala Gly Ala Ser Gly Lys Asp Gly Ser Ser Leu Val Tyr
 65                  70                  75                  80

ttc tta att gta gga gca aca gtg act ggg gca gga att tat tat gcc   288
Phe Leu Ile Val Gly Ala Thr Val Thr Gly Ala Gly Ile Tyr Tyr Ala
                 85                  90                  95

tac aaa act ata aaa gaa gac caa aaa aga tac aat gaa aga gtg atg   336
Tyr Lys Thr Ile Lys Glu Asp Gln Lys Arg Tyr Asn Glu Arg Val Met
            100                 105                 110
```

```
gga tta gga ctg tcc cca gaa gag aaa cag aga aga gcc att gcc tcc    384
Gly Leu Gly Leu Ser Pro Glu Glu Lys Gln Arg Arg Ala Ile Ala Ser
        115                 120                 125

gct aca gag gga ggc tca gtt cct cag atc agg gca cca agt cac gtc    432
Ala Thr Glu Gly Gly Ser Val Pro Gln Ile Arg Ala Pro Ser His Val
    130                 135                 140

cct ttc ctg ctg att ggt gga ggg act gct gct ttt gca gca gcc aga    480
Pro Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala Ala Ala Arg
145                 150                 155                 160

tcc atc cgg gct cgg gat cct ggg gcc agg gtc ctg att gta tct gaa    528
Ser Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile Val Ser Glu
                165                 170                 175

gac cct gaa ctg cca tac atg cga cct cct ctt tca aaa gaa ttg tgg    576
Asp Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys Glu Leu Trp
            180                 185                 190

ttt tca gat gat cca aat gtc aca aag aca ctg caa ttc aga cag tgg    624
Phe Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Gln Phe Arg Gln Trp
        195                 200                 205

aat gga aaa gag aga agc ata tat ttc cag cca cct tct ttc tat gtc    672
Asn Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser Phe Tyr Val
    210                 215                 220

tct gct cag gac ctg cct aat att gag aac ggt ggt gtg gct gtc ctc    720
Ser Ala Gln Asp Leu Pro Asn Ile Glu Asn Gly Gly Val Ala Val Leu
225                 230                 235                 240

act ggg aaa aag gta gta cat ctg gat gta aga ggc aac atg gtg aaa    768
Thr Gly Lys Lys Val Val His Leu Asp Val Arg Gly Asn Met Val Lys
                245                 250                 255

ctt aat gat ggc tct cag att acc ttt gaa aag tgc ttg att gca acg    816
Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr Phe Glu Lys Cys Leu Ile Ala Thr
            260                 265                 270

gga ggc act cca aga agt ctg tct gcc atc gat agg gct gga gca gag    864
Gly Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ala Glu
        275                 280                 285

gtg aag agt aga aca aca ctt ttc agg aag att gga gat ttt aga gcc    912
Val Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp Phe Arg Ala
    290                 295                 300

ttg gag aag atc tct cgg gag gtc aag tca att aca gtt atc ggc ggg    960
Leu Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Val Ile Gly Gly
305                 310                 315                 320

ggc ttc ctt ggg agt gag ctg gcc tgt gct ctt ggc aga aag tct caa    1008
Gly Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg Lys Ser Gln
                325                 330                 335
```

```
gcc tcg ggc ata gaa gtg atc cag ctg ttc cct gag aaa gga aat atg    1056
Ala Ser Gly Ile Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys Gly Asn Met
            340                 345                 350

ggg aag atc ctt cct caa tac ctc agc aac tgg acc atg gaa aaa gtc    1104
Gly Lys Ile Leu Pro Gln Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met Glu Lys Val
        355                 360                 365

aaa cga gag gga gtg aaa gtg atg ccc aat gca att gta caa tca gtt    1152
Lys Arg Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val Gln Ser Val
    370                 375                 380

gga gtc agc ggt ggc agg tta ctc att aag ctg aaa gat gga agg aag    1200
Gly Val Ser Gly Gly Arg Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly Arg Lys
385                 390                 395                 400

gta gaa act gac cac ata gtg aca gct gtg ggc cta gag ccc aat gtt    1248
Val Glu Thr Asp His Ile Val Thr Ala Val Gly Leu Glu Pro Asn Val
                405                 410                 415

gag ttg gcc aag act ggc gga ctg gaa ata gat tcc gat ttt ggt ggc    1296
Glu Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp Phe Gly Gly
            420                 425                 430

ttc cgg gta aat gca gaa ctc caa gca cgt tct aac atc tgg gtg gca    1344
Phe Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile Trp Val Ala
        435                 440                 445

ggg gat gct gca tgc ttc tat gat ata aag ttg ggt cga agg cga gta    1392
Gly Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg Arg Arg Val
    450                 455                 460

gag cat cat gat cat gct gtt gtg agt gga aga ctg gct gga gaa aac    1440
Glu His His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala Gly Glu Asn
465                 470                 475                 480

atg act gga gcc gct aag cca tac tgg cat cag tca atg ttc tgg agt    1488
Met Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met Phe Trp Ser
                485                 490                 495

gat ttg ggt cct gat gtc ggc tat gaa gct att ggt ctg gtg gat agt    1536
Asp Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu Val Asp Ser
            500                 505                 510

agt ttg ccc aca gtt ggt gtt ttt gca aaa gca act gca caa gac aac    1584
Ser Leu Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala Gln Asp Asn
        515                 520                 525

cca aaa tct gcc aca gag cag tca gga act ggt atc cgt tcg gag agt    1632
Pro Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser Glu Ser
    530                 535                 540

gag aca gag tca gaa gct tcg gaa atc aca att cct ccc agc gcc cct    1680
Glu Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro Ser Ala Pro
545                 550                 555                 560
```

```
gca gtc cca cag gtc cct gtt gaa ggg gag gac tac ggc aaa ggt gtc    1728
Ala Val Pro Gln Val Pro Val Glu Gly Glu Asp Tyr Gly Lys Gly Val
                565                 570                 575

atc ttc tac ctc agg gac aaa gtt gtg gtg ggg att gtg cta tgg aac    1776
Ile Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val Leu Trp Asn
            580                 585                 590

gtc ttt aac cga atg cca att gca agg aag atc att aag gac ggt gag    1824
Val Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys Asp Gly Glu
        595                 600                 605

caa cat gaa gat ctc aat gaa gta gct aaa ctc ttc aac att cat gaa    1872
Gln His Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn Ile His Glu
    610                 615                 620

gat tgaatcccaa tcgtggaata cacaagcact tttccatccc tggcg              1920
Asp
625
```

<210> 5
<211> 625
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 5

```
Cys Val Glu Gly Lys Gly Arg Ser Gly Ser Phe Arg Gly Val Ile Ala
1               5                   10                  15

Glu Met Phe Arg Cys Gly Gly Leu Ala Gly Ala Phe Lys Gln Lys Leu
            20                  25                  30

Val Pro Leu Val Arg Thr Val Tyr Val Gln Arg Pro Lys Gln Arg Asn
        35                  40                  45

Arg Leu Pro Val Val Gln Cys His Leu Leu Gly Ser Pro Ser Arg Thr
    50                  55                  60

Leu Ala Ser Ala Gly Ala Ser Gly Lys Asp Gly Ser Ser Leu Val Tyr
65                  70                  75                  80

Phe Leu Ile Val Gly Ala Thr Val Thr Gly Ala Gly Ile Tyr Tyr Ala
                85                  90                  95

Tyr Lys Thr Ile Lys Glu Asp Gln Lys Arg Tyr Asn Glu Arg Val Met
            100                 105                 110

Gly Leu Gly Leu Ser Pro Glu Glu Lys Gln Arg Arg Ala Ile Ala Ser
        115                 120                 125

Ala Thr Glu Gly Gly Ser Val Pro Gln Ile Arg Ala Pro Ser His Val
    130                 135                 140
```

Pro Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala Ala Ala Arg
145 150 155 160

Ser Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile Val Ser Glu
165 170 175

Asp Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys Glu Leu Trp
180 185 190

Phe Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Gln Phe Arg Gln Trp
195 200 205

Asn Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser Phe Tyr Val
210 215 220

Ser Ala Gln Asp Leu Pro Asn Ile Glu Asn Gly Gly Val Ala Val Leu
225 230 235 240

Thr Gly Lys Lys Val Val His Leu Asp Val Arg Gly Asn Met Val Lys
245 250 255

Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr Phe Glu Lys Cys Leu Ile Ala Thr
260 265 270

Gly Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ala Glu
275 280 285

Val Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp Phe Arg Ala
290 295 300

Leu Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Val Ile Gly Gly
305 310 315 320

Gly Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg Lys Ser Gln
325 330 335

Ala Ser Gly Ile Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys Gly Asn Met
340 345 350

Gly Lys Ile Leu Pro Gln Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met Glu Lys Val
355 360 365

Lys Arg Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val Gln Ser Val
370 375 380

Gly Val Ser Gly Gly Arg Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly Arg Lys
385 390 395 400

Val Glu Thr Asp His Ile Val Thr Ala Val Gly Leu Glu Pro Asn Val
405 410 415

Glu Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp Phe Gly Gly
420 425 430

Phe Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile Trp Val Ala
435 440 445

Gly Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg Arg Arg Val
450 455 460

Glu His His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala Gly Glu Asn
465 470 475 480

Met Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met Phe Trp Ser
485 490 495

Asp Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu Val Asp Ser
500 505 510

Ser Leu Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala Gln Asp Asn
515 520 525

Pro Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser Glu Ser
530 535 540

Glu Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro Ser Ala Pro
545 550 555 560

Ala Val Pro Gln Val Pro Val Glu Gly Glu Asp Tyr Gly Lys Gly Val
565 570 575

Ile Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val Leu Trp Asn
580 585 590

Val Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys Asp Gly Glu
595 600 605

Gln His Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn Ile His Glu
610 615 620

Asp
625

<210> 6
<211> 608
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<220>
<223> factor inductor de apoptosis en ratontes (isoforma mAIF); mAIF-alt-exon-Gold; polipéptido maduro

<400> 6

Met Phe Arg Cys Gly Gly Leu Ala Gly Ala Phe Lys Gln Lys Leu Val
1 5 10 15

Pro Leu Val Arg Thr Val Tyr Val Gln Arg Pro Lys Gln Arg Asn Arg
20 25 30

Leu Pro Val Val Gln Cys His Leu Leu Gly Ser Pro Ser Arg Thr Leu
35 40 45

Ala Ser Ala Gly Ala Ser Gly Lys Asp Gly Ser Ser Leu Val Tyr Phe
50 55 60

Leu Ile Val Gly Ala Thr Val Thr Gly Ala Gly Ile Tyr Tyr Ala Tyr
65 70 75 80

Lys Thr Ile Lys Glu Asp Gln Lys Arg Tyr Asn Glu Arg Val Met Gly
85 90 95

Leu Gly Leu Ser Pro Glu Glu Lys Gln Arg Arg Ala Ile Ala Ser Ala
100 105 110

Thr Glu Gly Gly Ser Val Pro Gln Ile Arg Ala Pro Ser His Val Pro
115 120 125

Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala Ala Ala Arg Ser
130 135 140

Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile Val Ser Glu Asp
145 150 155 160

Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys Glu Leu Trp Phe
165 170 175

Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Gln Phe Arg Gln Trp Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser Phe Tyr Val Ser
195 200 205

Ala Gln Asp Leu Pro Asn Ile Glu Asn Gly Gly Val Ala Val Leu Thr
210 215 220

Gly Lys Lys Val Val His Leu Asp Val Arg Gly Asn Met Val Lys Leu
225 230 235 240

Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr Phe Glu Lys Cys Leu Ile Ala Thr Gly
245 250 255

Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ala Glu Val
260 265 270

Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp Phe Arg Ala Leu
275 280 285

Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Val Ile Gly Gly Gly
290 295 300

Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg Lys Ser Gln Ala
305 310 315 320

Ser Gly Ile Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys Gly Asn Met Gly
325 330 335

Lys Ile Leu Pro Gln Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met Glu Lys Val Lys
340 345 350

Arg Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val Gln Ser Val Gly
355 360 365

Val Ser Gly Gly Arg Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly Arg Lys Val
370 375 380

Glu Thr Asp His Ile Val Thr Ala Val Gly Leu Glu Pro Asn Val Glu
385 390 395 400

Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp Phe Gly Gly Phe
405 410 415

Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile Trp Val Ala Gly
420 425 430

Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg Arg Arg Val Glu
435 440 445

His His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala Gly Glu Asn Met
450 455 460

Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met Phe Trp Ser Asp
465 470 475 480

Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu Val Asp Ser Ser
485 490 495

Leu Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala Gln Asp Asn Pro
500 505 510

Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser Glu Ser Glu
515 520 525

Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro Ser Ala Pro Ala
530 535 540

Val Pro Gln Val Pro Val Glu Gly Glu Asp Tyr Gly Lys Gly Val Ile
545 550 555 560

Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val Leu Trp Asn Val
565 570 575

Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys Asp Gly Glu Gln
580 585 590

His Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn Ile His Glu Asp
595 600 605

<210> 7
<211> 1906
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1881)

<220>
<223> factor inductor de apoptosis en humanos (hAIF); hAIF-Gold

<400> 7

```
aga gga aag gga agg agg agg tcc cga ata gcg gtc gcc gaa atg ttc    48
Arg Gly Lys Gly Arg Arg Arg Ser Arg Ile Ala Val Ala Glu Met Phe
  1               5                  10                  15

cgg tgt gga ggc ctg gcg gcg ggt gct ttg aag cag aag ctg gtg ccc    96
Arg Cys Gly Gly Leu Ala Ala Gly Ala Leu Lys Gln Lys Leu Val Pro
             20                  25                  30

ttg gtg cgg acc gtg tgc gtc cga agc ccg agg cag agg aac cgg ctc   144
Leu Val Arg Thr Val Cys Val Arg Ser Pro Arg Gln Arg Asn Arg Leu
         35                  40                  45

cca ggc aac ttg ttc cag cga tgg cat gtt cct cta gaa ctc cag atg   192
Pro Gly Asn Leu Phe Gln Arg Trp His Val Pro Leu Glu Leu Gln Met
     50                  55                  60

aca aga caa atg gct agc tct ggt gca tca ggg ggc aaa atc gat aat   240
Thr Arg Gln Met Ala Ser Ser Gly Ala Ser Gly Gly Lys Ile Asp Asn
 65                  70                  75                  80

tct gtg tta gtc ctt att gtg ggc tta tca aca gta gga gct ggt gcc   288
Ser Val Leu Val Leu Ile Val Gly Leu Ser Thr Val Gly Ala Gly Ala
                 85                  90                  95

tat gcc tac aag act atg aaa gag gac gaa aaa aga tac aat gaa aga   336
Tyr Ala Tyr Lys Thr Met Lys Glu Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Glu Arg
            100                 105                 110

att tca ggg tta ggg ctg aca cca gaa cag aaa cag aaa aag gcc gcg   384
Ile Ser Gly Leu Gly Leu Thr Pro Glu Gln Lys Gln Lys Lys Ala Ala
        115                 120                 125

tta tct gct tca gaa gga gag gaa gtt cct caa gac aag gcg cca agt   432
Leu Ser Ala Ser Glu Gly Glu Glu Val Pro Gln Asp Lys Ala Pro Ser
    130                 135                 140

cat gtt cct ttc ctg cta att ggt gga ggc aca gct gct ttt gct gca   480
His Val Pro Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala Ala
145                 150                 155                 160
```

```
gcc aga tcc atc cgg gct cgg gat cct ggg gcc agg gta ctg att gta    528
Ala Arg Ser Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile Val
                165                 170                 175

tct gaa gat cct gag ctg ccg tac atg cga cct cct ctt tca aaa gaa    576
Ser Glu Asp Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys Glu
            180                 185                 190

ctg tgg ttt tca gat gac cca aat gtc aca aag aca ctg cga ttc aaa    624
Leu Trp Phe Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Arg Phe Lys
        195                 200                 205

cag tgg aat gga aaa gag aga agc ata tat ttc cag cca cct tct ttc    672
Gln Trp Asn Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser Phe
    210                 215                 220

tat gtc tct gct cag gac ctg cct cat att gag aat ggt ggt gtg gct    720
Tyr Val Ser Ala Gln Asp Leu Pro His Ile Glu Asn Gly Gly Val Ala
225                 230                 235                 240

gtc ctc act ggg aag aag gta gta cag ctg gat gtg aga gac aac atg    768
Val Leu Thr Gly Lys Lys Val Val Gln Leu Asp Val Arg Asp Asn Met
                245                 250                 255

gtg aaa ctt aat gat ggc tct caa ata acc tat gaa aag tgc ttg att    816
Val Lys Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr Tyr Glu Lys Cys Leu Ile
            260                 265                 270

gca aca gga ggt act cca aga agt ctg tct gcc att gat agg gct gga    864
Ala Thr Gly Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala Gly
        275                 280                 285

gca gag gtg aag agt aga aca acg ctt ttc aga aag att gga gac ttt    912
Ala Glu Val Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp Phe
    290                 295                 300

aga agc ttg gag aag att tca cgg gaa gtc aaa tca att acg att atc    960
Arg Ser Leu Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Ile Ile
305                 310                 315                 320

ggt ggg ggc ttc ctt ggt agc gaa ctg gcc tgt gct ctt ggc aga aag    1008
Gly Gly Gly Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg Lys
                325                 330                 335

gct cga gcc ttg ggc aca gaa gtg att caa ctc ttc ccc gag aaa gga    1056
Ala Arg Ala Leu Gly Thr Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys Gly
            340                 345                 350

aat atg gga aag atc ctc ccc gaa tac ctc agc aac tgg acc atg gaa    1104
Asn Met Gly Lys Ile Leu Pro Glu Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met Glu
        355                 360                 365

aaa gtc aga cga gag ggg gtt aag gtg atg ccc aat gct att gtg caa    1152
Lys Val Arg Arg Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val Gln
    370                 375                 380
```

```
tcc gtt gga gtc agc agt ggc aag tta ctt atc aag ctg aaa gac ggc    1200
Ser Val Gly Val Ser Ser Gly Lys Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly
385                 390                 395                 400

agg aag gta gaa act gac cac ata gtg gca gct gtg ggc ctg gag ccc    1248
Arg Lys Val Glu Thr Asp His Ile Val Ala Ala Val Gly Leu Glu Pro
                405                 410                 415

aat gtt gag ttg gcc aag act ggt ggc ctg gaa ata gac tca gat ttt    1296
Asn Val Glu Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp Phe
            420                 425                 430

ggt ggc ttc cgg gta aat gca gag cta caa gca cgc tct aac atc tgg    1344
Gly Gly Phe Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile Trp
        435                 440                 445

gtg gca gga gat gct gca tgc ttc tac gat ata aag ttg gga agg agg    1392
Val Ala Gly Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg Arg
    450                 455                 460

cgg gta gag cac cat gat cac gct gtt gtg agt gga aga ttg gct gga    1440
Arg Val Glu His His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala Gly
465                 470                 475                 480

gaa aat atg act gga gct gct aag ccg tac tgg cat cag tca atg ttc    1488
Glu Asn Met Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met Phe
                485                 490                 495

tgg agt gat ttg ggc ccc gat gtt ggc tat gaa gct att ggt ctt gtg    1536
Trp Ser Asp Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu Val
            500                 505                 510

gac agt agt ttg ccc aca gtt ggt gtt ttt gca aaa gca act gca caa    1584
Asp Ser Ser Leu Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala Gln
        515                 520                 525

gac aac ccc aaa tct gcc aca gag cag tca gga act ggt atc cga tca    1632
Asp Asn Pro Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser
    530                 535                 540

gag agt gag aca gag tcc gag gcc tca gaa att act att cct ccc agc    1680
Glu Ser Glu Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro Ser
545                 550                 555                 560

acc ccg gca gtt cca cag gct ccc gtc cag ggg gag gac tac ggc aaa    1728
Thr Pro Ala Val Pro Gln Ala Pro Val Gln Gly Glu Asp Tyr Gly Lys
                565                 570                 575

ggt gtc atc ttc tac ctc agg gac aaa gtg gtc gtg ggg att gtg cta    1776
Gly Val Ile Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val Leu
            580                 585                 590

tgg aac atc ttt aac cga atg cca ata gca agg aag atc att aag gac    1824
Trp Asn Ile Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys Asp
        595                 600                 605
```

```
ggt gag cag cat gaa gat ctc aat gaa gta gcc aaa cta ttc aac att    1872
Gly Glu Gln His Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn Ile
    610                 615                 620

cat gaa gac tgaagcccca cagtggaatt ggcaa                            1906
His Glu Asp
625
```

<210> 8

<211> 627

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

```
Arg Gly Lys Gly Arg Arg Arg Ser Arg Ile Ala Val Ala Glu Met Phe
  1               5                  10                  15

Arg Cys Gly Gly Leu Ala Ala Gly Ala Leu Lys Gln Lys Leu Val Pro
             20                  25                  30

Leu Val Arg Thr Val Cys Val Arg Ser Pro Arg Gln Arg Asn Arg Leu
         35                  40                  45

Pro Gly Asn Leu Phe Gln Arg Trp His Val Pro Leu Glu Leu Gln Met
     50                  55                  60

Thr Arg Gln Met Ala Ser Ser Gly Ala Ser Gly Gly Lys Ile Asp Asn
 65                  70                  75                  80

Ser Val Leu Val Leu Ile Val Gly Leu Ser Thr Val Gly Ala Gly Ala
                 85                  90                  95

Tyr Ala Tyr Lys Thr Met Lys Glu Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Glu Arg
            100                 105                 110

Ile Ser Gly Leu Gly Leu Thr Pro Glu Gln Lys Gln Lys Lys Ala Ala
        115                 120                 125

Leu Ser Ala Ser Glu Gly Glu Glu Val Pro Gln Asp Lys Ala Pro Ser
    130                 135                 140

His Val Pro Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala Ala
145                 150                 155                 160

Ala Arg Ser Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile Val
                165                 170                 175

Ser Glu Asp Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys Glu
            180                 185                 190

Leu Trp Phe Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Arg Phe Lys
        195                 200                 205
```

Gln Trp Asn Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser Phe
210 215 220

Tyr Val Ser Ala Gln Asp Leu Pro His Ile Glu Asn Gly Gly Val Ala
225 230 235 240

Val Leu Thr Gly Lys Lys Val Val Gln Leu Asp Val Arg Asp Asn Met
245 250 255

Val Lys Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr Tyr Glu Lys Cys Leu Ile
260 265 270

Ala Thr Gly Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala Gly
275 280 285

Ala Glu Val Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp Phe
290 295 300

Arg Ser Leu Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Ile Ile
305 310 315 320

Gly Gly Gly Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg Lys
325 330 335

Ala Arg Ala Leu Gly Thr Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys Gly
340 345 350

Asn Met Gly Lys Ile Leu Pro Glu Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met Glu
355 360 365

Lys Val Arg Arg Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val Gln
370 375 380

Ser Val Gly Val Ser Ser Gly Lys Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly
385 390 395 400

Arg Lys Val Glu Thr Asp His Ile Val Ala Ala Val Gly Leu Glu Pro
405 410 415

Asn Val Glu Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp Phe
420 425 430

Gly Gly Phe Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile Trp
435 440 445

Val Ala Gly Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg Arg
450 455 460

Arg Val Glu His His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala Gly
465 470 475 480

Glu Asn Met Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met Phe
485 490 495

Trp Ser Asp Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu Val
500 505 510

Asp Ser Ser Leu Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala Gln
515 520 525

Asp Asn Pro Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser
530 535 540

Glu Ser Glu Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro Ser
545 550 555 560

Thr Pro Ala Val Pro Gln Ala Pro Val Gln Gly Glu Asp Tyr Gly Lys
565 570 575

Gly Val Ile Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val Leu
580 585 590

Trp Asn Ile Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys Asp
595 600 605

Gly Glu Gln His Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn Ile
610 615 620

His Glu Asp
625

<210> 9
<211> 613
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> factor inductor de apoptosis en humanos (hAIF); hAIF-Gold; polipéptido maduro

<400> 9

Met Phe Arg Cys Gly Gly Leu Ala Ala Gly Ala Leu Lys Gln Lys Leu
1 5 10 15

Val Pro Leu Val Arg Thr Val Cys Val Arg Ser Pro Arg Gln Arg Asn
20 25 30

Arg Leu Pro Gly Asn Leu Phe Gln Arg Trp His Val Pro Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Met Thr Arg Gln Met Ala Ser Ser Gly Ala Ser Gly Gly Lys Ile
50 55 60

Asp Asn Ser Val Leu Val Leu Ile Val Gly Leu Ser Thr Val Gly Ala
65 70 75 80

Gly Ala Tyr Ala Tyr Lys Thr Met Lys Glu Asp Glu Lys Arg Tyr Asn
85 90 95

Glu Arg Ile Ser Gly Leu Gly Leu Thr Pro Glu Gln Lys Gln Lys Lys
100 105 110

Ala Ala Leu Ser Ala Ser Glu Gly Glu Glu Val Pro Gln Asp Lys Ala
115 120 125

Pro Ser His Val Pro Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe
130 135 140

Ala Ala Ala Arg Ser Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu
145 150 155 160

Ile Val Ser Glu Asp Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser
165 170 175

Lys Glu Leu Trp Phe Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Arg
180 185 190

Phe Lys Gln Trp Asn Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro
195 200 205

Ser Phe Tyr Val Ser Ala Gln Asp Leu Pro His Ile Glu Asn Gly Gly
210 215 220

Val Ala Val Leu Thr Gly Lys Lys Val Val Gln Leu Asp Val Arg Asp
225 230 235 240

Asn Met Val Lys Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr Tyr Glu Lys Cys
245 250 255

Leu Ile Ala Thr Gly Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg
260 265 270

Ala Gly Ala Glu Val Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly
275 280 285

Asp Phe Arg Ser Leu Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr
290 295 300

Ile Ile Gly Gly Gly Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly
305 310 315 320

Arg Lys Ala Arg Ala Leu Gly Thr Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu
325 330 335

Lys Gly Asn Met Gly Lys Ile Leu Pro Glu Tyr Leu Ser Asn Trp Thr
340 345 350

Met Glu Lys Val Arg Arg Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile
355 360 365

Val Gln Ser Val Gly Val Ser Ser Gly Lys Leu Leu Ile Lys Leu Lys
370 375 380

Asp Gly Arg Lys Val Glu Thr Asp His Ile Val Ala Ala Val Gly Leu
385 390 395 400

Glu Pro Asn Val Glu Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser
405 410 415

Asp Phe Gly Gly Phe Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn
420 425 430

Ile Trp Val Ala Gly Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly
435 440 445

Arg Arg Arg Val Glu His His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu
450 455 460

Ala Gly Glu Asn Met Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser
465 470 475 480

Met Phe Trp Ser Asp Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly
485 490 495

Leu Val Asp Ser Ser Leu Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr
500 505 510

Ala Gln Asp Asn Pro Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile
515 520 525

Arg Ser Glu Ser Glu Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro
530 535 540

Pro Ser Thr Pro Ala Val Pro Gln Ala Pro Val Gln Gly Glu Asp Tyr
545 550 555 560

Gly Lys Gly Val Ile Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile
565 570 575

Val Leu Trp Asn Ile Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile
580 585 590

Lys Asp Gly Glu Gln His Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe
595 600 605

Asn Ile His Glu Asp
610

<210> 10
<211> 1894
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1869)

<220>
<223> factor inductor de apoptosis en humanos (isoforma hAIF # 1); hAIF-alt-exon-Gold

<400> 10

```
aga gga aag gga agg agg agg tcc cga ata gcg gtc gcc gaa atg ttc    48
Arg Gly Lys Gly Arg Arg Arg Ser Arg Ile Ala Val Ala Glu Met Phe
  1               5                  10                  15

cgg tgt gga ggc ctg gcg gcg ggt gct ttg aag cag aag ctg gtg ccc    96
Arg Cys Gly Gly Leu Ala Ala Gly Ala Leu Lys Gln Lys Leu Val Pro
             20                  25                  30

ttg gtg cgg acc gtg tgc gtc cga agc ccg agg cag agg aac cgg ctc   144
Leu Val Arg Thr Val Cys Val Arg Ser Pro Arg Gln Arg Asn Arg Leu
         35                  40                  45

cca gtt gtg cag tct cat cac cta gga tcc cct tct aga tca cta gca   192
Pro Val Val Gln Ser His His Leu Gly Ser Pro Ser Arg Ser Leu Ala
     50                  55                  60

tct aca ggt gct tct ggg aaa gat ggc agc aac cta gtg tac ttc tta   240
Ser Thr Gly Ala Ser Gly Lys Asp Gly Ser Asn Leu Val Tyr Phe Leu
 65                  70                  75                  80

att gta gga gca aca gtc act ggg gca gga gtt tat tat gcc tac aag   288
Ile Val Gly Ala Thr Val Thr Gly Ala Gly Val Tyr Tyr Ala Tyr Lys
                 85                  90                  95

act atg aaa gag gac gaa aaa aga tac aat gaa aga att tca ggg tta   336
Thr Met Lys Glu Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Glu Arg Ile Ser Gly Leu
            100                 105                 110

ggg ctg aca cca gaa cag aaa cag aaa aag gcc gcg tta tct gct tca   384
Gly Leu Thr Pro Glu Gln Lys Gln Lys Lys Ala Ala Leu Ser Ala Ser
        115                 120                 125

gaa gga gag gaa gtt cct caa gac aag gcg cca agt cat gtt cct ttc   432
Glu Gly Glu Glu Val Pro Gln Asp Lys Ala Pro Ser His Val Pro Phe
    130                 135                 140

ctg cta att ggt gga ggc aca gct gct ttt gct gca gcc aga tcc atc   480
Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala Ala Ala Arg Ser Ile
145                 150                 155                 160

cgg gct cgg gat cct ggg gcc agg gta ctg att gta tct gaa gat cct   528
Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile Val Ser Glu Asp Pro
                165                 170                 175

gag ctg ccg tac atg cga cct cct ctt tca aaa gaa ctg tgg ttt tca   576
Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys Glu Leu Trp Phe Ser
            180                 185                 190
```

```
gat gac cca aat gtc aca aag aca ctg cga ttc aaa cag tgg aat gga    624
Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Arg Phe Lys Gln Trp Asn Gly
        195                 200                 205

aaa gag aga agc ata tat ttc cag cca cct tct ttc tat gtc tct gct    672
Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser Phe Tyr Val Ser Ala
    210                 215                 220

cag gac ctg cct cat att gag aat ggt ggt gtg gct gtc ctc act ggg    720
Gln Asp Leu Pro His Ile Glu Asn Gly Gly Val Ala Val Leu Thr Gly
225                 230                 235                 240

aag aag gta gta cag ctg gat gtg aga gac aac atg gtg aaa ctt aat    768
Lys Lys Val Val Gln Leu Asp Val Arg Asp Asn Met Val Lys Leu Asn
                245                 250                 255

gat ggc tct caa ata acc tat gaa aag tgc ttg att gca aca gga ggt    816
Asp Gly Ser Gln Ile Thr Tyr Glu Lys Cys Leu Ile Ala Thr Gly Gly
            260                 265                 270

act cca aga agt ctg tct gcc att gat agg gct gga gca gag gtg aag    864
Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ala Glu Val Lys
        275                 280                 285

agt aga aca acg ctt ttc aga aag att gga gac ttt aga agc ttg gag    912
Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp Phe Arg Ser Leu Glu
    290                 295                 300

aag att tca cgg gaa gtc aaa tca att acg att atc ggt ggg ggc ttc    960
Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Ile Ile Gly Gly Gly Phe
305                 310                 315                 320

ctt ggt agc gaa ctg gcc tgt gct ctt ggc aga aag gct cga gcc ttg    1008
Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg Lys Ala Arg Ala Leu
                325                 330                 335

ggc aca gaa gtg att caa ctc ttc ccc gag aaa gga aat atg gga aag    1056
Gly Thr Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys Gly Asn Met Gly Lys
            340                 345                 350

atc ctc ccc gaa tac ctc agc aac tgg acc atg gaa aaa gtc aga cga    1104
Ile Leu Pro Glu Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met Glu Lys Val Arg Arg
        355                 360                 365

gag ggg gtt aag gtg atg ccc aat gct att gtg caa tcc gtt gga gtc    1152
Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val Gln Ser Val Gly Val
    370                 375                 380

agc agt ggc aag tta ctt atc aag ctg aaa gac ggc agg aag gta gaa    1200
Ser Ser Gly Lys Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly Arg Lys Val Glu
385                 390                 395                 400

act gac cac ata gtg gca gct gtg ggc ctg gag ccc aat gtt gag ttg    1248
Thr Asp His Ile Val Ala Ala Val Gly Leu Glu Pro Asn Val Glu Leu
                405                 410                 415
```

```
gcc aag act ggt ggc ctg gaa ata gac tca gat ttt ggt ggc ttc cgg    1296
Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp Phe Gly Gly Phe Arg
            420                 425                 430

gta aat gca gag cta caa gca cgc tct aac atc tgg gtg gca gga gat    1344
Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile Trp Val Ala Gly Asp
        435                 440                 445

gct gca tgc ttc tac gat ata aag ttg gga agg agg cgg gta gag cac    1392
Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg Arg Arg Val Glu His
    450                 455                 460

cat gat cac gct gtt gtg agt gga aga ttg gct gga gaa aat atg act    1440
His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala Gly Glu Asn Met Thr
465                 470                 475                 480

gga gct gct aag ccg tac tgg cat cag tca atg ttc tgg agt gat ttg    1488
Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met Phe Trp Ser Asp Leu
                485                 490                 495

ggc ccc gat gtt ggc tat gaa gct att ggt ctt gtg gac agt agt ttg    1536
Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu Val Asp Ser Ser Leu
            500                 505                 510

ccc aca gtt ggt gtt ttt gca aaa gca act gca caa gac aac ccc aaa    1584
Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala Gln Asp Asn Pro Lys
        515                 520                 525

tct gcc aca gag cag tca gga act ggt atc cga tca gag agt gag aca    1632
Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser Glu Ser Glu Thr
    530                 535                 540

gag tcc gag gcc tca gaa att act att cct ccc agc acc ccg gca gtt    1680
Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro Ser Thr Pro Ala Val
545                 550                 555                 560

cca cag gct ccc gtc cag ggg gag gac tac ggc aaa ggt gtc atc ttc    1728
Pro Gln Ala Pro Val Gln Gly Glu Asp Tyr Gly Lys Gly Val Ile Phe
                565                 570                 575

tac ctc agg gac aaa gtg gtc gtg ggg att gtg cta tgg aac atc ttt    1776
Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val Leu Trp Asn Ile Phe
            580                 585                 590

aac cga atg cca ata gca agg aag atc att aag gac ggt gag cag cat    1824
Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys Asp Gly Glu Gln His
        595                 600                 605

gaa gat ctc aat gaa gta gcc aaa cta ttc aac att cat gaa gac        1869
Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn Ile His Glu Asp
    610                 615                 620

tgaagcccca cagtggaatt ggcaa                                        1894
```

<210> 11
<211> 623
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Arg Gly Lys Gly Arg Arg Arg Ser Arg Ile Ala Val Ala Glu Met Phe
1 5 10 15

Arg Cys Gly Gly Leu Ala Ala Gly Ala Leu Lys Gln Lys Leu Val Pro
20 25 30

Leu Val Arg Thr Val Cys Val Arg Ser Pro Arg Gln Arg Asn Arg Leu
35 40 45

Pro Val Val Gln Ser His His Leu Gly Ser Pro Ser Arg Ser Leu Ala
50 55 60

Ser Thr Gly Ala Ser Gly Lys Asp Gly Ser Asn Leu Val Tyr Phe Leu
65 70 75 80

Ile Val Gly Ala Thr Val Thr Gly Ala Gly Val Tyr Tyr Ala Tyr Lys
85 90 95

Thr Met Lys Glu Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Glu Arg Ile Ser Gly Leu
100 105 110

Gly Leu Thr Pro Glu Gln Lys Gln Lys Lys Ala Ala Leu Ser Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Glu Glu Val Pro Gln Asp Lys Ala Pro Ser His Val Pro Phe
130 135 140

Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala Ala Ala Arg Ser Ile
145 150 155 160

Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile Val Ser Glu Asp Pro
165 170 175

Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys Glu Leu Trp Phe Ser
180 185 190

Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Arg Phe Lys Gln Trp Asn Gly
195 200 205

Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser Phe Tyr Val Ser Ala
210 215 220

Gln Asp Leu Pro His Ile Glu Asn Gly Gly Val Ala Val Leu Thr Gly
225 230 235 240

Lys Lys Val Val Gln Leu Asp Val Arg Asp Asn Met Val Lys Leu Asn
245 250 255

Asp Gly Ser Gln Ile Thr Tyr Glu Lys Cys Leu Ile Ala Thr Gly Gly
260 265 270

Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ala Glu Val Lys
275 280 285

Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp Phe Arg Ser Leu Glu
290 295 300

Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Ile Ile Gly Gly Gly Phe
305 310 315 320

Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg Lys Ala Arg Ala Leu
325 330 335

Gly Thr Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys Gly Asn Met Gly Lys
340 345 350

Ile Leu Pro Glu Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met Glu Lys Val Arg Arg
355 360 365

Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val Gln Ser Val Gly Val
370 375 380

Ser Ser Gly Lys Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly Arg Lys Val Glu
385 390 395 400

Thr Asp His Ile Val Ala Ala Val Gly Leu Glu Pro Asn Val Glu Leu
405 410 415

Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp Phe Gly Gly Phe Arg
420 425 430

Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile Trp Val Ala Gly Asp
435 440 445

Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg Arg Arg Val Glu His
450 455 460

His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala Gly Glu Asn Met Thr
465 470 475 480

Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met Phe Trp Ser Asp Leu
485 490 495

Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu Val Asp Ser Ser Leu
500 505 510

Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala Gln Asp Asn Pro Lys
515 520 525

Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser Glu Ser Glu Thr
530 535 540

Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro Ser Thr Pro Ala Val
545 550 555 560

Pro Gln Ala Pro Val Gln Gly Glu Asp Tyr Gly Lys Gly Val Ile Phe
565 570 575

Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val Leu Trp Asn Ile Phe
580 585 590

Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys Asp Gly Glu Gln His
595 600 605

Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn Ile His Glu Asp
610 615 620

<210> 12
<211> 609
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> factor inductor de apoptosis en humanos (isofoma hIFA # 1); hAIF-alt-exon-Gold; pilipéptidos madura

<400> 12

Met Phe Arg Cys Gly Gly Leu Ala Ala Gly Ala Leu Lys Gln Lys Leu
1 5 10 15

Val Pro Leu Val Arg Thr Val Cys Val Arg Ser Pro Arg Gln Arg Asn
20 25 30

Arg Leu Pro Val Val Gln Ser His His Leu Gly Ser Pro Ser Arg Ser
35 40 45

Leu Ala Ser Thr Gly Ala Ser Gly Lys Asp Gly Ser Asn Leu Val Tyr
50 55 60

Phe Leu Ile Val Gly Ala Thr Val Thr Gly Ala Gly Val Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Tyr Lys Thr Met Lys Glu Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Glu Arg Ile Ser
85 90 95

Gly Leu Gly Leu Thr Pro Glu Gln Lys Gln Lys Lys Ala Ala Leu Ser
100 105 110

Ala Ser Glu Gly Glu Glu Val Pro Gln Asp Lys Ala Pro Ser His Val
115 120 125

Pro Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala Ala Ala Arg
130 135 140

Ser Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile Val Ser Glu
145 150 155 160

Asp Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys Glu Leu Trp
165 170 175

Phe Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Arg Phe Lys Gln Trp
180 185 190

Asn Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser Phe Tyr Val
195 200 205

Ser Ala Gln Asp Leu Pro His Ile Glu Asn Gly Gly Val Ala Val Leu
210 215 220

Thr Gly Lys Lys Val Val Gln Leu Asp Val Arg Asp Asn Met Val Lys
225 230 235 240

Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr Tyr Glu Lys Cys Leu Ile Ala Thr
245 250 255

Gly Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ala Glu
260 265 270

Val Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp Phe Arg Ser
275 280 285

Leu Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Ile Ile Gly Gly
290 295 300

Gly Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg Lys Ala Arg
305 310 315 320

Ala Leu Gly Thr Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys Gly Asn Met
325 330 335

Gly Lys Ile Leu Pro Glu Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met Glu Lys Val
340 345 350

Arg Arg Glu Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val Gln Ser Val
355 360 365

Gly Val Ser Ser Gly Lys Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly Arg Lys
370 375 380

Val Glu Thr Asp His Ile Val Ala Ala Val Gly Leu Glu Pro Asn Val
385 390 395 400

Glu Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp Phe Gly Gly
405 410 415

Phe Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile Trp Val Ala
420 425 430

Gly Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg Arg Arg Val
435 440 445

```
Glu His His Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala Gly Glu Asn
    450                 455                 460

Met Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met Phe Trp Ser
465                 470                 475                 480

Asp Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu Val Asp Ser
                485                 490                 495

Ser Leu Pro Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala Gln Asp Asn
            500                 505                 510

Pro Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser Glu Ser
        515                 520                 525

Glu Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro Ser Thr Pro
    530                 535                 540

Ala Val Pro Gln Ala Pro Val Gln Gly Glu Asp Tyr Gly Lys Gly Val
545                 550                 555                 560

Ile Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val Leu Trp Asn
                565                 570                 575

Ile Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys Asp Gly Glu
            580                 585                 590

Gln His Glu Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn Ile His Glu
        595                 600                 605

Asp
```

<210> 13
<211> 1762
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (79)..(1737)

<220>
<223> factor inductor de apoptosis en humanos (isoforma hAIF #2); hAIF-exon-skip-Gold

<400> 13

```
gaggaaaggg aaggaggagg tcccgaatag cggtcgccga aatgttccgg tgtggaggcc 60

tggcggcggg tgctttga agc aga agc tgg tgc cct tgg tgc gga ccg tgt   111
                    Ser Arg Ser Trp Cys Pro Trp Cys Gly Pro Cys
                      1               5                  10
```

```
gcg tcc gaa gcc cga ggc aga gga acc ggc tcc cag gcc tac aag act    159
Ala Ser Glu Ala Arg Gly Arg Gly Thr Gly Ser Gln Ala Tyr Lys Thr
            15                  20                  25

atg aaa gag gac gaa aaa aga tac aat gaa aga att tca ggg tta ggg    207
Met Lys Glu Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Glu Arg Ile Ser Gly Leu Gly
        30                  35                  40

ctg aca cca gaa cag aaa cag aaa aag gcc gcg tta tct gct tca gaa    255
Leu Thr Pro Glu Gln Lys Gln Lys Lys Ala Ala Leu Ser Ala Ser Glu
    45                  50                  55

gga gag gaa gtt cct caa gac aag gcg cca agt cat gtt cct ttc ctg    303
Gly Glu Glu Val Pro Gln Asp Lys Ala Pro Ser His Val Pro Phe Leu
60                  65                  70                  75

cta att ggt gga ggc aca gct gct ttt gct gca gcc aga tcc atc cgg    351
Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala Ala Ala Arg Ser Ile Arg
                80                  85                  90

gct cgg gat cct ggg gcc agg gta ctg att gta tct gaa gat cct gag    399
Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile Val Ser Glu Asp Pro Glu
            95                  100                 105

ctg ccg tac atg cga cct cct ctt tca aaa gaa ctg tgg ttt tca gat    447
Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys Glu Leu Trp Phe Ser Asp
        110                 115                 120

gac cca aat gtc aca aag aca ctg cga ttc aaa cag tgg aat gga aaa    495
Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Arg Phe Lys Gln Trp Asn Gly Lys
    125                 130                 135

gag aga agc ata tat ttc cag cca cct tct ttc tat gtc tct gct cag    543
Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser Phe Tyr Val Ser Ala Gln
140                 145                 150                 155

gac ctg cct cat att gag aat ggt ggt gtg gct gtc ctc act ggg aag    591
Asp Leu Pro His Ile Glu Asn Gly Gly Val Ala Val Leu Thr Gly Lys
                160                 165                 170

aag gta gta cag ctg gat gtg aga gac aac atg gtg aaa ctt aat gat    639
Lys Val Val Gln Leu Asp Val Arg Asp Asn Met Val Lys Leu Asn Asp
            175                 180                 185

ggc tct caa ata acc tat gaa aag tgc ttg att gca aca gga ggt act    687
Gly Ser Gln Ile Thr Tyr Glu Lys Cys Leu Ile Ala Thr Gly Gly Thr
        190                 195                 200

cca aga agt ctg tct gcc att gat agg gct gga gca gag gtg aag agt    735
Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ala Glu Val Lys Ser
    205                 210                 215

aga aca acg ctt ttc aga aag att gga gac ttt aga agc ttg gag aag    783
Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp Phe Arg Ser Leu Glu Lys
220                 225                 230                 235
```

```
att tca cgg gaa gtc aaa tca att acg att atc ggt ggg ggc ttc ctt    831
Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Ile Ile Gly Gly Gly Phe Leu
                240                 245                 250

ggt agc gaa ctg gcc tgt gct ctt ggc aga aag gct cga gcc ttg ggc    879
Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg Lys Ala Arg Ala Leu Gly
            255                 260                 265

aca gaa gtg att caa ctc ttc ccc gag aaa gga aat atg gga aag atc    927
Thr Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys Gly Asn Met Gly Lys Ile
        270                 275                 280

ctc ccc gaa tac ctc agc aac tgg acc atg gaa aaa gtc aga cga gag    975
Leu Pro Glu Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met Glu Lys Val Arg Arg Glu
    285                 290                 295

ggg gtt aag gtg atg ccc aat gct att gtg caa tcc gtt gga gtc agc    1023
Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val Gln Ser Val Gly Val Ser
300                 305                 310                 315

agt ggc aag tta ctt atc aag ctg aaa gac ggc agg aag gta gaa act    1071
Ser Gly Lys Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly Arg Lys Val Glu Thr
                320                 325                 330

gac cac ata gtg gca gct gtg ggc ctg gag ccc aat gtt gag ttg gcc    1119
Asp His Ile Val Ala Ala Val Gly Leu Glu Pro Asn Val Glu Leu Ala
            335                 340                 345

aag act ggt ggc ctg gaa ata gac tca gat ttt ggt ggc ttc cgg gta    1167
Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp Phe Gly Gly Phe Arg Val
        350                 355                 360

aat gca gag cta caa gca cgc tct aac atc tgg gtg gca gga gat gct    1215
Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile Trp Val Ala Gly Asp Ala
    365                 370                 375

gca tgc ttc tac gat ata aag ttg gga agg agg cgg gta gag cac cat    1263
Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg Arg Arg Val Glu His His
380                 385                 390                 395

gat cac gct gtt gtg agt gga aga ttg gct gga gaa aat atg act gga    1311
Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala Gly Glu Asn Met Thr Gly
                400                 405                 410

gct gct aag ccg tac tgg cat cag tca atg ttc tgg agt gat ttg ggc    1359
Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met Phe Trp Ser Asp Leu Gly
            415                 420                 425

ccc gat gtt ggc tat gaa gct att ggt ctt gtg gac agt agt ttg ccc    1407
Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu Val Asp Ser Ser Leu Pro
        430                 435                 440

aca gtt ggt gtt ttt gca aaa gca act gca caa gac aac ccc aaa tct    1455
Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala Gln Asp Asn Pro Lys Ser
    445                 450                 455
```

```
gcc aca gag cag tca gga act ggt atc cga tca gag agt gag aca gag    1503
Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser Glu Ser Glu Thr Glu
460                 465                 470                 475

tcc gag gcc tca gaa att act att cct ccc agc acc ccg gca gtt cca    1551
Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro Ser Thr Pro Ala Val Pro
                480                 485                 490

cag gct ccc gtc cag ggg gag gac tac ggc aaa ggt gtc atc ttc tac    1599
Gln Ala Pro Val Gln Gly Glu Asp Tyr Gly Lys Gly Val Ile Phe Tyr
            495                 500                 505

ctc agg gac aaa gtg gtc gtg ggg att gtg cta tgg aac atc ttt aac    1647
Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val Leu Trp Asn Ile Phe Asn
        510                 515                 520

cga atg cca ata gca agg aag atc att aag gac ggt gag cag cat gaa    1695
Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys Asp Gly Glu Gln His Glu
    525                 530                 535

gat ctc aat gaa gta gcc aaa cta ttc aac att cat gaa gac            1737
Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn Ile His Glu Asp
540                 545                 550

tgaagcccca cagtggaatt ggcaa                                        1762
```

<210> 14

<211> 553

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

```
Ser Arg Ser Trp Cys Pro Trp Cys Gly Pro Cys Ala Ser Glu Ala Arg
1               5                   10                  15

Gly Arg Gly Thr Gly Ser Gln Ala Tyr Lys Thr Met Lys Glu Asp Glu
            20                  25                  30

Lys Arg Tyr Asn Glu Arg Ile Ser Gly Leu Gly Leu Thr Pro Glu Gln
        35                  40                  45

Lys Gln Lys Lys Ala Ala Leu Ser Ala Ser Glu Gly Glu Glu Val Pro
    50                  55                  60

Gln Asp Lys Ala Pro Ser His Val Pro Phe Leu Leu Ile Gly Gly Gly
65                  70                  75                  80

Thr Ala Ala Phe Ala Ala Ala Arg Ser Ile Arg Ala Arg Asp Pro Gly
                85                  90                  95

Ala Arg Val Leu Ile Val Ser Glu Asp Pro Glu Leu Pro Tyr Met Arg
            100                 105                 110
```

Pro Pro Leu Ser Lys Glu Leu Trp Phe Ser Asp Asp Pro Asn Val Thr
115 120 125

Lys Thr Leu Arg Phe Lys Gln Trp Asn Gly Lys Glu Arg Ser Ile Tyr
130 135 140

Phe Gln Pro Pro Ser Phe Tyr Val Ser Ala Gln Asp Leu Pro His Ile
145 150 155 160

Glu Asn Gly Gly Val Ala Val Leu Thr Gly Lys Lys Val Val Gln Leu
165 170 175

Asp Val Arg Asp Asn Met Val Lys Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ile Thr
180 185 190

Tyr Glu Lys Cys Leu Ile Ala Thr Gly Gly Thr Pro Arg Ser Leu Ser
195 200 205

Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ala Glu Val Lys Ser Arg Thr Thr Leu Phe
210 215 220

Arg Lys Ile Gly Asp Phe Arg Ser Leu Glu Lys Ile Ser Arg Glu Val
225 230 235 240

Lys Ser Ile Thr Ile Ile Gly Gly Gly Phe Leu Gly Ser Glu Leu Ala
245 250 255

Cys Ala Leu Gly Arg Lys Ala Arg Ala Leu Gly Thr Glu Val Ile Gln
260 265 270

Leu Phe Pro Glu Lys Gly Asn Met Gly Lys Ile Leu Pro Glu Tyr Leu
275 280 285

Ser Asn Trp Thr Met Glu Lys Val Arg Arg Glu Gly Val Lys Val Met
290 295 300

Pro Asn Ala Ile Val Gln Ser Val Gly Val Ser Ser Gly Lys Leu Leu
305 310 315 320

Ile Lys Leu Lys Asp Gly Arg Lys Val Glu Thr Asp His Ile Val Ala
325 330 335

Ala Val Gly Leu Glu Pro Asn Val Glu Leu Ala Lys Thr Gly Gly Leu
340 345 350

Glu Ile Asp Ser Asp Phe Gly Gly Phe Arg Val Asn Ala Glu Leu Gln
355 360 365

Ala Arg Ser Asn Ile Trp Val Ala Gly Asp Ala Ala Cys Phe Tyr Asp
370 375 380

Ile Lys Leu Gly Arg Arg Arg Val Glu His His Asp His Ala Val Val
385 390 395 400

Ser Gly Arg Leu Ala Gly Glu Asn Met Thr Gly Ala Ala Lys Pro Tyr
405 410 415

Trp His Gln Ser Met Phe Trp Ser Asp Leu Gly Pro Asp Val Gly Tyr
420 425 430

Glu Ala Ile Gly Leu Val Asp Ser Ser Leu Pro Thr Val Gly Val Phe
435 440 445

Ala Lys Ala Thr Ala Gln Asp Asn Pro Lys Ser Ala Thr Glu Gln Ser
450 455 460

Gly Thr Gly Ile Arg Ser Glu Ser Glu Thr Glu Ser Glu Ala Ser Glu
465 470 475 480

Ile Thr Ile Pro Pro Ser Thr Pro Ala Val Pro Gln Ala Pro Val Gln
485 490 495

Gly Glu Asp Tyr Gly Lys Gly Val Ile Phe Tyr Leu Arg Asp Lys Val
500 505 510

Val Val Gly Ile Val Leu Trp Asn Ile Phe Asn Arg Met Pro Ile Ala
515 520 525

Arg Lys Ile Ile Lys Asp Gly Glu Gln His Glu Asp Leu Asn Glu Val
530 535 540

Ala Lys Leu Phe Asn Ile His Glu Asp
545 550

<210> 15
<211> 526
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> factor inductor de apoptosis (isoforma hAIF #2); hAIF-exon-skip-Gold; polipéptido maduro

<400> 15

Met Lys Glu Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Glu Arg Ile Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15

Leu Thr Pro Glu Gln Lys Gln Lys Lys Ala Ala Leu Ser Ala Ser Glu
20 25 30

Gly Glu Glu Val Pro Gln Asp Lys Ala Pro Ser His Val Pro Phe Leu
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Gly Thr Ala Ala Phe Ala Ala Ala Arg Ser Ile Arg
50 55 60

Ala Arg Asp Pro Gly Ala Arg Val Leu Ile Val Ser Glu Asp Pro Glu
65 70 75 80

Leu Pro Tyr Met Arg Pro Pro Leu Ser Lys Glu Leu Trp Phe Ser Asp
85 90 95

Asp Pro Asn Val Thr Lys Thr Leu Arg Phe Lys Gln Trp Asn Gly Lys
100 105 110

Glu Arg Ser Ile Tyr Phe Gln Pro Pro Ser Phe Tyr Val Ser Ala Gln
115 120 125

Asp Leu Pro His Ile Glu Asn Gly Gly Val Ala Val Leu Thr Gly Lys
130 135 140

Lys Val Val Gln Leu Asp Val Arg Asp Asn Met Val Lys Leu Asn Asp
145 150 155 160

Gly Ser Gln Ile Thr Tyr Glu Lys Cys Leu Ile Ala Thr Gly Gly Thr
165 170 175

Pro Arg Ser Leu Ser Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ala Glu Val Lys Ser
180 185 190

Arg Thr Thr Leu Phe Arg Lys Ile Gly Asp Phe Arg Ser Leu Glu Lys
195 200 205

Ile Ser Arg Glu Val Lys Ser Ile Thr Ile Ile Gly Gly Gly Phe Leu
210 215 220

Gly Ser Glu Leu Ala Cys Ala Leu Gly Arg Lys Ala Arg Ala Leu Gly
225 230 235 240

Thr Glu Val Ile Gln Leu Phe Pro Glu Lys Gly Asn Met Gly Lys Ile
245 250 255

Leu Pro Glu Tyr Leu Ser Asn Trp Thr Met Glu Lys Val Arg Arg Glu
260 265 270

Gly Val Lys Val Met Pro Asn Ala Ile Val Gln Ser Val Gly Val Ser
275 280 285

Ser Gly Lys Leu Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly Arg Lys Val Glu Thr
290 295 300

Asp His Ile Val Ala Ala Val Gly Leu Glu Pro Asn Val Glu Leu Ala
305 310 315 320

Lys Thr Gly Gly Leu Glu Ile Asp Ser Asp Phe Gly Gly Phe Arg Val
325 330 335

Asn Ala Glu Leu Gln Ala Arg Ser Asn Ile Trp Val Ala Gly Asp Ala
340 345 350

Ala Cys Phe Tyr Asp Ile Lys Leu Gly Arg Arg Arg Val Glu His His
355 360 365

Asp His Ala Val Val Ser Gly Arg Leu Ala Gly Glu Asn Met Thr Gly
370 375 380

Ala Ala Lys Pro Tyr Trp His Gln Ser Met Phe Trp Ser Asp Leu Gly
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Tyr Glu Ala Ile Gly Leu Val Asp Ser Ser Leu Pro
405 410 415

Thr Val Gly Val Phe Ala Lys Ala Thr Ala Gln Asp Asn Pro Lys Ser
420 425 430

Ala Thr Glu Gln Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser Glu Ser Glu Thr Glu
435 440 445

Ser Glu Ala Ser Glu Ile Thr Ile Pro Pro Ser Thr Pro Ala Val Pro
450 455 460

Gln Ala Pro Val Gln Gly Glu Asp Tyr Gly Lys Gly Val Ile Phe Tyr
465 470 475 480

Leu Arg Asp Lys Val Val Val Gly Ile Val Leu Trp Asn Ile Phe Asn
485 490 495

Arg Met Pro Ile Ala Arg Lys Ile Ile Lys Asp Gly Glu Gln His Glu
500 505 510

Asp Leu Asn Glu Val Ala Lys Leu Phe Asn Ile His Glu Asp
515 520 525

<210> 16
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 16

acggtgcgtg gaaggaaaag gaagg 25

<210> 17
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 17

cgccagggat ggaaaagtgc ttgtg 25

<210> 18
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripció de la secuencia artificial: cebador

<400> 18

tcagttcctc agatcagggc acc 23

<219> 19
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 19

aaaaacacca actgtgggca aac 23

<210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripció de la secuencia artificial: cebador

<400> 20

catcgatagg gctggagcag agg 23

<210> 21
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripció de la secuencia artificial: cebador

<400> 21

tttccatggt ccagttgctg agg 23

<210> 22
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripció de la secuencia artificial: cebador

<400> 22

gagccacgtg gtctgtttga cccgttcg 28

<210> 23
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripció de la secuencia artificial: cebador

<400> 23

ggagttctgc atttacccgg aagccacc 28

<210> 24
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripció de la secuencia artificial: cebador

<400> 24

gagaggaaag ggaaggagga ggtc 24

<210> 25
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripció de la secuencia artificial: cebador

<400> 25

ttgccaattc cactgtgggg cttc 24