



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 226**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01920759 .6**

86 Fecha de presentación : **22.03.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1265914**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.12.2002**

54 Título: **Polipéptidos relacionados con Wnt-1, y ácidos nucleicos que los codifican.**

30 Prioridad: **22.03.2000 US 191258 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **Curagen Corporation
11th Floor, 555 Long Wharf Drive
New Haven, Connecticut 06511, US
GENENTECH, Inc.**

72 Inventor/es: **Rastelli, Luca, K. y
Pennica, Diane**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos relacionados con Wnt-1, y ácidos nucleicos que los codifican.

Los miembros de la familia Wnt son proteínas de señalización glicosiladas, ricas en cisteína, que median en diversos procesos del desarrollo embrionario tales como el control de la proliferación celular, la adhesión, la polaridad celular y el establecimiento de los destinos últimos de las células. Los componentes de la ruta de señalización por Wnt se han relacionado con la tumorigénesis en carcinomas de colon familiares y esporádicos, cáncer de mama y melanoma. Existen experimentos que sugieren que el gen supresor del tumor de la poliposis adenomatosa de colon (APC) desempeña también un papel importante en la señalización por Wnt, regulando los niveles de beta-catenina. APC es fosforilado por acción de GSK-3b, se une a la beta-catenina y facilita su degradación. Se han asociado mutaciones en APC o en beta-catenina con carcinomas de colon y con melanomas, lo que sugiere que estas mutaciones contribuyen al desarrollo de estos tipos de cáncer, implicando a la ruta de las Wnt en la tumorigénesis.

Aunque se ha aprendido mucho sobre la ruta de señalización por Wnt durante los últimos años, solamente se han caracterizado unos cuantos de los componentes transcripcionalmente activados aguas abajo, activados por Wnt. Los componentes que han sido descritos no pueden explicar la totalidad de las diversas funciones atribuidas a la señalización por Wnt.

EMBL-EBI ID:AKO27111 lista la secuencia de ácidos nucleicos de un cDNA (clon HSI07327) de *Homo sapiens*, depositado por Kawakami, T. y col., (29/9/00).

El documento EP 1 354950 (documento WO 02/053737) y el documento JP 2000-402288 describen un gen activador de NF-KB, clonado procedente de una genoteca de cDNA preparada a partir de fibroblastos de pulmón humano, y sus usos en la identificación de un inhibidor o de un promotor de la activación de NF-KB.

El Resumen AAB56802 de la base de datos EBI (y el documento WO 00/55174) describe una secuencia de proteína asociada con cáncer de próstata humano.

La invención se basa en parte en el descubrimiento de nuevas secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos nuevos. A los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos descritos en la invención se les denominará de ahora en adelante y de manera colectiva secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos "WUP" (del inglés, "Wnt1 UPregulated") (secuencias reguladas por incremento por *Wnt1*).

La invención se define tomando como referencia las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva.

Aunque se pueden usar métodos o materiales similares o equivalentes a los aquí descritos en la práctica o en los ensayos de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no tienen intención de ser limitativos.

40

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra un análisis de dominios de proteínas.

45

Descripción detallada

Para identificar genes adicionales aguas abajo en la ruta de señalización por Wnt, que son relevantes para el fenotipo de las células transformadas, los autores de la invención estudiaron la expresión génica en células C57MG de epitelio mamario de ratón, que expresan Wnt-1, en comparación con el patrón de expresión génica encontrado en células C57MG normales y en células C57MG que expresan Wnt-4. Wnt-4 no es capaz de inducir tumores ni una transformación celular autocrina como lo es Wnt-1. Los autores de la invención han identificado genes y polipéptidos que son regulados por incremento en las células C57MG que expresan Wnt-1 (WUP), y sus ortólogos de seres humanos.

55

Los genes que están regulados por incremento en células que expresan Wnt-1, representan dianas atractivas para tratar enfermedades como el cáncer. Uno de estos genes, *WUP*, se describe en la presente invención. Una proteína probablemente implicada en el transporte y procesamiento de proteínas mitocondriales o del retículo endoplásmico, *WUP* está regulada por incremento en células que tienen altas demandas metabólicas, tales como las células cancerosas que experimentan una rápida proliferación.

60

Definiciones

65

Salvo que se defina de otro modo, todas las expresiones y términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que el comúnmente conocido por un experto en la técnica a la que esta invención pertenece. Las definiciones que vienen a continuación se presentan para mayor claridad.

En el presente documento se han adaptado las recomendaciones de (Demerec y col., 1996) en lo que son relevantes en genética. Para distinguir entre los genes (y los ácidos nucleicos relacionados) y las proteínas que codifican, las abreviaturas de los genes se indican con el texto en *letra itálica* (o subrayado) mientras que las abreviaturas de las proteínas comienzan con letra mayúscula y no están escritas en letra itálica. Por lo tanto, *WUP* o WUP se refieren a la secuencia de nucleótidos que codifica WUP.

“Aislada”, cuando se refiere a una molécula, se refiere a una molécula que ha sido identificada y separada y/o recuperada a partir de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son los materiales que interfieren con el uso diagnóstico o terapéutico.

“Recipiente” se usa en sentido amplio para indicar cualquier receptáculo destinado a contener materiales o reactivos. Los recipientes pueden estar fabricados de vidrio, plástico, cerámica, metal o de cualquier otro material que pueda contener reactivos. Los materiales aceptables no reaccionarán de manera adversa con los contenidos.

1. Definiciones relativas a ácidos nucleicos

(a) Secuencias de control

Secuencias de control son secuencias de DNA que permiten la expresión de una secuencia codificadora operativamente unida en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control de procariotas incluyen promotores, secuencias de operador y sitios de unión al ribosoma. Las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y elementos estimuladores.

(b) Operativamente unido

Un ácido nucleico está operativamente unido cuando está situado en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o un elemento estimulador está operativamente unido a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de esa secuencia, o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificadora si está colocado de manera que facilita la traducción. Generalmente, “operativamente unido” significa que las secuencias de DNA que están siendo unidas se encuentran contiguas, y en el caso de una secuencia conductora de secreción, se encuentran contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los elementos estimuladores no tienen que estar contiguos. La unión se efectúa mediante métodos convencionales de DNA recombinante.

(c) Ácidos nucleicos aislados

Una molécula de un ácido nucleico aislado se purifica procedente del lugar en el que se encuentra en la naturaleza y se separa de al menos una de las moléculas de ácido nucleico contaminantes. Las moléculas de *WUP* aisladas se distinguen de la molécula de *WUP* específica, tal como existe en las células. Sin embargo, una molécula de *WUP* aislada incluye moléculas de *WUP* contenidas en las células que normalmente expresan el *WUP* en los casos, por ejemplo, en los que la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

2. Definiciones relativas a proteínas

(a) Polipéptido purificado

Cuando la molécula es un polipéptido purificado, el polipéptido se purificará (1) para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o de una secuencia de aminoácidos interna, usando un secuenciador, o (2) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras, usando azul de Coomassie o tinción de plata. Los polipéptidos aislados incluyen los polipéptidos expresados heterológicamente en células manipuladas por ingeniería genética o los polipéptidos expresados *in vitro*, ya que al menos uno de los componentes del entorno natural de *WUP* no estará presente. Por lo general, se preparan polipéptidos aislados mediante al menos una etapa de purificación.

(b) Polipéptido activo

Un *WUP* activo o un fragmento de *WUP* activo conserva una actividad biológica y/o una actividad inmunológica del *WUP* natural o presente en la naturaleza. Actividad inmunológica se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un *WUP* natural; actividad biológica se refiere a una función, o bien estimuladora o bien inhibidora, producida por un *WUP* natural, que excluye la actividad inmunológica. Una actividad biológica de *WUP* incluye, por ejemplo, su regulación por incremento en células que expresan *Wnt1*.

(c) *Anticuerpos (Ac)*

Los anticuerpos pueden ser Ac monoclonales individuales anti-WUP (que incluyen Ac agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-WUP con especificidad poliepitópica, Ac anti-WUP monoclonarios y fragmentos de Ac anti-WUP. Un “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de Ac sustancialmente homogéneos, es decir, los Ac individuales que la población comprende son idénticos excepto por mutaciones que se presentan en la naturaleza y que pueden estar presentes en cantidades minoritarias.

(d) *Secuencias identificadoras de epítomos*

Un polipéptido identificado por epítopo se refiere a un polipéptido quimérico fusionado a un “polipéptido de identificación”. Esas secuencias identificadoras proporcionan epítomos contra los que se pueden generar Ac o contra los que existen Ac disponibles, pero que no interfieren con la actividad del polipéptido. Para disminuir la reactividad de un anticuerpo anti-secuencia identificadora con epítomos endógenos, el polipéptido de identificación es preferiblemente único. Los polipéptidos de identificación adecuados generalmente tienen al menos seis residuos de aminoácidos y usualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos, preferiblemente entre 8 y 20 residuos de aminoácidos). Ejemplos de secuencias identificadoras de epítomos incluyen HA procedente del virus de la gripe A y FLAG.

El nuevo WUP de la invención incluye los ácidos nucleicos cuyas secuencias se proporcionan en las Tablas 5 y 7. La invención también incluye un WUP mutante o variante que tiene la identidad de secuencia definida en las reivindicaciones, cualquiera de cuyas bases puede ser distinta de la correspondiente base mostrada en las Tablas 5 y 7 aunque sigue codificando una proteína que mantiene las actividades y las funciones fisiológicas de un fragmento de WUP. La invención incluye también ácidos nucleicos cuyas secuencias son complementarias a las que se acaban de describir. La invención incluye además ácidos nucleicos que tienen la identidad de secuencia definida en las reivindicaciones o sus complementos, cuyas estructuras incluyen modificaciones químicas. Esas modificaciones incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, bases modificadas y ácidos nucleicos cuyas cadenas principales de azúcar y fosfato están modificadas o están en forma de derivado. Estas modificaciones se llevan a cabo, al menos en parte, para aumentar la estabilidad química del ácido nucleico modificado, de manera que se pueden usar, por ejemplo, como ácidos nucleicos de unión anti-sentido en aplicaciones terapéuticas en un individuo.

La invención incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente de al menos el 90%, preferiblemente de al menos el 98%, con respecto a los SEQ. ID. NOS: 6 u 8, en los que dicho polipéptido es un polipéptido WUP activo, así como los nucleótidos que codifican cualquiera de estos polipéptidos, y los complementos de cualquiera de estos nucleótidos.

El nuevo WUP de la invención incluye el fragmento de proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en las Tablas 6 y 8 (SEQ ID NO: 39). La invención también incluye una proteína WUP mutante o variante que tiene la identidad de secuencia definida en las reivindicaciones, cualquiera de cuyos residuos puede ser distinto del correspondiente residuo mostrado en los SEQ ID NOS: 6 u 8, aunque sigue codificando una proteína que mantiene sus actividades y funciones fisiológicas. La invención también abarca Ac y fragmentos de anticuerpos, tales como F_{ab} o $(F_{ab})_2$, que se unen de manera inmuno-específica a cualquiera de los WUP de la invención.

El ortólogo humano de la secuencia de ratón se muestra en la Tabla 5; los codones de iniciación y terminación se indican en letra negrilla y subrayados.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 5

Secuencia de nucleótidos de hWUPI (SEQ ID NO: 5)

60	ggcttctgtag ctgctccgca gccagcccc ggcgcgctcg cagagtccta ggcggtgcgc
120	ggcttcctgc ctccctccctc ctcggcggtc gggccccgcg cctccggtt gcctgccttc
180	gctctcaggt tgaaggagctc aagcttggga aagtggtgtg catctccttgt atcgtcatctc
240	cagttctgct ctggatctac aaaaaattcc tggagccata tatataccct ctggtttccc
300	ccttcgttag tegtatatgg cctaagaaag caatacaaga atccaatgat acaaacaaaag
360	gcgaagtaaa ctcttaagggt gcagacatga atggattacc aacaaaaagg ccaacagaaa
420	tctgtgataa aaagaaagac taaggaattt tctctgaagg acccatcat ttaaaaaaatg
480	gacctgataa tatgaagcat ctcccttgtt attgtctctg accttttttat ctgagaccgg
540	aatttcaggat aggagtcctag atatttacct gatactaatc aggaatatata tgcctatccgt
600	atttaaaaaatg tagtttagtta tatttaatga cctcattcct aagttccctt ttcgttaattg
660	tagctttccat ttctgttatt gctgtttgaa taatatgatt aaatagaagg tttgtgccag
720	tagacattat gttactaat cagcacttta aaatctttgg ttctctaatt catatgaaat
780	tgcctgtttgc tctaatttct ttgggctctt ctaatttgag tggagtacaa ttttgttgtg
840	aaacagtcca gtgaaactgt gcagggaat gaaggtagaa ttttgaggag taataatgat
900	gtgaaaacata aagatttaat aattactgtc caacacagtg gagcagcttg tccacaaata
960	tagtaattac tattttattgc tctaaggag attaaaaaa gatagggaac aggggggaac
1020	tctctttgaaa aatgaaacat ctgttacatt aatgtctaata tataaaattt taatccttac
1080	tgcattttctt ctgttcctac aaatgtatta aacattcagt ttaactggta aaaaaaaaaa
1099	aaaaaaaaccc gggggggggg

ES 2 298 226 T3

La secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 comprende en parte una secuencia que se pensaba que codificaba un péptido desde los nucleótidos del 670 al 791; sin embargo, los autores de la invención han determinado que en realidad el péptido correcto, basándose en la homología, está codificado por los nucleótidos del 3 al 380, proporcionando el inicio de traducción correcto como MVCI (SEQ ID NO: 39; Tabla 6).

TABLA 6

Secuencia del polipéptido hWUP1 (SEQ ID NO: 39)

Met	Val	Cys	Ile	Pro	Cys	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15	
Lys	Lys	Phe	Leu	Glu	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Leu	Val	Ser	Pro	Phe	Val
			20					25					30		
Ser	Arg	Ile	Trp	Pro	Lys	Lys	Ala	Ile	Gln	Glu	Ser	Asn	Asp	Thr	Asn
		35					40					45			
Lys	Gly	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Gly	Ala	Asp	Met	Asn	Gly	Leu	Pro	Thr
	50					55					60				
Lys	Gly	Pro	Thr	Glu	Ile	Cys	Asp	Lys	Lys	Lys	Asp				
65					70					75					

También se ha identificado una secuencia humana muy similar (SEQ ID NO: 7).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 7

Secuencia de nucleótidos de hWUP2 (SEQ ID NO: 7)

60	gtgagtgtgc cgggcttagc ggccctgggttc gggctcttgta gctgctccgc gcccagccc
120	gggcgcgctc gcagagtcctt aggcgggtgcg cggcctccctg cctccctccc cctcggcggc
180	cgcggccccc cggcctccgc ggtgcccctgccc ttcgctctca ggttgaggag ctcaagcttg
240	ggaaaatggt gtgcatctctt tgtatcgtca tccagttct gctctggatc tacaaaaaat
300	tcctggagcc atatatatac cctctgggttc cccctctcgt tagtcgtata tggccctaaga
360	aagcaataca agaatccaat gatacaaca aaggcaaat aaactttaag ggtgcagaca
420	tgaatggatt accaacaaaa ggaccaacag aaatctgtga taataagaaa gactaaagaa
480	atcttccctaa aggaccccat catctaaaaa atggacctga taatatgaag catcttccct
540	gtaattgtct ctgacctttt tatctggagc cggaaattcag gataggagtc tagatatctta
600	cctgatacta atcaggaaat atatgatatc atatcttcaa atgtagttag ttatatcttaa
660	tgacctcatt cctaagttcc ttttctcgtta atgtagcttt catctctgctt atcgtctgttc
720	gaataaatatg attaaataga aggtcttgctc cagtagacat tatgttacta aatcagcact
780	ttaaaatctt tggttctctta attcatatga atttgctgctt tgctctaaat tcttctgggct
840	cttctaattt gagtggagta caattcttgctt gtgaaacagt ccagtgaaac tgtgcaggga
900	aatgaaggta gaattctggg aggtaatatc gatgtgaaac ataaagattt aataattact
960	gtccaacaca gtggagcagc ttgtccacaa atatagtaat tactatttat tgctcttaagg
1020	aagattaaaa aaagataggg aaaaagggga aactctcttg aaaaatgaaa catctgttac
1080	attaatgtct aattataaaa ttttaatcct tactgcatct ctctctgtcc tacaaatgta
1113	ttaaacattc agtttaaaa aaaaaaaaaaaa aaa

Un polipéptido codificado por el SEQ ID NO: 7 se presenta en la Tabla 8 (SEQ ID NO: 39).

TABLA 8

Secuencia del polipéptido hWUP2 (SEQ ID NO: 39)

Met	Val	Cys	Ile	Pro	Cys	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Trp	Ile	Tyr
1				5				10						15	
Lys	Lys	Phe	Leu	Glu	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Leu	Val	Ser	Pro	Phe	Val
			20				25					30			
Ser	Arg	Ile	Trp	Pro	Lys	Lys	Ala	Ile	Gln	Glu	Ser	Asn	Asp	Thr	Asn
		35					40					45			
Lys	Gly	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Gly	Ala	Asp	Met	Asn	Gly	Leu	Pro	Thr
	50					55				60					
Lys	Gly	Pro	Thr	Glu	Ile	Cys	Asp	Lys	Lys	Lys	Asp				
65					70				75						

La Tabla 10 muestra las nuevas proteínas alineadas junto con otros péptidos putativos codificados por la extensión de la extensión EST de rata (SEQ ID NO: 9), por una EST de conejo (*GenBank* C86606; SEQ ID NO: 10), por una EST de peces (*GenBank* AU036392, SEQ ID NO: 11) y por una proteína putativa de *Drosophila* (*GenBank* O97172; SEQ ID NO: 12). En la Tabla 10, el SEQ ID NO: 2 aparece nombrado como "cgrry0c0261_11202-243_EXT_REV", el SEQ ID NO: 4 es "ss.Cura16.3p.contig.full.991216_REVCOMP", el SEQ ID NO: 6 es "V34238patented_rev" y el SEQ ID NO: 8 es "87769892".

TABLA 10

Multiple Alignment		
SEQ 8 87769892	LLRGPARARSQSP - RRCAASCLLPFRSRPAG - LRGACLRSSQ	ELKLELMVCI PC
SEQ 6 V34238patented_rev	LCSCSAAQPGRRRRV LGARXPAS SLGGGQPR - LRGACLRSSQ	ELKLELMVCI PC
SEQ 10 C86606		ELKLELMVCI PC
AA966965	AGAPQELISELPETIMVCI PC	
SEQ 2 cgrry0c0261_11202-243_EXT_REV	VAC L P C I S A P L S V R O P R C P L L V S L A A F L P D R R H S E L Q P E T I M V C I P C	
SEQ 4 ss.Cura16.3p.contig.full.99121	AGAPQELISELPETIMVCI PC	
SEQ 9 AIZ31196rat_EXT	AWASWWWRVTLAAVVSOLTSFDAVR - CAGIPOELISELPETIMVCI PC	
SEQ 11 AU036392	FQPTRPVGPKKFWICSAFVVTIMVCI PC	
SEQ 12 O97172	LNGVFG	
87769892	IVIPVLLWVYKFKLEPYIYFVEP F - - - - - VSRIWPKKAVQSGEMN - - - - - KSRVNF	
V34238patented_rev	IVIPVLLWVYKFKLEPYIYFVEP F - - - - - VSRIWPKKAVQSGEMN - - - - - KSRVNF	
C86606	IVIPVLLWVYKFKLEPYIYFVEP F - - - - - XSRIWPKKAVQSGEMN - - - - - KSRVNF	
AA966965	IVIPVLLWVYKFKLEPYIYFVEP F - - - - - RIWPKKAVQSGEMN - - - - - MSKVDC	
cgrry0c0261_11202-243_EXT_REV	IVIPVLLWVYKFKLEPYIYFVEP F - - - - - RIWPKKAVQSGEMN - - - - - MSKVDC	
ss.Cura16.3p.contig.full.99121	IVIPVLLWVYKFKLEPYIYFVEP F - - - - - RIWPKKAVQSGEMN - - - - - MSKVDC	
AIZ31196rat_EXT	IVIPVLLWVYKFKLEPYIYFVEP F - - - - - RIWPKKAVQSGEMN - - - - - MSKVDC	
AU036392	IVIPVLLWVYKFKLEPYIYFVEP F - - - - - RIWPKKAVQSGEMN - - - - - MSKVDC	
O97172	IVIPVLLWVYKFKLEPYIYFVEP F - - - - - RIWPKKAVQSGEMN - - - - - MSKVDC	
87769892	RGADTNGLPTKGF - - - - - TEVSCKKGL	
V34238patented_rev	RGADTNGLPTKGF - - - - - TEVSCKKGL	
C86606	RGADTNGLPTKGF - - - - - TEVSCKKGL	
AA966965	RGADTNGLPTKGF - - - - - TEVSCKKGL	
cgrry0c0261_11202-243_EXT_REV	RGADTNGLPTKGF - - - - - TEVSCKKGL	
ss.Cura16.3p.contig.full.99121	RGADTNGLPTKGF - - - - - TEVSCKKGL	
AIZ31196rat_EXT	RGADTNGLPTKGF - - - - - TEVSCKKGL	
AU036392	RGADTNGLPTKGF - - - - - TEVSCKKGL	
O97172	RGADTNGLPTKGF - - - - - TEVSCKKGL	
	NVSQDDAEEETNPLNATAMAAETEVDSCKKGL	

Este alineamiento demuestra que SEQ ID NO: 9 es una proteína altamente conservada y demuestra que la Met de MVCI (residuos 1-4 de SEQ ID NO: 9) indica una Met de Kozak que es el sitio de iniciación de la traducción. Un análisis adicional indica que esta proteína es homóloga a las proteínas serina-peptidasas señal de tipo I. En *E. coli*, estas proteínas son responsables de la escisión de las secuencias conductoras N-terminales de las proteínas secretadas o de las proteínas periplásmicas. Prodom muestra una homología muy buena con la proteína ATP-sintetasa del transporte de iones hidrógeno de la membrana mitocondrial.

La homología con la proteína de transmembrana se ajusta al perfil hidrófobo. El análisis Blocks, mostrado en la Figura 1, revela también una homología con serina-proteasas.

PSORT (Nakai y Horton, 1999) predice que todos los ortólogos se localizan en la membrana del retículo endoplásmico, pero la homología con proteínas bacterianas y mitocondriales indica que WUP se localiza probablemente en la membrana de la mitocondria. Debido a su homología con las proteínas serina-peptidasas señal de tipo I de *E. coli*, WUP probablemente esté implicada en la introducción y procesamiento mitocondriales de proteínas mitocondriales.

Los ácidos nucleicos y las proteínas de la invención son útiles para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de cánceres, que incluyen cáncer de colon, cáncer de mama y melanoma. Sin embargo, ningún uso médico es parte de esta invención como uso reivindicado. Por ejemplo, un cDNA que codifica WUP puede ser útil en terapia génica y una proteína WUP puede ser útil cuando se administra a un individuo que la necesita. El nuevo ácido nucleico que codifica WUP y la proteína WUP de la invención también pueden ser útiles en aplicaciones diagnósticas *in vitro*, en las que se ha de determinar la presencia o una cantidad del ácido nucleico o de la proteína. Estos materiales son también útiles en la generación de anticuerpos que se unen de manera inmuno-específica a las nuevas sustancias de la invención para uso en métodos diagnósticos o terapéuticos.

Polinucleótidos WUP

Uno de los aspectos de la invención concierne a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican WUP, según se definen en las reivindicaciones pendientes de aprobación. Sus fragmentos de ácido nucleico pueden ser útiles como sondas de hibridación para identificar ácidos nucleicos que codifican WUP (p. ej., los mRNA de WUP) y para usar como cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación y/o mutación de moléculas de WUP. Una "molécula de ácido nucleico" incluye moléculas de DNA (p. ej., cDNA o DNA genómico), moléculas de RNA (p. ej., mRNA), análogos del DNA o RNA generados usando análogos, derivados y homólogos de nucleótidos, en los casos en los que dicha molécula tiene la identidad de secuencia definida en las reivindicaciones. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente comprende DNA bicatenario.

La secuencia natural de WUP de longitud parcial o de longitud completa se puede usar para "sacar" secuencias similares (homólogas) (Ausubel y col., 1987; Sambrook, 1989), tales como: (1) el cDNA de longitud completa o fragmentos del cDNA de WUP procedentes de una genoteca de cDNA de cualquier especie (p. ej., de especie humana, murina, felina, canina, bacteriana, vírica, retrovírica, de levaduras), (2) procedentes de células o tejidos, (3) variantes dentro de una especie y (4) homólogos y variantes de otras especies. Para encontrar secuencias relacionadas que pueden codificar genes relacionados, la sonda se puede diseñar para que codifique secuencias únicas o secuencias degeneradas. Las secuencias también pueden ser secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos estimuladores e intrones de la secuencia natural de WUP.

Por ejemplo, usando estas sondas se puede aislar una región que codifica WUP en otras especies. Se diseña una sonda de aproximadamente 40 bases, basada en WUP, y se fabrica. Para detectar las hibridaciones, las sondas se marcan usando, por ejemplo, radioisótopos tales como ^{32}P o ^{35}S , o marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda a través de sistemas de avidina-biotina. Las sondas marcadas se usan para detectar ácidos nucleicos que tienen una secuencia complementaria a la de WUP en genotecas de cDNA, DNA genómico o mRNA de una especie deseada.

Esas sondas se pueden usar como parte de un kit de ensayo de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresan de manera errónea un WUP, tal como midiendo el nivel de un WUP en una muestra de células de un individuo, p. ej., detectando los niveles del mRNA de WUP o determinando si un WUP genómico ha sido mutado o deletado.

2. Ácido nucleico aislado

Una molécula de un ácido nucleico aislado está separada de otras moléculas de ácido nucleico que se presentan en la fuente natural del ácido nucleico. Preferiblemente, un ácido nucleico aislado está libre de secuencias que flanquean al ácido nucleico en la naturaleza (es decir, secuencias situadas en las terminaciones 5' y 3' del ácido nucleico) en el DNA genómico del organismo del que deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en distintas realizaciones, las moléculas aisladas de WUP pueden contener menos que aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean a la molécula de ácido nucleico de manera natural en el DNA genómico de la célula/tejido del que el ácido nucleico deriva (p. ej., cerebro, corazón, hígado, bazo, etc.). Además, una molécula de ácido nucleico aislada, tal como una molécula de cDNA, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o de medio de cultivo cuando es producida mediante técnicas recombinantes, o de precursores químicos o de otros productos químicos cuando se sintetiza por métodos químicos.

Una molécula de ácido nucleico de la invención, p. ej., una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de los SEQ ID NOS: 6 u 8, o un complemento de esta secuencia de nucleótidos anteriormente mencionada, se puede aislar usando técnicas estándar de biología molecular y la información proporcionada sobre la secuencia. Usando la totalidad o una porción de la secuencia de ácido nucleico de los SEQ ID NOS: 6 u 8 como sonda de hibridación, se pueden aislar moléculas de *WUP* usando técnicas estándar de hibridación y clonación (Ausubel y col., 1987; Sambrook, 1989).

Se pueden usar técnicas de amplificación por PCR para amplificar *WUP* usando como molde cDNA, mRNA o como alternativa, DNA genómico, y cebadores oligonucleotídicos adecuados. Esos ácidos nucleicos se pueden clonar en un vector adecuado y se pueden caracterizar mediante análisis de la secuencia de DNA. Además, los oligonucleótidos que corresponden a las secuencias de *WUP* se pueden preparar mediante técnicas estándar de síntesis, p. ej., con un sintetizador de DNA automático.

3. Oligonucleótido

Un oligonucleótido comprende una serie de residuos de nucleótidos unidos, teniendo dicho oligonucleótido un número suficiente de bases nucleotídicas para ser usadas en una reacción de PCR o en otra aplicación. Una secuencia oligonucleotídica corta puede estar basada en, o se puede diseñar partiendo de, una secuencia genómica o una secuencia de cDNA, y se usa para amplificar, confirmar o revelar la presencia de un DNA o RNA idéntico, similar o complementario en una célula o tejido particular. Los oligonucleótidos comprenden porciones de una secuencia de ácido nucleico que tiene una longitud de aproximadamente 10 nt, 50 nt, o 100 nt, preferiblemente una longitud de aproximadamente de 15 nt a 30 nt. Un oligonucleótido que comprende una molécula de ácido nucleico con una longitud menor que 100 nt puede comprender además al menos 6 nucleótidos contiguos de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, o de uno de sus complementos. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar por métodos químicos y se pueden usar también como sondas.

4. Secuencias de ácido nucleico complementarias; unión

En otra de las realizaciones, una molécula de ácido nucleico aislada, de la invención, comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos mostrada en los SEQ ID NOS: 5 ó 7. Una porción de esta secuencia de nucleótidos (p. ej., un fragmento, se puede usar como sonda o cebador, o como un fragmento que codifica una porción biológicamente activa de un WUP). Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en los SEQ ID NOS: 5 ó 7, es una molécula que es lo suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en los SEQ ID NOS: 5 ó 7, que es capaz de formar enlaces de hidrógeno con pocos o con ningún desapareamiento con la secuencia de nucleótidos mostrada en los SEQ ID NOS: 5 ó 7, formando de este modo un dúplex estable.

“Complementario” se refiere a la formación de pares de bases según Watson-Crick o Hoogsteen entre unidades nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico, y el término “unión” significa la interacción física o química entre dos polipéptidos o compuestos, o entre polipéptidos o compuestos asociados o entre sus combinaciones. El término unión incluye interacciones iónicas, no iónicas, de van der Waals, hidrófobas e interacciones similares. Una interacción física puede ser directa o indirecta. Las interacciones indirectas pueden tener lugar a través de, o pueden ser debidas a, los efectos de otro polipéptido o compuesto. Unión directa hace referencia a interacciones que no tienen lugar a través de, o debido a, el efecto de otro polipéptido o compuesto, sino que en vez de ello tienen lugar sin otros intermediarios químicos sustanciales.

Los fragmentos de ácido nucleico son de al menos 6 ácidos nucleicos (contiguos) o de al menos 4 aminoácidos (contiguos), longitud suficiente para permitir la hibridación específica en el caso de los ácidos nucleicos, o el reconocimiento específico de un epítipo en el caso de los aminoácidos, respectivamente, y son en su mayoría una porción menor que una secuencia de longitud completa. Los fragmentos pueden derivar de una porción contigua de una secuencia de ácido nucleico o de una secuencia de aminoácidos elegida.

5. Derivados y análogos

Derivados son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos formadas a partir de los compuestos naturales ya sea directamente o ya sea mediante modificación o mediante sustitución parcial. Análogos son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos que tienen una estructura similar, pero no idéntica, a la del compuesto natural, pero que difieren de él respecto a determinados componentes o cadenas laterales. Los análogos pueden ser sintéticos o pueden proceder de un origen evolutivo diferente y pueden presentar una actividad metabólica similar u opuesta comparados con el tipo salvaje. Los homólogos son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos de un gen particular que derivan de especies diferentes.

Los derivados y análogos pueden ser de longitud completa o pueden tener una longitud distinta de la longitud completa si el derivado o análogo contiene un ácido nucleico o un aminoácido modificado, según se describe más adelante. Los derivados o análogos de los ácidos nucleicos o de las proteínas incluyen, pero no se limitan a, moléculas que comprenden regiones que son sustancialmente homólogas a los ácidos nucleicos o a las proteínas de distintas realizaciones, con una identidad de al menos aproximadamente el 70%, 80% o 95% (siendo una identidad preferida la del 80% - 95%) a lo largo de una secuencia de ácido nucleico o de una secuencia de aminoácidos de tamaño idéntico, o

cuando se comparan con una secuencia alineada en la que el alineamiento se realiza mediante un programa informático de homología, conocido en la técnica, o cuando el ácido nucleico que las codifica es capaz de hibridarse con el complemento de una secuencia que codifica las proteínas anteriormente mencionadas en condiciones de rigurosidad, de rigurosidad moderada o de baja rigurosidad (Ausubel y col., 1987).

6. Homología

Una “secuencia de ácido nucleico homóloga” o una “secuencia de aminoácidos homóloga” o sus variaciones, se refieren a secuencias caracterizadas por una homología a nivel de nucleótidos o a nivel de aminoácidos, según se ha tratado en lo que antecede. Las secuencias de nucleótidos homólogas codifican las secuencias que codifican isoformas de WUP. Las isoformas pueden ser expresadas en diferentes tejidos del mismo organismo, como resultado de, por ejemplo, un procesamiento de RNA alternativo. Como alternativa, las isoformas pueden estar codificadas por genes diferentes. En la invención, las secuencias de nucleótidos homólogas incluyen secuencias de nucleótidos que codifican un WUP de especies diferentes a seres humanos, que incluyen, pero no se limitan a: vertebrados, y por lo tanto pueden incluir, p. ej., rana, ratón, rata, conejo, perro, gato, vaca, caballo y otros organismos, en la medida en que entren dentro del alcance de las reivindicaciones. Las secuencias de nucleótidos homólogas también incluyen, pero no se limitan a, variaciones alélicas y mutaciones presentes en la naturaleza, de las secuencias de nucleótidos que aquí se presentan. Una secuencia de nucleótidos homóloga no incluye, sin embargo, la secuencia de nucleótidos exacta que codifica el WUP humano. Las secuencias de ácidos nucleicos homólogas incluyen las secuencias de ácido nucleico que codifican sustituciones de aminoácidos conservativas (véase más adelante) de los SEQ ID NOS: 6 u 8, así como un polipéptido que posee actividad biológica de WUP. Distintas actividades biológicas de WUP se describen más adelante, en la medida en la que entren dentro del alcance de las reivindicaciones.

7. Marcos de lectura abiertos

El marco de lectura abierto (ORF) (del inglés, “*Open Reading Frame*”) de un gen WUP codifica WUP. Un ORF es una secuencia de nucleótidos que contiene un codón de iniciación (ATG) y que finaliza con uno de los tres codones de “terminación” (TAA, TAG o TGA). En esta invención, sin embargo, un ORF puede ser cualquier parte de una secuencia codificadora que puede comprender o no un codón de iniciación y un codón de terminación. Para obtener una secuencia única, los ORF de WUP preferibles codifican al menos 50 aminoácidos.

Polipéptidos WUP

1. Forma madura

Un WUP puede codificar un WUP maduro. Una forma “madura” de un polipéptido, o una forma “madura” descrita en la presente invención, es el producto de un polipéptido presente en la naturaleza o una forma precursora o una proproteína. El polipéptido presente en la naturaleza, el precursor o la proproteína incluye, a modo de ejemplo no limitativo, el producto génico de longitud completa, codificado por el correspondiente gen. Como alternativa, se puede definir como el polipéptido, el precursor o la proproteína codificados por un marco de lectura abierto aquí descrito. La forma “madura” del producto se produce, de nuevo a modo de ejemplo no limitativo, como resultado de una o más etapas del procesamiento que tiene lugar en la naturaleza en la medida en la que pueden tener lugar dentro de la célula, o de la célula hospedadora, en la que el producto génico se produce. Ejemplos de estas etapas de procesamiento que conducen a una forma “madura” de un polipéptido o de una proteína, incluyen la escisión del residuo de metionina N-terminal codificado por el codón de iniciación de un marco de lectura abierto, o la escisión proteolítica de un péptido señal o de una secuencia conductora. Por lo tanto una forma madura que se produce a partir de un polipéptido precursor o de una proteína precursora que tiene los residuos de 1 a N, en la que el residuo 1 es la metionina N-terminal, tendría los residuos del 2 al N que quedarían después de retirar la metionina N-terminal. Como alternativa, una forma madura que se produce a partir de un polipéptido precursor o una proteína precursora que tiene los residuos de 1 a N, en la que una secuencia señal N-terminal, que va desde el residuo 1 hasta el residuo M, es escindida, tendría los residuos restantes que van desde el residuo M+1 hasta el residuo N. Además, según aquí se usa, una forma “madura” de un polipéptido o una proteína puede producirse en una etapa de modificación postraducciona en vez de en un evento de escisión proteolítica. Esos procedimientos adicionales incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, glicosilación, miristoilación o fosforilación. En general, un polipéptido maduro o una proteína madura pueden ser el resultado de la operación de solamente uno de estos procedimientos, o de una combinación de cualquiera de ellos.

2. Activo

Un polipéptido WUP activo conserva una actividad biológica y/o una actividad inmunológica similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de un polipéptido WUP de la invención, presente en la naturaleza (de tipo salvaje), incluyendo las formas maduras. Un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis, se puede usar para determinar la actividad de WUP. Actividad inmunológica se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un WUP natural. Actividad biológica se refiere a una función, ya sea inhibidora o estimuladora, causada por un WUP natural, que excluye la actividad inmunológica.

Variante de ácidos nucleicos WUP y su hibridación

1. *Polinucleótidos, genes y genes recombinantes variantes.* La invención abarca además moléculas de ácido nucleico que tienen la identidad de secuencia definida en las reivindicaciones, que difieren de las secuencias de nucleótidos mostradas en los SEQ ID NOS: 5 ó 7 debido a la degeneración del código genético y por lo tanto codifican el mismo WUP que el que codifican las secuencias de nucleótidos mostradas en los SEQ ID NOS: 5 ó 7. Un molécula de ácido nucleico aislado de la invención tiene una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en los SEQ ID NOS: 6 u 8.

Además de las secuencias de *WUP* mostradas en los SEQ ID NOS: 5 ó 7, en una población pueden existir polimorfismos de las secuencias de DNA que cambian las secuencias de aminoácidos de *WUP*. Por ejemplo, la variación alélica entre los individuos exhibirá un polimorfismo genético en *WUP*. El término “gen” y la expresión “gen recombinante” se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto (ORF) que codifica *WUP*, preferiblemente un *WUP* de vertebrados. Esas variaciones alélicas naturales pueden típicamente dar como resultado una varianza del 1% - 5% en *WUP*. Cualquiera y la totalidad de esas variaciones de nucleótidos y los polimorfismos de aminoácidos resultantes en el *WUP*, que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional del *WUP*, están incluidas en el alcance de la invención.

Además, los *WUP* de otras especies que tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, se contemplan según se definen en las reivindicaciones. Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a las variantes alélicas y a los homólogos naturales de los cDNA de los *WUP* se pueden aislar sobre la base de su homología con los *WUP* de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, usando sondas derivadas de cDNA para que se hibriden con las secuencias homólogas de *WUP* en condiciones de rigurosidad.

“Polinucleótido *WUP* variante” o “secuencia de ácido nucleico *WUP* variante” significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido *WUP* activo según se define en las reivindicaciones, y que tiene (1) una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos el 80% con el SEQ ID NO: 7 o una identidad de al menos el 90% con el SEQ ID NO: 5, (2) un *WUP* natural de longitud completa que carece del péptido señal. Generalmente, un polinucleótido *WUP* variante presentará una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos el 80% con el SEQ ID NO: 7, o una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos el 90% con el SEQ ID NO: 5 y aún más preferiblemente, una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 98% con la secuencia de ácido nucleico del SEQ ID NOS: 5 ó 7. Un polinucleótido *WUP* variante puede codificar el *WUP* natural de longitud completa que carece del péptido señal. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos natural.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico” con respecto a las secuencias de ácido nucleico que codifican *WUP*, aquí identificadas, se define como el porcentaje de nucleótidos de una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos de la secuencia de *WUP* de interés, después de alinear las secuencias y de introducir huecos, cuando es necesario, para obtener el porcentaje máximo de identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico se puede obtener de diferentes modos que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos públicamente disponibles tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica saben determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, que incluyen los algoritmos necesarios para obtener el alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

Cuando se alinean secuencias de nucleótidos, el % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico C determinada, con respecto a, con o frente a, una secuencia de ácido nucleico D determinada (que como alternativa puede estar expresada como una secuencia de ácido nucleico C determinada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico D), se puede calcular de la siguiente manera:

$$\% \text{ de identidad de secuencia de ácido nucleico} = W/Z \cdot 100$$

en donde:

W es el número de nucleótidos puntuados como correspondencias idénticas mediante aplicación de los programas o algoritmos de alineamientos de secuencias al alineamiento de C y D, y

Z es el número total de nucleótidos de D.

Cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C con respecto a D no será igual al % de porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico de D con respecto a C.

2. Rigurosidad

Se pueden obtener homólogos (es decir, ácidos nucleicos que codifican un *WUP* derivado de especies distintas de la especie humana) u otras secuencias relacionadas (p. ej., parálogos) mediante una hibridación en condiciones de

rigurosidad baja, moderada o alta, con la totalidad o con una porción de la secuencia humana particular usada como sonda, utilizando métodos muy conocidos en la técnica para la hibridación y clonación de ácidos nucleicos.

La especificidad de un DNA monocatenario para hibridarse con fragmentos complementarios viene determinada por la “rigurosidad” de las condiciones de reacción. La rigurosidad de la hibridación aumenta a medida en la que la predisposición del DNA a formar dúplex disminuye. En reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, la rigurosidad se puede elegir para favorecer hibridaciones específicas (rigurosidad alta), que se pueden usar para identificar, por ejemplo, clones de longitud completa en una genoteca. Se pueden usar hibridaciones menos específicas (rigurosidad baja) para identificar moléculas de DNA (homólogas pero no idénticas) o segmentos de DNA relacionados pero no exactos.

Los dúplex de DNA se estabilizan por medio de: (1) el número de pares de bases complementarias, (2) el tipo de pares de bases, (3) la concentración de sales (fuerza iónica) de la mezcla de reacción, (4) la temperatura de la reacción y (5) la presencia de determinados disolventes orgánicos, tales como la formamida que disminuye la estabilidad de los dúplex de DNA. En general, cuanto más larga es la sonda, más alta es la temperatura requerida para una renaturalización correcta. Una estrategia común es variar la temperatura: temperaturas relativas más altas producen condiciones de reacción más rigurosas. (Ausubel y col., 1987) proporcionan una excelente explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación.

Hibridar en “condiciones rigurosas” describe protocolos de hibridación en los que secuencias de nucleótidos que son homólogas entre sí al menos en el 60%, quedan hibridadas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan de manera que sean de aproximadamente 5°C por debajo del punto de fusión térmica (T_m) (del inglés, “*Thermal melting point*”) correspondiente a la secuencia específica, a una fuerza iónica y a un pH definidos. La T_m es la temperatura (en condiciones definidas de fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico) a la que el 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana, se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio. Debido a que las secuencias diana generalmente están presentes en exceso, a la T_m el 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio.

(a) Rigurosidad alta

“Condiciones de hibridación rigurosas” son condiciones que permiten que una sonda, cebador u oligonucleótido se hibride solamente con su secuencia diana. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán distintas. Las condiciones rigurosas comprenden: (1) lavados a fuerza iónica baja y temperatura alta (p. ej., cloruro sódico 15 mM, citrato sódico 1,5 mM, dodecilsulfato sódico al 0,1%, a 50°C; (2) presencia de un agente desnaturizante durante la hibridación (p. ej., formamida al 50% (v/v), albúmina de suero bovino al 0,1%, Ficoll al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1%, tampón de fosfato sódico 50 mM (pH 6,5; cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM, a 42°C); o (3) formamida al 50%. Los lavados también comprenden típicamente SSC 5X (NaCl 0,75 M, citrato sódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, Disolución de Denhardt 5X, DNA de esperma de salmón sometido a sonicación (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10%, a 42°C, con lavados a 42°C en SSC 0,2X (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50%, a 55°C, seguidos de un lavado en condiciones de rigurosidad alta que consiste en SSC 0,1X que contiene EDTA, a 55°C. Preferiblemente, las condiciones son tales que secuencias homólogas entre sí en al menos aproximadamente el 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, típicamente quedan hibridadas entre sí. Estas condiciones se presentan como ejemplos y no quieren ser limitativas.

(b) Rigurosidad moderada

Las “condiciones moderadamente rigurosas” usan disoluciones de lavado y condiciones de hibridación que son menos rigurosas (Sambrook, 1989), de manera que un polinucleótido se hibridará con derivados o análogos completos de los SEQ ID NOS: 5 ó 7. Uno de los ejemplos comprende la hibridación en SSC 6X, disolución de Denhardt 5X, SDS al 0,5% y DNA desnaturizado de esperma de salmón 100 mg/ml, a 55°C, seguida de uno o más lavados en SSC 1X, SDS al 0,1%, a 37°C. La temperatura, fuerza iónica, etc., se pueden ajustar para que se acomoden a factores experimentales tales como la longitud de las sondas. Otras condiciones de rigurosidad moderada se describen en (Ausubel y col., 1987; Kriegler, 1990).

(c) Rigurosidad baja

Las “condiciones de rigurosidad baja” usan disoluciones de lavado y condiciones de hibridación que son menos rigurosas que las correspondientes a la rigurosidad moderada (Sambrook, 1989), de manera que un polinucleótido se hibridará con los derivados o análogos completos de los SEQ ID NOS: 5 ó 7. Un ejemplo no limitativo de condiciones de hibridación de rigurosidad baja son una hibridación en formamida al 35%, SSC 5X, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,2%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, DNA desnaturizado de esperma de salmón 100 mg/ml, sulfato de dextrano al 10% (p/v), a 40°C, seguida de uno o más lavados en SSC 2X, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1% SDS, a 50°C. Otras condiciones de rigurosidad baja, tales como las hibridaciones entre especies diferentes, se describen en (Ausubel y col., 1987; Kriegler, 1990; Shilo y Weinberg, 1981).

3. Mutaciones conservadoras

Además de las variantes alélicas de WUP presentes en la naturaleza, se pueden introducir cambios mediante mutación en los SEQ ID NOS: 5 ó 7 que provocan alteraciones en las secuencias de aminoácidos del WUP codificado

que no alteran la función del WUP. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de nucleótidos que dan lugar a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos “no esenciales”, en las secuencias de los SEQ ID NOS: 6 u 8. Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que puede ser alterado en las secuencias de tipo salvaje de WUP sin alterar su actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido “esencial” es requerido para esa actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos que están conservados entre los WUP de la invención, se pronostica que son particularmente no susceptibles de experimentar alteración. Los aminoácidos en los que se pueden realizar sustituciones conservadoras son muy conocidos en la técnica.

En la Tabla A se muestran sustituciones conservadoras útiles en “Sustituciones preferidas”. Las sustituciones conservadoras en las que un aminoácido de una clase es sustituido por otro aminoácido del mismo tipo, caen dentro del alcance de la presente invención siempre que esa sustitución no altere materialmente la actividad biológica del compuesto. Si esas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, indicados en la Tabla B como ilustrativos, y los productos se someten a escrutinio con respecto a la actividad biológica del polipéptido WUP.

TABLA A

Sustituciones preferidas

Residuo original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Ile, Norleucina, Ala	Leu

Las sustituciones no conservadoras que afectan (1) la estructura de la cadena principal del polipéptido, tales como una conformación en lámina β o en hélice α , (2) la carga o (3) el carácter hidrófobo o (4) el volumen de la cadena lateral del sitio diana, pueden modificar la función o la identidad inmunológica del polipéptido WUP. Los residuos se dividen en grupos basados en propiedades de las cadenas laterales comunes, según se indica en la Tabla B. Las sustituciones no conservadoras implican el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Las sustituciones se pueden introducir en sitios de sustituciones conservadoras o más preferiblemente en sitios de sustituciones no conservadoras.

TABLA B

Clases de aminoácidos

Clase	Aminoácidos
hidrófobos	Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile
hidrófilos neutros	Cys, Ser, Thr
ácidos	Asp, Glu
básicos	Asn, Gln, His, Lys, Arg
conformación de cadena partida	Gly, Pro
aromáticos	Trp, Tyr, Phe

Los polipéptidos variantes se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (mutagénesis dirigida a sitios específicos), barridos de alanina y mutagénesis mediante PCR. La mutagénesis dirigida a sitios específicos (Carter, 1986; Zoller y Smith, 1987), mutagénesis de casete, mutagénesis de selección mediante restricción (Wells y col., 1985) u otras técnicas conocidas se pueden realizar en el DNA clonado para producir el DNA variante de WUP. (Ausubel y col., 1987; Sambrook, 1989).

En una de las realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga al menos en el 80%, 90% y más preferiblemente en aproximadamente el 95% con los SEQ ID NOS: 6 u 8.

4. Ácidos nucleicos anti-sentido

El uso de oligonucleótidos WUP con sentido y antisentido puede prevenir la expresión de polipéptidos WUP. Estos oligonucleótidos se unen a las secuencias de ácidos nucleicos diana, formando dúplex que bloquean la transcripción o traducción de la secuencia diana aumentando la degradación de los dúplex, terminando prematuramente la transcripción o traducción, o mediante otro medio.

Los oligonucleótidos con sentido o antisentido son ácidos nucleicos monocatenarios, ya sean RNA o DNA, que se pueden unir a secuencias del mRNA diana (con sentido) de WUP o del DNA (antisentido) de WUP. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden diseñar conforme a las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick o de Hoogsteen. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a la región codificadora completa del mRNA de WUP, pero más preferiblemente, a sólo una porción de la región codificadora o de la región no codificadora del mRNA de WUP. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea el sitio de iniciación de la traducción del mRNA de WUP. Los oligonucleótidos con sentido o antisentido pueden comprender un fragmento de la región codificadora del DNA de WUP de al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente desde aproximadamente 14 nucleótidos hasta 30 nucleótidos. En general, las moléculas de RNA o DNA antisentido pueden comprender al menos, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 bases de longitud o más. Entre otros, (Stein y Cohen, 1988; van der Krol y col., 1988b) describen métodos para formar derivados de oligonucleótidos antisentido a partir de una secuencia de DNA determinada.

Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden usar para generar el ácido nucleico antisentido incluyen: 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracil, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosine, N6-isopentenil-adenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilamino-metiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxi-uracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-dian-tinopuina. Como alternativa, el ácido nucleico antisentido se puede producir mediante métodos biológicos usando un vector de expresión dentro del cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido de manera que el RNA transcrito será complementario a un ácido nucleico diana de interés.

Para introducir oligonucleótidos antisentido o con sentido en células diana (células que contienen la secuencia de ácido nucleico diana), se puede usar cualquier método de transferencia génica. Ejemplos de métodos de transferencia génica incluyen (1) métodos biológicos, tales como los vectores de transferencia génica similares al virus de Epstein-Barr o la conjugación del DNA exógeno a una molécula de unión a ligando, (2) métodos físicos, tales como electroporación e inyección y (3) métodos químicos, tales como la precipitación con CaPO₄ y los complejos de oligonucleótido-lípido.

Un oligonucleótido antisentido o con sentido se inserta en un vector retrovítico adecuado para transferencia génica. Una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana se pone en contacto con el vector retrovítico recombinante, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Ejemplos de vectores retrovíticos adecuados incluyen los derivados del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de copia doble denominados DCT5A, DCT5B y DCT5C (documento WO 90/13641, 1990). Para conseguir una transcripción suficiente de la molécula de ácido nucleico, se prefieren construcciones de los vectores en los que la transcripción de la molécula de ácido nucleico antisentido está controlada por un promotor fuerte pol II o pol III.

Para especificar las células diana en una población mixta de células, se puede sacar provecho de los receptores de superficie celular que son específicos de las células diana. Oligonucleótidos antisentido y con sentido se conjugan con una molécula de unión a ligando, según se describe en el (documento WO 91/04753, 1991). Se eligen ligandos de receptores que son específicos para las células diana. Ejemplos de moléculas adecuadas de unión a ligando incluyen receptores de superficie celular, factores de crecimiento, citoquinas u otros ligandos que se unen a receptores o moléculas de superficie celular. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando, no interfiere sustancialmente con la capacidad de los receptores o de la molécula para unirse al conjugado ligando-molécula de unión, o para bloquear la entrada del oligonucleótido con sentido o antisentido o de su versión conjugada en la célula.

Los liposomas transfieren eficientemente oligonucleótidos con sentido o antisentido a las células (documento WO 90/10448, 1990). El complejo constituido por oligonucleótido con sentido o antisentido-lípido preferiblemente es disociado dentro de la célula por acción de una lipasa endógena.

La molécula de ácido nucleico antisentido de la invención puede ser una molécula de ácido nucleico α -anómico. Un ácido nucleico α -anómico forma híbridos bicatenarios específicos con un RNA complementario, en los que al contrario de lo que sucede con las unidades α usuales, las cadenas corren paralelas entre sí (Gautier y col., 1987). La molécula de ácido nucleico antisentido puede comprender también un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue y col., 1987a) o un análogo quimérico de RNA-DNA (Inoue y col., 1987b).

Un ácido nucleico antisentido de la invención puede ser una ribozima. Las ribozimas son moléculas de RNA catalíticas con actividad de ribonucleasa, que son capaces de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un mRNA, con respecto al que tienen una región complementaria. Por lo tanto, se pueden usar las ribozimas, tales como las ribozimas de tipo cabeza de martillo (Haseloff y Gerlach, 1988), para escindir catalíticamente transcritos de mRNA de WUP e inhibir así su traducción. Se puede diseñar una ribozima específica para un ácido nucleico que codifica WUP sobre la base de la secuencia de nucleótidos del cDNA de WUP (es decir, los SEQ ID NOS: 5 ó 7. Por ejemplo, se puede construir un derivado de un RNA de *Tetrahymena* L-19 IVS en el que la secuencia de nucleótidos del centro activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos que ha de ser escindida en un mRNA que codifica WUP (Cech y col., Patente de EE.UU. Núm. 5.116.742, 1992; Cech y col., Patente de EE. UU. Núm. 4.987.071, 1991). También se puede usar un mRNA de WUP para seleccionar un RNA catalítico que presenta una actividad de ribonucleasa específica, en un material reunido de moléculas de RNA (Bartel y Szostak, 1993).

Como alternativa, la expresión de WUP puede ser inhibida dirigiendo secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora del WUP (p. ej., a la región del promotor y/o de secuencias estimuladoras de WUP) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del WUP en células diana (Helene, 1991; Helene y col., 1992; Maher, 1992).

Modificaciones de nucleótidos antisentido o con sentido pueden aumentar su eficacia. Enlaces de azúcar-fosfodiéster modificados u otras uniones con azúcares (documento WO 91/06629, 1991), aumentan la estabilidad *in vivo* confiriendo resistencia a nucleasas endógenas sin alterar la especificidad de unión a las secuencias diana. Otras modificaciones pueden aumentar las afinidades de los oligonucleótidos por sus dianas, tales como las modificaciones con restos orgánicos unidos covalentemente (documento WO 90/10448, 1990) o con poli-(L)-lisina. Otras uniones modifican las especificidades de unión de los nucleótidos por sus dianas, e incluyen complejos con metales o agentes intercalantes (p. ej. elipticina) y agentes alquilantes.

Por ejemplo, la cadena principal de fosfato de desoxirribosa de los ácidos nucleicos, se puede modificar para generar ácidos nucleicos peptídicos (Hyrup y Nielsen, 1996). "Ácidos nucleicos peptídicos" o "PNA" se refieren a compuestos miméticos de ácidos nucleicos (p. ej., compuestos miméticos de DNA) en el sentido de que la cadena principal de fosfato de desoxirribosa se ha reemplazado por una cadena principal pseudopeptídica y solamente se conservan las cuatro nucleobases naturales. La cadena principal neutra de los PNA permite su hibridación específica a DNA y RNA en condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de PNA se puede realizar usando protocolos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida (Hyrup y Nielsen, 1996; Perry-O'Keefe y col., 1996).

Los PNA de WUP se pueden usar para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Por ejemplo, los PNA se pueden usar como agentes antisentido o antígenos para la modulación, específica de secuencia, de la expresión génica, induciendo la parada de la transcripción o traducción o inhibiendo la replicación. Los PNA de WUP también se pueden usar en los análisis de mutaciones de un único par de bases (p. ej., la sujeción de la PCR dirigida por PNA; como enzimas de restricción artificiales cuando se usan en combinación con otras enzimas, p. ej., nucleasas S_1 (Hyrup y Nielsen, 1996); o como sondas o cebadores de una secuencia de DNA y de hibridación (Hyrup y Nielsen, 1996; Perry-O'Keefe y col., 1996).

Los PNA de WUP se pueden modificar para aumentar su estabilidad o su incorporación celular. A los PNA se les puede añadir grupos lipófilos u otros grupos auxiliares, se pueden formar dímeros de PNA-DNA, o se pueden usar liposomas u otras técnicas de liberación de fármacos. Por ejemplo, se pueden generar quimeras de PNA-DNA que pueden aunar las propiedades ventajosas del PNA y del DNA. Esas quimeras permiten a las enzimas de reconocimiento de DNA (p. ej., RNasa H y DNA-polimerasas) interaccionar con la porción de DNA, al mismo tiempo que la porción de PNA proporciona una elevada afinidad y especificidad de unión. Las quimeras de PNA-DNA se pueden unir usando fragmentos enlazadores de longitudes adecuadas, seleccionados en relación con el apilamiento de bases, el número de enlaces existentes entre las nucleobases y la orientación (Hyrup y Nielsen, 1996). Se puede realizar la síntesis de quimeras PNA-DNA (Finn y col., 1996; Hyrup y Nielsen, 1996). Por ejemplo, una cadena de DNA se puede sintetizar sobre un soporte sólido usando la química estándar de acoplamiento con fosforamidita y análogos de nucleósidos modificados, p. ej., se puede usar la fosforamidita de la 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxi-timidina entre el PNA y el extremo 5' del DNA (Finn y col., 1996; Hyrup y Nielsen, 1996). Los monómeros de PNA se acoplan luego gradualmente paso a paso para producir una molécula quimérica con un segmento 5' de PNA y con un segmento 3' del DNA (Finn y col., 1996). Como alternativa, las moléculas quiméricas se pueden sintetizar con un segmento 5' de DNA y con un segmento 3' de PNA (Petersen y col., 1976).

El oligonucleótido puede incluir otros grupos anexionados tales como péptidos (p. ej., para el direccionamiento hacia receptores de células hospedadoras *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (Lemaitre y col., 1987; Letsinger y col., 1989) o la Publicación de PCT Núm. WO88/09810) o a través de la barrera hematoencefálica (p. ej., la Publicación de PCT Núm. WO 89/10134). Además, los oligonucleótidos se pueden modificar con agentes de escisión desencadenada por hibridación (van der Krol y col., 1988a) o con agentes intercalantes (Zon, 1988). El oligonucleótido se puede conjugar con otra molécula, p. ej., un péptido, un agente favorecedor de la formación de enlaces cruzados desencadenada por hibridación, un agente de transporte, polipéptidos como los definidos en las reivindicaciones pendientes de aprobación, agentes de escisión desencadenada por hibridación, y moléculas similares.

Polipéptidos WUP

Uno de los aspectos de la invención concierne a polipéptidos WUP aislados, según se definen en las reivindicaciones pendientes de aprobación. Estos polipéptidos son adecuados para usar como inmunógenos para generar anticuerpos anti-WUP. En una de las realizaciones, se puede aislar un WUP natural a partir de células o de fuentes procedentes de tejidos mediante un esquema de purificación adecuado usando técnicas estándar de purificación de proteínas. En otra de las realizaciones, los WUP se producen mediante técnicas de DNA recombinante. Como alternativa a la expresión recombinante, un WUP o un polipéptido se puede sintetizar por métodos químicos usando técnicas estándar de síntesis de péptidos.

1. Polipéptidos

Un polipéptido WUP incluye la secuencia de aminoácidos de WUP, secuencias que se proporcionan en los SEQ ID NOS: 6 u 8. La invención también incluye una proteína mutante o variante que tiene la identidad de secuencia definida en las reivindicaciones y en la que cualquiera de sus residuos se pueden cambiar partiendo de los correspondientes residuos mostrados en los SEQ ID NOS: 6 u 8, mientras siga codificando una proteína que mantenga las actividades y las funciones fisiológicas de WUP, siendo dicho polipéptido un polipéptido WUP activo.

2. Polipéptidos WUP variantes

En general, una variante de WUP es un polipéptido que conserva una función similar a la de WUP e incluye toda variante en la que residuos situados en una posición concreta de la secuencia han sido sustituidos por otros aminoácidos, e incluye además la posibilidad de insertar un residuo o residuos adicionales entre dos residuos de la proteína original, así como la posibilidad de delecionar uno o más residuos de la secuencia original. Cualquier sustitución, inserción o delección de aminoácidos está abarcada por la invención. En circunstancias favorables, la sustitución es una sustitución conservadora según ésta se ha definido anteriormente.

“Variante de polipéptido WUP” significa un polipéptido WUP activo que tiene al menos: (1) una identidad de secuencia de aminoácidos de 80% con los SEQ ID NOS: 6 u 8, o (2) una secuencia de polipéptido WUP que consiste en una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 39. Por ejemplo, las variantes de polipéptido WUP incluyen polipéptidos WUP en los que uno o más de los residuos de aminoácidos están añadidos o delecionados en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos natural de longitud completa. Una variante de polipéptido WUP tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80%, preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 81%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y muy preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 99%, con respecto a la secuencia de los SEQ ID NOS: 6 u 8, siendo dicho polipéptido un polipéptido WUP activo. Una variante de polipéptido WUP puede tener una secuencia que carece del péptido señal. Normalmente, los polipéptidos variantes de WUP tienen una longitud de al menos 100, 150, 200 ó 300 aminoácidos o más.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos” se define como el porcentaje de residuos de aminoácido que son idénticos con respecto a los residuos de aminoácido de la secuencia del polipéptido WUP descrita, en una secuencia candidata, cuando las dos secuencias están alineadas. Para determinar el % de identidad en los aminoácidos, las secuencias se alinean y, si es necesario, se introducen huecos para conseguir el % máximo de identidad de las secuencias; las sustituciones conservadoras no se consideran parte de la identidad de las secuencias. Los procedimientos de alineamiento de secuencias de aminoácido para determinar el porcentaje de identidad son muy conocidos por los expertos en la técnica. Frecuentemente se usan programas informáticos públicamente disponibles, tales como BLAST, BLAST2, ALIGN2 o Megalign (DNASTAR) para alinear secuencias de péptidos. Los expertos en la técnica saben determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo los algoritmos necesarios para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

Cuando se alinean secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada, con respecto a, con o frente a, una secuencia de aminoácidos B determinada (que como alternativa puede estar expresada como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a, una secuencia de aminoácidos B) se puede calcular de la siguiente manera:

$$\% \text{ de identidad de secuencia de aminoácidos} = X/Y \cdot 100$$

en donde:

X es el número de residuos de aminoácido puntuados como correspondencias idénticas mediante aplicación de los programas o algoritmos de alineamientos de secuencias al alineamiento de A y B e

Y es el número total de residuos de aminoácidos de B.

Cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A respecto a B no será igual al % de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos B con respecto a A.

3. Péptidos aislados/purificados

Un polipéptido, proteína o fragmento biológicamente activo, “aislado” o “purificado” está separado o se ha recuperado procedente de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes incluyen materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros materiales proteináceos o no proteináceos. Preferiblemente, el polipéptido se purifica hasta alcanzar un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o de una secuencia de aminoácidos interna. Para estar sustancialmente aisladas, las preparaciones tienen menos del 30% en peso seco de material contaminante distinto de WUP (contaminantes), más preferiblemente menos que el 20%, del 10% y muy preferiblemente menos que el 5% de contaminantes. Un WUP aislado, producido mediante técnicas recombinantes, o una porción aislada biológicamente activa, está preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos que el 20%, más preferiblemente menos que el 10% y muy preferiblemente menos que aproximadamente el 5% del volumen de la preparación de WUP. Ejemplos de contaminantes incluyen restos celulares, medios de cultivo y sustancias usadas y producidas durante la síntesis *in vitro* de WUP.

4. Biológicamente activo

Las porciones biológicamente activas de WUP incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas a, o derivadas de, las secuencias de aminoácidos del WUP (SEQ ID NOS: 6 u 8), que incluyen menor número de aminoácidos que el WUP de longitud completa, y que exhiben al menos una de las actividades de un WUP. Las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o un motivo con al menos una de las actividades de WUP natural. Una porción biológicamente activa de un WUP puede ser un polipéptido que tiene una longitud, por ejemplo, de 10, 25, 50, 100 o más residuos de aminoácidos. Otras porciones biológicamente activas, en las que otras regiones de la proteína están delecionadas, se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y se pueden evaluar con respecto a una o más de las actividades funcionales de un WUP natural.

Las porciones biológicamente activas de WUP pueden tener una secuencia de aminoácidos mostrada en los SEQ ID NOS: 6 u 8, o pueden ser sustancialmente homólogas a los SEQ ID NOS: 6 u 8, y conservan la actividad funcional de la proteína de los SEQ ID NOS: 6 u 8, aunque difieren en la secuencia de aminoácidos debido a la variación alélica natural o a mutagénesis.

5. Determinación de la homología entre dos o más secuencias

“Variante de WUP” significa un WUP activo que posee la identidad de secuencia definida en las reivindicaciones y al menos: (1) una identidad de secuencia de aminoácidos del 80% con los SEQ ID NOS: 6 u 8, (2) una secuencia de WUP que carece de péptido señal. Por ejemplo, las variantes de WUP incluyen WUP en los que uno o más de los residuos de aminoácidos están añadidos o delecionados en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos natural de longitud completa. Una variante de WUP tendrá una identidad de secuencia de

aminoácidos de al menos el 80%, preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 81%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y muy preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 99%, con respecto a los SEQ ID NOS: 6 u 8. Una variante de WUP puede tener una secuencia que carece del péptido señal. Normalmente, los polipéptidos variantes de WUP tienen una longitud de al menos aproximadamente 80, 90, 100, 150, 200 ó 300 aminoácidos o más.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos” se define como el porcentaje de residuos de aminoácido que son idénticos con respecto a los residuos de aminoácido de la secuencia de WUP descrita, en una secuencia candidata, cuando las dos secuencias se alinean. Para determinar el % de identidad de los aminoácidos, las secuencias se alinean y, si es necesario, se introducen huecos para conseguir el % máximo de identidad de las secuencias; las sustituciones conservadoras no se consideran parte de la identidad de las secuencias. Los procedimientos de alineamiento de secuencias de aminoácido para determinar el porcentaje de identidad son muy conocidos por los expertos en la técnica. Se usan frecuentemente programas informáticos públicamente disponibles, tales como BLAST, BLAST2, ALIGN2 o Megalign (DNASTAR) para alinear secuencias de péptidos. Los expertos en la técnica saben determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo los algoritmos necesarios para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

Cuando se alinean secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada, con respecto a, con o frente a, una secuencia de aminoácidos B determinada (que como alternativa puede estar expresada como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a, una secuencia de aminoácidos B), se puede calcular de la siguiente manera:

$$\% \text{ de identidad de secuencia de aminoácidos} = X/Y \cdot 100$$

en donde

X es el número de residuos de aminoácido puntuados como correspondencias idénticas por los programas o algoritmos de alineamientos de secuencias al alineamiento de A y B, e

Y es el número total de residuos de aminoácidos de B.

Cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos B con respecto a A.

6. Proteínas quiméricas y de fusión

Los polipéptidos de fusión son útiles en estudios sobre la expresión, localización celular, ensayos biológicos y purificación de WUP. Una “proteína quimérica” de WUP o una “proteína de fusión” con WUP comprende WUP fusionado a un polipéptido distinto de WUP. Un polipéptido distinto de WUP es sustancialmente no homólogo a WUP (SEQ ID NOS: 6 u 8). Una proteína de fusión con WUP puede incluir una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con la secuencia de los SEQ ID NOS: 6 u 8, incluyendo cualquier número de las porciones biológicamente activas. WUP puede estar fusionado al extremo C-terminal de las secuencias de GST (glutathion S-transferasa). Esas proteínas de fusión facilitan la purificación de WUP recombinante. En algunas células hospedadoras (p. ej., de mamíferos), fusiones con secuencias señal heterólogas pueden mejorar la expresión y/o secreción de WUP. En la Tabla C se presentan ejemplos de fusiones adicionales.

Otras parejas de fusión pueden adaptarse a WUP con fines terapéuticos. Fusiones con miembros de la familia de proteínas de las inmunoglobulinas (Ig) son útiles en tratamientos que inhiben interacciones con ligandos o sustratos de WUP, suprimiendo por consiguiente la transducción de señales mediada por WUP *in vivo*. Los polipéptidos de fusión WUP-Ig también se pueden usar como inmunógenos para producir anticuerpos anti-WUP en un individuo, para purificar ligandos de WUP y para realizar el escrutinio de moléculas que inhiben las interacciones de WUP con otras moléculas.

Las proteínas de fusión se pueden crear fácilmente usando métodos recombinantes. Un ácido nucleico que codifica WUP se puede fusionar en el marco de lectura con un ácido nucleico que codifica un producto distinto de WUP, en la terminación NH₂- o en la terminación COO-, o internamente. También se pueden sintetizar genes de fusión mediante técnicas convencionales, que incluyen los sintetizadores de DNA automáticos. También es útil la amplificación por PCR usando cebadores de anclaje que dan lugar a extremos protuberantes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que se pueden posteriormente renaturalizar y reamplificar para generar una secuencia génica quimérica (Ausubel y col., 1987). Existen muchos vectores comercialmente disponibles que facilitan la subclonación de WUP en el marco de lectura a un resto de fusión.

Tabla C. Polipéptidos de fusión útiles distintos de WUP

Reporte	in vitro	in vivo	Notas	Referencia bibliográfica
Hormona de crecimiento humana	Radioinmuno-ensayo	Ninguno	Caro, falta de sensibilidad, intervalo lineal reducido	(Selden col., 1986) y
β -glucuronidasa (GUS)	Colorimétrico, fluorescente o quimioluminiscente	Colorimétrico (tinción histoquímica con X-gluc)	Sensible, intervalo lineal amplio, no isotópico	(Gallagher, 1992)
Proteína fluorescente verde (GFP) y moléculas relacionadas (RFP, BFP, WUP, etc.)	Fluorescente	Fluorescente	Se puede usar en células vivas; resiste al fotoblanqueo	(Chalfie col., 1994) y
Luciferasa (de luciérnaga)	Bioluminiscente	Bioluminiscente	La proteína es inestable, difícil de reproducir, la señal es breve	(de Wet col., 1987) y
Cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT)	Cromatografía, extracción diferencial, fluorescente o inmunoensayo	Ninguno	Sustratos radiactivos caros, duración larga, no sensible, intervalo lineal estrecho	(Gorman col., 1982) y

Tabla C. Polipéptidos de fusión útiles distintos de WUP (continuación)

Reporte	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	Notas	Referencia bibliográfica
β -galactosidasa	Colorimétrico, fluorescente, quimioluminiscente	Colorimétrico (tinción histoquímica con X-gal), bioluminiscente en células vivas	Sensible, intervalo lineal amplio; algunas de las células tienen una elevada actividad endógena	(Alam y Cook, 1990)
Fosfatasa alcalina secretada (SEAP)	Colorimétrico, fluorescente, quimioluminiscente	Ninguno	El ensayo de quimioluminiscencia es sensible y tiene un intervalo lineal amplio; algunas de las células tienen actividad de fosfatasa alcalina endógena.	(Berger y col., 1988)

*Aplicaciones terapéuticas de WUP**1. Agonistas y antagonistas*

5 “Antagonista” incluye toda molécula que bloquea, inhibe o neutraliza de manera parcial o completa una actividad biológica de un WUP endógeno. De manera similar, “agonista” incluye toda molécula que imita una actividad biológica de un WUP endógeno. Las moléculas que pueden actuar como agonistas o antagonistas incluyen Ac o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de un WUP endógeno, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc.

10

2. Identificación de antagonistas y agonistas

15 Para realizar ensayos para detectar antagonistas, WUP se añade a, o se expresa en, una célula junto con el compuesto que se ha de escrutar con respecto a una actividad particular. Si el compuesto inhibe la actividad de interés en presencia de, ese compuesto es un antagonista del WUP; si la actividad de WUP aumenta, el compuesto es un agonista.

(a) Ejemplos específicos de antagonistas y agonistas potenciales

20 Toda molécula que altera los efectos celulares de WUP es un antagonista o agonista candidato. Las técnicas de escrutinio, muy conocidas por los expertos en la técnica, pueden identificar estas moléculas. Ejemplos de antagonistas y agonistas incluyen: (1) compuestos orgánicos e inorgánicos de pequeño tamaño, (2) péptidos pequeños, (3) anticuerpos y derivados, (4) polipéptidos estrechamente relacionados con WUP, (5) DNA y RNA antisentido, (6) ribozimas, (7) triple hélices de DNA y (8) ácidos nucleicos aptámeros.

25 Son antagonistas las moléculas pequeñas que se unen al sitio activo de WUP o a otra parte relevante del polipéptido y que inhiben la actividad biológica del WUP. Ejemplos de moléculas pequeñas antagonistas incluyen péptidos pequeños, moléculas similares a péptidos, preferiblemente solubles, y compuestos sintéticos no peptídicos, orgánicos o inorgánicos. Estas mismas moléculas, si aumentan la actividad de WUP, son ejemplos de agonistas.

30 Casi cualquier anticuerpo que afecta a la función de WUP es un antagonista candidato, y ocasionalmente, un agonista. Ejemplos de anticuerpos antagonistas incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, monocatenarios, anti-idiotipo, quiméricos, o versiones humanizadas de esos anticuerpos o fragmentos. Los anticuerpos pueden proceder de cualquier especie en la que se pueda generar una inmunorrespuesta. Los anticuerpos humanizados también están contemplados.

35

Como alternativa, un antagonista o agonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del WUP que reconoce una proteína que interacciona con WUP pero que no transmite ningún efecto, inhibiendo así competitivamente la acción de WUP. Como alternativa, un WUP mutado puede ser activado de manera constitutiva y puede actuar como agonista.

40

Las construcciones de RNA o DNA antisentido pueden ser antagonistas efectivos. Las moléculas de RNA o DNA antisentido bloquean la función inhibiendo la traducción mediante hibridación con el mRNA al que se dirigen. La tecnología antisentido se puede usar para controlar la expresión génica a través de la formación de triple hélices o a través de un RNA o DNA antisentido, casos ambos que dependen de la unión de polinucleótidos al DNA o al RNA. Por ejemplo, la porción codificadora en 5' de la secuencia de WUP se usa para diseñar un oligonucleótido de RNA antisentido que tiene una longitud de aproximadamente de 10 a 40 pares de bases. Un oligonucleótido de DNA se diseña para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice) (Beal y Dervan, 1991; Cooney y col., 1988; Lee y col., 1979), previniendo así la transcripción y la traducción del WUP. El oligonucleótido de RNA antisentido se hibrida con el mRNA *in vivo* y bloquea la traducción de esa molécula de mRNA en el WUP (antisentido) (Cohen, 1989; Okano y col., 1991). Estos oligonucleótidos se pueden también suministrar a las células de manera que el RNA o el DNA antisentido se puedan expresar *in vivo* para inhibir la producción del WUP. Cuando se usa un DNA antisentido, se prefieren los oligo-desoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, p. ej., entre las posiciones aproximadamente -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

55 Las ribozimas son moléculas de RNA capaces de catalizar la escisión específica de RNA. Las ribozimas actúan a través de una hibridación específica de secuencia, con el RNA diana complementario, seguida de una escisión endonucleolítica. Los sitios específicos de escisión por ribozimas dentro de un RNA diana potencial, se pueden identificar mediante técnicas conocidas (documento WO 97/33551, 1997; Rossi, 1994).

60 Para inhibir la transcripción, son antagonistas útiles los ácidos nucleicos de triple hélice que son monocatenarios y que comprenden desoxinucleótidos. Estos oligonucleótidos se diseñan de manera que se promueva la formación de triple hélices a través de la reglas de formación de pares de bases de Hoogsteen, que generalmente requiere extensiones de purinas o pirimidinas (documento WO 97/33551, 1997).

65 Los aptámeros son secuencias cortas de oligonucleótidos que se pueden usar para reconocer y para unirse de manera específica a casi todas las moléculas. La evolución sistemática de ligandos por medio de un procedimiento de enriquecimiento exponencial (SELEX) (Ausubel y col., 1987; Ellington y Szostak, 1990; Tuerk y Gold, 1990) es un procedimiento muy eficaz y se puede usar para encontrar esos aptámeros. Los aptámeros tienen muchos usos

diagnósticos y clínicos; los aptámeros se pueden usar también en casi cualquier uso en el que se usa un anticuerpo con fines clínicos o de diagnóstico. Además, son más baratos de fabricar una vez que ha sido identificados, y se pueden aplicar fácilmente en diversos formatos, que incluyen la administración en composiciones farmacéuticas, en ensayos biológicos y en ensayos diagnósticos (Jayasena, 1999).

Anticuerpos anti-WUP

La invención abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, tales como F_{ab} o $(F_{ab})_2$, que se unen de manera inmuno-específica a cualquiera de los epítopos de WUP, según se definen en las reivindicaciones.

“Anticuerpo” (Ac) comprende anticuerpos individuales dirigidos contra WUP (Ac anti-WUP; que incluyen anticuerpos, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-WUP con especificidad poliepitópica, anticuerpos anti-WUP monocatenarios y fragmentos de anticuerpos anti-WUP. Un “anticuerpo monoclonal” se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que la población comprende son idénticos excepto por posibles mutaciones que tienen lugar en la naturaleza que se pueden presentar en cantidades poco importantes. Ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales (pAc), monoclonales (mAc), humanizados, biespecíficos (bsAc) (del inglés, “*bi-specific Antibodies*”) y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales (pAc)

Los anticuerpos policlonales se pueden generar en un mamífero hospedador, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un inmunógeno y, si se desea, de un adyuvante. Típicamente, el inmunógeno y/o el adyuvante se inyectan en el mamífero a través de inyecciones subcutáneas o intraperitoneales múltiples. El inmunógeno puede incluir WUP o una de sus proteínas de fusión. Ejemplos de adyuvantes incluyen el adyuvante completo de Freund y monofosforil-Lípido A sintético-dicorinomicolato de trehalosa (MPL-TDM). Para mejorar la inmunorrespuesta, un inmunógeno puede estar conjugado con una proteína que es inmunogénica en ese hospedado, tal como la hemocianina de la lapa californiana (KLH) (del inglés, “*Keyhole Limpet Hemocyanin*”), albúmina sérica, tiroglobulina bovina y el inhibidor de tripsina de semilla de soja. Los protocolos para la producción de anticuerpos se encuentran descritos en (Ausubel y col., 1987; Harlow y Lane, 1988). Como alternativa, los pAc se pueden preparar en pollos, produciendo moléculas de IgY (Schade y col., 1996).

2. Anticuerpos monoclonales (mAc)

Se pueden preparar mAc anti-WUP usando métodos que emplean hibridomas (Milstein y Cuello, 1983). Los métodos que emplean hibridomas comprenden al menos cuatro etapas: (1) inmunizar un hospedador, o linfocitos procedentes de un hospedador; (2) recoger los linfocitos que secretan (o que potencialmente secretan) el mAb, (3) fusionar los linfocitos con células immortalizadas, y (4) seleccionar las células que secretan el mAc (anti-WUP) deseado.

Un ratón, rata, cobaya, hámster u otro hospedador apropiado es inmunizado para inducir la generación de linfocitos que producen o que son capaces de producir anticuerpos que se unirán de manera específica al inmunógeno. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Si se requieren células humanas, generalmente se usan linfocitos de sangre periférica (PBL) (del inglés, “*Peripheral Blood Lymphocytes*”); sin embargo, se prefieren esplenocitos o linfocitos procedentes de otros orígenes de mamíferos. El inmunógeno típicamente incluye WUP o una proteína de fusión.

Los linfocitos se fusionan luego con una línea de células immortalizadas para formar células de hibridoma, lo que se facilita con un agente favorecedor de la fusión tal como el polietilenglicol (Goding, 1996). Se pueden usar células immortalizadas procedentes de roedores, bovinas o humanas, immortalizadas mediante transformación, o líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Debido a que se prefieren poblaciones puras de células de hibridoma y no células immortalizadas no fusionadas, las células después de la fusión se hacen crecer en un medio adecuado que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células immortalizadas no fusionadas. Una técnica común usa células parentales que carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT) (del inglés, “*Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase*”). En este caso, al medio se añaden hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT) para impedir el crecimiento de células deficientes en HGPRT al tiempo que se permite que los hibridomas crezcan.

Las células immortalizadas preferidas se fusionan eficientemente; se pueden aislar de poblaciones mixtas realizando una selección en un medio tal como el medio HAT; y se mantienen de manera estable y con un alto nivel de expresión del anticuerpo después de la fusión. Las líneas preferidas de células immortalizadas son las líneas de mieloma murino, disponibles procedentes de la *American Type Culture Collection* (Manassas, VA). También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-seres humanos en el caso de la producción de mAc humanos (Kozbor y col., 1984; Schook, 1987).

Debido a que las células de hibridoma secretan anticuerpos de modo extracelular, los medios de cultivo se pueden ensayar con respecto a la presencia de mAc dirigidos contra WUP (mAc anti-WUP). La inmunoprecipitación o los ensayos de unión *in vitro*, tales como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) (del inglés, “*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*”) miden la especificidad de unión de los mAc (Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999), incluyendo el análisis de Scatchard (Munson y Rodbard, 1980).

Las células de hibridoma que secretan un mAc anti-WUP se pueden aislar en forma de clones individuales mediante procedimientos de dilución límite y se pueden someter a subcultivo (Goding, 1996). Medios de cultivo adecuados incluyen el medio de Eagle modificado por Dulbecco, RPMI-1640, o si se desea, un medio libre de proteínas o con un contenido reducido de proteínas o un medio libre de suero (p. ej., Ultra DOMA PF o HL-1; Biowhittaker; Walkersville, MD). Las células de hibridoma también se pueden hacer crecer *in vivo* en forma de ascitis.

Los mAc se pueden aislar o purificar a partir del medio de cultivo o del fluido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de las Ig, tales como cromatografía en *A-Sepharose*, hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, precipitación en sulfato amónico o cromatografía de afinidad (Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999).

Los mAc también se pueden preparar mediante métodos recombinantes (Patente de EE. UU. Núm. 4166452, 1979). El DNA que codifica los mAc anti-WUP se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales, p. ej., usando sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente a los genes de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos murinos, para hibridarlas preferiblemente a un DNA aislado de líneas celulares de hibridoma que secretan mAc anti-WUP. Una vez aislados, los fragmentos de DNA aislados se subclonan dentro de vectores de expresión con los que se transfectan luego células hospedadoras tales como células COS-7 de simios, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de no ser así no producen proteína de Ig, para que expresen los mAc. Los fragmentos de DNA aislados se pueden modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificadora de los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada humanas en el lugar de las secuencias homólogas murinas (Patente de EE. UU. Núm. 4816567, 1989; Morrison y col., 1987) o fusionando la secuencia codificadora de Ig a la totalidad o a una parte de la secuencia codificadora de un polipéptido distinto de Ig. Ese polipéptido distinto de Ig puede sustituir a los dominios constantes de un anticuerpo o puede sustituir a los dominios variables de un sitio de unión a antígeno para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

3. Anticuerpos monovalentes

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes que, a consecuencia de ello, no forman enlaces cruzados entre ellos. Por ejemplo, uno de los métodos implica la expresión recombinante de la cadena ligera y de una cadena pesada modificada de Ig. Los truncamientos en las cadenas pesadas, generalmente en cualquier punto de la región F_c , impedirán que las cadenas pesadas formen enlaces cruzados. Como alternativa, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen con otro residuo de aminoácido o se delecionan, previniéndose la formación de enlaces cruzados. Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. Los anticuerpos se pueden digerir para producir fragmentos, tales como fragmentos F_{ab} (Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999).

4. Anticuerpos humanizados y humanos

Los anticuerpos anti-WUP pueden también comprender anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos son Ig quiméricas, cadenas de Ig o fragmentos de Ig (tales como F_v , F_{ab} , $F_{ab'}$, $F_{(ab')_2}$ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de Ig no humana.

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene introducidos uno o más residuos de aminoácidos procedentes de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos de procedencia no humana se suelen denominar residuos “importados”, los cuales típicamente se sacan de un dominio variable “importado”. La humanización se lleva a cabo sustituyendo regiones CDR o secuencias de CDR de un anticuerpo humano por las correspondientes secuencias de un anticuerpo de roedores (Jones y col., 1986; Riechmann y col., 1988; Verhoeyen y col., 1988). Esos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (Patente de EE. UU. Núm. 4816567, 1989), en los que una porción sustancialmente menor que un dominio variable humano intacto, ha sido sustituida por la correspondiente secuencia procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos procedentes de sitios análogos de anticuerpos de roedores. Los anticuerpos humanizados incluyen Ig humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos procedentes de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se han reemplazado por residuos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador) tal como ratón, rata o conejo, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los correspondientes residuos no humanos reemplazan residuos de regiones estructurales F_v de la Ig humana. Los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor, ni en las secuencias de CDR o de regiones estructurales importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad, o al menos un dominio variable, o típicamente dos dominios variables, en los que la mayoría si no la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una Ig no humana, y la mayoría si no la totalidad de las regiones FR son las de una secuencia consenso de Ig humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprende también una porción de una región constante (F_c) de Ig, típicamente la de una Ig humana (Jones y col., 1986; Presta, 1992; Riechmann y col., 1988).

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando técnicas diversas, que incluyen el uso de genotecas de presentación en fagos (Hoogenboom y col., 1991; Marks y col., 1991) y la preparación de mAc humanos (Boerner y col., 1991; Reisfeld y Sell, 1985). De manera similar, la introducción de genes humanos de Ig en animales transgénicos en los que los genes endógenos de Ig han sido parcial o totalmente inactivados, se puede aprovechar para sintetizar anticuerpos humanos. Tras la estimulación inmunológica, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se

asemeja enormemente a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación y ensamblaje de genes y el repertorio de anticuerpos (Patente de EE. UU. Núm. 5545807, 1996; Patente de EE. UU. Núm. 5545806, 1996; Patente de EE. UU. Núm. 5569825, 1996; Patente de EE. UU. Núm. 5633425, 1997; Patente de EE. UU. Núm. 5661016, 1997; Patente de EE. UU. Núm. 5625126, 1997; Fishwild y col., 1996; Lonberg y Huszar, 1995; Lonberg y col., 1994; Marks y col., 1992).

5. *mAc biespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Por ejemplo, una especificidad de unión es para WUP; la otra es para cualquier antígeno a elegir, preferiblemente, una proteína o un receptor de superficie celular o una subunidad de un receptor.

Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas ligera/pesada de Ig, en los que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, 1983). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas ligera y pesada de las Ig, los hibridomas resultantes (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica deseada. El anticuerpo deseado se puede purificar usando cromatografía de afinidad u otras técnicas (documento WO 93/08829, 1993; Traunecker y col., 1991).

Para fabricar un anticuerpo biespecífico (Suresh y col., 1986), los dominios variables que contienen los sitios de unión de antígeno-anticuerpo deseados, se fusionan con secuencias de dominios constantes de Ig. La fusión tiene lugar preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones de la bisagra, CH2 y CH3. Preferiblemente, la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, está en al menos una de las fusiones. Los DNA que codifican las fusiones de la cadena pesada de Ig y, si se desea, de la cadena ligera de Ig, se insertan en vectores de expresión distintos y se utilizan para cotransfectar un organismo hospedador adecuado.

La interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede construir por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes (documento WO 96/27011, 1996). La interfase preferida comprende al menos parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas de aminoácidos de tamaño pequeño, procedentes de la interfase de la primera molécula de anticuerpo, se reemplazan con cadenas laterales más grandes (p. ej., de tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena(s) lateral grande, sobre la interfase de la segunda molécula de anticuerpo, las cadenas laterales de aminoácidos grandes con cadenas más pequeñas (p. ej., de alanina o treonina). Este mecanismo aumenta la producción del heterodímero sobre la de productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar en forma de anticuerpos de longitud completa o en forma de fragmentos de anticuerpo (p. ej., anticuerpos biespecíficos $F_{(ab')_2}$). Una de las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos utiliza las uniones químicas. Los anticuerpos intactos se pueden escindir por proteólisis para generar fragmentos $F_{(ab')_2}$ (Brennan y col., 1985). Los fragmentos se reducen con un agente formador de complejos con ditioles, tal como el arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles vecinales y prevenir la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. Los fragmentos $F_{ab'}$ generados se convierten luego en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados $F_{ab'}\text{-TNB}$ se reconvierte luego en el $F_{ab'}$ -tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado $F_{ab'}\text{-TNB}$ para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos $F_{ab'}$ se pueden recuperar directamente a partir de *E. coli* y se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos biespecíficos $F_{(ab')_2}$ totalmente humanizados (Shalaby y col., 1992). Cada uno de los fragmentos $F_{ab'}$ es secretado independientemente por *E. coli* y se acopla directamente *in vitro* mediante métodos químicos, formando el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos, directamente a partir del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se pueden utilizar los motivos de las cremalleras de leucina (Kostelny y col., 1992). Péptidos procedentes de las proteínas Fos y Jun se unen a las porciones $F_{ab'}$ de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de los anticuerpos se reducen en la región de la bisagra para formar monómeros y después se oxidan de nuevo para formar heterodímeros de anticuerpos. Este método puede también producir homodímeros de anticuerpos. La tecnología del "anticuerpo dividido" (Holliger y col., 1993) proporciona un método alternativo para generar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L), por medio de un fragmento enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Los dominios de V_H y V_L de uno de los fragmentos están forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpo biespecíficos es el uso de dímeros monocatenarios (sF_v) (Gruber y col., 1994). Se contemplan también los anticuerpos que tienen más de dos valencias, tales como los anticuerpos triespecíficos (Tutt y col., 1991).

Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos se pueden unir a dos epítomos diferentes dispuestos sobre un WUP determinado. Como alternativa los mecanismos de defensa celular se pueden restringir a una célula particular que expresa el WUP particular: Un brazo anti-WUP se puede combinar con un brazo que se une a una molécula que desencadena la proliferación de los leucocitos, tal como una molécula de receptor de células T (p. ej., CD2, CD3, CD28 o B7), o a receptores de F_c para IgG ($F_c\gamma R$), tales como $F_c\gamma RI$ (CD64), $F_c\gamma RII$ (CD32) y $F_c\gamma RIII$ (CD16). También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir a agentes citotóxicos hacia células que expresan un WUP particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a WUP y un brazo que se une a un agente citotóxico o a un quelante de radionucleidos.

6. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados, que consisten en dos anticuerpos unidos covalentemente, se han propuesto para dirigir las células del sistema inmunitario hacia células no deseadas (documento 4.676.980, 1987) y para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (documento WO 91/00360, 1991; documento WO 92/20373, 1992). Se contemplan anticuerpos preparados *in vitro* usando métodos químicos de síntesis de proteínas que incluyen los métodos que implican a agentes favorecedores de la formación de enlaces cruzados. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuros o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato (documento 4.676.980, 1987).

7. Inmunconjugados

Los inmunconjugados pueden comprender un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, con una toxina (p. ej., una toxina enzimáticamente activa o un fragmento de origen bacteriano, fúngico, de plantas o de animales), o con un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Toxinas y fragmentos útiles y enzimáticamente activos incluyen la cadena A de la Difteria, fragmentos activos, no de unión, de la toxina de la Difteria, cadena A de la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, a-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de Dianthin, proteínas de *Phytolaca americana*, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogellin, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Existen disponibles diversos radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados, tales como ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

Los conjugados del anticuerpo y un agente citotóxico se preparan usando diversos agentes favorecedores de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como el 3-(2-piridilditiol)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo-HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos *bis*-azido (tales como bis (p-azido-benzoyl)hexanodiamina), derivados de *bis*-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-fluorina activa (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina ricina (Vitetta y col., 1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopenta-acético (MX-DTPA) marcado con ^{14}C es un ejemplo de agente quelante para conjugar un radionucleido a un anticuerpo (documento WO 94/11026, 1994).

El anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el predireccionamiento hacia un tumor, caso en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por la retirada de la circulación del conjugado no unido usando un agente de aclaramiento y después por la administración de un "ligando" de estreptavidina (por ejemplo, biotina) que está conjugado con un agente citotóxico (p. ej., un radionucleido).

8. Creación de la función de efector mediante ingeniería genética

El anticuerpo se puede modificar para aumentar su eficacia en el tratamiento de una enfermedad, tal como un cáncer. Por ejemplo, se puede introducir un residuo(s) de cisteína en la región F_c , permitiendo así la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. Estos anticuerpos homodiméricos pueden presentar una capacidad de internalización mejorada y/o una capacidad de destrucción celular mediada por el complemento y una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) aumentadas (Caron y col., 1992; Shopes, 1992). Los anticuerpos homodiméricos que tiene una actividad antitumoral aumentada se pueden preparar usando agentes favorecedores de la formación de enlaces cruzados hetero-bifuncionales (Wolff y col., 1993). De manera alternativa, un anticuerpo construido por ingeniería genética con regiones F_c duales, puede ejercer una mayor lisis mediada por el complemento (Stevenson y col., 1989).

9. Immunoliposomas

También se pueden formular liposomas que contienen el anticuerpo (Patente de EE. UU. Núm. 4485045, 1984; Patente de EE. UU. Núm. 4544545, 1985; Patente de EE. UU. Núm. 5013556, 1991; Eppstein y col., 1985; Hwang y col., 1980). Se pueden generar liposomas útiles mediante un método de evaporación en fase inversa, con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina en forma de derivado con PEG (PEG-PE). Esas preparaciones se someten a extrusión a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con un diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo se pueden conjugar con los liposomas (Martin y Papa-

hadjopoulos, 1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuros. Un agente quimioterapéutico tal como la Doxorubicina, también puede estar contenido en el liposoma (Gabizon y col., 1989). Se contemplan otros liposomas útiles con composiciones diferentes.

5 10. *Aplicaciones diagnósticas de los anticuerpos dirigidos contra WUP*

Los anticuerpos anti-WUP se pueden usar para localizar y/o cuantificar WUP (p. ej., para usar para medir los niveles de WUP dentro de muestras de tejido o para usar en métodos de diagnóstico, etc.). Los anticuerpos anti-epítomos de WUP se pueden utilizar como compuestos farmacológicamente activos.

10 Los anticuerpos anti-WUP se pueden usar para aislar WUP mediante técnicas estándar, tales como la cromatografía de inmunoafinidad o la inmunoprecipitación. Estas estrategias facilitan la purificación de polipéptidos endógenos que contienen el antígeno WUP a partir de células y tejidos. Estas estrategias, así como otras, se pueden usar para detectar WUP en una muestra para evaluar la abundancia y el patrón de expresión de la proteína antigénica. Los anticuerpos anti-WUP se pueden usar para controlar los niveles de proteína en tejidos como parte de un procedimiento de ensayos clínicos; por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado. El acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable (marcador) permite la detección de complejos Ab-antígeno. Las clases de marcadores incluyen materiales fluorescentes, luminiscentes, bioluminiscentes y radioactivos, enzimas y grupos prostéticos. Los marcadores útiles incluyen peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, acetilcolinesterasa, estreptavidina/biotina, avidina/biotina, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamin-fluoresceína, cloruro de dansilo, ficoeritrina, luminol, luciferasa, luciferina, Aequorin y ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

25 11. *Anticuerpos terapéuticos*

Los anticuerpos de la invención, que incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados y totalmente humanos, se pueden usar en aplicaciones terapéuticas. Esos agentes generalmente se emplearán para tratar o prevenir una enfermedad o patología en un individuo. Una preparación de anticuerpos, preferiblemente una preparación que tiene una especificidad y afinidad altas por el antígeno, media en un efecto mediante su unión al epítipo(s) diana. Generalmente, la administración de esos anticuerpos puede mediar en uno de dos efectos: (1) el anticuerpo puede prevenir la unión a ligandos, eliminando la unión a ligandos endógenos y la posterior transducción de señales, o (2) el anticuerpo induce un resultado fisiológico uniéndose a un sitio efector sobre la molécula diana e iniciando la transducción de señales.

35 Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo se refiere en general a la cantidad necesaria para conseguir un objetivo terapéutico, una afinidad de unión a epítipo, una tasa de administración y una tasa de agotamiento del anticuerpo en un individuo. Los intervalos comunes para las dosis terapéuticamente efectivas pueden ser, como ejemplo no limitativo, desde aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de las dosificaciones pueden variar, por ejemplo, desde dos veces al día hasta una vez a la semana.

40 12. *Composiciones farmacéuticas de los anticuerpos*

Los anticuerpos anti-WUP, así como otras moléculas que interaccionan con WUP (tales como aptámeros) identificadas en otros ensayos, se pueden administrar en composiciones farmacéuticas para tratar diversos trastornos. Los principios y consideraciones implicados en la preparación de estas composiciones, así como la orientación para la elección de los componentes, se puede encontrar en (de Boer, 1994; Gennaro, 2000; Lee, 1990).

Los anticuerpos que son internalizados se prefieren cuando anticuerpos completos se usan como inhibidores. También se pueden usar liposomas como vehículo de administración para la introducción intracelular. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, el fragmento inhibidor de menor tamaño, que se une específicamente al epítipo, es el preferido. Por ejemplo, se pueden diseñar moléculas de péptidos que se unan a un epítipo preferido, sobre la base de las secuencias de las regiones variables de un anticuerpo útil. Esos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o se pueden producir mediante la tecnología del DNA recombinante (Marasco y col., 1993). Las formulaciones también pueden contener más de un único compuesto activo para un tratamiento particular, preferiblemente compuestos activos que tienen actividades que no se afectan entre sí de manera adversa. La composición puede comprender un agente que potencia la función, tal como un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento.

60 Los componentes activos también pueden ir encerrados en microcápsulas preparadas mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial; por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales para el suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

65 Es altamente preferible que las formulaciones que se han de usar para la administración *in vivo* sean estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles o mediante cualquiera de las diversas técnicas.

También se pueden elaborar preparaciones de liberación prolongada, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólido que contiene el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Boswell y Scribner, Patente de EE. UU. Núm. 3.773.919, 1973), copolímeros de ácido L-glutámico y de γ -etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y de poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros tales como los de etileno-acetato de vinilo y de ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan las proteínas durante períodos de tiempo y pueden ser preferidos.

Vectores de expresión recombinante de WUP y células hospedadoras

Los vectores son herramientas usadas para transportar DNA entre células hospedadoras, o usadas como medio para expresar una secuencia de nucleótidos. Algunos vectores actúan solamente en procariotas, mientras que otros actúan tanto en procariotas como en eucariotas, permitiendo la preparación de DNA a gran escala en procariotas para su expresión en eucariotas. La inserción del DNA de interés, tal como una secuencia de nucleótidos de WUP o un fragmento, se lleva a cabo mediante técnicas de ligación y/o mediante protocolos de cruce sexual muy conocidos por el experto en la técnica. Ese DNA se inserta de manera que su integración no altera ninguno de los componentes necesarios del vector. En el caso de vectores que se usan para expresar la proteína correspondiente al DNA insertado, el DNA introducido se liga operativamente a los elementos del vector que gobiernan su transcripción y traducción.

Los vectores se pueden dividir en dos clases generales: Los vectores de clonación son plásmidos o fagos replicantes que contienen regiones que no son esenciales para su propagación en una célula hospedadora apropiada, y dentro de los cuales se puede insertar un DNA extraño; el DNA extraño se replica y se propaga como si fuera un componente del vector. Un vector de expresión (tal como un plásmido, levadura o un genoma de un virus de animales) se usa para introducir material genético extraño en una célula hospedadora o en un tejido hospedador con el fin de transcribir o traducir ese DNA extraño. En los vectores de expresión, el DNA introducido se encuentra operativamente ligado a elementos, tales como promotores, que envían señales a la célula hospedadora para que transcriba el DNA insertado. Algunos promotores son extraordinariamente útiles, tales como los promotores inducibles que controlan la transcripción génica en respuesta a factores específicos. Un WUP operativamente ligado o una construcción antisentido con respecto a un promotor inducible, pueden controlar la expresión de WUP o de sus fragmentos, o de construcciones antisentido. Ejemplos de promotores inducibles clásicos incluyen los que responden a interferón α , choque térmico, iones de metales pesados, y esteroides tales como glucocorticoides (Kaufman, 1990) y tetraciclina. Otros promotores inducibles convenientes incluyen los que no son endógenos en relación con las células en las que la construcción se introduce, sino que, sin embargo, responden en aquellas células en las que el agente de inducción se suministra por vía exógena.

Los vectores presentan muchas manifestaciones de diferencias. Un “plásmido” es una molécula de DNA circular bicatenario dentro de la cual se pueden introducir segmentos de DNA adicionales. Los vectores víricos pueden aceptar segmentos de DNA adicionales dentro del genoma vírico. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora (p. ej., vectores que tiene un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (p. ej., vectores no episómicos de mamíferos) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y de esta manera se replican junto con el genoma hospedador. En general, los vectores de expresión útiles suelen ser plásmidos. Sin embargo, se contemplan otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (p. ej., retrovirus defectuosos en replicación, adenovirus y virus adeno-asociados).

Los vectores de expresión recombinante que comprenden WUP (o sus fragmentos) regulan la transcripción de WUP utilizando una o más de las secuencias reguladoras que encuentran respuesta por parte de las células hospedadoras (o que pueden ser manipuladas *in vitro*) que están operativamente ligadas a WUP. “Operativamente ligada” indica que una secuencia de nucleótidos de interés está ligada a secuencias reguladoras de manera que se obtiene la expresión de la secuencia de nucleótidos.

Los vectores se pueden introducir en diversos organismos y/o células (Tabla D). Como alternativa, los vectores se pueden transcribir y traducir *in vitro*, usando por ejemplo secuencias reguladoras del promotor de T7 y la polimerasa de T7.

ES 2 298 226 T3

TABLA D

Ejemplos de hospedadores para clonación o expresión

Organismos	Ejemplos	Fuentes y referencias bibliográficas*
Procariotas		
Enterobacteriáceas	<i>E. coli</i> Cepa MM294 de K 12 K 12 strain MM294 X1776 W3110 K5 772	ATCC 31.446 ATCC 31.537 ATCC 27.325 ATCC 53.635
	<i>Enterobacter</i>	
	<i>Erwinia</i>	
	<i>Klebsiella</i>	
	<i>Proteus</i>	
	<i>Salmonella</i> (<i>S. typhimurium</i>)	
	<i>Serratia</i> (<i>S. marcescens</i>)	
	<i>Shigella</i>	
	<i>Bacilli</i> (<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>)	
	<i>Pseudomonas</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	
	<i>Streptomyces</i>	
Eucariotas		
Levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
	<i>Kluyveromyces</i> <i>K. lactis</i> MW98-8C,	(Fleer y col., 1991) (de Louvencourt y col., 1983)
	CBS683, CBS4574	(de Louvencourt y col., 1983)
	<i>K. fragilis</i>	ATCC 12.424
	<i>K. bulgaricus</i>	ATCC 16.045
	<i>K. wickerhamii</i>	ATCC 24.178
	<i>K. waltii</i>	ATCC 56.500
	<i>K. drosophilarum</i>	ATCC 36.906
	<i>K. thermotolerans</i>	
	<i>K. marxianus; yarrowia</i>	(EPO 402226, 1990)
	<i>Pichia pastoris</i>	(Sreekrishna y col., 1988)
Levaduras	<i>Candida</i>	
	<i>Trichoderma reesia</i>	
	<i>Neurospora crassa</i>	(Case y col., 1979)
	<i>Torulopsis</i>	

ES 2 298 226 T3

Organismos	Ejemplos	Fuentes y referencias bibliográficas*
	<i>Rhodotorula</i>	
	<i>Schwanniomyces</i> (<i>S. occidentalis</i>)	
Hongos filamentosos	<i>Neurospora</i>	
	<i>Penicillium</i>	
	<i>Tolypocladium Aspergillus</i> (<i>A. nidulans</i> y <i>A. niger</i>)	WO 91/00357, 1991) (Kelly y Hynes, 1985; Tilbum y col., 1983; Yelton y Tilbum y col., 1983; Yelton y col., 1984)
Células de invertebrados	<i>Drosophila</i> S2	
	<i>Spodoprera</i> Sf9	
Células de vertebrados	Ovario de Hámster Chino (CHO)	
	COS, COS-7 de simios	ATCC CRL 1651
	HEK 293	
Las células que no llevan referencia bibliográfica generalmente se encuentran disponibles procedentes de la <i>American Type Culture Collection</i> (Manassas, VA).		

La elección del vector viene impuesta por el organismo o por las células que se van a usar y por el destino que se quiere dar al vector. Los vectores se pueden replicar una sola vez en las células diana o pueden ser vectores "suicidas". En general, los vectores comprenden secuencias señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos estimuladores, promotores y secuencias de terminación de la transcripción. La elección de estos elementos depende de los organismos en los que el vector se usará y se determinan con facilidad. Algunos de estos elementos pueden ser condicionales, tal como un promotor inducible o condicional que es "encendido" cuando las condiciones son adecuadas. Ejemplos de promotores inducibles incluyen los promotores que son específicos de tejido, que relegan la expresión a determinados tipos de células, los que responden a esteroides o los que son reactivos frente a choque térmico. Algunos sistemas bacterianos de represión, tales como el operón lac, se han utilizado en células de mamífero y en animales transgénicos (Fieck y col., 1992; Wyborski y col., 1996; Wyborski y Short, 1991). Los vectores suelen usar un marcador de selección para facilitar la identificación de las células que han incorporado el vector. En la técnica se conocen bien muchos marcadores de selección para uso con procariotas, normalmente genes de resistencia a antibióticos o para uso de mutantes autótrofos o auxótrofos.

El uso de oligonucleótidos WUP con sentido y antisentido puede prevenir la expresión de polipéptidos WUP. Estos oligonucleótidos se unen a secuencias del ácido nucleico diana, formando dúplex que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana aumentando la degradación de los dúplex, finalizando prematuramente de la transcripción o la traducción, o mediante otro medio.

Los oligonucleótidos con sentido o antisentido son ácidos nucleicos monocatenarios, ya sea RNA o DNA, que se pueden unir a secuencias diana de mRNA (con sentido) de WUP o de DNA (antisentido) de WUP. Los oligonucleótidos con sentido o antisentido pueden comprender un fragmento de la región codificadora de DNA de WUP de al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente desde aproximadamente 14 nucleótidos hasta 30 nucleótidos. En general, las moléculas de RNA o DNA antisentido pueden comprender al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 bases de longitud o más. Entre otros autores, (Stein y Cohen, 1988; van der Krol y col., 1988b) describen métodos para preparar derivados de oligonucleótidos con sentido o antisentido a partir de una secuencia de cDNA determinada.

Las modificaciones de oligonucleótidos con sentido y antisentido pueden aumentar su eficacia. Los enlaces azúcar-fosfodiéster modificados u otras uniones con azúcares (documento WO 91/06629, 1991), aumentan la estabilidad *in vivo* confiriendo resistencia a nucleasas endógenas sin alterar la especificidad de unión a las secuencias diana. Otras modificaciones pueden aumentar las afinidades de los oligonucleótidos por sus dianas, tales como las modificaciones con restos orgánicos unidos covalentemente (documento WO 90/10448, 1990) o con poli(L)-lisina. Otras uniones modifican las especificidades de unión de los oligonucleótidos por sus dianas, e incluyen los complejos con metales o agentes intercalantes (p. ej., elipticina) y agentes alquilantes.

ES 2 298 226 T3

Para introducir oligonucleótidos con sentido o antisentido en las células diana (células que contienen la secuencia del ácido nucleico diana), se puede usar cualquiera de los métodos de transferencia génica y son muy conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de métodos de transferencia génica incluyen 1) métodos biológicos, tales como el uso de vectores de transferencia génica similares al virus de Epstein-Barr o la conjugación del DNA exógeno a una molécula de unión a ligando (documento WO 91/04753, 1991), 2) métodos físicos, tales como electroporación, y 3) métodos químicos, tal como la precipitación con CaPO_4 y los complejos oligonucleótido-lípido (documento WO 90/10448, 1990).

Las expresiones “célula hospedadora” y “célula hospedadora recombinante” se usan indistintamente. Esas expresiones se refieren no solamente a una célula concreta en cuestión sino también a la progenie o a la progenie potencial de esa célula. Debido a que ciertas modificaciones se pueden producir en las sucesivas generaciones debido o bien a mutación o bien a influencias medioambientales, esa progenie puede no ser de hecho idéntica a la célula parental, pero aún así está incluida en el alcance de la expresión.

Los métodos de transfección de células eucariotas y de transformación de células procariotas son muy conocidos en la técnica. La elección de la célula hospedadora impondrá la técnica preferida para introducir el ácido nucleico de interés. La Tabla E, que no tiene intención de ser limitativa, resume muchos de los métodos conocidos en la técnica. La introducción de ácidos nucleicos en un organismo se puede también realizar con técnicas *ex vivo* que usan un método de transfección *in vitro*, así como técnicas genéticas establecidas, en caso de haberlas, para el organismo particular.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 298 226 T3

TABLA E

Métodos para introducir un ácido nucleico en las células

Células	Métodos	Referencias bibliográficas	Notas
Procariotas (bacterias)	Cloruro cálcico	(Cohen y col., 1972; Hanahan, 1983; Mandel y Higa, 1970)	
	Electroporación	(Shigekawa y Dower, 1988)	
Eucariotas			
Células de mamífero	Transfección con fosfato cálcico	Disolución salina tamponada con ácido N-(2-Hidroxietil) piperazín-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES) (Chen y Okayama, 1988; Graham y van der Eb, 1973; Wigler et al., 1978). Disolución tamponada con BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico) Ishiura y col., 1982)	Las células se pueden "asustar" con glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO) para aumentar eficiencia de la transfección (Ausubel y col., 1987).
	Transfección con Dietilaminoetil (DEAE)-Dextrano	(Fujita y col., 1986; Lopata y col., 1984; Selden y col., 1986)	Más útil para transfecciones transitorias, pero no para transfecciones estables. Se puede usar Cloroquina para aumentar la eficiencia.
	Electroporación	(Neumann y col., 1982; Potter, 1988; Potter y col., 1984; Wong y Neumann, 1982)	Especialmente útil en el caso de linfocitos difíciles de transfectar.
	Transfección con reactivo de lípidos catiónicos	(Elroy-Stein y Moss, 1990; Felgner y col., 1987; Rose y col., 1991; Whitt y Rose al., 1991; Whitt y col., 1990)	Aplicable a transfecciones tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> .
	Retrovítica	Producción ilustrada en (Cepko y col., 1984; Miller y Buttimore, 1986; Pear y col., 1993)	Procedimiento largo, muchas líneas de empaquetamiento disponibles en la ATCC. Aplicable a transfecciones tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> .

ES 2 298 226 T3

Células	Métodos	Referencias bibliográficas	Notas
	Polibreno	(Chaney y col., 1986; Kawai y Nishizawa, 1984)	
	Microinyección	(Capecchi, 1980)	Se puede usar para establecer líneas celulares que portan copias integradas de secuencias de DNA de WUP.
	Fusión de protoplastos	(Rassoulzadegan y col., 1982; Sandri-Goldin y col., 1981; Schaffner, 1980)	
Células de insectos (<i>in vitro</i>)	Sistemas en baculovirus	(Luckow, 1991; Miller, 1988; O'Reilly y col., 1992)	Útil para la producción <i>in vitro</i> de la Producción de modificaciones eucarioticeukarioticas.
Levaduras	Electroporación	(Becker y Guarente, 1991)	
	Acetato de litio	(Gietz y col., 1998; Ito y col., 1983)	
	Fusión de esferoplastos	(Beggs, 1978; Hinnen y col., 1978)	Laborioso, puede producir aneuploidía
Células vegetales (referencia general: (Hansen y Wright, 1999))	Transformación en <i>Agrobacterium</i>	(Bechtold y Pelletier, 1998; Escudero y Hohn, 1997; Hansen y Chilton, 1999; Touraev y col., 1997)	
	Biolística (microproyectiles)	(Finer y col., 1999; Hansen y Chilton, 1999; Shillito, 1999)	
	Electroporación (protoplastos)	(Fromm y col., 1985; Oulee y col., 1986; Rhodes y col., 1988; Saunders y col., 1989). Se puede combinar con liposomas Trick y col., 1997)	
	Tratamiento con polietilenglicol (PEG)	(Shillito, 1999)	
	Liposomas	Se puede combinar con la electroporación (Trick y col., 1997)	
	Microinyección <i>in planta</i>	(Leduc y col., 1996; Zhou y col., 1983)	
	Empapamiento de semillas	(Trick y col., 1997)	
	Rayo láser	(Hoffman, 1996)	
	Triquititas de carburo de silicio	(Thompson and al., 1995)	

Los vectores suelen usar un marcador de selección para facilitar la identificación de las células que han incorporado el vector. En la técnica se conocen bien muchos marcadores de selección para uso con procariotas, normalmente genes de resistencia a antibióticos o para uso de mutantes autótrofos y auxótrofos. La Tabla F lista marcadores de selección que se suelen usar para transfectar células de mamíferos.

TABLA F

Marcadores de selección útiles para transfectar células eucariotas

Marcador de selección	Selección	Acción	Referencia bibliográfica
Adenosina desaminasa (ADA)	Los medios incluyen 9- β -D-xilofuranosil-adenina (Xyl-A)	Conversión de Xyl-A en Xyl-ATP, que se incorpora en los ácidos nucleicos destruyendo las células. ADA desintoxica	(Kaufman y col., 1986)
Dihidrofolato-reductasa (DHFR)	Metotrexato (MTX) y suero dializado (medio libre de purinas)	MTX inhibidor competitivo de la DHFR. En ausencia de purinas exógenas, las células requieren DHFR, enzima necesaria para la biosíntesis de las purinas	(Simonsen y Levinson, 1983)
Aminoglicosidasa fosfotransferasa ("APH", "neo", "G418")	G418,	G418, aminoglicósido destoxificado por APH, interfiere con la función ribosómica y por consiguiente con la traducción	(Southern y Berg, 1982)
Higromicina-B-fosfotransferase (HPH)	Higromicina-B	La higromicina-B, un aminociclitol destoxificado por HPH, altera la traslocación de la proteína y promueve la traducción errónea	(Palmer y col., 1987)

Timidina-quinasa Selección inversa (TK)	Selección hacia adelante (TK+): El medio (HAT) incorpora aminop- terina	Hygromycin-B, an amino- cyclitol detoxified by HPH, disrupts protein translocation and promotes mistransla- tion.	(Palmer y col., 1987)
	(TK-): El medio incorpora 5- bromodesoxiuridine (BrdU).	Forward: La Aminopterin fuerza a las células a sintetizar dTTP a partir de timidina, ruta que requiere una ruta que requiere TK	(Littlefield 1964)

Una célula hospedadora de la invención, tal como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo, se puede usar para producir WUP usando las células hospedadoras de la invención. En una de las realizaciones, el método comprende cultivar la célula hospedadora de la invención (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica WUP) en un medio adecuado, de manera que se produce WUP. En otra de las realizaciones, el método comprende además aislar WUP a partir del medio o de la célula hospedadora.

Animales transgénicos que portan WUP

Los animales transgénicos son útiles para estudiar la función y/o la actividad de WUP y para identificar y/o evaluar moduladores de la actividad de WUP. "Animales transgénicos" son animales no humanos, preferiblemente mamíferos, más preferiblemente roedores tales como ratas o ratones, en los que una o más de sus células incluyen un transgén. Otros animales transgénicos incluyen primates, ovejas, perros, vacas, cabras, pollos, anfibios, etc. Un "transgén" es un DNA exógeno que se integra en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro. Los transgenes preferiblemente dirigen la expresión de un producto génico codificado en uno o en más de los tipos de células o de los tejidos del animal transgénico, con el fin de impedir la expresión de un producto génico codificado de manera natural en uno o más de los tipos de células o de los tejidos (animal transgénico "knockout") (animal en el que se ha eliminado la función de un gen), o de servir como marcador o indicador de una integración, localización cromosómica o región de recombinación (p. ej., ratones *cre/loxP*). Un "animal recombinante homólogo" es un animal no humano, tal como un roedor, en el que el WUP endógeno se ha alterado con una molécula de DNA exógeno que se recombina de manera homóloga con el WUP endógeno en una célula (p. ej. una célula embrionaria) antes del desarrollo del animal. Las células hospedadoras que contienen WUP exógeno se pueden usar para producir animales transgénicos no humanos, tales como oocitos fertilizados o células troncales embrionarias en las que se han introducido secuencias codificadoras de WUP. Esas células hospedadoras se pueden usar luego para crear animales transgénicos no humanos o animales recombinantes homólogos.

1. Estrategias para la producción de animales transgénicos

Un animal transgénico se puede crear introduciendo WUP en el pronúcleo masculino de un oocito fertilizado (p. ej., mediante microinyección, infección retroviral) y permitiendo que el oocito se desarrolle en un animal hembra adoptiva pseudopreñada (pffa) (del inglés, "*pseudopregnant female foster animal*"). Las secuencias de cDNA de WUP (SEQ ID NO: 5) se pueden introducir en forma de transgén en el genoma de un animal no humano. Como alternativa, un homólogo de WUP, tal como la variante de WUP presente en la naturaleza (SEQ ID NO: 7), se puede usar como transgén. También se pueden incluir secuencias intrónicas y señales de poliadenilación en el transgén para aumentar la expresión del transgén. Secuencias reguladoras específicas de tejido se pueden unir operativamente al transgén WUP para dirigir la expresión del transgén WUP en células particulares. Los métodos para generar animales transgénicos a través de la manipulación y microinyección de embriones, en particular de animales tales como ratones, se han convertido en métodos convencionales en la técnica, p. ej. (Evans y col., Patente de EE. UU. Núm. 4.870.009, 1989; Hogan, 0879693843, 1994; Leder y Stewart, Patente de EE. UU. Núm. 4.736.866, 1988; Wagner y Hoppe, Patente de EE. UU. Núm. 4.873.191, 1989). Se pueden preparar otros animales transgénicos distintos de ratones mediante métodos similares. Un animal transgénico fundador, que se puede usar para engendrar animales transgénicos adicionales, se puede identificar por la presencia del transgén en su genoma y/o por la expresión del mRNA del transgén en tejidos o células de esos animales. Los animales transgénicos (p. ej., que portan WUP) se pueden cruzar con otros animales transgénicos que portan otros transgenes.

2. Vectores para usar en la producción de animales transgénicos

Para crear un animal recombinante homólogo, se usa un vector que contiene al menos una porción de WUP en la que se ha introducido una delección, adición o sustitución para así modificar, p. ej., alterar funcionalmente, a WUP. En una de las estrategias, un vector *knockout* (que lleva anulada la función de un gen), altera funcionalmente al gen WUP endógeno tras la recombinación homóloga y a causa de ello se expresa una proteína WUP no funcional, en caso de que se exprese.

Como alternativa, el vector se puede diseñar de manera que, tras la recombinación homóloga, el WUP endógeno se muta o se modifica de alguna otra manera aunque sigue codificando la función de la proteína (p. ej., la región reguladora aguas arriba se puede modificar para así modificar la expresión de WUP endógeno). En este tipo de vector de recombinación homóloga, la porción modificada del WUP está flanqueada en sus terminaciones 5' y 3' por ácido nucleico adicional del WUP para permitir que tenga lugar una recombinación homóloga entre el WUP exógeno portado por el vector y un WUP endógeno presente en una célula troncal embrionaria. El ácido nucleico de WUP adicional flanqueante es suficiente para que se produzca una recombinación homóloga con el WUP endógeno. Típicamente, en el vector están incluidas varias kilobases de DNA flanqueante (tanto en la terminación 5' como en la 3') (Thomas y Capecchi, 1987). El vector se introduce luego en una línea de células troncales embrionarias (p. ej., mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el WUP introducido se ha recombinado de manera homóloga con el WUP endógeno (Li y col., 1992).

3. Introducción de células que portan un transgén WUP durante el desarrollo embrionario

Las células seleccionadas se inyectan luego en un blastocisto de un animal (p. ej., un ratón) para formar quimeras por agregación (Bradley, 1987). Un embrión quimérico se puede después implantar en un pffa adecuado y el embrión se lleva a término. La progenie que alberga el DNA recombinado de manera homóloga en sus células germinales se puede usar para engendrar en los que todas las células del animal contienen el DNA recombinado de manera homóloga por transmisión del transgén en la línea germinal. Se han descrito métodos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos (Berns y col., documento WO 93/04169, 1993; Bradley, 1991; Kucherlapati y col., documento WO 91/01140, 1991; Le Mouellie y Brullet, documento WO 90/11354, 1990).

Como alternativa, se pueden producir animales transgénicos que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del transgén. Un ejemplo de un sistema de recombinasa *cre/loxP* del bacteriófago P1 (Lakso y col., 1992). Otro sistema de recombinasa es el sistema de recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman y col., 1991). Si para regular la expresión del transgén se usa un sistema de recombinasa *cre/loxP*, se requieren animales que contengan transgenes que codifiquen tanto la recombinasa Cre como una proteína seleccionada. Esos animales se pueden producir como animales “doble” transgénicos, cruzando un animal que contiene un transgén que codifica una proteína seleccionada con otro animal que contiene un transgén que codifica una recombinasa.

También se pueden producir clones de animales transgénicos (Wilmot y col., 1997). Expuesto de manera breve, se puede aislar una célula procedente de un animal transgénico y se puede inducir para que salga del ciclo de crecimiento y entre en la fase G0. La célula quiescente se puede fusionar luego con un oocito al que se le ha extraído el núcleo y procedente de un animal de la misma especie de la que se ha aislado la célula quiescente. El oocito reconstruido se cultiva luego para que se desarrolle en una mórula o blastocito y después se transfiere a un pffa. La descendencia nacida de este animal hembra adoptiva será un clon del animal transgénico “parental”.

Composiciones farmacéuticas

Las moléculas de ácido nucleico WUP, los polipéptidos WUP y los anticuerpos anti-WUP (compuestos activos) de la invención, y sus derivados, análogos y homólogos, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas. Esas composiciones típicamente comprenden la molécula de ácido nucleico, la proteína o el anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye uno cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardadores de la absorción, y vehículos similares, compatibles con la administración farmacéutica (Gennaro, 2000). Ejemplos preferidos de esos vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, disolución salina, disoluciones de Ringer, disolución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles. Excepto cuando un medio o agente convencional es incompatible con un compuesto activo, se contempla el uso de estas composiciones. En las composiciones también se pueden incorporar compuestos activos complementarios.

1. Consideraciones generales

Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con la vía de administración que se piense utilizar, que incluye la administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes encargados del

ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede ir contenida en ampollas, jeringas desechables o viales multidosis fabricados de vidrio o plástico.

5 2. *Formulaciones inyectables*

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen disoluciones (cuando son solubles en agua) o suspensiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En el caso de la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen disolución fisiológica salina, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida para ser administrada usando una jeringa. Esas composiciones deben ser estables durante su fabricación y almacenaje y se deben preservar de la contaminación producida por microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (tal como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, usando un revestimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y usando tensioactivos. Diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal, pueden contener contaminación microbiana. En la composición se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol y sorbitol, y cloruro sódico. Las composiciones que retardan la absorción incluyen agentes tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (p. ej., un WUP o un anticuerpo anti-WUP) en la cantidad requerida, en un disolvente apropiado junto con un solo componente o con una mezcla de componentes según convenga, seguido de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico, y los demás componentes requeridos según se ha expuesto. Los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles y los métodos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización, que producen un polvo que contiene el componente activo y todos los componentes deseados procedentes de disoluciones estériles.

30 3. *Composiciones para administración oral*

Las composiciones para administración oral generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden ir contenidas en cápsulas de gelatina o comprimidas en forma de comprimido. Para los fines de la administración terapéutica por vía oral, el compuesto activo puede estar incorporar junto con excipientes y se puede usar en forma de comprimidos, tabletas o cápsulas. Las composiciones para administración oral también se pueden preparar utilizando un vehículo fluido para su uso en forma de colutorio, en el caso en el que el compuesto presente en el vehículo fluido se aplica por vía oral. Se pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, tabletas y formulaciones similares, pueden contener cualquiera de los siguientes componentes o compuestos de naturaleza similar: un agente aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, PRIMOGEL o almidón de maíz; un agente lubricante tal como estearato de magnesio o STEROTES; un agente deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

45 4. *Composiciones para inhalación*

Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de pulverización en aerosol desde un nebulizador o desde un recipiente presurizado que contiene un propelente adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono.

50 5. *Administración por vía sistémica*

Una administración por vía sistémica puede ser también una administración transmucosal o una administración transdérmica. Para la administración transmucosal o transdérmica se seleccionan agentes penetrantes que son capaces de penetrar por la barrera(s) diana. Los penetrantes transmucosales incluyen detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Para la administración transmucosal se pueden usar pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en forma de ungüentos, bálsamos, geles o cremas.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (p. ej., con bases tales como la manteca de cacao y otros glicéridos) o en forma de enemas de retención para el suministro por vía rectal.

6. *Vehículos*

Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegen el compuesto frente a una rápida eliminación por el organismo, tal como en forma de formulaciones de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Estos materiales se pueden obtener comercialmente procedentes de ALZA Corporation (Mountain View, CA) y NOVA Pharmaceuticals,

Inc. (Lake Elsinore, CA), o pueden ser preparados por un experto en la técnica. Las suspensiones liposómicas también se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas suspensiones se pueden preparar conforme a métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como en (Eppstein y col., Patente de EE. UU. Núm. 4.522.811, 1985).

7. Dosificación unitaria

Se pueden preparar formulaciones para administración oral o composiciones para administración parenteral en dosificaciones unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria se refiere a unidades físicamente discretas ajustadas como dosificaciones individuales para el individuo que se ha de tratar, que contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto activo en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones de las formas de dosificación unitarias de la invención vienen impuestas por, y dependen directamente de, las características exclusivas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto deseado, y de las limitaciones inherentes a la elaboración de la composición del compuesto activo.

8. Composiciones para terapia génica

Se pueden insertar moléculas de ácido nucleico en vectores para su uso como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden ser adecuados para suministrarlos a un individuo mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (Nabel y Nabel, Patente de EE. UU. Núm: 5.328.470, 1994), o mediante inyección estereotáctica (Chen y col., 1994). La preparación farmacéutica de un vector de terapia génica puede incluir un diluyente aceptable o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está embebido el vehículo de suministro génico. Como alternativa, en los casos en los que el vector completo de suministro génico se puede producir en forma intacta en las células recombinantes, p. ej., vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro génico.

9. Dosificación

Las composiciones farmacéuticas y los métodos pueden comprender además otros compuestos terapéuticamente activos según aquí se indica, que normalmente se aplican en el tratamiento de las afecciones patológicas anteriormente mencionadas.

En el uso para el tratamiento o prevención de afecciones que requieren una modulación por WUP, un nivel de dosificación adecuado generalmente será aproximadamente desde 0,01 mg hasta 500 mg por kg de peso corporal del paciente y por día, que se pueden administrar en dosis individuales o múltiples. Preferiblemente, el nivel de dosificación será desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 250 mg/kg y por día; más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 100 mg/kg y por día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser desde aproximadamente 0,01 mg hasta 250 mg/kg y por día, desde aproximadamente 0,05 mg hasta 100 mg/kg y por día, o desde aproximadamente 0,1 mg hasta 50 mg/kg y por día. Dentro de este intervalo, la dosificación puede ser desde 0,05 mg hasta 0,5 mg/kg y por día, desde 0,5 hasta 5 mg/kg y por día o desde 5 mg hasta 50 mg/kg y por día. En el caso de la administración oral, las composiciones se proporcionan preferiblemente en forma de comprimidos que contienen desde 1,0 miligramos hasta 1.000 miligramos del componente activo, concretamente 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 y 1.000,0 miligramos del componente activo, para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se ha de tratar. Los compuestos se pueden administrar con una pauta de 1 a 4 veces al día, preferiblemente de una o dos veces al día.

Sin embargo, se entenderá que el nivel específico de la dosis y la frecuencia de dosificación para un paciente concreto pueden variar y dependerán de diversos factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, modo y tiempo de la administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, gravedad de la afección particular y del hospedador que experimenta el tratamiento.

10. Kits para las composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden estar incluidas en un *kit*, recipiente, envase o dosificador junto con instrucciones para su administración. Cuando se suministran en forma de un *kit*, los diferentes componentes de la composición pueden estar empaquetados en recipientes distintos y mezclarse inmediatamente antes de su uso. Este empaquetamiento de los componentes por separado puede permitir un almacenamiento de larga duración sin pérdida de las funciones de los componentes activos.

Los *kits* pueden incluir también reactivos en recipientes separados que facilitan la ejecución de un ensayo específico tal como los ensayos de diagnóstico o de tipificación de tejidos. Por ejemplo, para controles internos se pueden suministrar moldes y cebadores adecuados de DNA de WUP.

(a) Recipientes o contenedores

Los reactivos incluidos en los *kits* se pueden suministrar en recipientes de cualquier tipo con tal que se preserve la vida de los diferentes componentes y que no sean adsorbidos ni alterados por los materiales del recipiente. Por ejem-

plero, ampollas de vidrio selladas pueden contener luciferasa liofilizada o un tampón que ha sido envasado en atmósfera de un gas neutro, no reactivo, tal como nitrógeno. Las ampollas pueden consistir en cualquier material adecuado, tal como vidrio, polímeros orgánicos tales como policarbonato, poliestireno, etc., materiales cerámicos, metales o cualquier otro material habitualmente utilizado para contener reactivos. Otros ejemplos de recipientes adecuados incluyen frascos simples que se pueden fabricar a partir de sustancias similares tales como ampollas, y envoltorios que pueden consistir en interiores revestidos de papel laminado tal como de aluminio o una aleación. Otros recipientes incluyen tubos de ensayo, viales, matraces, frascos, jeringas o recipientes similares. Los recipientes también pueden llevar una abertura estéril de acceso, tal como un frasco que lleva un tapón que puede ser atravesado por una aguja de inyección hipodérmica. Otros recipientes pueden tener dos compartimentos que están separados por una membrana fácilmente extraíble y que tras su retirada permite que los componentes se mezclen. Las membranas extraíbles pueden ser de vidrio, plástico, caucho, etc.

(b) *Materiales con las instrucciones*

Los *kits* se pueden también suministrar con materiales que contienen las instrucciones. Las instrucciones pueden estar impresas en papel o en otro sustrato y/o se pueden suministrar en forma de un medio de lectura electrónica, tal como un disquete, CD-ROM, DVD-ROM, disco Zip, cinta de video, cinta de audio, etc. Las instrucciones detalladas pueden no estar físicamente asociadas con el *kit*; en vez de ello, se puede dirigir al usuario a una página web de Internet, especificada por el fabricante o el distribuidor del *kit*, o se puede suministrar en un correo electrónico.

Métodos de escrutinio y detección

Las moléculas de ácido nucleico aislados se pueden usar para expresar WUP (p. ej., a través de un vector de expresión recombinante en una célula hospedadora para aplicaciones en terapia génica), para detectar el mRNA de WUP (p. ej., en una muestra biológica), o para detectar una lesión genética en un WUP, y para modular la actividad de WUP, según se describe más adelante. Además, los polipéptidos WUP se pueden usar para realizar el escrutinio de fármacos o compuestos que modulan la actividad o la expresión de WUP así como para la fabricación de un medicamento para tratar trastornos caracterizados por una producción insuficiente o excesiva de WUP o por una producción de formas de WUP que presentan una actividad disminuida o aberrante en comparación con la proteína WUP de tipo salvaje, o para modular la función biológica en la que WUP está implicado. Además, los anticuerpos anti-WUP se pueden usar para detectar y aislar WUP y para modular la actividad de WUP.

1. Ensayos de escrutinio

Un ensayo de escrutinio puede identificar modalidades, es decir, compuestos o agentes candidatos o compuestos o agentes a ensayar (p. ej., péptidos, compuestos peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos), alimentos, sus combinaciones, etc., que producen un efecto sobre WUP, un efecto estimulador o inhibidor, que incluye un efecto sobre la traducción, transcripción, actividad o copias del gen en las células. Los ensayos para determinar compuestos que aumentan o disminuyen la actividad de WUP son convenientes. Un compuesto puede modular la actividad de WUP teniendo efecto sobre: (1) el número de copias del gen que hay en la célula (compuestos amplificadores y compuestos desamplificadores); (2) aumentando o disminuyendo la transcripción del WUP (reguladores de la transcripción por incremento y reguladores de la transcripción por disminución); (3) aumentando o disminuyendo la traducción del mRNA de WUP en proteína (reguladores de la traducción por incremento y reguladores de la traducción por disminución); o (4) aumentando o disminuyendo la actividad de propio WUP (agonistas y antagonistas).

(a) *Efectos de compuestos*

Para identificar compuestos que producen efecto sobre WUP en los niveles de DNA, RNA y proteína, las células u organismos se ponen en contacto con un compuesto candidato y se valora el correspondiente cambio en el DNA, RNA o proteína de WUP (Ausubel y col., 1987). En el caso de los compuestos amplificadores y desamplificadores de DNA, se mide la cantidad de DNA de WUP, y en el caso de los compuestos que son reguladores de la transcripción por incremento y reguladores de la transcripción por disminución se determina la cantidad del mRNA de WUP; en el caso de los compuestos que son reguladores de la traducción por incremento y reguladores de la traducción por disminución se mide la cantidad de polipéptidos WUP. Los compuestos que son agonistas o antagonistas se pueden identificar poniendo las células u organismos en contacto con el compuesto.

En una de las realizaciones, existen disponibles muchos ensayos para hacer escrutinios de compuestos candidatos o de compuestos a ensayar que se unen a, o que modulan, la actividad de WUP o de uno de sus polipéptidos o de una de sus porciones biológicamente activas. Los compuestos a ensayar se pueden obtener usando cualquiera de las numerosas estrategias de los métodos que utilizan librerías combinatorias, que incluyen: librerías biológicas; librerías en fase sólida o en fase de disolución, en paralelo y espacialmente accesibles; métodos de síntesis de librerías que requieren desconvolución; método que utiliza una librería de tipo “una bolita-un compuesto” y métodos que usan selección mediante cromatografía de afinidad en librerías sintéticas. La estrategia basada en librerías biológicas está limitada a péptidos, mientras que las otras cuatro estrategias abarcan librerías de compuestos de tipo péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas (Lam, 1997).

(b) *Moléculas pequeñas*

Una “molécula pequeña” se refiere a una composición que tiene un peso molecular menor que aproximadamente 5 kDa y más preferiblemente menor que aproximadamente 4 kDa y muy preferiblemente menor que 0,6 kDa. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, compuestos peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos y otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Las librerías de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos de hongos, bacterias o algas, son conocidas en la técnica y se pueden someter a escrutinio utilizando cualquiera de los ensayos de la invención. Ejemplos de métodos para la síntesis de librerías moleculares se pueden encontrar en: (Carell y col., 1994a; Carell y col., 1994b; Cho y col., 1993; DeWitt y col., 1993; Gallop y col., 1994; Zuckermann y col., 1994).

Las librerías de compuestos se pueden presentar en disolución (Houghten y col., 1992) o sobre bolitas (Lam y col., 1991), sobre *chips* (Fodor y col., 1993), en bacterias, esporas (Ladner y col., Patente de EE. UU. Núm: 5.223.409, 1993), plásmidos (Cull y col., 1992) o fagos (Cwirla y col., 1990; Devlin y col., 1990; Felici y col., 1991; Ladner y col., Patente de EE. UU. Núm: 5.223.409, 1993; Scott y Smith, 1990). Un ensayo libre de células comprende poner en contacto WUP, o uno de sus fragmentos biológicamente activo, con un compuesto conocido que se une a WUP para constituir una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto a ensayar, y determinar la capacidad del compuesto a ensayar para interactuar con WUP, en el que determinar la capacidad del compuesto a ensayar para interactuar con WUP comprende determinar la capacidad del WUP para unirse preferentemente a, o para modular la actividad de, una molécula WUP diana.

(c) *Ensayos libres de células*

Los ensayos libres de células de la invención se pueden usar tanto con la forma de WUP soluble como con la forma de WUP unida a membrana. En el caso de los ensayos libres de células que comprenden la forma unida a membrana, se utiliza un agente solubilizante para mantener el WUP en disolución. Ejemplos de esos agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tal como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, TRITON® X-100 y otros detergentes de la serie TRITON®, THESIT®, Isotridecylpoli(etileneglicol-éter)_n, sulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano, sulfonato de 3-(3-colamidopropil)dimetilaminiol-1-propano (CHAPS), o sulfonato de 3-(3-colamidopropil)dimetilaminiol-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO).

(d) *Inmovilización de las moléculas diana para facilitar los escrutinios*

En más de una de las realizaciones de los métodos de ensayo, la inmovilización de WUP o de sus moléculas pareja puede facilitar la separación entre las formas que están formando complejos y las formas que no están formando complejos, de una o de ambas de las proteínas, así como adaptar ensayos de alta capacidad de procesamiento. La unión de un compuesto a ensayar a WUP o la interacción de WUP con una molécula diana, en presencia y en ausencia de un compuesto candidato, se puede llevar a cabo en cualquier recipiente adecuado para contener los reaccionantes, tal como placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. Se puede proporcionar una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas de las proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, proteínas de fusión GST-WUP o proteínas de fusión GST-molécula diana se pueden adsorber sobre bolitas de *Sepharose*-glutathione (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) o sobre placas de microtitulación que llevan unido glutathione formando un derivado, que se mezclan después con el compuesto a ensayar, o con el compuesto a ensayar y, o la proteína diana no adsorbida o WUP, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación de complejos (p. ej., en condiciones fisiológicas con respecto a la concentración de sales y al pH). Después de la incubación, las bolitas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para retirar todos los componentes no unidos, la matriz se inmoviliza en el caso de las bolitas, y el complejo se determina directamente o indirectamente, por ejemplo, según se ha descrito. Como alternativa, los complejos se pueden disociar de la matriz y el nivel de unión a WUP o la actividad de WUP se pueden determinar usando técnicas estándar.

En los ensayos de escrutinio también se pueden usar otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices. Se puede inmovilizar WUP o su molécula diana usando sistemas de biotina-avidina o biotina-estreptavidina. La biotinilación se puede realizar usando muchos reactivos, tales como biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida; PIERCE Chemicals, Rockford, IL), y se pueden inmovilizar en los pocillos de placas de 96 pocillos revestidos con estreptavidina (PIERCE Chemical). Como alternativa, anticuerpos que reaccionan con WUP o con sus moléculas diana, pero que no interfieren en la unión del WUP a su molécula diana, se pueden unir en forma de derivado a los pocillos de la placa, y a la molécula diana no unida o al WUP atrapado en los pocillos mediante conjugación con el anticuerpo. Los métodos para detectar esos complejos, además de los descritos para detectar los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de complejos usando anticuerpos que reaccionan con WUP o con su molécula diana, así como ensayos ligados a enzimas que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada con el WUP o con la molécula diana.

(e) *Escrutinios para identificar moduladores*

Se pueden identificar moduladores de la expresión de WUP con un método en el que una célula se pone en contacto con un compuesto candidato y se determina la expresión de mRNA de WUP o de proteína WUP en la célula. El nivel de expresión de mRNA de WUP o de proteína WUP en presencia del compuesto candidato se compara con

los niveles de mRNA de *WUP* o de proteína *WUP* en ausencia del compuesto candidato. El compuesto candidato se puede luego identificar como modulador de la expresión de mRNA de *WUP* o de proteína *WUP* sobre la base de esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de mRNA de *WUP* o de proteína *WUP* es mayor (es decir, de manera estadísticamente significativa) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se
 5 identifica como estimulador de la expresión de mRNA de *WUP* o de proteína *WUP*. Como alternativa, cuando la expresión de mRNA de *WUP* o de proteína *WUP* es menor (de manera estadísticamente significativa) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como inhibidor de la expresión de mRNA de *WUP* o de proteína *WUP*. El nivel de expresión de mRNA de *WUP* o de proteína *WUP* en las células se
 10 puede determinar mediante métodos descritos para detectar el mRNA de *WUP* o proteína *WUP*.

(i) Ensayos híbridos

WUP se puede usar como proteína “cebo” en ensayos de doble híbrido o de “triple híbrido” (Bartel y col., 1993; Brent y col., Documento WO 94/10300, 1994; Iwabuchi y col., 1993; Madura y col., 1993; Saifer y col., Patente de EE.
 15 UU. Núm: 5.283.317, 1994; Zervos y col., 1993) para identificar otras proteínas que se unen a, o que interaccionan con, *WUP* y que modulan la actividad de *WUP*. Es también probable que esas *WUP*-bps estén implicadas en la propagación de señales producidas por el *WUP*, por ejemplo, como elementos aguas arriba o aguas abajo de una ruta de *WUP*.

El sistema de doble híbrido se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que
 20 consiste en la existencia de dominios de unión a DNA y de dominios de activación separables. Brevemente expuesto, el ensayo utiliza dos construcciones de DNA diferentes. En una de las construcciones, el gen que codifica *WUP* está fusionado a un gen que codifica el dominio de unión a DNA de un factor de transcripción conocido (p. ej., *GAL4*). La otra construcción, una secuencia de DNA procedente de una genoteca de secuencias de DNA, que codifica una proteína no identificada (“presa” o “muestra”) está fusionada a un gen que codifica el dominio de activación del
 25 factor de transcripción conocido. Si la proteína “cebo” y la proteína “presa” son capaces de interaccionar *in vivo*, formando un complejo dependiente de *WUP*, los dominios de unión a DNA y de activación del factor de transcripción se acercan quedando muy próximos. Esta proximidad permite la transcripción de un gen de reporte (p. ej., *LacZ*) que está operativamente ligado a un sitio de regulación de la transcripción que responde al factor de transcripción. La expresión del gen de reporte puede ser detectada y las colonias celulares que contienen el factor de transcripción
 30 funcional se pueden aislar y se pueden usar para obtener el gen clonado que codifica la proteína que interacciona con *WUP*.

Se pueden identificar nuevos agentes mediante los ensayos de escrutinio anteriormente mencionados y se pueden
 35 usar para tratamientos como los aquí descritos.

2. Ensayos de detección

Las porciones o los fragmentos de secuencias de cDNA de *WUP* aquí identificadas (y las secuencias completas
 40 del gen *WUP*) son útiles por sí mismas. A modo de ejemplo no limitativo, estas secuencias se pueden usar para: (1) identificar a un individuo a partir de una muestra biológica minúscula (tipificación de tejidos); y (2) ayudar en la identificación forense de una muestra biológica.

(a) Tipificación de tejidos

Las secuencias de *WUP* de la invención se pueden usar para identificar individuos a partir de muestras biológicas
 45 minúsculas. En esta técnica, el DNA genómico de un individuo se digiere con una o más enzimas de restricción y se hibrida con sondas en una transferencia Southern para dar bandas únicas. Las secuencias de la invención son útiles como marcadores de DNA adicionales de “polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción” (RFLP; (Smulson y col., Patente de EE. UU. Núm: 5.272.057, 1993)).

Además, las secuencias de *WUP* se pueden usar para determinar la secuencia real de DNA, base por base, de las
 50 porciones diana del genoma de un individuo. Las secuencias de *WUP* se pueden usar para preparar dos cebadores para PCR a partir de las terminaciones 5' y 3' de las secuencias, que se pueden usar para amplificar las secuencias correspondientes procedentes del genoma de un individuo y para secuenciar después el fragmento amplificado.

Paneles de las secuencias de DNA correspondientes procedentes de individuos pueden proporcionar identificacio-
 55 nes únicas e individuales, ya que cada individuo tendrá un conjunto único de esas secuencias de DNA debido a las diferencias alélicas. Las secuencias de la invención se pueden usar para obtener esas secuencias de identificación procedentes de individuos y de tejidos. Las secuencias de *WUP* de la invención representan de manera unívoca porciones
 60 del genoma de un individuo. La variación alélica se produce en cierta medida en las regiones codificadoras de estas secuencias, y en mayor medida en las regiones no codificadoras. La variación alélica entre seres humanos individuales se produce con una frecuencia de aproximadamente una vez cada 500 bases. Gran parte de la variación alélica es debida a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (del inglés, “*Single Nucleotide Polymorphisms*”), que incluyen los RFLP.

Cada una de las secuencias que aquí se describen, se pueden usar, en cierta medida, como un estándar frente al
 65 que se puede comparar el DNA de un individuo con el fin de su identificación. Debido a que la mayor cantidad de polimorfismos se produce en las regiones no codificadoras, se necesita un número menor de secuencias para diferenciar

a los individuos. Las secuencias no codificadoras pueden identificar positivamente a los individuos con un panel de 10 a 1.000 cebadores que cada uno de los cuales produce una secuencia no codificadora amplificada de 100 bases. Si se usan las secuencias codificadoras pronosticadas, tales como las de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, un número de cebadores más adecuado para una identificación positiva de los individuos sería de 500 - 2.000.

Medicina predictiva

La invención también concierne al campo de la medicina predictiva en el que se usan ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, la farmacogenómica y estudios clínicos de control, con fines de pronóstico (predictivos) para tratar a un individuo de manera profiláctica. De acuerdo con esto, uno de los aspectos de la invención se refiere a ensayos de diagnóstico de determinación de WUP y/o de la expresión de un ácido nucleico WUP así como de la actividad de WUP, en el contexto de una muestra biológica (p. ej., sangre, suero, células, tejido), para determinar si un individuo padece una enfermedad o un trastorno, o si está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con una expresión o actividad aberrantes de WUP, incluyendo cáncer. La invención también proporciona ensayos de pronóstico (predictivos) para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con WUP, con la expresión de un ácido nucleico WUP o con la actividad de WUP. Por ejemplo, en una muestra biológica se pueden realizar ensayos con respecto a la presencia de mutaciones en WUP. Esos ensayos se pueden usar con fines de pronóstico o predictivos, para tratar de modo profiláctico a un individuo antes de la aparición de un trastorno caracterizado por, o asociado con, WUP, la expresión de un ácido nucleico WUP o la actividad biológica de WUP.

Otro de los aspectos de la invención proporciona métodos para determinar la actividad de WUP, o la expresión de un ácido nucleico WUP, en un individuo, para seleccionar los agentes terapéuticos o profilácticos adecuados para ese individuo (a lo que aquí se hace referencia como “farmacogenómica”). La farmacogenómica permite la selección de las modalidades (p. ej., fármacos, alimentos) para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo, basada en el genotipo del individuo (p. ej., el genotipo individual para determinar la capacidad del individuo para responder a un agente particular). Otro aspecto de la invención concierne al control de la influencia de las modalidades (p. ej., fármacos, alimentos) sobre la expresión o actividad de WUP en estudios clínicos.

1. Ensayos de diagnóstico

Un ejemplo de método para detectar la presencia o ausencia de WUP en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica procedente de un individuo y poner en contacto esa muestra biológica con un compuesto o con un agente capaz de detectar WUP o un ácido nucleico WUP (p. ej., mRNA, DNA genómico) de manera que en la muestra se confirme la presencia de WUP. Un agente adecuado para detectar mRNA o DNA genómico de WUP es una sonda de ácido nucleico marcada que se puede hibridar al mRNA o DNA genómico de WUP. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico WUP de longitud completa, tal como el ácido nucleico de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, o una de sus porciones, tales como un oligonucleótido que tiene una longitud de al menos 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos y que es suficiente para hibridarse de manera específica en condiciones rigurosas al mRNA o al DNA genómico de WUP.

Un agente adecuado para detectar un polipéptido WUP es un anticuerpo capaz de unirse a WUP según se define en las reivindicaciones, preferiblemente un anticuerpo que lleva un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, se puede usar un anticuerpo monoclonal An intacto, o uno de sus fragmentos (p. ej., F_{ab} o $F(ab)_2$). Una sonda marcada o un anticuerpo marcado se acopla (es decir, se liga físicamente) a una sustancia detectable, así como también se puede hacer una detección indirecta de la sonda o del anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado por fluorescencia y el marcaje en los extremos de una sonda de DNA con biotina de manera que puede ser detectada con estreptavidina marcada por fluorescencia. La expresión “muestra biológica” incluye tejidos, células y fluidos biológicos aislados procedentes de un individuo, así como tejidos, células y fluidos presentes en un individuo. El método de detección se puede usar para detectar mRNA de WUP, proteína WUP o DNA genómico de WUP en una muestra biológica *in vitro* así como también *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de mRNA de WUP incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de un polipéptido WUP incluyen ensayos de inmunoadsorción ligados a enzima (ELISA) (del inglés, “*Enzyme Linked Immunosorbent Assays*”, transferencias Western, inmunoprecipitaciones y técnicas de inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de DNA genómico de WUP incluyen hibridaciones Southern y la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Además, las técnicas *in vivo* para detectar WUP incluyen introducir en un individuo un anticuerpo anti-WUP marcado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un individuo se puede detectar por medio de técnicas estándar de formación de imágenes.

La muestra biológica procedente del individuo puede contener moléculas de proteína y/o moléculas de mRNA y/o moléculas de DNA genómico. Una muestra biológica preferida es la sangre.

Los métodos pueden conllevar además obtener una muestra biológica procedente de un individuo para proporcionar un control, poner en contacto la muestra con un compuesto o agente para detectar WUP, mRNA o DNA genómico, y comparar la presencia de WUP, mRNA o DNA genómico en la muestra de control, con la presencia de WUP, mRNA o DNA genómico en la muestra sometida al ensayo.

La invención también abarca kits, según se definen en las reivindicaciones, para detectar WUP en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender: un compuesto marcado o un agente capaz de detectar WUP o mRNA de WUP en una muestra; reactivos y/o equipamiento para determinar la cantidad de WUP presente en la muestra; y reactivos y/o equipamiento para comparar la cantidad WUP presente en la muestra con un estándar. El compuesto o el agente pueden estar envasados en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para el uso del kit para detectar WUP o su ácido nucleico.

2. Ensayos de pronóstico

Los métodos de diagnóstico que aquí se describen se pueden además utilizar para identificar individuos que padecen, o que están en riesgo de desarrollar, una enfermedad o trastorno asociados con la expresión o la actividad aberrantes de WUP. Por ejemplo, los ensayos que aquí se describen, se pueden usar para identificar un individuo que padece, o que está en riesgo de desarrollar, un trastorno asociado con WUP, con la expresión de un ácido nucleico WUP o con la actividad de WUP. Como alternativa, los ensayos de pronóstico se pueden usar para identificar un individuo que padece, o que está en riesgo de desarrollar, una enfermedad o trastorno asociados con una expresión o actividad aberrantes de WUP, en cuyo caso se obtiene una muestra a ensayar procedente de un individuo y se detecta WUP o un ácido nucleico WUP (p. ej., mRNA, DNA genómico). Una muestra a ensayar es una muestra biológica obtenida procedente de un individuo. Por ejemplo, una muestra a ensayar puede ser un fluido biológico (p. ej., suero), una muestra de células o un tejido.

Los ensayos de pronóstico se pueden usar para determinar si a un individuo se le puede administrar una modalidad (p. ej., un agonista, antagonista, compuesto peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, alimento, etc.) para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con una expresión o actividad aberrantes de WUP. Esos métodos se pueden usar para determinar si un individuo puede ser tratado de manera eficaz con un agente indicado para un trastorno. Los métodos pueden determinar si un individuo puede ser tratado de manera eficaz con un agente indicado para un trastorno asociado con la expresión o la actividad aberrantes de WUP, en cuyo caso se obtiene una muestra a ensayar y se detecta WUP o un ácido nucleico WUP (p. ej., cuando la presencia de WUP o de un ácido nucleico WUP es diagnóstico de que al individuo se le puede administrar el agente para tratar un trastorno asociado con la expresión o la actividad aberrantes de WUP).

Los métodos también se pueden usar para detectar lesiones genéticas en un WUP para determinar si un individuo que tiene esa lesión genética está en riesgo de padecer un trastorno. Los métodos incluyen detectar, en una muestra procedente del individuo, la presencia o ausencia de una lesión genética caracterizada por una alteración que afecta a la integridad de un gen que codifica un polipéptido WUP, o la expresión errónea de WUP. Esas lesiones genéticas se pueden detectar determinando: (1) a delección de uno o más nucleótidos en WUP; (2) una adición de uno o más nucleótidos en WUP; (3) una sustitución de uno o más nucleótidos en WUP; (4) un reordenamiento cromosómico de un gen de WUP; (5) una alteración en el nivel de transcritos del mRNA de WUP; (6) una modificación aberrante de un WUP, tal como un cambio por metilación del DNA genómico, (7) la presencia de un patrón de procesamiento por corte y empalme distinto al de tipo salvaje de un transcrito de mRNA de WUP, (8) un nivel de WUP distinto del de tipo salvaje, (9) una pérdida alélica de WUP, y/o (10) una modificación postraduccional incorrecta de un polipéptido WUP. Existen gran número de técnicas analíticas conocidas que se pueden usar para detectar lesiones en WUP. Se puede usar cualquier muestra biológica que contenga células nucleadas.

Para la detección de lesiones se puede usar una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (p. ej., (Mullis, Patente de EE. UU. Núm. 4.683.202, 1987; Mullis y col., Patente de EE. UU. Núm. 4.683.195, 1987)), tal como una PCR de anclaje o una PCR por amplificación rápida de los extremos de cDNA (RACE), o como alternativa, en una reacción de ligación en cadena (LCR) (p. ej., (Landegren y col., 1988; Nakazawa y col., 1994), esta última es particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en genes WUP (Abravaya y col., 1995). Este método puede incluir recoger una muestra procedente de un paciente, aislar los ácidos nucleicos a partir de la muestra, poner en contacto los ácidos nucleicos con uno o más cebadores que se hibridan específicamente con WUP en condiciones tales que la hibridación y amplificación del WUP, si se encuentra presente, se produce, y detectar la presencia o ausencia de un producto resultante de la amplificación, o detectar el tamaño del producto resultante de la amplificación, y comparar la longitud con una muestra de control. Se prevé que puede ser conveniente usar la PCR y/o la LCR como una etapa preliminar de amplificación junto con cualquiera de las técnicas usadas para detectar las mutaciones que aquí se describen.

Métodos de amplificación alternativos incluyen: replicación automantenida de la secuencia (Guatelli y col., 1990), un sistema de amplificación transcripcional (Kwoh y col., 1989); Q β -Replicasa (Lizardi y col., 1988), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico presentes con baja abundancia.

Se pueden identificar mutaciones en el WUP de una muestra por las alteraciones en los patrones de escisión con enzimas de restricción. Por ejemplo, se aísla el DNA de la muestra y un DNA de control, se amplifican (opcionalmente), se digieren con una o más endonucleasas de restricción y se determinan las longitudes de los fragmentos mediante electroforesis en gel y se comparan. La diferencia en las longitudes de los fragmentos entre el DNA de la muestra y el DNA de control indica la existencia de mutaciones en el DNA de la muestra. Además, el uso de ribozimas especí-

ficas de secuencia se puede emplear para puntuar con respecto a la presencia de mutaciones específicas mediante el desarrollo o la pérdida de un sitio de escisión por ribozima.

La hibridación de los ácidos nucleicos de una muestra y de un control, p. ej., DNA o RNA, con matrices de alta densidad que contienen cientos o miles de sondas oligonucleotídicas, permite identificar mutaciones genéticas en *WUP* (Cronin y col., 1996; Kozal y col., 1996). Por ejemplo, las mutaciones genéticas en *WUP* se pueden identificar en matrices bidimensionales que contienen sondas de DNA generadas por acción de la luz según se describe en Cronin y col., *supra*. Brevemente expuesto, una primera matriz de sondas para hibridación se puede usar para examinar a través de largas extensiones de DNA en una muestra y en un control para identificar los cambios de bases entre las secuencias fabricando matrices lineales de sondas secuenciales solapantes. Esta etapa permite la identificación de mutaciones puntuales. Esta etapa va seguida del uso de una segunda matriz para hibridación que permite la caracterización de mutaciones específicas usando matrices más pequeñas de sondas especializadas, complementarias a todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada una de las matrices para las mutaciones está compuesta de conjuntos de sondas paralelas, uno de ellos complementario al gen de tipo salvaje y el otro complementario al gen mutante.

En otra realización más, se puede usar cualquiera de las diversas reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente el *WUP* y detectar mutaciones detectando la secuencia del *WUP* de la muestra con la secuencia correspondiente de tipo salvaje (control). Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen las basadas en las técnicas clásicas (Maxam y Gilbert, 1977; Sanger y col., 1977). Se puede usar cualquiera de los diversos métodos de secuenciación automática cuando se realizan ensayos de diagnóstico (Naeve y col., 1995) que incluyen la secuenciación mediante espectrometría de masas (Cohen y col., 1996; Griffin y Griffin, 1993; Koster, documento WO 94/16101, 1994).

Otros métodos para detectar mutaciones en el *WUP* incluyen los métodos en los que se usa una protección contra agentes de escisión para detectar bases mal apareadas en heterodúplex de RNA/RNA o de RNA/DNA (Myers y col., 1985). En general, la técnica de "escisión de los desapareamientos" comienza proporcionando heterodúplex formados hibridando RNA o DNA (marcado) que contiene la secuencia de *WUP* de tipo salvaje con RNA o DNA potencialmente mutante, obtenido de una muestra. Los dúplex bicatenarios se tratan con un agente que escinde regiones monocatenarias del dúplex tales como las que surgen de los desapareamientos de pares de bases entre las cadenas del control y las de la muestra. Por ejemplo, dúplex de RNA/DNA se pueden tratar con RNase y los híbridos de DNA/DNA se pueden tratar con nucleasa S₁ para digerir enzimáticamente las regiones mal apareadas. En otras realizaciones, dúplex de DNA/DNA o se pueden tratar con hidroxilamina o con tetróxido de osmio y con piperidina con el fin de digerir las regiones mal apareadas. El material digerido se separa luego por tamaños sobre geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, para determinar el sitio de la mutación (Grompe y col., 1989; Saleeba y Cotton, 1993). El DNA o RNA de control pueden estar marcados para la detección.

Las reacciones de escisión de desapareamientos pueden utilizar una o más proteínas que reconocen pares de base desapareadas en un DNA bicatenario (reparación de los desapareamientos en el DNA) en sistemas definidos, para detectar y mapear mutaciones puntuales en los cDNA de *WUP* obtenidos procedentes de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde por A en desapareamientos G/A y la timidina-DNA-glicosilasa procedente de células HeLa escinde por T en desapareamientos G/T (Hsu y col., 1994). Según una realización ilustrativa, una sonda basada en una secuencia de *WUP* de tipo salvaje se hibrida con un cDNA o con otro producto de tipo DNA procedente de una célula(s) a ensayar. El dúplex se trata con una enzima de reparación de desapareamientos de DNA y los productos resultantes de la escisión (si existen) se pueden detectar aplicando protocolos de electroforesis o protocolos similares (Modrich y col., Patente de EE. UU. Núm. 5. 459.039, 1995).

Los cambios en la movilidad electroforética se pueden usar para identificar mutaciones en *WUP*. Por ejemplo, se pueden usar el polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) (del inglés, "*Single Strand Conformation Polymorphism*") para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre los ácidos nucleicos mutantes y los de tipo salvaje (Cotton, 1993; Hayashi, 1992; Orita y col., 1989). Los fragmentos de DNA monocatenario de la muestra y ácidos nucleicos *WUP* de control, se desnaturalizan y después se vuelven a naturalizar. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos monocatenarios varía según la secuencia; el cambio en movilidad electroforética resultante permite la detección con incluso de un único cambio de bases. Los fragmentos de DNA pueden estar marcados o se pueden detectar con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo se puede aumentar usando RNA (en vez de DNA) en el que la estructura secundaria es más sensible a cambios en la secuencia. El método en cuestión puede usar análisis de los heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex bicatenarias basándose en los cambios en movilidad electroforética (Keen y col., 1991).

La migración de los fragmentos mutantes o de tipo salvaje se puede ensayar usando electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE; (Myers y col., 1985). En una DGGE, el DNA se modifica para prevenir su completa desnaturalización, por ejemplo añadiendo una abrazadera de GC (del inglés, "*GC clamp*") de aproximadamente 40 pb de un DNA de alto punto de fusión y rico en GC, mediante PCR. También se puede usar un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente desnaturalizante para identificar diferencias en la movilidad del DNA de control y del DNA de la muestra (Rossiter y Caskey, 1990).

Ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales incluyen, pero no se limitan a, la hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva o extensión de cebadores selectiva. Por ejemplo, se pueden preparar cebadores oligonucleotídicos en los que la mutación conocida se sitúa en el centro y después se pueden hibridar con el

DNA diana en condiciones que permiten la hibridación únicamente si se encuentra un apareamiento de bases perfecto (Saiki y col., 1986; Saiki y col., 1989). Esos oligonucleótidos alelo específicos se hibridan con el DNA diana amplificado mediante PCR o con varias de las diferentes mutaciones cuando los oligonucleótidos están unidos a la membrana de hibridación y se hibridan con el DNA diana marcado.

Como alternativa se puede usar la tecnología de amplificación alelo-específica que depende de una amplificación selectiva por PCR. Los cebadores oligonucleotídicos para amplificaciones específicas pueden portar la mutación de interés en el centro de la molécula (de manera que la amplificación depende de una hibridación diferencial (Gibbs y col., 1989)) o en el extremo 3'-terminal de uno de los cebadores, caso en el que, en las condiciones adecuadas, el desapareamiento puede impedir, o disminuir la extensión por acción de la polimerasa (Prosser, 1993). Se puede introducir un sitio de restricción nuevo en la región de la mutación para crear una detección basada en la escisión (Gasparini y col., 1992). También se puede realizar una amplificación certera usando la Taq ligasa para la amplificación (Barany, 1991). En esos casos, la ligación tiene lugar solamente si existe un apareamiento de bases perfecto en la terminación 3' de la secuencia 5', lo que permite la detección de una mutación conocida mediante puntuación de la amplificación.

Los métodos descritos se pueden realizar, por ejemplo, usando kits preempaquetados, que comprenden al menos una sonda (un ácido nucleico o un anticuerpo) que se puede usar convenientemente, por ejemplo, en ámbitos clínicos para diagnosticar pacientes que exhiben síntomas o un historial clínico familiar de una enfermedad o dolencia en la que está implicado WUP.

Además, cualquier tipo de célula o tejido en el que se expresa WUP se puede utilizar en los ensayos de pronóstico que aquí se describen.

3. Farmacogenómica

Agentes, o moduladores, que ejercen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad o expresión de WUP, según se identifica mediante un ensayo de escrutinio, se pueden administrar a individuos para tratar trastornos, de manera profiláctica o terapéutica. Junto con este tratamiento, se puede tener en consideración la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre el genotipo de un individuo y la respuesta de ese individuo a una modalidad de procedencia externa, tal como un alimento, un compuesto o un fármaco). Las diferencias metabólicas de los tratamientos terapéuticos pueden dar lugar a reacciones adversas graves o al fracaso terapéutico, al modificar la relación entre la dosis y la concentración en sangre del fármaco farmacológicamente activo. Así, la farmacogenómica del individuo permite la selección de agentes eficaces (p. ej., fármacos) para los tratamientos profilácticos y terapéuticos basados en la consideración del genotipo del individuo. La farmacogenómica se puede usar además para determinar las dosificaciones y las pautas posológicas apropiadas. Por consiguiente, la actividad de WUP, la expresión de un ácido nucleico WUP, o una mutación(s) en WUP en un individuo se puede hacer que oriente sobre la selección del agente(s) adecuado para el tratamiento terapéutico o profiláctico.

La farmacogenómica trata sobre las variaciones hereditarias clínicamente significativas en la respuesta a las modalidades debidas a una predisposición alterada frente a la modalidad o a una acción anormal en las personas afectadas (Eichelbaum y Evert, 1996; Linder y col., 1997). En general, se pueden diferenciar dos afecciones farmacogenómicas: (1) afecciones genéticas transmitidas en forma de un factor único que altera la interacción de una modalidad con el organismo (acción modificada de fármacos) o (2) afecciones genéticas transmitidas en forma de factores individuales que alteran el modo en el que el organismo actúa sobre una modalidad (metabolismo alterado del fármaco). Estas afecciones farmacogenéticas se pueden presentar o bien en forma de defectos poco frecuentes o bien como polimorfismos de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la deficiencia en glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) (del inglés, "*Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase*") es una enzimopatía hereditaria común en la que la complicación clínica principal es una hemólisis después de la ingestión de fármacos oxidantes (fármacos antipalúdicos, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y el consumo de habas.

Como realización ilustrativa, la actividad de enzimas metabolizadoras de fármacos es un determinante importante tanto de la intensidad como de la duración de la acción de un fármaco. El descubrimiento de polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de fármacos (p. ej., N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y las enzimas CYP2D6 y CYP2C19 del citocromo P450) explica los fenómenos que experimentan algunos pacientes que muestran una respuesta exagerada frente a un fármaco y/o reacciones adversas importantes después de tomar la dosis estándar e inocua de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizador rápido (EM) (del inglés, "*Extensive Metabolizer*") y el metabolizador lento (PM) (del inglés, "*Poor Metabolizer*"). La prevalencia del PM es diferente entre las diferentes poblaciones, por ejemplo, el gen CYP2D6 es altamente polimórfico y se han identificado varias mutaciones en los PM, todas las cuales conducen a la ausencia de un CYP2D6 funcional. Los metabolizadores lentos debidos a los CYP2D6 y CYP2C19 mutantes, experimentan con frecuencia respuestas exageradas frente al fármaco y efectos secundarios cuando reciben dosis estándar. Si un metabolito es el resto terapéutico activo, el individuo PM no manifiesta respuesta terapéutica alguna, como se demuestra en el caso del efecto analgésico de la codeína mediado por su metabolito morfina formado por acción de CYP2D6. En el otro extremo se encuentran los denominados metabolizadores ultrarrápidos que no responden a las dosis estándar. Recientemente, se ha identificado que la base molecular del metabolismo ultrarrápido es debida a una amplificación del gen CYP2D6.

La actividad de WUP, la expresión de un ácido nucleico *WUP* o el contenido en mutaciones de *WUP* en un individuo se puede determinar para seleccionar el agente(s) adecuado para un tratamiento terapéutico o profiláctico del individuo. Además, se pueden usar estudios farmacogenéticos para aplicar el genotipado de alelos polimórficos que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos a la identificación de un fenotipo individual de capacidad de respuesta a un fármaco. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o a la selección de fármacos, puede evitar reacciones adversas o fracasos terapéuticos y así aumentar la eficiencia terapéutica o profiláctica cuando se trata a un individuo con un modulador de WUP, tal como un modulador identificado mediante uno de los ensayos de escrutinio descritos como ilustrativos.

4. Vigilancia de los efectos durante los estudios clínicos

La vigilancia de la influencia de agentes (p. ej., fármacos, compuestos) sobre la expresión o actividad de WUP se puede aplicar no solamente en procedimientos básicos de escrutinio de fármacos, sino también en estudios clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente, que mediante un ensayo de escrutinio se ha determinado que aumenta la expresión de WUP, los niveles de proteína o que regula por incremento la actividad de WUP, se puede vigilar en estudios clínicos de individuos que exhiben una expresión de WUP disminuida, niveles de proteína WUP disminuidos o una actividad de WUP regulada por disminución. De manera alternativa, la eficacia de un agente que se ha determinado que disminuye la expresión de WUP, los niveles de proteína WUP o la actividad de WUP regulada por disminución, se puede vigilar en estudios clínicos de individuos que exhiben una expresión de WUP aumentada, niveles de proteína WUP aumentados o una actividad de WUP regulada por incremento. En esos estudios clínicos, la expresión o actividad de WUP y, preferiblemente, la de otros genes que han sido implicados, por ejemplo, en el cáncer, se puede usar como indicadores (del inglés, “*read out*”) o como marcadores de una capacidad de respuesta particular de las células.

Por ejemplo, se pueden identificar genes, que incluyen WUP, que son modulados en las células por tratamiento con una modalidad (p. ej., un alimento, compuesto, fármaco o una molécula pequeña). Para estudiar el efecto de los agentes sobre el cáncer, por ejemplo, en un estudio clínico, las células se pueden aislar y su RNA se puede preparar y analizar con respecto a los niveles de expresión de WUP y de otros genes implicados en ese trastorno. El patrón de expresión génica, se puede cuantificar mediante análisis de transferencia Northern, expresión diferencial de genes (del inglés “*nuclear run-on*” o experimentos de RT-PCR, o midiendo la cantidad de proteína, o midiendo el nivel de actividad de WUP o de otros productos génicos. De esta manera, el patrón de expresión génica puede servir por sí mismo como marcador, siendo indicativo de la respuesta fisiológica celular frente a ese agente. Por consiguiente, este estado de la respuesta puede ser determinado antes del tratamiento, y en diferentes momentos durante el tratamiento del individuo con ese agente.

La eficacia del tratamiento de un individuo con un agente (p. ej., un agonista, antagonista, proteína, péptido, compuesto peptidomimético, ácido nucleico, molécula pequeña, alimento u otro fármaco candidato identificado en los ensayos de escrutinio que aquí se describen) se puede vigilar mediante las etapas de (1) obtener una muestra de un individuo, previa a la administración del tratamiento; (2) detectar el nivel de expresión de un WUP, mRNA o DNA genómico en la muestra previa a la administración del tratamiento; (3) obtener una o más muestras del individuo, posteriores a la administración del tratamiento; (4) detectar el nivel de expresión o la actividad del WUP, mRNA, o DNA genómico en las muestras posteriores a la administración del tratamiento; (5) comparar el nivel de expresión o actividad del WUP, mRNA, or DNA genómico en la muestra previa a la administración del tratamiento, con el nivel de expresión o actividad del WUP, mRNA o DNA genómico en la muestra o muestras posteriores a la administración del tratamiento; y (6) modificar la administración del agente al individuo de acuerdo con los resultados. Por ejemplo, puede ser conveniente aumentar la administración del agente para aumentar la expresión o la actividad de WUP hasta niveles más altos que los detectados. Es decir, aumentar la eficacia del agente. De manera alternativa, puede ser conveniente disminuir la administración del agente, para disminuir la expresión o la actividad de WUP a niveles más bajos que los detectados, es decir, para disminuir la expresión o actividad de WUP hasta niveles más bajos que los detectados, es decir, para disminuir la eficacia del agente.

5. Usos del tratamiento

Los usos profilácticos y terapéuticos pueden tratar a un individuo que está en riesgo de padecer, (o que es susceptible a padecer) un trastorno o que padece un trastorno asociado con una expresión o actividad aberrantes de WUP. Ejemplos incluyen trastornos en los que los requerimientos metabólicos de la célula (y por consiguiente los requerimientos de las mitocondrias y del retículo endoplásmico) son altos, tal como sucede durante un crecimiento celular rápido. Ejemplos de esos trastornos y enfermedades incluyen cánceres, tales como, melanoma, cáncer de mama o cáncer de colon.

6. Enfermedades y trastornos

Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por un aumento de los niveles de WUP o por un aumento de su actividad biológica se pueden tratar con agentes terapéuticos que antagonizan (es decir, disminuyen o inhiben) su actividad. Los antagonistas se pueden administrar de manera terapéutica o profiláctica. Los agentes terapéuticos que se pueden usar incluyen: (1) péptidos WUP o sus análogos, derivados, fragmentos u homólogos; (2) anticuerpos dirigidos contra un péptido WUP; (3) ácidos nucleicos WUP; (4) la administración de un ácido nucleico antisentido y de ácidos nucleicos que son “disfuncionales” (es decir, debido a una inserción heteróloga en las secuencias codificadoras) que se utilizan para eliminar su función endógena mediante recombinación homóloga (Capecchi, 1989); o (5) moduladores

(es decir, inhibidores, agonistas y antagonistas, incluyendo compuestos peptidomiméticos o anticuerpos específicos contra WUP adicionales) que alteran la interacción entre WUP y su pareja de unión.

- Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por una disminución de los niveles de WUP o por una disminución de su actividad biológica se pueden tratar con agentes terapéuticos que aumentan (es decir, son agonistas de) su actividad. Los agentes terapéuticos que regulan la actividad por incremento se pueden administrar de manera terapéutica o profiláctica. Los agentes terapéuticos que se pueden usar incluyen péptidos o sus análogos, derivados, fragmentos u homólogos; o un agonista que aumenta la biodisponibilidad.
- Los niveles aumentados o disminuidos se pueden detectar fácilmente cuantificando el péptido y/o el RNA, obteniendo una muestra de tejido del paciente (p. ej., de un tejido biopsiado) y analizándolo *in vitro* con respecto a los niveles de RNA o péptido, con respecto a la estructura y/o con respecto a la actividad de los péptidos expresados (o de los mRNA de WUP). Los métodos incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos (p. ej., mediante análisis de transferencia Western, inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS), inmunocitoquímica, etc.) y/o análisis de hibridación para detectar la expresión de los mRNA (p. ej., ensayos Northern, transferencias de puntos, hibridación *in situ* y métodos similares).

7. Métodos profilácticos

- Los individuos que están en riesgo de padecer una enfermedad que está causada por, o a la que contribuye, una expresión o actividad aberrantes de WUP, se pueden identificar, por ejemplo, mediante cualquiera de los análisis de diagnóstico o pronóstico existentes o mediante una combinación de los mismos. La administración de un agente profiláctico puede tener lugar antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberrancia de WUP, de manera que una enfermedad o trastorno se previene o, de manera alternativa, se retarda en su progresión. Dependiendo del tipo de aberrancia de WUP, por ejemplo, se puede usar un agonista de WUP o un antagonista de WUP para tratar la individuo. El agente adecuado se puede determinar en ensayos de escrutinio.

8. Métodos terapéuticos

- Otro aspecto de la invención concierne a métodos para identificar moduladores de la expresión o actividad de WUP con fines terapéuticos. Un agente que modula la actividad de WUP puede ser un ácido nucleico o una proteína, un ligando cognado de WUP presente en la naturaleza, un péptido, un compuesto peptidomimético de WUP u otra molécula pequeña. El agente puede estimular la actividad de WUP. Ejemplos de agentes estimuladores de ese tipo incluyen un WUP activo y una molécula de ácido nucleico WUP que ha sido introducida en la célula. En otra realización, el agente inhibe la actividad de WUP. Ejemplos de agentes inhibidores incluyen ácidos nucleicos WUP antisentido y anticuerpos anti-WUP. Los métodos de modulación se pueden realizar *in vitro* (p. ej., cultivando la célula con el agente o, como alternativa se pueden realizar *in vivo* (p. ej., administrando el agente a un individuo). Así pues, la invención proporciona métodos para identificar agentes adecuados para tratar a un individuo aquejado con una enfermedad o trastorno caracterizado por una expresión o actividad aberrantes de una molécula de WUP o de un ácido nucleico WUP. En este sentido, se puede utilizar un agente (p. ej., un agente identificado en un ensayo de escrutinio) o una combinación de agentes que modulan (p. ej., que regulan por incremento o que regulan por disminución) la expresión o la actividad de WUP. Como alternativa, una molécula de WUP o de un ácido nucleico WUP se puede utilizar como terapia para compensar una expresión o actividad disminuida o aberrante de WUP.
- La estimulación de la actividad de WUP es conveniente en situaciones en las que WUP está regulado por disminución de manera anormal y/o en las que es probable que una actividad de WUP aumentada ejerza un efecto beneficioso.

9. Determinación del efecto biológico del agente terapéutico

- Se pueden realizar ensayos *in vitro* o *in vivo* adecuados para determinar el efecto de un agente terapéutico específico y si su administración está indicada para el tratamiento del tejido afectado.

- En distintas realizaciones específicas se pueden realizar ensayos *in vitro* con células representativas del tipo(s) implicado en el trastorno del paciente, para determinar si un agente terapéutico determinado ejerce el efecto deseado sobre ese tipo(s) de célula. Las modalidades para usar en el tratamiento se pueden ensayar en sistemas de modelos animales adecuados que incluyen, pero que no se limitan a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos y animales similares, antes de ensayarlas en individuos humanos. De manera similar, en los ensayos *in vivo*, se puede usar cualquiera de los sistemas de modelos animales conocidos en la técnica antes de la administración a individuos humanos.

10. Usos profilácticos y terapéuticos de las composiciones de la invención

- Los ácidos nucleicos WUP y las proteínas WUP son útiles en las potenciales aplicaciones terapéuticas y profilácticas implicadas en diversos trastornos que incluyen, pero que no se limitan a, cáncer.
- Como ejemplo, un cDNA que codifica WUP puede ser útil en terapia génica, y la proteína puede ser útil cuando se administra a un individuo que la necesita. A modo de ejemplo no limitativo, las composiciones de la invención serán efectivas en el tratamiento de pacientes que padecen cáncer.

Los ácidos nucleicos *WUP*, o sus fragmentos, pueden también ser útiles en aplicaciones de diagnóstico, en las que se ha de determinar la presencia o la cantidad del ácido nucleico o de la proteína. Un uso adicional podría ser el uso como molécula antibacteriana (es decir, se ha descubierto que algunos péptidos poseen propiedades antibacterianas). Estos materiales son además útiles en la generación de anticuerpos que se unen de manera inmuno-específica a las nuevas sustancias de la invención, para usarlos en métodos terapéuticos o de diagnóstico.

Ejemplo

Los detalles experimentales del siguiente ejemplo se pueden encontrar en (Pennica y col., 1998).

Las proteínas Wnt median en diversos procesos del desarrollo embrionario tales como el control de la proliferación celular, la adhesión, la polaridad celular y el establecimiento de los destinos últimos de las células. Aunque Wnt-1 no se expresa en glándula mamaria normal, la expresión de Wnt-1 en ratones transgénicos produce tumores mamarios.

Una estrategia de sustracción en el cDNA, basada en PCR, la hibridación sustractiva por supresión (SSH) (Diatchenko y col., 1996), usa RNA aislado de células C57MG epiteliales mamarias de ratón y de células C57MG transformadas de manera estable con un retrovirus Wnt-1. La sobreexpresión de Wnt-1 en esta línea de células es suficiente para inducir un fenotipo parcialmente transformado, caracterizado por células alargadas y refráctiles que pierden la inhibición por contacto y forman una matriz multicapa (Brown y col., 1986; Wong y col., 1994). Los genes que se expresan de manera diferencial entre estas dos líneas celulares contribuyen probablemente al fenotipo transformado.

1. Métodos

SSH. La SSH se realizó usando el kit de sustracción de cDNA por PCR selectiva (CLONTECH). Se sintetizó el cDNA bicatenario "tester" a partir de 2 µg de RNA poli(A)⁺ aislado de la línea celular C57MG/Wnt-1 y se sintetizó el cDNA "driver" a partir de 2 µg de RNA poli(A)⁺ procedente de las células parentales C57MG cells. La genoteca de cDNA sustraída se subclonó en un vector pGEM-T para su posterior análisis.

Expresión del RNA de WUP humano. La amplificación por PCR del cDNA de la primera cadena se llevó a cabo con paneles de cDNA de múltiples tejidos humanos (CLONTECH) y con una concentración 300 µM de cada uno de los dNTP, a 94°C durante 1 s, a 62°C durante 30 s, a 72°C durante 1 min, durante 22-32 ciclos.

Análisis de amplificación génica y de expresión de RNA. La amplificación génica relativa y la expresión del RNA de *WUP* y *c-myc* en las líneas celulares se determinaron mediante una PCR cuantitativa. Se diseñaron cebadores específicos de genes y sondas fluorogénicas y se usaron para amplificar y cuantificar los genes. El método se usó para calcular el SE de los niveles de expresión de RNA. La señal específica de WUP se normalizó con respecto a la del gen doméstico de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidro-genasa. Todos los reactivos analíticos TaqMan se obtuvieron procedentes de *Perkin-Elmer Applied Biosystems*.

2. Resultados

Para identificar los genes Wnt-1 inducibles, se usó la técnica de SSH usando la línea C57MG de células de epitelio mamario de ratón y células C57MG que expresan Wnt-1 y Wnt-4 de manera estable. Los cDNA candidatos expresados de manera diferencial (un total de 1.384 total) se secuenciaron. El 39% de las secuencias se correspondieron con genes u homólogos conocidos, el 32% se correspondieron con secuencias identificadoras de secuencias expresadas y el 29% no tuvieron correspondencia. Para confirmar que el transcrito se había expresado diferencialmente, se realizó un análisis semicuantitativo de PCR con transcripción inversa usando mRNA de las células C57MG y C57MG/Wnt-1.

La técnica de SSH determinó que WUP estaba regulada por incremento en las células que expresan Wnt-1 2-3 veces en comparación con la expresada en las células de tipo salvaje o en las células C57MG que expresan Wnt-4. El análisis de PCR cuantitativa (TaqMan) confirmó la regulación por incremento, evidenciando un incremento de 1,4 veces en las células que expresan Wnt-1 en comparación con las células de tipo salvaje o con las células que expresan Wnt-4.

Referencias bibliográficas

U.S. Patent No. 4166452. Apparatus for testing human responses to stimuli. 1979.

U.S. Patent No. 4485045. Synthetic phosphatidyl cholines useful in forming liposomes. 1984.

U.S. Patent No. 4544545. Liposomes containing modified cholesterol for organ targeting. 1985.

4,676,980. Target specific cross-linked heteroantibodies. 1987.

U.S. Patent No. 4816567. Recombinant immunoglobulin preparations. 1989.

WO 90/10448. Covalent conjugates of lipid and oligonucleotide. 1990.

WO 90/13641. Stably transformed eucaryotic cells comprising a foreign transcribable DNA under the control of a pol III promoter. 1990.

EPO 402226. Transformation vectors for yeast *Yarrowia*. 1990.

WO 91/00360. Bispecific reagents for AIDS therapy. 1991.

WO 91/04753. Conjugates of antisense oligonucleotides and therapeutic uses thereof. 1991.

U.S. Patent No. 5013556. Liposomes with enhanced circulation time. 1991.

WO 91/06629. Oligonucleotide analogs with novel linkages. 1991.

WO 92/20373. Heteroconjugate antibodies for treatment of HIV infection. 1992.

WO 93/08829. Compositions that mediate killing of HIV-infected cells. 1993.

WO 94/11026. Therapeutic application of chimeric and radiolabeled antibodies to human B lymphocyte restricted differentiation antigen for treatment of B cells. 1994.

WO 96/27011. A method for making heteromultimeric polypeptides. 1996.

U.S. Patent No. 5545807. Production of antibodies from transgenic animals. 1996.

U.S. Patent No. 5545806. Transgenic non-human animals for producing heterologous antibodies. 1996.

U.S. Patent No. 5569825. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies of various isotypes. 1996.

WO 97/33551. Compositions and methods for the diagnosis, prevention, and treatment of neoplastic cell growth and proliferation. 1997.

U.S. Patent No. 5633425. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies. 1997.

U.S. Patent No. 5661016. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies of various isotypes. 1997.

U.S. Patent No. 5625126. Transgenic non-human animals for producing heterologous antibodies. 1997.

Abravaya, K., J.J. Carrino, S. Muldoon, and H.H. Lee. 1995. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap- LCR). *Nucleic Acids Res.* 23:675-82.

Alam, J., and J.L. Cook. 1990. Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* 188:245-254.

Austin, C.P., and C.L. Cepko. 1990. Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. *Development.* 110:713-732.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, et al. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.

Barany, F. 1991. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:189-93.

Bartel, D.P., and J.W. Szostak. 1993. Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]. *Science.* 261:1411-8.

Bartel, P., C.T. Chien, R. Sternglanz, and S. Fields. 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques.* 14:920-4.

Beal, P.A., and P.B. Dervan. 1991. Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide- directed triple-helix formation. *Science.* 251:1360-3.

Bechtold, N., and G. Pelletier. 1998. In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol.* 82:259-66.

Becker, D.M., and L. Guarente. 1991. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol.* 194:182-187.

Beggs, J.D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*. 275:104-109.

Berger, J., J. Hauber, R. Hauber, R. Geiger, et al. 1988. Secreted placental alkaline phosphatase: A powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene*. 66:1-10.

WO 93/04169. GENE TARGETING IN ANIMAL CELLS USING ISOGENIC DNA CONSTRUCTS. 1993.

Bodine, D.M., K.T. McDonagh, N.E. Seidel, and A.W. Nienhuis. 1991. Survival and retrovirus infection of murine hematopoietic stem cells *in vitro*: effects of 5-FU and method of infection. *Exp. Hematol.* 19:206-212.

Boemer, P., R. Lafond, W.Z. Lu, P. Brams, et al. 1991. Production of antigen-specific human monoclonal antibodies from *in vitro*-primed human splenocytes. *J Immunol.* 147:86-95.

U.S. Patent No. 3,773,919. Polylactide-drug mixtures. 1973.

Bradley. 1987. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. Oxford University Press, Inc., Oxford. 268 pp.

Bradley, A. 1991. Modifying the mammalian genome by gene targeting. *Curr Opin Biotechnol.* 2:823-9.

Brennan, M., P.F. Davison, and H. Paulus. 1985. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science*. 229:81-3.

WO 94/10300. INTERACTION TRAP SYSTEM FOR ISOLATING NOVEL PROTEINS. 1994.

Brown, A.M., R.S. Wildin, T.J. Prendergast, and H.E. Varmus. 1986. A retrovirus vector expressing the putative mammary oncogene int-1 causes partial transformation of a mammary epithelial cell line. *Cell*. 46:1001-9.

Capecchi, M.R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*. 22:479.

Capecchi, M.R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 244:1288-92.

Carell, T., E.A. Wintner, and J. Rebek Jr. 1994a. A novel procedure for the synthesis of libraries containing small organic molecules. *Angewandte Chemie International Edition*. 33:2059-2061.

Carell, T., E.A. Wintner, and J. Rebek Jr. 1994b. A solution phase screening procedure for the isolation of active compounds from a molecular library. *Angewandte Chemie International Edition*. 33:2061-2064.

Caron, P.C., W. Laird, M.S. Co, N.M. Avdalovic, et al. 1992. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med*. 176:1191-5.

Carter, P. 1986. Site-directed mutagenesis. *Biochem J*. 237:1-7.

Case, M.E., M. Schweizer, S.R. Kushner, and N.H. Giles. 1979. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76:5259-63.

U.S. Patent No. 5,116,742. RNA ribozyme restriction endoribonucleases and methods. 1992.

U.S. Patent No. 4,987,071. RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endoribonucleases and methods. 1991.

Cepko, C.L., B.E. Roberts, and R.E. Mulligan. 1984. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell*. 37:1053-1062.

Chalfie, M., Y. tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, et al. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263:802-805.

Chaney, W.G., D.R. Howard, J.W. Pollard, S. Sallustio, et al. 1986. High-frequency transfection of CHO cells using Polybrene. *Somatic Cell Mol. Genet.* 12:237.

Chen, C., and H. Okayama. 1988. Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques*. 6:632-638.

Chen, S.H., H.D. Shine, J.C. Goodman, R.G. Grossman, et al. 1994. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:3054-7.

Cho, C.Y., E.J. Moran, S.R. Cherry, J.C. Stephans, et al. 1993. An unnatural biopolymer. *Science*. 261:1303-5.

Cohen, A.S., D.L. Smisek, and B.H. Wang. 1996. Emerging technologies for sequencing antisense oligonucleotides: capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Adv Chromatogr.* 36:127-62.

Cohen, J.S. 1989. Oligodeoxynucleotides: Antisense inhibitors of gene expression. *CRC Press*, Boca Raton, FL. 255 pp.

Cohen, S.M.N., A.C.Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:2110.

Cooney, M., G. Czemuszewicz, E.H. Postel, S.J. Flint, et al. 1988. Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human c-myc gene *in vitro*. *Science.* 241:456-9.

Cotton, R.G. 1993. Current methods of mutation detection. *Mutat Res.* 285:125-44.

Cronin, M.T., R.V. Fucini, S.M. Kim, R.S. Masino, et al. 1996. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays. *Hum Mutat.* 7:244-55.

Cull, M.G., J.F. Miller, and P.J. Schatz. 1992. Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:1865-9.

Cwiria, S.E., E.A. Peters, R.W. Barrett, and W.J. Dower. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:6378-82.

de Boer, A.G. 1994. Drug absorption enhancement: Concepts, possibilities, limitations and trends. Harwood Academic Publishers, Langhorne, PA.

de Louvencourt, L., H. Fukuhara, H. Heslot, and M. Wesolowski. 1983. Transformation of *Kluyveromyces lactis* by killer plasmid DNA. *J Bacteriol.* 154:737-42.

de Wet, J.R., K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinski, et al. 1987. Structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 7:725-737.

Demerec, M., E.A. Adelberg, A.J. Clark, and P.E. Hartman. 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics.* 54:61-76.

Devlin, J.J., L.C. Panganiban, and P.E. Devlin. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science.* 249:404-6.

DeWitt, S.H., J.S. Kiely, C.J. Stankovic, M.C. Schroeder, et al. 1993. "Diversomers": an approach to nonpeptide, nonoligomeric chemical diversity. *Proc Natl. Acad Sci USA.* 90:6909-13.

Diatchenko, L., Y.F. Lau, A.P. Campbell, A. Chenchik, et al. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:6025-30.

Eichelbaum, M., and B. Evert. 1996. Influence of pharmacogenetics on drug disposition and response. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 23:983-5.

Effington, A.D., and J.W. Szostak. 1990. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 346:818-22.

Elroy-Stein, O., and B. Moss. 1990. Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:6743-6747.

US Patent No. 4,522,811. Serial injection of muramyl dipeptides and liposomes enhances the anti-infective activity of muramyl dipeptides. Serial injection of muramyl dipeptides and liposomes enhances the anti-infective activity of muramyl dipeptides. 1985.

Eppstein, D.A., Y.V. Marsh, M. van der Pas, P.L. Felgner, et al. 1985. Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:3688-92.

Escudero, J., and B. Hohn. 1997. Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *Plant Cell.* 9:2135-2142.

U.S. Patent No. 4,870,009. Method of obtaining gene product through the generation of transgenic animals. 1989.

Fekete, D.M., and C.L. Cepko. 1993. Retroviral infection coupled with tissue transplantation limits gene transfer in the chick embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2350-2354.

- Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, et al.** 1987. Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA/transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:7413-7417.
- Felici, F., L. Castagnoli, A. Musacchio, R. Jappelli, et al.** 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol.* 222:301-10.
- Fieck, A., D.L. Wyborski, and J.M. Short.** 1992. Modifications of the *E. coli* Lac repressor for expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucleic Acids Res.* 20:1785-91.
- Finer, J.J., K.R. Finer, and T. Ponappa.** 1999. Particle bombardment-mediated transformation. *Current Topics in microbiology and immunology.* 240:59-80.
- Finn, P.J., N.J. Gibson, R. Fallen, A. Hamilton, et al.** 1996. Synthesis and properties of DNA-PNA chimeric oligomers. *Nucleic Acids Res.* 24:3357-63.
- Fishwild, D.M., S.L. ODonnell, T. Bengoechea, D.V. Hudson, et al.** 1996. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice [see comments]. *Nat Biotechnol.* 14:845-51.
- Fleer, R., P. Yeh, N. Amellal, I. Maury, et al.** 1991. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Biotechnology (N Y)*. 9:968-75.
- Fodor, S.P., R.P. Rava, X.C. Huang, A.C. Pease, et al.** 1993. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature.* 364:555-6.
- Fromm, M., L.P. Taylor, and V. Walbot.** 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:5824-5828.
- Fujita, T., H. Shubiya, T. Ohashi, K. Yamanishi, et al.** 1986. Regulation of human interleukin-2 gene: Functional DNA sequences in the 5' flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes. *Cell.* 46:401-407.
- Gabizon, A., R. Shiota, and D. Papahadjopoulos.** 1989. Pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin encapsulated in stable liposomes with long circulation times. *J Natl Cancer Inst.* 81:1484-8.
- Gallagher, S.R.** 1992. GUS protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression. *Academic Press*, San Diego, CA.
- Galiop, M.A., R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P. Fodor, et al.** 1994. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J Med Chem.* 37:1233-51.
- Gasparini, P., A. Bonizzato, M. Dognini, and P.F. Pignatti.** 1992. Restriction site generating-polymerase chain reaction (RG-PCR) for the probeless detection of hidden genetic variation: application to the study of some common cystic fibrosis mutations. *Mol Cell Probes.* 6:1-7.
- Gautier, C., F. Morvan, B. Rayner, T. Huynh-Dinh, et al.** 1987. Alpha-DNA. IV: Alpha-anomeric and beta-anomeric tetrathymidylates covalently linked to intercalating oxazolopyridocarbazole. Synthesis, physicochemical properties and poly (rA) binding. *Nucleic Acids Res.* 15:6625-41.
- Gennaro, A.R.** 2000. Remington: The science and practice of pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Gibbs, R.A., P.N. Nguyen, and C.T. Caskey.** 1989. Detection of single DNA base differences by competitive oligo-nucleotide priming. *Nucleic Acids Res.* 17:2437-48.
- Gietz, R.D., R.A. Woods, P. Manivasakam, and R.H. Schiestl.** 1998. Growth and transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. In Cells: A laboratory manual. Vol. 1. D. Spector, R. Goldman, and L. Leinwand, editors. *Cold Spring Harbor Press*, Cold Spring Harbor, NY.
- Goding, J.W.** 1996. Monoclonal antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, San Diego. 492 pp.
- Gorman, C.M., L.F. Moffat, and B.H. Howard.** 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2:1044-1051.
- Graham, F.L., and A.J. van der Eb.** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 52:456-.
- Griffin, H.G., and A.M. Griffin.** 1993. DNA sequencing. Recent innovations and future trends. *Appl Biochem Biotechnol.* 38:147-59.

Grompe, M., D.M. Muzny, and C.T. Caskey. 1989. Scanning detection of mutations in human ornithine transcarbamoylase by chemical mismatch cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:5888-92.

Gruber, M., B.A. Schodin, E.R. Wilson, and D.M. Kranz. 1994. Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. *J Immunol*. 152:5368-74.

Guatelli, J.C., K.M. Whitfield, D.Y. Kwoh, K.J. Barringer, et al. 1990. Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction model after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:1874-8.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.

Hansen, G., and M: D. Chilton. 1999. Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:21-57.

Hansen, G., and M.S. Wright. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* 4:226-231.

Harlow, E., and D. Lana. 1988. Antibodies: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor. 726 pp.

Harlow, E., and D. Lana. 1999. Using antibodies: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.

Haseloff, J., and W.L. Gerlach. 1988. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*. 334:585-91.

Hayashi, K. 1992. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *Genetic and Analytical Techniques Applications*. 9:73-79.

Helene, C. 1991. The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming- oligonucleotides. *Anticancer Drug Des.* 6:569-84.

Helene, C., N.T. Thuong, and A. Harel-Bellan. 1992. Control of gene expression by triple helix-forming oligonucleotides. The antigene strategy. *Ann NY Acad Sci.* 660:27-36.

Hinnen, A., J.B. Hicks, and G.R. Fink. 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75:1929-1933.

Hoffman, F. 1996. Laser microbeams for the manipulation of plant cells and subcellular structures. *Plant Sci.* 113:1-11.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. 1994. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 500 pp.

Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:6444-8.

Hoogenboom, H.R., A.D. Griffiths, K.S. Johnson, D.J. Chiswell, et al. 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19:4133-7.

Houghten, R.A., J.R. Appel, S.E. Blondelle, J.H. Cuervo, et al. 1992. The use of synthetic peptide combinatorial libraries for the identification of bioactive peptides. *Biotechniques*. 13:412-21.

Hsu, I.C., Q. Yang, M.W. Kahng, and J.F. Xu. 1994. Detection of DNA point mutations with DNA mismatch repair enzymes. *Carcinogenesis*. 15:1657-62.

Hwang, K.J., K.F. Luk, and P.L. Beaumier. 1980. Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77:4030-4.

Hyrup, B., and P.E. Nielsen. 1996. Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem.* 4:5-23.

Inoue, H., Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, et al. 1987a. Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O- methyl)ribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 15:6131-48.

Inoue, H., Y. Hayase, S. Iwai, and E. Ohtsuka. 1987b. Sequence-dependent hydrolysis of RNA using modified oligonucleotide splints and RNase H. *FEBS Lett.* 215:327-30.

- Ishiura, M., S. Hirose, T. Uchida, Y. Hamada, *et al.* 1982. Phage partirle-mediated gene transfer to cultured mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2:607-616.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153:163-168.
- Iwabuchi, K., B. Li, P. Bartel, and S. Fields. 1993. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8:1693-6.
- Jayasena, S.D. 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem.* 45:1628-50.
- Jones, P.T., P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, *et al.* 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 321:522-5.
- Kaufman, R.J. 1990. Vectors used for expression in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185:487-511.
- Kaufman, R.J., P. Murtha, D.E. Ingolia, C.-Y. Yeung, *et al.* 1986. Selection and amplification of heterologous genes encoding adenosine deaminase in mammalian celis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:3136-3140.
- Kawai, S., and M. Nishizawa. 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 4:1172.
- Keen, J., D. Lester, C. Ingleheam, A. Curtis, *et al.* 1991. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on Hydrolink geis. *Trends Genet.* 7:5.
- Kelly, J.M., and M.J. Hynes. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. *Embo J.* 4:475-9.
- Kostelny, S.A., M.S. Cole, and J.Y. Tso. 1992. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol.* 148:1547-53.
- WO94/16101. DNA SEQUENCING BY MASS SPECTROMETRY. 1994.
- Kozal, M.J., N. Shah, N. Shen, R. Yang *et al.* 1996. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med.* 2:753-9.
- Kozbor, D., P. Tripputi, J.C. Roder, and C.M. Croce. 1984. A human hybrid myeloma for production of human monoclonal antibodies. *J Immunol.* 133:3001-5.
- Kriegler, M. 1990. Gene transfer and expression: A laboratory manual. Stockton Press, New York. 242 pp.
- WO 91/01140. HOMOLOGOUS RECOMBINATION FOR UNIVERSAL DONOR CELLS AND CHIMERIC MAMMALIAN HOSTS. 1991.
- Kwoh, D.Y., G.R. Davis, K.M. Whitfield, H.L. Chappelle, *et al.* 1989. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:1173-7.
- US Patent No. 5,223,409. Directed evolution of novel binding proteins. 1993.
- Lakso, M., B. Sauer, B. Mosinger, E.J. Lee, *et al.* 1992. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:6232-6.
- Lam, K.S. 1997. Application of combinatorial library methods in cancer research and drug discovery. *Anticancer Drug Design*. 12:145-167.
- Lam, K.S., S.E. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby, *et al.* 1991. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Nature*. 354:82-84.
- Landegren, U., R. Kaiser, J. Sanders, and L. Hood. 1988. A ligase-mediated gene detection technique. *Science*. 241:1077-80.
- WO 90/11354. Process for the specific replacement of a copy of a gene present in the receiver genome via the integration of a gene. 1990.
- U.S. Patent No. 4,736,866. Transgenic non-human animals. 1988.

Leduc, N., and *et al.* 1996. Isolated maize zygotes mimic *in vivo* embryogenic development and express microinjected genes when cultured *in vitro*. *Dev. Biol.* 10:190-203.

Lee, J.S., **D.A. Johnson**, and **A.R. Morgan**. 1979. Complexes formed by (pyrimidine)_n (purine)_n DNAs on lowering the pH are three-stranded. *Nucleic Acids Res.* 6:3073-91.

Lee, V.H.L. 1990. Peptide and protein drug delivery. Marcel Dekker, New York, NY.

Lemaitre, M., **B. Bayard**, and **B. Lebleu**. 1987. Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:648-52.

Lemischka, I.R., **D.H. Raulet**, and **R.C. Mulligan**. 1986. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell*. 45:917-927.

Letsinger, R.L., **G.R. Zhang**, **D.K. Sun**, **T. Ikeuchi**, *et al.* 1989. Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:6553-6.

Li, E., **T.H. Bestor**, and **R. Jaenisch**. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-26.

Linder, M.W., **R.A. Prough**, and **R. Valdes**. 1997. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem*. 43:254-66.

Littlefield, J.W. 1964. Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science*. 145:709-710.

Lizardi, P.M., **C.E. Guerra**, **H. Lomeli**, **I. Tussie-Luna**, *et al.* 1988. Exponential amplification of recombinant-RNA hybridization probes. *Biotechnology*. 6:1197-1202.

Lonberg, N., and **D. Huszar**. 1995. Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol*. 13:65-93.

Lonberg, N., **L.D. Taylor**, **F.A. Harding**, **M. Trounstine**, *et al.* 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications [see comments]. *Nature*. 368:856-9.

Lopata, M.A., **D.W. Cleveland**, and **B. Sollner-Webb**. 1984. High-level expression of a chloramphenicol acetyltransferase gene by DEAE-dextran-mediated DNA transfection coupled with a dimethylsulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Research*. 12:5707.

Luckow, V.A. 1991. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. in Recombinant DNA technology and applications. A. Prokop, R.K. Bajpai, and C. Ho, editors. McGraw-Hill, New York. 97-152.

Madura, K., **R.J. Dohmen**, and **A. Varshavsky**. 1993. N-recognin/Ubc2 interactions in the N-end rule pathway. *J Biol Chem*. 268:12046-54.

Maher, L.J. 1992. DNA triple-helix formation: an approach to artificial gene repressors? *Bioessays*. 14:807-15.

Mandel, M., and **A. Higa**. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53:159-162.

Marasco, W.A., **W.A. Haseltine**, and **S.Y. Chen**. 1993. Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:7889-93.

Marks, J.D., **A.D. Griffiths**, **M. Malmqvist**, **T.P. Clackson**, *et al.* 1992. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (N Y)*. 10:779-83.

Marks, J.D., **H.R. Hoogenboom**, **T.P. Bonnert**, **J. McCafferty**, *et al.* 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*. 222:581-97.

Martin, F.J., and **D. Papahadjopoulos**. 1982. Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. *J Biol Chem*. 257:286-8.

Maxam, A.M., and **W. Gilbert**. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74:560-4.

Miller, A.D., and **C. Buttimore**. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell Biol*. 6:2895-2902.

Miller, L.K. 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.* 42:177-199.

Milstein, C., and A.C. Cuello. 1983. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature.* 305:537-40.

US Patent No. 5,459,039. Methods for mapping genetic mutations. 1995.

Morrison, S.L., L. Wims, S. Wallick, L. Tan, et al. 1987. Genetically engineered antibody molecules and their application. *Ann NY Acad Sci.* 507:187-98.

US Patent No. 4,683,202. Process for amplifying nucleic acid sequences. 1987.

US Patent No. 4,683,195. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. 1987.

Munson, P.J., and D. Rodbard. 1980. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem.* 107:220-39.

Myers, R.M., Z. Larin, and T. Maniatis. 1985. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science.* 230:1242-6.

US Patent No. 5,328,470. Treatment of diseases by site-specific instillation of cells or site-specific transformation of cells and kits therefor. 1994.

Naeve, C.W., G.A. Buck, R.L. Niece, R.T. Pon, et al. 1995. Accuracy of automated DNA sequencing: a multi-laboratory comparison of sequencing results. *Biotechniques.* 19:448-53.

Nakai, K., and P. Horton. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* 24:34-6.

Nakazawa, H., D. English, P.L. Randell, K. Nakazawa, et al. 1994. Uv and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:360-4.

Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P.H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1:841-845.

O'Gorman, S., D.T. Fox, and G.M. Wahl. 1991. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science.* 251:1351-5.

Okano, H., J. Aruga, T. Nakagawa, C. Shiota, et al. 1991. Myelin basic protein gene and the function of antisense RNA in its repression in myelin-deficient mutant mouse. *J Neurochem.* 56:560-7.

O'Reilly, D.R., L.K. Miller, and V.A. Luckow. 1992. Baculovirus expression vectors. W.H. Freeman and Company, New York.

Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, et al. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:2766-70.

Ou-Lee, T.M., R. Turgeon, and R. Wu. 1986. Uptake and expression of a foreign gene linked to either a plant virus or *Drosophila* promoter in protoplasts of rice, wheat and sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:6815-6819.

Palmer, T.D., R.A. Hock, W.R.A. Osborne, and A.D. Miller. 1987. Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine-deficient human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:1055-1059.

Pear, W., G. Nolan, M. Scott, and D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:8392-8396.

Pennica, D., T.A. Swanson, J.W. Welsh, M.A. Rey, et al. 1998. WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:14717-22.

Perry-O'Keefe, H., X.W. Yao, J.M. Coull, M. Fuchs, et al. 1996. Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: an alternative to southern hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:14670-5.

Petersen, K.H., D.K. Jensen, M. Egholm, O. Buchardt, et al. 1976. A PNA-DNA linker synthesis of N-((4,4'-dimethoxytrityloxy)ethyl)-N-(thymine-1-ylacetyl)glycine. *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters.* 5:1119-1124.

Potter, H. 1988. Electroporation in biology: Methods, applications,, and instrumentation. *Analytical Biochemistry*. 174:361-373.

Potter, H., L. Weir, and P. Leder. 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:7161-7165.

Presta, L.G. 1992. Antibody engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 3:394-8.

Prosser, J. 1993. Detecting single-base mutations. *Trends Biotechnol*. 11:238-46.

Rassoulzadegan, M., B. Binetruy, and F. Cuzin. 1982. High frequency of gene transfer afterfusion between bacteria and eukaryotic cells. *Nature*. 295:257.

Reisfeld, R.A., and S. Sell. 1985. Monoclonal antibodies and cancer therapy: Proceedings of the Roche-UCLA symposium held in Park City, Utah, January 26-February 2, 1985. Alan R. Liss, New York. 609 pp.

Rhodes, C.A., D.A. Pierce, I.J. Mettler, D. Mascarenhas, et al. 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*. 240:204-207.

Riechmann, L., M. Clark, H. Waldmann, and G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 332:323-7.

Rose, J.K., L. Buonocore, and M. Whitt. 1991. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *BioTechniques*. 10:520-525.

Rossi, J.J. 1994. Practical ribozymes. Making ribozymes work in cells. *Curr Biol*. 4:469-71.

Rossiter, B.J., and C.T. Caskey. 1990. Molecularscanning methods of mutation detection. *J Biol Chem*. 265:12753-6.

US Patent No. 5,283,317. Intermediates for conjugation of polypeptides with high molecular weight polyalkylene glycols. 1994.

Saiki, R.K., T.L. Bugawan, G.T. Hom, K.B. Mullis, et al. 1986. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 324:163-6.

Saiki, R.K., P.S. Walsh, C.H. Levenson, and H.A. Erlich. 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:6230-4.

Saleeba, J.A., and R.G. Cotton. 1993. Chemical cleavage of mismatch to detect mutations. *Methods Enzymol*. 217:286-95.

Sambrook, J. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor.

Sandri-Goldin, R.M., A.L. Goldin, J.C. Glorioso, and M. Levine. 1981. High-frequency transfer of cloned herpes simplex virus type 1 sequences to mammalian cells by protoplast fusion. *Mol. Cell. Biol*. 1:7453-752.

Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74:5463-7.

Saunders, J.A., B.F. Matthews, and P.D. Miller. 1989. Plant gene transfer using electrofusion and electroporation. In *Electroporation and electrofusion in cell biology*. E. Neumann, A.E. Sowers, and C.A. Jordan, editors. *Plenum Press*, New York. 343-354.

Schade, R., C. Staak, C. Hendriksen, M. Erhard, et al. 1996. The production of avian (egg yold) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA). 24:925-934.

Schaffner, W. 1980. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77:2163.

Schook, L.B. 1987. Monoclonal antibody production techniques and applications. Marcel Dekker, Inc., New York. 336 pp.

Scott, J.K., and G.P. Smith. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 249:386-90.

Selden, R.F., K. Burke-Howie, M.E. Rowe, H.M. Goodman, et al. 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Molecular and Cellular Biololgy*. 6:3173-3179.

- Shalaby, M.R., H.M. Shepard, L. Presta, M.L. Rodrigues, et al.** 1992. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med.* 175:217-25.
- 5 **Shigekawa, K., and W.J. Dower.** 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques.* 6:742-751.
- Shillito, R.** 1999. Methods of genetic transformations: Electroporation and polyethylene glycol treatment. In Molecular improvement of cereal crop. 1. Vasil, editor. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. 9-20.
- 10 **Shilo, B.Z., and R.A. Weinberg.** 1981. DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:6789-92.
- 15 **Shopes, B.** 1992. A genetically engineered human IgG mutant with enhanced cytolytic activity. *J Immunol.* 148:2918-22.
- Simonsen, C.C., and A.D. Levinson.** 1983. Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:2495-2499.
- 20 US Patent No. 5,272,057. Method of detecting a predisposition to cancer by the use of restriction fragment length polymorphism of the gene for human poly (ADP-ribose) polymerase. 1993.
- Southem, P.J., and P. Berg.** 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Gen.* 1:327-341.
- 25 **Sreekrishna, K., R.H. Potenz, J.A. Cruze, W.R. McCombie, et al.** 1988. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Basic Microbiol.* 28:265-78.
- 30 **Stein, C.A., and J.S. Cohen.** 1988. Oligodeoxynucleotides as inhibitors of gene expression: a review. *Cancer Res.* 48:2659-68.
- Stevenson, G.T., A. Pindar, and C.J. Slade.** 1989. A chimeric antibody with dual Fc regions (bisFabFc) prepared by manipulations at the IgG hinge. *Anticancer Drug Des.* 3:219-30.
- 35 **Suresh, M.R., A.C. Cuello, and C. Milstein.** 1986. Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. *Methods Enzymol.* 121:210-28.
- Thomas, K.R., and M.R. Capecchi.** 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 51:503-12.
- 40 **Thompson, J.A., and et. al.** 1995. Maize transformation utilizing silicon carbide whiskers: A review. *Euphytica.* 85:75-80.
- 45 **Tilburn, J., C. Scazzocchio, G.G. Taylor, J.H. Zabicky-Zissman, et al.** 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 26:205-21.
- Touraev, A., and et. al.** 1997. Plant male germ line transformation. *Plant J.* 12:949-956.
- 50 **Trautnecker, A., F. Oliveri, and K. Karjalainen.** 1991. Myeloma based expression system for production of large mammalian proteins. *Trends Biotechnol.* 9:109-13.
- Trick, H.N., and et. al.** 1997. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 3:9-26.
- 55 **Tuerk, C., and L. Gold.** 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 249:505-10.
- Turner, D.L., E.Y. Snyder, and C.L. Cepko.** 1990. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron.* 4:833-845.
- 60 **Tutt, A., G.T. Stevenson, and M.J. Glennie.** 1991. Trispecific F(ab')₃ derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. *J Immunol.* 147:60-9.
- van der **Krol, A.R., J.N. Mol, and A.R. Stuitje.** 1988b. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques.* 6:958-76.
- 65 van der **Krol, A.R., J.N. Mol, and A.R. Stuitje.** 1988a. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques.* 6:958-76.

Verhoeven, M., C. Milstein, and G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science*. 239:1534-6.

Vitetta, E.S., R.J. Fulton, R.D. May, M. Till, et al. 1987. Redesigning nature's poisons to create anti-tumor reagents. *Science*. 238:1098-104.

US Patent No. 4,873,191. Genetic transformation of zygotes. 1989.

Wells, J.A., M. Vasser, and D.B. Powers. 1985. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene*. 34:315-23.

Whitt, M.A., L. Buonocore, J.K. Rose, V. Ciccarone, et al. 1990. TransfectACE reagent promotes transient transfection frequencies greater than 90%. *Focus*. 13:8-12.

Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, and R. Axel. 1978. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell*. 14:725.

Williams, D.A., I.R. Lemischka, D.G. Nathan, and R.C. Mulligan. 1984. Introduction of a new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature*. 310:476-480.

Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind, et al. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385:810-3.

Wolff, E.A., G.J. Schreiber, W.L. Cosand, and H.V. Raff. 1993. Monoclonal antibody homodimers: enhanced anti-tumor activity in nude mice. *Cancer Res*. 53:2560-5.

Wong, G.T., B.J. Gavin, and A.P. McMahon. 1994. Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol*. 14:6278-86.

Wong, T.K., and E. Neumann. 1982. Electric field mediated gene transfer. Biochemical and Biophysical Research Communications. 107:584-587.

Wyborski, D.L., L.C. DuCoeur, and J.M. Short. 1996. Parameters affecting the use of the lac repressor system in eukaryotic cells and transgenic animals. *Environ Mol Mutagen*. 28:447-58.

Wyborski, D.L., and J.M. Short. 1991. Analysis of inducers of the *E. coli* lac repressor system in mammalian cells and whole animals. *Nucleic Acids Res*. 19:4647-53.

Yelton, M.M., J.E. Hamer, and W.E. Timberlake. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:1470-4.

Zervos, A.S., J. Gyuris, and R. Brent. 1993. Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell*. 72:223-32.

Zhou, G., and et. al. 1983. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods Enzymol*. 101:433-481.

Zoller, M.J., and M. Smith. 1987. Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods Enzymol*. 154:329-50.

Zon, G. 1988. Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. *Pharm Res*. 5:539-49.

Zuckermann, R.N., E.J. Martin, D.C. Spellmeyer, G.B. Stauber, et al. 1994. Discovery of nanomolar ligands for 7-transmembrane G-protein-coupled receptors from a diverse N-(substituted)glycine peptoid library. *J Med Chem*. 37:2678-85.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con respecto a la secuencia de los SEQ ID NOS: 6 u 8, en el que dicho polipéptido es un polipéptido WUP activo (*Wnt1 UPregulated*) (Regulado por incremento por *Wnt1*).
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con respecto a la secuencia de los SEQ ID NOS: 6 u 8.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos el 98% con respecto a la secuencia de los SEQ ID NOS: 6 u 8.
4. Un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos de la Tabla 6 (SEQ ID NO: 39), que corresponde a los aminoácidos 51 - 126 del SEQ ID NO: 6.
5. Un polipéptido quimérico aislado que comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con respecto a la secuencia de los SEQ ID NOS: 6 u 8, fusionada a un polipéptido distinto de WUP seleccionado entre el grupo que consiste en glutathione-S-transferasa, una proteína inmunoglobulina o sus fragmentos, hormona de crecimiento humana, β -glucuronidasa, proteína fluorescente verde, luciferasa, cloranfenicol-acetil-transferasa, β -galactosidasa y fosfatasa alcalina secretada.
6. Un polipéptido aislado que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, o un complemento de dicho polinucleótido.
7. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con respecto a la secuencia del SEQ ID NO: 5 o una identidad de secuencia de al menos el 80% con respecto a la secuencia del SEQ ID NO: 7, o un complemento de dicho polinucleótido.
8. El polinucleótido de la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de nucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos el 98% con respecto a la secuencia de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, o un complemento de dicho polinucleótido.
9. Un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5.
10. Un método para determinar si un compuesto regula por incremento o regula por disminución la transcripción de un gen que comprende el SEQ ID NO: 5 ó 7, que comprende: poner dicho compuesto en contacto con una composición que comprende una RNA-polimerasa y dicho gen, y medir la cantidad de polinucleótido que corresponde a un mRNA de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, y medir la cantidad de transcripción del gen.
11. Un método para determinar si un compuesto regula por incremento o regula por disminución la traducción de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, que comprende: poner dicho compuesto en contacto con una composición que comprende un ribosoma y un polinucleótido que corresponde a un mRNA de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, y medir la cantidad de traducción del gen.
12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que dicha composición está en una célula.
13. Un vector, que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos de las reivindicaciones 6 - 8.
14. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 13.
15. Un método para escrutar una muestra de tejido con respecto a su potencial tumorigénico, que comprende: medir la expresión de un polinucleótido que comprende el SEQ ID NO: 5 ó 7 en dicha muestra de tejido.
16. El método de la reivindicación 15, en el que dicho medir se refiere a medir una cantidad de mRNA que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6 u 8.
17. Un animal transgénico no humano, que posee al menos uno de los genes de WUP alterados que comprende el SEQ ID NO: 5 ó 7.
18. El animal transgénico no humano de la reivindicación 17, en el que el animal no humano es un ratón.
19. Un animal transgénico no humano, que comprende un polinucleótido exógeno que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con respecto a la secuencia de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, o un complemento de dicho polinucleótido.
20. El animal transgénico no humano de la reivindicación 19, en el que dicho polinucleótido exógeno tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con respecto a la secuencia de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, o un complemento

de dicho polinucleótido, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 98% con respecto a la secuencia de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, o un complemento de dicho polinucleótido.

21. Un método *in vitro* para escrutar una muestra con respecto a una mutación en el gen de WUP, que comprende:
5 detectar la expresión de una secuencia de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8; y comparar una secuencia de polinucleótidos WUP de la muestra con una secuencia de polinucleótidos de los SEQ ID NOS: 5 ó 7, para identificar una mutación en el gen de WUP.

22. Un método para determinar el estadio clínico de un tumor, que comprende comparar la expresión de un polinucleótido WUP de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8 en una muestra, con la expresión de los SEQ ID NOS: 5 ó 7 en muestras de control.

23. Un método para detectar un polipéptido regulado por incremento por Wnt1 en una muestra biológica, que comprende:

- 15 a) detectar la expresión del polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8 en una muestra biológica; y
- b) comparar la expresión de ese polinucleótido con la de una muestra de control para determinar si la expresión del polinucleótido está regulada por incremento.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 21 - 23, en el que la expresión del polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8 se detecta con una sonda de ácido nucleico que se une al polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8 en condiciones de rigurosidad.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 21 - 23, en el que la expresión del polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8 se detecta con al menos uno de los oligonucleótidos que pueden amplificar el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 22 - 23, en el que la expresión del polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8 se detecta con un anticuerpo de la reivindicación 9.

27. El método de la reivindicación 26, en el que el anticuerpo está marcado de manera detectable.

28. El método de la reivindicación 27, en el que el marcador es un resto radioactivo o un resto fluorescente.

29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 21 - 28, en el que la muestra procede de un tumor.

30. Un kit para detectar una regulación por incremento de un polipéptido regulado por incremento por Wnt-1, que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8 o un complemento de dicho polinucleótido, o un anticuerpo según la reivindicación 9, para detectar la expresión del polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8 en una muestra biológica.

31. El kit de la reivindicación 30, en el que el polinucleótido, o un complemento de dicho polinucleótido, puede hacer de cebador para amplificar el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8.

32. El kit de la reivindicación 30, en el que el anticuerpo está marcado de manera detectable.

33. El kit de la reivindicación 32, en el que el anticuerpo está marcado con un resto radioactivo o fluorescente.

34. Un polipéptido aislado según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6 u 8.

FIGURA 1

Análisis BLOCKS de dominios de proteínas de 87769892

Tamaño de las sondas: 76 aminoácidos

Archivo de sondas: irastelliblocks.seq

Fichero(s) diana: blocks.dat

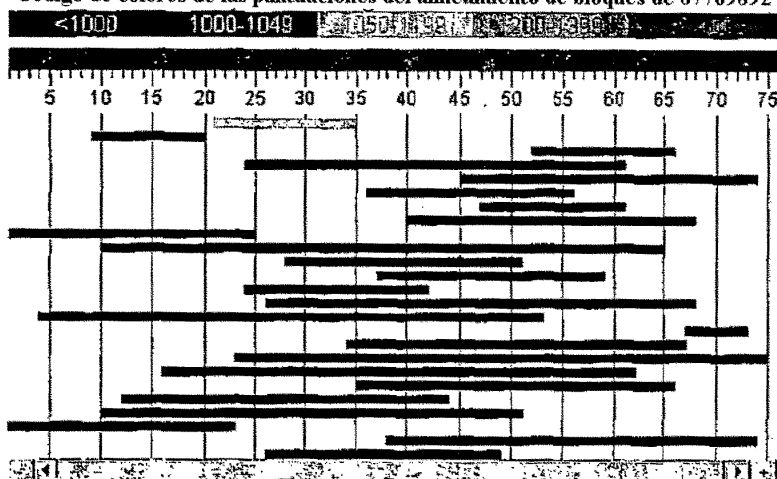
Archivos inspeccionados: 4034

Puntuaciones realizadas: 4034

Alineamientos realizados: 422518

BL50007D - Puntuación=981, Fosfolipasa X específica de fosfatidilinositol URL: BL 50007D

Código de colores de las puntuaciones del alineamiento de bloques de 87769892



AC#	Descripción	Fuerza	Puntuación	RF	AS#
EL00134C	0 Serina-proteasas, familia de la tripsina, histidina-proteinas	1245	1054	0	21 PPTVPLVSTPSTI
EL01121C	0 Carboxilsterasas de tipo B, serina-proteinas	1254	1012	0	4 PULLVSTPSTI
EL00201C	0 Proteinas factores de alargamiento de unión a GTP	1090	1000	0	52 NFKKAKKGLPTK
EL00567C	0 Aldehído deshidrogenasas ácido glutámico-proteinas	1255	984	0	14 VFLNPTVYI rIaPQdAI QGSHDTRGKXZKt aDmE
EL00637A	0 Sitio de unión a AMP de la DNA-ligasa dependiente de ATP	1256	974	0	45 DTrKqKbNtKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL00607A	0 Proteinas cobre/zinc-superóxido-dismutasas	1196	970	0	35 PQCAI qESMDTRGKXZKt
EL00537B	0 Aminotransferasas clase- fosfato de piridoxal	1085	955	0	47 KKKKUNP KADbC
EL01111C	0 Proteinas de la familia de las glicoproteinas	1555	987	0	40 I qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL00637B	0 Proteinas de bromodominios	1302	965	0	0 mCtiPcIUI PULLVSTPSTI
EL00267C	0 Hidroxilación de aminoácidos aromáticos dependiente de proteína	1563	964	0	10 vLLNlyKdKfI qPyIyPSTPSTI rIaPQdAI QGSHDTRGKXZKt aDmE
EL00637C	0 Proteinas glucosa-6-fosfato-deshidrogenasas	1442	963	0	28 SpPv/ElwPQdAI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL01107C	0 Proteinas L27E de las proteínas ribosómicas	1563	963	0	37 KQdAI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL00637D	0 Proteina chaperona de ensamblaje de pilis de bacterias Gram negativas	1216	963	0	24 YPLVSPFVSRKAI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL50007D	0 Fosfolipasa x específica de fosfatidilinositol	1798	963	0	25 IwPSTPSTI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL01111D	0 Proteinas piruvato-quinasas	1870	960	0	4 PCTVSPFVSRKAI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL00637E	0 Dihidroxiácidos y 6-fosfogluconato deshidra.	1146	957	0	67 t-LCK
EL00537A	0 Proteinas 34e de las proteínas ribosómicas	1544	956	0	24 IwPSTPSTI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL01107D	0 Proteina de la familia UPT036 de proteínas no caracterizadas	1554	956	0	22 IyPSTPSTI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL00537B	0 Proteinas despolimerizantes de actina	1512	954	0	16 KdLTPyIyPSTPSTI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL00537C	0 Proteina amiloide A de suero	1511	953	0	25 vPSTPSTI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL01107E	0 Familia BCCT de proteínas transportadoras	1519	953	0	12 IwPSTPSTI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL00537D	0 Proteinas L11 de las proteínas ribosómicas	1442	952	0	10 VLLNlyKdKfI qPyIyPSTPSTI rIaPQdAI QGSHDTRGKXZKt aDmE
EL00115L	0 Heptapéptido repetido de la RNA-polimerasa II de eucariotas	1782	951	0	7 mCtiPcIUI PULLVSTPSTI
EL00637F	0 Proteinas L14 de las proteínas ribosómicas	1543	949	0	28 KdLTPyIyPSTPSTI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK
EL00296A	0 Inmunoglobulinas y Complejo principal de histocompatibilidad	1245	945	0	26 IwPSTPSTI qCnDtrKqGdHngLPKGPtLcDCK

ES 2 298 226 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> *Genentech, Inc.*
CuraGen Corporation

5

<120> POLIPÉPTIDOS NUEVOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS QUE LOS CODIFICAN

<130> 11669.210EPWO

10

<140> PCT/US01/09600

<141> 22-03-2001

15

<150> US 60/191.258

<151> 22-03-2000

<160> 39

20

<170> *PatentIn* versión 3.3

<210> 1

25

<211> 1.066

<212> DNA

<213> *Murine sp.*

30

<400> 1

```

cccaggcgctc ttggtggtgg tgagtgaggt ttagggagct ggggctcgcg cagcgggtgtc      60
tgccagcgga ctgttcggcg gcttgacgtc cccagacgct gtgcttgagc cgggtgcaccc      120
35 caggaattag gtagcctgct tgccttgcac ttctgcaccg ctctccgtcc gtggacctcg      180
gtgtccccctc cttgtttctc tcgcggcttt cctccctttg gaccggcacg tgtcggagct      240
40 ccaacctggg acaatggtgt gcattccttg cattgtcatt ccagtcctgc tctggatctt      300
caaaaagtcc ctggagccat acatataccc tgtggtcagt cgcataatggc ctaaaaaagc      360
cgtccagcaa tccggcgata agaatatgag caaggtagac tgcaagggtg caggtactaa      420
45 tggattaccc acaaaaggac caacagaagt ctccgataaa aagaaagact agtgtgggtc      480
tcctgaagge ccttggtgtg ttgcaaatgg acctaatgat atgaagcctt ctttgtctct      540
50 gacctttttt ctctgagacc aggaatctag ataatatgtt agcttctgcc tgatactgat      600
ccgggagcac atgatattta tatttaaaa tccagtagtt atatttaaga tctcaccct      660
gagtttcttt ttcatataag tagctttcat ttctattatt ccaatttact gatatgaaca      720
55 aatagaaggt ccgtgtgagc agacgctcag aacagagccc ttggcccttc gagttctttc      780
ttacgagttt gccgttctca cttctgtggg ctccataacc ttgagtggga tgagtcttag      840
60 tgggaaacag tgccgtccga ggtgggatgc gatgagaaga tgtgatcact gcaggcgag      900
cggcgagtgg acagctggcc gagaccagct ccaaggcagc tggagaagga aggacgggag      960
cttccttgaa aaatgtaacc tggacatcgt tgtcaatccc acaaccctg actctctgtg      1020
65 cttctagtcc tgacggtgta ttaaactgtc atttaacttg tgaaaa      1066

```

ES 2 298 226 T3

<210> 2
 <211> 113
 <212> PRT
 5 <213> Especie murina

 <400> 2
 10 **Val Ala Cys Leu Pro Cys Ile Ser Ala Pro Leu Ser Val Arg Gly Pro**
 1 5 10 15

 Arg Cys Pro Leu Leu Val Ser Leu Ala Ala Phe Leu Pro Leu Asp Arg
 15 **20 25 30**

 His Val Ser Glu Leu Gln Pro Gly Thr Met Val Cys Ile Pro Cys Ile
 20 **35 40 45**

 Val Ile Pro Val Leu Leu Trp Ile Phe Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr
 25 **50 55 60**

 Ile Tyr Pro Val Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Val Gln Gln
 65 70 75 80
 30
 Ser Gly Asp Lys Asn Met Ser Lys Val Asp Cys Lys Gly Ala Gly Thr
 85 90 95
 35
 Asn Gly Leu Pro Thr Lys Gly Pro Thr Glu Val Ser Asp Lys Lys Lys
 100 105 110
 40 **Asp**

 <210> 3
 <211> 955
 45 <212> DNA
 <213> Especie de Múridos

 <220>
 50 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(3)
 <223> n es a, c, g, o t
 55 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(7)
 60 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica miscelánea
 65 <222> (48)..(48)
 <223> n es a, c, g, o t

ES 2 298 226 T3

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (128)..(128)

5 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica miscelánea

10 <222> (268)..(268)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

15 <221> característica miscelánea

<222> (801)..(801)

<223> n es a, c, g, o t

20

<400> 3

	nnngtgngtg aggtttaggg agctggggct cgcgcagcgg gtgtctgnca gcggagctgt	60
25	tcggcggtctt gacgtcccca gacgctgtgc gttgagccgg tgcaccccag gaattagtgt	120
	cggagctnca acctgggaca atgggtgtgca ttccttgcat tgtcattcca gtcctgctct	180
30	ggatcttcaa aaagtctctg gagccataca tataccctgt ggtcagtcgc atatggccta	240
	aaaaagccgt ccagcaatcc ggcgatanga atatgagcaa ggtagactgc aagggtgcag	300
	gtactaatgg attaccacaa aaaggaccaa cagaagtctc ggataaaaag aaagactagt	360
35	gtgggtctcc tgaaggccct tggctgtttg caaatggacc taatgatatg aagccttctt	420
	tgtctctgac cttttttctc tgagaccagg aatctagata atagtttagc ttctgcctga	480
40	tactgatccg ggagcacatg atatttatat ttaaaattcc agtagttata tttaatgatc	540
	tcacccctga gtttcttttt cattaaagta gctttcattt ctattattcc aatttactga	600
	tatgaacaaa tagaagggtc gtgtgagcag acgctcagaa cagagccctt ggcccttcga	660
45	gttctttctt acgagtttgc cgttctcact tctgtgggct cctatacctt gagtgggatg	720
	agtcttagtg ggaaacagtg ccgtccgagg tgggatgcga tgagaagatg tgatcactgc	780
50	aggcgcagcg gcgagtggac ngctggccga gaccagctcc aaggcagctg gagaaggaag	840
	gacgggagct tccttgaaaa atgtaacctg gacatcgttg tcaatcccac aacccttgac	900
	tctctgtgct tctagtctg acggtgtatt aaacgtccat ttaacttggt gaaaa	955

55

<210> 4

<211> 87

<212> PRT

60

<213> Especie de Múridos

<220>

65 <221> característica miscelánea

<222> (58)..(58)

<223> Xaa puede ser cualquiera de los aminoácidos presentes en la naturaleza

ES 2 298 226 T3

<400> 4

5	Ala	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Met	
	1				5					10					15		
	Val	Cys	Ile	Pro	Cys	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Trp	Ile	Phe	Lys	
				20					25					30			
10	Lys	Phe	Leu	Glu	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Val	Val	Ser	Arg	Ile	Trp	Pro	
			35					40					45				
15	Lys	Lys	Ala	Val	Gln	Gln	Ser	Gly	Asp	Xaa	Asn	Met	Ser	Lys	Val	Asp	
		50					55					60					
20	Cys	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Gly	Leu	Pro	Thr	Lys	Gly	Pro	Thr	Glu	
	65					70					75					80	
	Val	Ser	Asp	Lys	Lys	Lys	Asp										
						85											

<210> 5

<211> 1.099

<212> DNA

30 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> característica miscelánea

35 <222> (64)..(64)

<223> n es a, c, g o t

<400> 5

40	ggctttttag	ctgctccgca	gccagcccg	ggcgcgctcg	cagagtccta	ggcggtgcgc	60
45	ggcntcctgc	ctcctccctc	ctcggcggtc	gcggcccgcg	cctccgcggt	gcctgccttc	120
	gctctcaggt	tgaggagctc	aagcttgga	aaatgggtgtg	cattccttgt	atcgtcattc	180
	cagttctgct	ctggatctac	aaaaaattcc	tggagccata	tatataccct	ctggtttccc	240
50	ccttcggttag	tcgtatatgg	cctaagaaaag	caatacaaga	atccaatgat	acaaacaaag	300
	gcaaagtaaa	ctttaagggt	gcagacatga	atggattacc	aacaaaagga	ccaacagaaa	360
55	tctgtgataa	aaagaaagac	taaagaaatt	ttcctaaagg	accccatcat	ttaaaaaatg	420
	gacctgataa	tatgaagcat	cttccttgta	attgtctctg	acctttttat	ctgagaccgg	480
	aattcaggat	aggagtctag	atattttacct	gataactaatc	aggaaatata	tgatatccgt	540
60	atttaaaatg	tagttagtta	tatttaatga	cctcattcct	aagttccttt	ttcgttaatg	600
	tagctttcat	ttctgttatt	gctgtttgaa	taatatgatt	aaatagaagg	tttgtgccag	660
65	tagacattat	gttactaaat	cagcacttta	aaatcctttgg	ttctctaatt	catatgaatt	720

ES 2 298 226 T3

	tgctgtttgc	tctaatttct	ttgggctctt	ctaatttgag	tggagtacaa	ttttgttgtg	780
	aaacagtc	ca gtgaaactgt	gcaggga	aat gaaggtagaa	ttttgggagg	taataatgat	840
5	gtgaaacata	aagattt	aat aattactgtc	caacacagt	g gacagcttg	tccacaaata	900
	tagtaattac	tatttattgc	tctaaggaag	attaaaaaaa	gatagggaaa	aggggggaaac	960
10	ttctttgaaa	aatgaaacat	ctgttacatt	aatgtctaat	tataaaattt	taatccttac	1020
	tgcatttctt	ctgttcctac	aaatgtatta	aacattcagt	ttaactggta	aaaaaaaaaa	1080
	aaaaaaaacc	cc gggggggggg					1099

<210> 6

<211> 126

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

 $\langle 220 \rangle$

25 <221> característica miscelánea

<222> (21)..(21)

<223> Xaa puede ser cualquiera de los aminoácidos presentes en la naturaleza

30 $\langle 400 \rangle$ 6

Leu Cys Ser Cys Ser Ala Ala Gln Pro Gly Arg Ala Arg Arg Val Leu
1 5 10 15

Gly Gly Ala Arg Xaa Pro Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Gly Pro
20 25 30

Arg Leu Arg Gly Ala Cys Leu Arg Ser Gln Val Glu Glu Leu Lys Leu
35 40 45

Gly Lys Met Val Cys Ile Pro Cys Ile Val Ile Pro Val Leu Leu Trp
50 55 60

Ile Tyr Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr Ile Tyr Pro Leu Val Ser Pro
65 70 75 80

Phe Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gln Glu Ser Asn Asp
85 90 95

Thr Asn Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys Gly Ala Asp Met Asn Gly Leu
100 105 110

Pro Thr Lys Gly Pro Thr Glu Ile Cys Asp Lys Lys Lys Asp
115 120 125

ES 2 298 226 T3

<210> 7

<211> 1.113

<212> DNA

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

```

10      gtgagtgatgc ccgggctagc ggcctggggtt gggctttgta gctgctccgc ggcccagccc      60
      gggcgcgctc gcagagtcct aggcgggtgcg cggcctcctg cctcctccct cctcggcggt      120
15      cgcgggcccg cggcctccgc ggtgcctgcc ttcgctctca ggttgaggag ctcaagcttg      180
      ggaaaatggt gtgcattcct tgtatcgtca ttccagttct gctctggatc tacaaaaaat      240
      tcctggagcc atatataac cctctggttt ccccttcctg tagtcgtata tggcctaaga      300
20      aagcaatata agaatccaat gatacaaaac aaggcaaagt aaactttaag ggtgcagaca      360
      tgaatggatt accaacaata ggaccaacag aaatctgtga taaaagaaa gactaaagaa      420
25      attttcctaa aggaccccat catttaaaaa atggacctga taatatgaag catcttcctt      480
      gtaattgtct ctgacctttt tatctgagac cggaattcag gataggagtc tagatattta      540
30      cctgatacta atcaggaaat atatgatatc cgtatttaaa atgtagttag ttatatattaa      600
      tgacctcatt cctaagttcc ttttctgta atgtagcttt catttctggt attgctgttt      660
      gaataatatg attaaataga aggtttgtgc cagtagacat tatgttacta aatcagcact      720
35      ttaaaatctt tgggtctcta attcatatga atttgctggt tgctctaatt tctttgggct      780
      cttctaattt gagtggagta caattttggt gtgaaacagt ccagtgaac tgtgcagggg      840
40      aatgaaggta gaattttggg aggtataaat gatgtgaaac ataaagattt aataattact      900
      gtccaacaca gtggagcagc ttgtccacaa atatagtaat tactatttat tgctctaagg      960
45      aagattaaaa aaagataggg aaaaggggga aacttctttg aaaaatgaaa catctgttac      1020
      attaatgtct aattataaaa ttttaatcct tactgcattt cttctgttcc tacaaatgta      1080
      ttaaaccattc agtttaaaaa aaaaaaaaaa aaa      1113

```

50

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

55 <213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 298 226 T3

<400> 8

```

5      Leu Leu Arg Gly Pro Ala Arg Ala Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Cys
      1              5              10              15

10     Ala Ala Ser Cys Leu Leu Pro Pro Arg Arg Ser Arg Pro Ala Gly Leu
      20              25              30

15     Arg Gly Ala Cys Leu Arg Ser Gln Val Glu Glu Leu Lys Leu Gly Lys
      35              40              45

20     Met Val Cys Ile Pro Cys Ile Val Ile Pro Val Leu Leu Trp Ile Tyr
      50              55              60

25     Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr Ile Tyr Pro Leu Val Ser Pro Phe Val
      65              70              75              80

30     Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gln Glu Ser Asn Asp Thr Asn
      85              90              95

35     Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys Gly Ala Asp Met Asn Gly Leu Pro Thr
      100             105             110

40     Lys Gly Pro Thr Glu Ile Cys Asp Lys Lys Lys Asp
      115             120

```

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> *Rattus sp.*

ES 2 298 226 T3

<400> 9

5 Ala Trp Ala Ser Trp Trp Trp Arg Val Thr Leu Ala Ala Val Val Ser
1 5 10 15

10 Gly Leu Thr Ser Pro Asp Ala Val Arg Cys Ala Gly Ile Pro Gln Glu
20 25 30

Leu Val Ser Glu Ile Gln Arg Gly Thr Met Val Cys Ile Pro Cys Ile
15 35 40 45

Val Ile Pro Val Leu Leu Trp Ile Phe Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr
50 55 60

Ile Tyr Pro Val Val Ser Arg Ile Trp Pro Arg Lys Ala Val Gln Gln
65 70 75 80

Leu Asp Asn Arg Asn Thr Gly Lys Val Asp Cys Lys Gly Ala Asp Thr
85 90 95

Asn Gly Phe Ser Thr Lys Gly Pro Thr Glu Val Ser Asp Lys Lys Lys
100 105 110

Asp

40 $\langle 210 \rangle$ 10

<211> 80

<212> PRT

45 <213> *Oryctolagus* sp.

 $\langle 220 \rangle$

<221> característica miscelánea

50 $\langle 222 \rangle$ (28)..(28)

<223> Xaa puede ser cualquiera de los aminoácidos presentes en la naturaleza.

 $\langle 220 \rangle$

55 <221> característica miscelánea

$\langle 222 \rangle$ (38)..(38)

<223> Xaa puede ser cualquiera de los aminoácidos presentes en la naturaleza

60

65

ES 2 298 226 T3

<400> 10

```

5      Glu Leu Lys Ala Gly Thr Met Val Cys Ile Pro Cys Ile Val Ile Pro
      1          5          10          15

10     Ile Leu Leu Trp Ile Tyr Lys Lys Phe Leu Glu Xaa Tyr Ile Tyr Pro
      20          25          30

15     Leu Ile Ser Pro Phe Xaa Ser Arg Ile Trp Pro Arg Lys Ala Val Gln
      35          40          45

20     Glu Ser Ser Asp Asn Gly Arg Val Asp Cys Lys Gly Thr Asp Thr Asn
      50          55          60

25     Gly Leu Pro Thr Lys Gly Pro Thr Glu Ile Pro Asp Lys Lys Lys Asp
      65          70          75          80

```

<210> 11

<211> 70

30 <212> PRT

<213> *Osteichthyes sp.*

<400> 11

```

35     Phe Gln Pro Thr Arg Pro Val Gly Pro Lys Lys Phe Trp Ile Val Cys
      1          5          10          15

40     Ser Ile Pro Val Thr Thr Met Val Cys Ile Pro Cys Ile Val Ile Pro
      20          25          30

45     Phe Val Leu Trp Phe Tyr His Lys Tyr Leu Gln Pro Ile Leu Tyr Pro
      35          40          45

50     Ile Ile Ser Lys Phe Trp Thr Pro Lys Ala Val Glu Ala Asn Gly Thr
      50          55          60

55     Ser Lys Phe Phe Phe Phe
      65          70

```

<210> 12

<211> 99

<212> PRT

65 <213> *Drosophila sp.*

ES 2 298 226 T3

<400> 12

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

<210> 13

<211> 87

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> AA966965

<400> 13

45	Ala	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Met
	1				5					10					15	
50	Val	Cys	Ile	Pro	Cys	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Trp	Ile	Phe	Lys
				20					25					30		
55	Lys	Phe	Leu	Glu	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Val	Val	Ser	Arg	Ile	Trp	Pro
			35					40					45			
60	Lys	Lys	Ala	Val	Gln	Gln	Ser	Gly	Asp	Lys	Asn	Met	Ser	Lys	Val	Asp
		50					55					60				
65	Cys	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Gly	Leu	Pro	Thr	Lys	Gly	Pro	Thr	Glu
	65					70					75					80
	Val	Ser	Asp	Lys	Lys	Lys	Asp									
					85											

ES 2 298 226 T3

<210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido ilustrativo
 10
 <400> 14

 Pro Tyr Ile Tyr Pro Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile
 1 5 10
 15

 <210> 15
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Péptido ilustrativo

 <400> 15

 Pro Val Leu Leu Trp Ile Tyr Lys Lys Phe Leu
 1 5 10
 30

 <210> 16
 35 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Péptido ilustrativo

 <400> 16
 45
 Asn Phe Lys Gly Ala Asp Met Asn Gly Leu Pro Thr Lys Gly
 1 5 10

 50 <210> 17
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido ilustrativo
 60

 65

ES 2 298 226 T3

<400> 17

Tyr Pro Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala
5 1 5 10 15

Ile Gln Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys Gly
10 20 25 30

Ala Asp Met Asn Gly
15 35

<210> 18

<211> 29

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

25 <223> Péptido ilustrativo

<400> 18

30 Asp Thr Asn Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys Gly Ala Asp Met Asn Gly
 1 5 10 15

35 Leu Pro Thr Lys Gly Pro Thr Glu Ile Cys Asp Lys Lys
 20 25

<210> 19

 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Péptido ilustrativo

<400> 19

50 Pro Lys Lys Ala Ile Gly Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys Val
 1 5 10 15

Asn Phe Lys Gly
20

 $\langle 210 \rangle$ 20

60 $\langle 211 \rangle$ 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 $\langle 220 \rangle$

<223> Péptido ilustrativo

ES 2 298 226 T3

<400> 20

Asn Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys Gly Ala Asp Met Asn Gly
1 5 10

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido ilustrativo

<400> 21

Ile Gly Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys Gly
1 5 10 15

Ala Asp Met Asn Gly Leu Pro Thr Lys Gly Pro Thr
20 25

<210> 22

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido ilustrativo

<400> 22

Met Val Cys Ile Pro Cys Ile Val Ile Pro Val Leu Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr Ile Tyr
20 25

<210> 23

<211> 55

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido ilustrativo

ES 2 298 226 T3

<400> 23

Val Leu Leu Trp Ile Tyr Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr Ile Tyr Pro
1 5 10 15

Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gln
20 25 30

Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys Gly Ala Asp
35 40 45

Met Asn Gly Leu Pro Thr Lys
50 55

<210> 24

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido ilustrativo

<400> 24

Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gln Glu Ser
1 5 10 15

Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys
20

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido ilustrativo

<400> 25

Lys Lys Ala Ile Gly Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys Val Asn
1 5 10 15

Phe Lys Gly Ala Asp Met
20

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 298 226 T3

<220>

<223> Péptido ilustrativo

5 <400> 26

Tyr Pro Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala
1 5 10 15

10

Ile Gln

<210> 27

15 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido ilustrativo

<400> 27

25 **Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gly**
1 5 10 15

30

Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys Gly Ala Asp
20 25 30

35

Met Asn Gly Leu Pro Thr Lys Gly Pro Thr
35 40

<210> 28

<211> 49

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Péptido ilustrativo

<400> 28

50 **Pro Cys Ile Val Ile Pro Val Leu Leu Trp Ile Tyr Lys Lys Phe Leu**
1 5 10 15

55

Glu Pro Tyr Ile Tyr Pro Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile Trp
20 25 30

60

Pro Lys Lys Ala Ile Gly Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys Val
35 40 45

Asn

65

<210> 29

<211> 6

ES 2 298 226 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido ilustrativo
 <400> 29
 10 Thr Glu Ile Cys Asp Lys
 1 5
 <210> 30
 15 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Péptido ilustrativo
 25 <400> 30
 Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gly Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly
 1 5 10 15
 30 Lys Val Asn Phe Lys Gly Ala Asp Met Asn Gly Leu Pro Thr Lys Gly
 20 25 30
 35 Pro
 <210> 31
 40 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Péptido ilustrativo
 <400> 31
 50 Ile Tyr Pro Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys
 1 5 10 15
 55 Ala Ile Gly Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys
 20 25 30
 60 Gly Ala Asp Met Asn Gly Leu Pro Thr Lys Gly Pro Thr Glu Ile Cys
 35 40 45
 65 Asp Lys Lys Lys
 50

ES 2 298 226 T3

<210> 32

<211> 46

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Péptido ilustrativo

10

<400> 32

Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr Ile Tyr Pro Leu Val Ser Pro Phe Val
1 5 10 15

15

Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gly Glu Ser Asn Asp Thr Asn
20 25 30

20

Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys Gly Ala Asp Met Asn Gly Leu
35 40 45

25

<210> 33

<211> 31

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Péptido ilustrativo

35

<400> 33

Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gln Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys
1 5 10 15

40

Val Asn Phe Lys Gly Ala Asp Met Asn Gly Leu Pro Thr Lys Gly
20 25 30

45

<210> 34

<211> 32

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Péptido ilustrativo

55

<400> 34

Leu Trp Ile Tyr Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr Ile Tyr Pro Ile Val
1 5 10 15

60

Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gly Glu Ser
20 25 30

65

<210> 35

<211> 41

ES 2 298 226 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido ilustrativo

<400> 35

10 Val Leu Leu Trp Ile Tyr Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr Ile Tyr Pro
1 5 10 15

15 Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gly
20 25 30

20 Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys
35 40

<210> 36

<211> 25

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido ilustrativo

<400> 36

35 Met Val Cys Ile Pro Cys Ile Val Ile Pro Val Leu Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

40 Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr Ile Tyr
20 25

<210> 37

<211> 36

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Péptido ilustrativo

<400> 37

55 Lys Ala Ile Gln Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys Gly Lys Val Asn Phe
1 5 10 15

60 Lys Gly Ala Asp Met Asn Gly Leu Pro Thr Lys Gly Pro Thr Glu Ile
20 25 30

65 Cys Asp Lys Lys
35

ES 2 298 226 T3

<210> 38

<211> 23

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Péptido ilustrativo

10

<400> 38

15

Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gly
1 5 10 15

20

Glu Ser Asn Asp Thr Asn Lys
20

<210> 39

<211> 76

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

 $\langle 220 \rangle$

<223> Péptido ilustrativo

30 <400> 39

Met Val Cys Ile Pro Cys Ile Val Ile Pro Val Leu Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

35

Lys Lys Phe Leu Glu Pro Tyr Ile Tyr Pro Leu Val Ser Pro Phe Val
20 25 30

40

Ser Arg Ile Trp Pro Lys Lys Ala Ile Gln Glu Ser Asn Asp Thr Asn
35 40 45

45

Lys Gly Lys Val Asn Phe Lys Gly Ala Asp Met Asn Gly Leu Pro Thr
50 55 60

50

Lys Gly Pro Thr Glu Ile Cys Asp Lys Lys Lys Asp
65 70 75

55

60

65