



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 458**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01921282 .8**
86 Fecha de presentación : **20.02.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1257573**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.11.2002**

54 Título: **Nuevo factor de transcripción CARP-2.**

30 Prioridad: **23.02.2000 EP 00103790**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **Merck Patent GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es: **Kluxen, Franz-Werner**

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

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo factor de transcripción CARP-2.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a polipéptidos y polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, recientemente identificados, referidos a veces de aquí en adelante como “nuevo Factor de Transcripción (CARP-2)”, a su uso en diagnóstico y en la identificación de compuestos que pueden ser agonistas, antagonistas que son potencialmente útiles en terapia, y a la producción de dichos polipéptidos y polinucleótidos.

Antecedentes de la invención

El proceso de descubrimiento de fármacos está experimentando actualmente una revolución fundamental dado que abarca “genómica funcional”, es decir, biología de base genómica o génica de alto rendimiento. Esta técnica, como medio para identificar genes y productos génicos como dianas terapéuticas, está superando rápidamente a las técnicas basadas en la “clonación posicional”. Un fenotipo, es decir una función biológica o enfermedad genética, puede ser identificado y seguirse sus pasos hacia el gen responsable, tomando como base su posición en el mapa genético.

La genómica funcional está basada fundamentalmente en tecnologías de secuenciación de DNA de alto rendimiento y en las diversas herramientas de la bioinformática para identificar secuencias génicas de potencial interés a partir de las muchas bases de datos de biología molecular actualmente disponibles. Continúa existiendo la necesidad de identificar y caracterizar otros genes y sus polipéptidos/proteínas relacionados, como dianas para el descubrimiento de fármacos.

25 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a CARP-2, en particular polipéptidos CARP-2 y polinucleótidos CARP-2, a materiales recombinantes y a métodos para su producción. Dichos polipéptidos y polinucleótidos son de interés en relación con métodos de tratamiento de ciertas enfermedades, incluyendo, pero no de forma limitativa, fallo cardíaco agudo y crónico de diferentes etiologías, infarto de miocardio, hipertrofia cardíaca, arritmia, miocarditis, hipertensión pulmonar, cardiotoxicidad (por ejemplo, inducida por quimioterapia), enfermedad coronaria del corazón. El fallo cardíaco agudo y crónico de diferentes etiologías, el infarto de miocardio, la hipertrofia cardíaca, la arritmia, la miocarditis, la hipertensión pulmonar, la cardiotoxicidad (por ejemplo, inducida por quimioterapia), la enfermedad coronaria del corazón, serán referidas de aquí en adelante como las “enfermedades de la invención”. En otro aspecto, la invención se refiere a métodos para identificar agonistas y antagonistas (por ejemplo, inhibidores) empleando los materiales aportados por la invención, y para el tratamiento de estados asociados con el desequilibrio de CARP-2 con los compuestos identificados. En otro aspecto más, la invención se refiere a ensayos de diagnóstico para detectar enfermedades asociadas con una actividad o niveles inadecuados de CARP-2.

40 Descripción de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos CARP-2. Dichos polipéptidos incluyen:

Un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1;

Una identidad de 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 2;

Un polipéptido que comprende la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 2.

Se cree que los polipéptidos de la presente invención son miembros de la familia de polipéptidos de Factores de Transcripción de Repeticiones de Anquirina Cardíacos. Por tanto, los mismos son de interés debido a que CARP-2 es un miembro de la familia de proteínas que comprenden repeticiones de anquirina que están involucradas en la interacción proteína-proteína. El homólogo más cercano, CARP, es un factor de transcripción conocido, cuya expresión está restringida a células de corazón, músculo esquelético y endoteliales.

Las propiedades biológicas de CARP-2 son referidas de aquí en adelante como “actividad biológica de CARP-2” o “actividad de CARP-2”. Con preferencia, un polipéptido de la presente invención exhibe al menos una actividad biológica de CARP-2.

Los polipéptidos de la presente invención también incluyen variantes de los polipéptidos antes mencionados, incluyendo todas las formas alélicas y variantes de empalme. Dichos polipéptidos varían respecto del polipéptido de referencia en cuanto a inserciones, deleciones y sustituciones que pueden ser conservadoras o no conservadoras, o cualquier combinación de las mismas. Variantes particularmente preferidas son aquellas en donde varios, por ejemplo de 50 a 30, de 30 a 20, de 20 a 10, de 10 a 5, de 5 a 3, de 3 a 2, de 2 a 1 o 1 aminoácidos están insertados, sustituidos o cancelados, en cualquier combinación.

Fragmentos preferidos de polipéptidos de la presente invención incluyen un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 30, 50 o 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 2, o un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 30, 50 o 100 aminoácidos contiguos truncados o cancelados de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los fragmentos preferidos son fragmentos biológicamente activos que median la actividad biológica de CARP-2, incluyendo aquellos con una actividad similar o una actividad mejorada, o con una actividad disminuida indeseable. También son preferidos aquellos fragmentos que son antígenos o inmunógenos en un animal, especialmente en un ser humano.

Los fragmentos de los polipéptidos de la invención se pueden emplear para producir el correspondiente polipéptido de longitud completa mediante síntesis de péptidos; por tanto, estas variantes se pueden utilizar como productos intermedios para la producción de los polipéptidos de longitud total de la invención. Los polipéptidos de la presente invención pueden encontrarse en forma de la proteína “madura” o pueden ser parte de una proteína más grande, tal como un precursor o una proteína de fusión. Con frecuencia es conveniente incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contenga secuencias secretoras o líder, pro-secuencias, secuencias que faciliten la purificación, por ejemplo múltiples residuos de histidina, o una secuencia adicional que aporte estabilidad durante la producción recombinante.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden preparar de cualquier manera adecuada, por ejemplo por aislamiento a partir de fuentes de origen natural, a partir de células hospedantes construidas genéticamente que comprenden sistemas de expresión (vide infra) o por síntesis química, empleando por ejemplo sintetizadores automatizados de péptidos, o una combinación de tales métodos. Los medios para preparar dichos polipéptidos son bien conocidos en la técnica.

Los fragmentos preferidos de polinucleótidos de la presente invención incluyen un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 15, 30, 50 o 100 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 1, o un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 30, 50 o 100 nucleótidos contiguos truncados o cancelados de la secuencia de SEQ ID NO: 1.

Variantes preferidas de polinucleótidos de la presente invención incluyen variantes de empalme, variantes alélicas y polimorfismos, incluyendo polinucleótidos que tienen uno o más polimorfismos de nucleótidos individuales (SNPs).

Los polinucleótidos de la presente invención también incluyen polinucleótidos que codifican variantes de polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y en donde varios, por ejemplo de 50 a 30, de 30 a 20, de 20 a 10, de 10 a 5, de 5 a 3, de 3 a 2, de 2 a 1 o 1 residuos de aminoácidos están sustituidos, cancelados o incorporados, en cualquier combinación.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona polinucleótidos que son transcritos de RNA de las secuencias de DNA de la presente invención. En consecuencia, se proporciona un polinucleótido de RNA que:

(a) comprende un transcrito de RNA de la secuencia de DNA que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2;

(b) es el transcrito de RNA de la secuencia de DNA que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2;

(c) comprende un transcrito de RNA de la secuencia de DNA de SEQ ID NO: 1; o

(d) es el transcrito de RNA de la secuencia de DNA de SEQ ID NO: 1; y polinucleótidos de RNA que son complementarios a los mismos.

La secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1 muestra homología con mRNA de *H. sapiens* respecto a la proteína nuclear inducible por citoquinas (Chu, W. *et al.*, J. Biol. Chem. 270 (17), 10236-10245 (1995)). La secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1 es una secuencia de cDNA que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2. La secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2 puede ser idéntica a la secuencia que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o puede ser una secuencia distinta de SEQ ID NO: 1, la cual, como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, codifica también el polipéptido de SEQ ID NO: 2. El polipéptido de la SEQ ID NO: 2 está relacionado con otras proteínas de la familia de Factores de Transcripción de Repeticiones de Anquirina Cardiac, que tienen homología y/o similitud estructural con mRNA de *H. sapiens* respecto a la proteína nuclear inducible por citoquinas (Chu, W. *et al.*, J. Biol. Chem. 270 (17), 10236-10245 (1995)).

Cabe esperar que los polipéptidos y polinucleótidos preferidos de la presente invención tengan, inter alia, funciones/propiedades biológicas similares a sus polipéptidos y polinucleótidos homólogos. Además, los polipéptidos y polinucleótidos preferidos de la presente invención tienen al menos una actividad de CARP-2.

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden obtener empleando técnicas estándar de clonación y selección a partir de una librería de cDNA derivada de mRNA en células de corazón humano (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Los polinucleótidos de la invención también se pueden obtener a partir de fuentes naturales tales como librerías de DNA genómico, o se pueden sintetizar empleando técnicas bien conocidas y comercialmente disponibles.

Cuando los polinucleótidos de la presente invención se emplean para la producción recombinante de polipéptidos de la presente invención, el polinucleótido puede incluir la secuencia codificadora del polipéptido maduro, por sí mismo, o la secuencia codificadora del polipéptido maduro en pausa de lectura con otras secuencias codificadoras,

tales como aquellas que codifican una secuencia líder o secretoria, una secuencia de pre-, o pro- o prepro-proteína, u otras porciones de péptidos de fusión. Por ejemplo, se puede codificar una secuencia marcadora que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas modalidades preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, como el proporcionado en el vector pQE (Quagen, Inc.) y descrito en Gentz *et al.*, Proc Natl Acad Scie USA (1989) 86:821-824, o es un extremo de HA. El polinucleótido puede contener también secuencias 5' y 3' no codificadoras, tales como secuencias transcritas, no traducidas, señales de empalme y poliadenilación, sitios de unión de ribosomas y secuencias que estabilizan mRNA.

Los polinucleótidos que son idénticos o tienen una identidad suficiente a una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1, se pueden emplear como sondas de hibridación para cDNA y DNA genómico o como cebadores para una reacción de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR). Dichas sondas y cebadores se pueden emplear para aislar cDNAs de longitud completa y clones genómicos que codifican polipéptidos de la presente invención y para aislar cDNA y clones genómicos de otros genes (incluyendo genes que codifican parálogos de fuentes humanas y ortólogos y parálogos de especies distintas a la humana) que tienen una alta similitud de secuencia a SEQ ID NO: 1, habitualmente una identidad de al menos 95%. Las sondas y cebadores preferibles comprenderán en general al menos 15 nucleótidos, con preferencia al menos 30 nucleótidos y pueden tener al menos 50, y acaso al menos 100 nucleótidos. Las sondas particularmente preferidas tendrán entre 30 y 50 nucleótidos. Los cebadores particularmente preferidos tendrán entre 20 y 25 nucleótidos.

Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, que incluye homólogos de especies distintas a la humana, se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las etapas de seleccionar una librería bajo condiciones de hibridación estrictas con una sonda marcada que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma, preferentemente de al menos 15 nucleótidos; y aislar cDNA de longitud completa y clones genómicos que contienen dicha secuencia de polinucleótidos. Dichas técnicas de hibridación son bien conocidas para el experto en la materia. Las condiciones de hibridación estrictas preferidas incluyen la incubación durante la noche a 42°C en una solución que comprende: 50% de formamida, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM de citrato trisódico), 50 mM de fosfato sódico (pH 7,6), 5 x de solución Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 µg/ml de DNA de esperma de salmón cortado, desnaturalizado; seguido por lavado de los filtros en 0,1 x SSC a 65°C aproximadamente. De este modo, la presente invención también incluye polinucleótidos aislados, preferentemente con una secuencia de nucleótidos de al menos 100, obtenidos mediante selección de una librería bajo condiciones de hibridación estrictas con una sonda marcada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma, preferentemente de al menos 15 nucleótidos.

El experto en la materia apreciará que, en muchos casos, una secuencia aislada de cDNA estará incompleta, ya que la región que codifica el polipéptido no se extiende totalmente hasta el terminal 5'. Esto es una consecuencia de la transcriptasa inversa, una enzima con una "procesividad" inherentemente baja (una medida de la capacidad de la enzima para permanecer unida al molde durante la reacción de polimerización), fallando a la hora de completar una copia de DNA del molde de mRNA durante la síntesis de la primera hebra de cDNA.

Existen varios métodos disponibles y bien conocidos para los expertos en la materia para obtener cDNAs de longitud completa o cDNAs de corta extensión, por ejemplo aquellos basados en el método de Amplificación Rápida de extremos de cDNA (RACE) (véase, por ejemplo, Frohman *et al.*, Proc Nat Acad Sci USA 85, 8998-9002, 1988). Recientes modificaciones de la técnica, ejemplificadas por la tecnología de Marathon (marca registrada) (Clontech Laboratories Inc) por ejemplo, han simplificado en gran medida la búsqueda de cDNAs más largos. En la tecnología de Marathon (marca registrada), se han preparado cDNAs a partir de mRNA extraído de un tejido seleccionado y una secuencia "adaptadora" ligada en cada extremo. Se efectúa entonces la amplificación de ácidos nucleicos (PCR) para amplificar el extremo 5' "ausente" del cDNA empleando una combinación de cebadores de oligonucleótidos específicos al gen y específicos al adaptador. La reacción PCR se repite entonces empleando cebadores "anidados", es decir, cebadores diseñados para anillarse dentro del producto amplificado (habitualmente un cebador específico al adaptador que anilla otro 5' en la secuencia del adaptador y un cebador específico al gen que anilla otro 5' en la secuencia conocida del gen). Los productos de esta reacción pueden ser entonces analizados mediante secuenciación de DNA y se puede construir un cDNA de longitud completa bien uniendo el producto directamente al cDNA existente para proporcionar una secuencia completa, o bien efectuando una PCR de longitud completa por separado empleando la información de la nueva secuencia para el diseño del cebador 5'.

Los polipéptidos recombinantes de la presente invención se pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica a partir de células hospedantes construidas genéticamente que comprenden sistemas de expresión. Por tanto, según otro aspecto, la presente invención se refiere a sistemas de expresión que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la presente invención, a células hospedantes que son construidas genéticamente con dichos sistemas de expresión y a la producción de polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células para producir dichas proteínas empleando RNAs derivados de los constructos de DNA de la presente invención.

Para la producción recombinante, las células hospedantes se pueden construir genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos para polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos se pueden introducir en las células hospedantes por métodos ya descritos en muchos manuales estándar de laboratorio, tal como Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology (1986) y Sambrook *et al (ibid)*. Métodos preferidos para introducir polinucleótidos en células hospedantes incluyen, por ejemplo, transfección con fosfato cálcico, transfección

mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística o infección.

Ejemplos representativos de hospedantes adecuados incluyen células bacterianas, tales como células de *Streptococci*, *Staphylococci*, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insectos tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células de animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 y células de melanoma de Bowes; y células de plantas.

Se puede emplear una gran variedad de sistemas de expresión, por ejemplo, sistemas cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriofagos, de transposones, de epitomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, virus papova, tal como SV40, virus de vacunas, adenovirus, virus de viruela loca, virus de pseudo-rabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los anteriores, tales como aquellos derivados de elementos génicos de plásmidos y bacteriofagos, tales como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan y engendran la expresión. En general, se puede emplear cualquier sistema o vector que sea capaz de mantener, propagar o expresar un polinucleótido para producir un polipéptido en un hospedante. La secuencia de polinucleótidos adecuada se puede insertar en un sistema de expresión por cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas y usuales, tales como, por ejemplo, aquellas indicadas por Sambrook *et al.*, (*ibid*). Se pueden incorporar señales de secreción adecuadas en el polipéptido deseado para permitir la secreción de la proteína traducida al interior del lumen del retículo endoplásmico, el espacio periplásmico o el entorno extracelular. Dichas señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

En el caso de que un polipéptido de la presente invención tenga que expresarse para su uso en ensayos de selección, en general es preferible que el polipéptido se produzca en la superficie de la célula. En este caso, las células pueden ser recogidas antes de su uso en el ensayo de selección. Si el polipéptido es secretado en el medio, el medio puede ser recuperado con el fin de recuperar y purificar el polipéptido. Si se producen intracelularmente, las células deben ser primeramente lisadas antes de recuperar el polipéptido.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser recuperados y purificados a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos, incluyendo la precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatita y cromatografía con lectina. Con suma preferencia, para la purificación se emplea la cromatografía líquida de alta resolución. Se pueden emplear técnicas bien conocidas para el repliegado de proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido es desnaturado durante la síntesis intracelular, aislamiento y/o purificación.

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden emplear como reactivos en diagnóstico, a través de la detección de mutaciones en el gen asociado. La detección de una forma mutada del gen caracterizada por el nucleótido de SEQ ID NO: 1 en la secuencia de cDNA o genómica y que está asociada con una disfunción, proporcionará una herramienta en diagnóstico que puede incorporarse en, o definir, una diagnosis de una enfermedad o la susceptibilidad a una enfermedad, que resulta de una sub-expresión, sobre-expresión o expresión espacial o temporal alterada del gen. Los individuos que portan mutaciones en el gen pueden ser detectados al nivel de DNA por diversas técnicas bien conocidas en este campo.

Los ácidos nucleicos para diagnóstico se pueden obtener a partir de células de un sujeto, tal como material de sangre, orina, saliva, biopsia de tejidos o autopsia. El DNA genómico se puede emplear directamente para la detección o bien puede ser amplificado enzimáticamente mediante el uso de PCR, preferentemente RT-PCR u otras técnicas de amplificación antes del análisis. De manera similar, también se puede emplear RNA o cDNA. Las delecciones e inserciones pueden ser insertadas por un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Se pueden identificar mutaciones en puntos por hibridación de DNA amplificado a secuencias de nucleótidos de CARP-2 marcadas. Se pueden distinguir secuencias perfectamente compaginadas respecto de los dúplices mal compaginados mediante digestión con RNasa o por diferencias en las temperaturas de fusión. También se puede detectar una diferencia en la secuencia de DNA por alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de DNA en geles, con o sin agentes desnaturantes, o por secuenciación directa de DNA (véase, por ejemplo, Myers *et al.*, Science (1985) 230: 1242). También se pueden revelar cambios de secuencia en localizaciones específicas mediante ensayos de protección con nucleasas, tal como protección con RNasa y S1 o el método de disociación química (véase Cotton *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85: 4397-4401).

Se puede construir una disposición de sondas de oligonucleótidos que comprenden la secuencia de polinucleótidos de CARP-2 o fragmentos de la misma, para realizar una selección eficaz de, por ejemplo, mutaciones genéticas. Dichas disposiciones son con preferencia disposiciones o cuadrículas de alta densidad. Los métodos de tecnología con disposiciones son bien conocidos y son de una aplicabilidad general y pueden utilizarse para enfocar una variedad de cuestiones en genética molecular, incluyendo expresión génica, enlace genético y variabilidad genética, véase, por ejemplo, M. Chee *et al.*, Science, 274, 610-613 (1996) y otras referencias allí citadas.

Para diagnosticar o determinar la susceptibilidad de un sujeto a una enfermedad de la invención, también se puede emplear la detección de niveles anormalmente disminuidos o incrementados de polipéptido o expresión de mRNA. La expresión disminuida o incrementada se puede medir al nivel de RNA empleando cualquiera de los métodos bien

conocidos en este campo para la cuantificación de polinucleótidos, tal como, por ejemplo, amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo PCR, RT-PCR, protección con RNasa, transferencia Northern y otros métodos de hibridación. Las técnicas de ensayo que se pueden emplear para determinar niveles de una proteína, tal como un polipéptido de la presente invención, en una muestra derivada de un hospedante, son bien conocidos para los expertos en este campo.

5 Dichos métodos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis por Transferencia Western y ensayos ELISA.

De este modo, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para diagnóstico que comprende:

- 10 (a) un polinucleótido de la presente invención, preferentemente la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o un fragmento o un transcrito de RNA de la misma;
- (b) una secuencia de nucleótidos complementaria a la de (a);
- 15 (c) un polipéptido de la presente invención, preferentemente el polipéptido de SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma; o
- (d) un anticuerpo a un polipéptido de la presente invención, preferentemente al polipéptido de SEQ ID NO: 2.

20 Podrá apreciarse que en cualquiera de tales kits, (a), (b), (c) o (d) pueden comprender un componente sustancial. Dicho kit podrá utilizarse en la diagnosis de una enfermedad o la susceptibilidad a una enfermedad, en particular las enfermedades de la invención, entre otras.

Las secuencias de polinucleótidos de la presente invención resultan valiosas para estudios de localización de cromosomas. La secuencia es dirigida específicamente a, y se puede hibridar con, una localización particular en el cromosoma humano de un individuo. El mapaje de secuencias relevantes a cromosomas de acuerdo con la presente invención constituye una primera etapa importante en la correlación de dichas secuencias con la enfermedad asociada con un gen. Una vez que una secuencia ha sido mapeada a una localización cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma se puede correlacionar con datos del mapa genético. Dichos datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick Mendelian Inheritance in Man (disponible on-line a través de de Johns Hopkins University Welch Medical Library). La relación entre genes y enfermedades cuyos mapas han sido trazados a la misma región cromosómica es entonces identificada a través de análisis de enlaces (co-herencia de genes físicamente adyacentes). Las localizaciones cromosómicas humanas precisas para una secuencia genómica (fragmento génico, etc), se pueden determinar empleando el Mapaje Híbrido por Radiación (RH) (Walter, M. Spillett, D., Thomas, P., Weissenbach, J., y Goodfellow, P. (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes, *Nature Genetics* 7, 22-28). Puede disponerse de varios paneles RH en Research Genetics (Huntsville, AL, USA), por ejemplo el panel GeneBridge4 RH (Hum Mol Genet 1996 Mar; 5(3): 339-46 A radiation hybrid map of the human genome. Gyapay G, Schmitt K, Fizames C, Jones H, Vega-Czarny N, Spillett D, Muselet D, Prud'Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J, Weissenbach J, Goodfellow PN). Para determinar la localización cromosómica de un gen empleando este panel, se llevan a cabo 93 PCRs empleando cebadores diseñados a partir del gen de interés en RH DNAs. Cada uno de estos DNAs contiene fragmentos genómicos humanos al azar mantenidos en un entorno de hámster (líneas celulares híbridas de humano/hámster). Dichas PCRs dan lugar a 93 puntuaciones que indican la presencia o ausencia del producto PCR del gen de interés. Dichas puntuaciones son comparadas con puntuaciones creadas empleando productos PCR de secuencias genómicas de localización conocida. Esta comparación se efectúa en <http://www.genome.wi.mit.edu/>.

30 35 40 45

Las secuencias de polinucleótidos de la presente invención son también herramientas valiosas para estudios en la expresión de tejidos. Dichos estudios permiten la determinación de modelos de expresión de polinucleótidos de la presente invención que pueden proporcionar una indicación en cuanto a los modelos de expresión de los polipéptidos codificados en tejidos, mediante la detección de los mRNAs que los codifican. Las técnicas usadas son bien conocidas en este campo e incluyen las técnicas de hibridación *in situ* a clones dispuestos en una cuadrícula, tal como hibridación de microdisposiciones de cDNA (Schena *et al.*, *Science*, 270, 467-470, 1995 and Shalon *et al.*, *Genome Res*, 6, 639-645, 1996) y técnicas de amplificación de nucleótidos tal como PCR. Un método preferido utiliza la tecnología TAQMAN (marca registrada) disponible en Perkin Elmer. Los resultados de estos estudios pueden aportar una indicación de la función normal del polipéptido en el organismo. Además, los estudios comparativos del modelo de expresión normal de mRNAs con aquel de mRNAs codificados por una forma alternativa del mismo gen (por ejemplo, uno que tiene una alteración en el potencial codificador de polipéptidos o una mutación reguladora), pueden proporcionar atisbos valiosos en cuanto al papel de los polipéptidos de la presente invención, o bien el hecho de una expresión inadecuada de los mismos en una enfermedad. Dicha expresión inadecuada puede ser de naturaleza temporal, espacial o simplemente cuantitativa.

50 55 60

Los polipéptidos de la presente invención se expresan en corazón y músculo esquelético.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a anticuerpos. Los polipéptidos de la invención o sus fragmentos, o células que los expresan, se pueden emplear como inmunógenos para producir anticuerpos que son inmunoespecíficos para los polipéptidos de la presente invención. El término "inmunoespecífico" significa que los anticuerpos tienen una afinidad por los polipéptidos de la invención sustancialmente mayor que su afinidad para otros polipéptidos relacionados del estado de la técnica.

65

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de la presente invención pueden ser obtenidos administrando los polipéptidos o fragmentos portadores de heptítopos, o células, a un animal, preferentemente un animal no humano, empleando protocolos usuales. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede emplear cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Ejemplos incluyen la técnica de hibridomas (Kohler, G. y Milstein, C., *Nature* (1975) 256: 495-497), la técnica de triomas, la técnica de hidridomas de células B humanas (Kozbor *et al.*, *Immunology Today* (1983) 4: 72) y la técnica de EBV-hibridomas (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

También se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de una sola cadena, tales como aquellas descritas en la Patente US No. 4.946.778, para producir anticuerpos de una sola cadena a polipéptidos de esta invención. Igualmente, para expresar anticuerpos humanizados se pueden emplear ratones transgénicos u otros organismos, incluyendo otros mamíferos.

Los anticuerpos anteriormente descritos se pueden emplear para aislar o para identificar clones que expresan el polipéptido o para purificar los polipéptidos por cromatografía de afinidad. Igualmente, los anticuerpos contra polipéptidos de la presente invención se pueden emplear para tratar enfermedades de la invención, entre otras.

Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención se pueden emplear también como vacunas. Por tanto, según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero, que comprende inocular el mamífero con un polipéptido de la presente invención, adecuado para producir una respuesta inmunológica de anticuerpos y/o células T, incluyendo, por ejemplo, células T productoras de citoquinas o células T citotóxicas, para proteger dicho animal frente a la enfermedad, independientemente de que la enfermedad se haya ya establecido o no dentro del individuo. También se puede inducir una respuesta inmunológica en un mamífero mediante un método que comprende suministrar un polipéptido de la presente invención por vía de un vector que dirige la expresión del polinucleótido y que codifica el polipéptido *in vivo* con el fin de inducir dicha respuesta inmunológica, para proteger dicho animal frente a las enfermedades de la invención. Una forma de administrar el vector consiste en acelerarlo en las células deseadas como un revestimiento sobre partículas o similar. Dicho vector de ácido nucleico puede comprender DNA, RNA, un ácido nucleico modificado o un híbrido de DNA/RNA. Para utilizarse como vacuna, se proporcionará normalmente un polipéptido o un vector de ácido nucleico en forma de una formulación (composición) de vacuna. La formulación puede comprender además un vehículo adecuado. Puesto que un polipéptido se puede disgregar en el estómago, preferentemente se administra por vía parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hace que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitarias o dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales selladas, y se pueden guardar en estado liofilizado, requiriendo únicamente la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso. La formulación de vacuna también puede incluir sistemas adyuvantes para acentuar la inmunogenicidad de la formulación, tal como sistemas de aceite en agua y otros sistemas conocidos en la técnica. La dosificación dependerá de la actividad específica de la vacuna y puede ser determinada fácilmente por experimentación usual.

Los polipéptidos de la presente invención tienen una o más funciones biológicas que son de relevancia en uno o más estados de enfermedad, en particular en las enfermedades de la invención anteriormente mencionadas. Por tanto, son útiles para identificar compuestos que estimulan o inhiben la función o nivel del polipéptido. En consecuencia, y según otro aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar compuestos que identifican aquellos que estimulan o inhiben la función o nivel del polipéptido. Dichos métodos identifican agonistas o antagonistas que pueden ser empleados para fines terapéuticos y profilácticos para dichas enfermedades de la invención como las anteriormente mencionadas. Los compuestos pueden ser identificados a partir de diversas fuentes, por ejemplo, células, preparados libres de células, librerías químicas, colecciones de compuestos químicos y mezclas de productos naturales. Dichos agonistas o antagonistas así identificados pueden ser sustratos naturales o modificados, ligandos, receptores, enzimas, etc, según sea el caso, del polipéptido; un mimético estructural o funcional de los mismos (véase Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology* 1 (2): Chapter 5 (1991)) o una pequeña molécula.

El método de selección puede medir simplemente la unión de un compuesto candidato al polipéptido o a células o membranas que portan el polipéptido o una proteína de fusión del mismo, por medio de un marcador asociado directa o indirectamente con el compuesto candidato. Alternativamente, el método de selección puede implicar la medición o detección (cualitativa o cuantitativamente) de la unión competitiva de un compuesto candidato al polipéptido contra un competidor marcado (por ejemplo, agonista o antagonista). Además, estos métodos de selección pueden comprobar si el compuesto candidato da lugar o no a una señal generada por activación o inhibición del polipéptido, empleando sistemas de detección adecuados a las células que portan el polipéptido. Los inhibidores de la activación son ensayados generalmente en presencia de un agonista conocido y se observa el efecto sobre la activación por el agonista en presencia del compuesto candidato. Por otro lado, los métodos de selección pueden comprender simplemente las etapas de mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene un polipéptido de la presente invención, para formar una mezcla, medir una actividad de CARP-2 en la mezcla y comparar la actividad de CARP-2 de la mezcla con una muestra de control que no contiene compuesto candidato.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden emplear en métodos de selección de baja capacidad convencionales y también en formatos de selección de alto rendimiento (HTS). Dichos formatos HTS incluyen no so-

lo el uso bien establecido de placas de microvaloración de 96 y, más recientemente, 384 pocillos, sino también métodos emergentes tal como el método en nanopocillos descrito por Schullek *et al.*, Anal Biochem., 246, 20-29 (1997).

Las proteínas de fusión, tales como aquellas preparadas a partir de la porción Fc y polipéptido CARP-2, como se ha descrito anteriormente, se pueden emplear también para ensayos de selección de alto rendimiento para identificar antagonistas para el polipéptido de la presente invención (véase D. Bennett *et al.*, J Mol Recognition, 8:52-58 (1995); y K. Johanson *et al.*, J Biol Chem, 270 (16): 9459-9471 (1995)).

Técnicas de selección

Los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos al polipéptido de la presente invención se pueden emplear también para configurar métodos de selección para detectar el efecto de compuestos añadidos sobre la producción de mRNA y polipéptido en células. Por ejemplo, se puede construir un ensayo ELISA para medir los niveles de polipéptido secretados o asociados a células empleando anticuerpos monoclonales y policlonales por métodos estándar bien conocidos en la técnica. Esto se puede emplear para descubrir agentes que pueden inhibir o acentuar la producción de polipéptido (lo que se conoce también como antagonista o agonista, respectivamente) a partir de células o tejidos adecuadamente manipuladas.

Un polipéptido de la presente invención se puede emplear para identificar receptores unidos o solubles en la membrana, si es que existen, por medio de técnicas de unión de receptores estándar conocidas en este campo. Dichas técnicas incluyen, pero no de forma limitativa, ensayos de unión y reticulación de ligandos en donde el polipéptido es marcado con un isótopo radioactivo (por ejemplo, ^{125}I), químicamente modificado (por ejemplo, biotinilado) o fusionado a una secuencia péptidos adecuada para la detección o purificación, e incubación con una fuente del receptor putativo (células, membranas celulares, sobrenadantes celulares, extractos de tejidos, fluidos corporales). Otros métodos incluyen técnicas biofísicas tales como resonancia de plasmón superficial y espectroscopía. Estos métodos de selección se pueden emplear también para identificar agonistas y antagonistas del polipéptido que compiten con la unión del polipéptido a sus receptores, si es que los hay. Métodos estándar para realizar tales ensayos son ya bien conocidos en la técnica.

Ejemplos de antagonistas de polipéptidos de la presente invención incluyen anticuerpos o, en algunos casos, oligonucleótidos o proteínas que están estrechamente relacionados con los ligandos, sustratos, receptores, enzimas, etc, según pueda ser el caso, del polipéptido, por ejemplo, un fragmento de los ligandos, sustratos, receptores, enzimas, etc; o una pequeña molécula que se une al polipéptido de la presente invención pero que no ejerce una respuesta, de manera que se previene la actividad del polipéptido.

Los métodos de selección pueden también implicar el uso de tecnología transgénica y el gen de CARP-2. La técnica de construir animales transgénicos está ya bien establecida. Por ejemplo, el gen de CARP-2 puede ser introducido a través de microinyección en el pronúcleo masculino de oocitos fertilizados, transferencia retroviral en embriones de pre- o post-implantación, o inyección de células madre embrionarias modificadas, tal como por electroporación, en blastocitos hospedantes. Animales transgénicos particularmente útiles son los llamados animales "knock-in" en los cuales un gen del animal es reemplazado por el equivalente humano dentro del genoma de dicho animal. Los animales transgénicos knock-in son útiles en el proceso de descubrimiento de fármacos, para la validación de dianas, en donde el compuesto es específico para la diana humana. Otros animales transgénicos útiles son los llamados animales "knock-out" en los cuales la expresión del ortólogo del animal de un polipéptido de la presente invención y codificado por una secuencia de DNA endógeno en una célula es parcial o totalmente anulada. El gen knock-out puede ser dirigido a células o tejidos específicos, puede ocurrir solo en ciertas células o tejidos como una consecuencia de las limitaciones de la tecnología, o puede ocurrir en todas, o prácticamente todas, las células del animal. La tecnología con animales transgénicos ofrece también un sistema entero de expresión-clonación en el animal en donde los genes introducidos son expresados para proporcionar cantidades grandes de polipéptidos de la presente invención.

Los kits de selección para utilizarse en los métodos anteriormente descritos constituyen otro aspecto de la presente invención. Dichos kits de selección comprenden:

- (a) un polipéptido de la presente invención;
- (b) una célula recombinante que expresa un polipéptido de la presente invención;
- (c) una membrana celular que expresa un polipéptido de la presente invención; o
- (d) un anticuerpo a un polipéptido de la presente invención;

cuyo polipéptido es preferentemente aquel de SEQ ID NO: 2.

Podrá apreciarse que en cualquiera de tales kits, (a), (b), (c) o (d) pueden comprender un componente sustancial.

Glosario

Se aportan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de ciertos términos usados con frecuencia anteriormente.

El término “anticuerpos” tal y como aquí se emplea incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, de una sola cadena y humanizados, así como fragmentos Fab, incluyendo los productos de un Fab o de otra librería de expresión de inmunoglobulina.

El término “aislado” significa alterado “por la mano del hombre” respecto de su estado natural, es decir, si se presenta en la naturaleza, ha sido cambiado o separado de su entorno original, o ambas cosas a la vez. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo no es “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural es un “aislado”, tal y como se emplea aquí el término. Además, un polinucleótido o polipéptido que se introduce en un organismo mediante transformación, manipulación genética o por cualquier otro método recombinante es un “aislado” incluso si todavía está presente en dicho organismo, cuyo organismo puede estar vivo o no vivo.

El término “polinucleótido” se refiere en general a cualquier polirribonucleótido (RNA) o polideoxirribonucleótido (DNA), que puede ser RNA o DNA sin modificar o modificado. Los “polinucleótidos” incluyen, sin limitación, DNA de una sola hebra o de doble hebra, DNA que es una mezcla de regiones de una sola hebra y de doble hebra, RNA de una sola hebra y de doble hebra, y RNA que es una mezcla de regiones de una sola hebra y de doble hebra, moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA que puede ser de una sola hebra o, más habitualmente, de doble hebra o una mezcla de regiones de una sola hebra y de doble hebra. Además, el término “polinucleótido” se refiere a regiones de triple hebra que comprenden RNA o DNA o ambos RNA y DNA. El término “polinucleótido” también incluye DNAs o RNAs que contienen una o más bases modificadas y DNAs o RNAs con estructuras modificadas respecto a la estabilidad o por otros motivos. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritoladas y bases no usuales tal como inosina. Se pueden efectuar diversas modificaciones en DNA y RNA; así, el “polinucleótido” abarca formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente de polinucleótidos como los encontrados habitualmente en la naturaleza, así como las formas químicas de DNA y RNA características de virus y células. El término “polinucleótido” abarca también polinucleótidos relativamente cortos, referidos frecuentemente como oligonucleótidos.

El término “polipéptido” se refiere a cualquier polipéptido que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. El término “polipéptido” se refiere tanto a cadenas cortas, referidos normalmente como péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, referidos generalmente como proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados genéticamente. Los “polipéptidos” incluyen secuencias de aminoácidos modificadas por procesos naturales, tal como procesado posterior a la traducción, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en este campo. Dichas modificaciones se encuentran descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una abundante literatura de investigación. Las modificaciones pueden presentarse en cualquier punto de un polipéptido, incluyendo la estructura del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los terminales amino o carboxilo.

Podrá apreciarse que el mismo tipo de modificación puede estar presente, en grados idénticos o variables, en diversos puntos de un polipéptido determinado. Igualmente, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados como resultado de ubiquitinación y pueden ser cíclicos, con o sin ramificaciones. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden derivarse de procesos naturales posteriores a la traducción o pueden prepararse por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, biotilación, enlace covalente de flavina, enlace covalente de una mitad heme, enlace covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, enlace covalente de un lípido o derivado de un lípido, enlace covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesado proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición, mediada por RNA de transferido, de aminoácidos a proteínas tal como arginilación, y ubiquitinización (véase, por ejemplo, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, 1-12, in *Post-translational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter *et al.*, “Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors”, *Meth Enzymol*, 182, 626-646, 1990, and Rattan *et al.*, “Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging”, *Ann NY Acad Sci*, 663, 48-62, 1992).

El término “fragmento” de una secuencia de polipéptidos se refiere a una secuencia de polipéptido que es más corta que la secuencia de referencia pero que retiene esencialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido de referencia. El término “fragmento” de una secuencia de polinucleótidos se refiere a una secuencia de polinucleótido que es más corta que la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 1.

El término “variante” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia pero que retiene las propiedades esenciales del mismo. Una variante típica de un polinucleótido difiere en cuanto a la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos

de la variante pueden o no alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia.

Los cambios de nucleótidos pueden resultar en sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncaciones de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como más abajo se expone. La variante típica de un polipéptido difiere en cuanto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. Generalmente, las alteraciones están limitadas de manera que la secuencias del polipéptido de referencia y de la variante sean estrechamente similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y el polipéptido de referencia pueden diferir en cuanto a la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, inserciones, deleciones en cualquier combinación. Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede ser o no uno codificado por el código genético. Las sustituciones conservadoras típicas incluyen Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe y Tyr. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser de origen natural tal como un alelo, o bien puede ser una variante desconocida en cuanto a su origen natural. Las variantes de polinucleótidos y polipéptidos que no son de origen natural se pueden preparar por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa. Como variantes se incluyen también los polipéptidos que tienen una o más modificaciones posteriores a la traducción, por ejemplo glicosilación, fosforilación, metilación, ADP-ribosilación y similares. Modalidades incluyen la metilación del aminoácido N-terminal, fosforilaciones de serinas y treoninas y modificación de glicinas C-terminales.

El término “alelo” se refiere a una de dos o más formas alternativas de un gen que se presenta en un locus (posición) determinado del genoma.

El término “polimorfismo” se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos (y secuencia de polipéptidos codificados, si es relevante) en una posición dada del genoma dentro de una población.

El término “polimorfismo en un solo nucleótido” (SNP) se refiere a la aparición de variabilidad del nucleótido en una posición de un nucleótido individual en el genoma, dentro de una población. Un SNP puede presentarse dentro de un gen o dentro de regiones intergénicas del genoma. Los SNPs pueden ser analizados empleando Amplificación Específica al Alelo (ASA). Para el proceso se requieren al menos 3 cebadores. Se emplea un cebador común en complemento inverso al polimorfismo que está siendo analizado. Este cebador común puede estar entre 50 y 1.500 pbs respecto de la base polimórfica. Los otros dos (o más) cebadores son idénticos entre sí excepto que la base 3' final balancea para compaginarse con uno de los dos (o más) alelos que constituyen el polimorfismo. Se efectúan entonces dos (o más) reacciones PCR en el DNA de muestra, empleando cada una de ellas el cebador común y uno de los Cebadores Específicos al Alelo.

El término “variante de empalme” tal y como aquí se emplea se refiere a moléculas de cDNA producidas a partir de moléculas de RNA inicialmente transcritas a partir de la misma secuencia de DNA genómico pero que han experimentado un empalme alternativo de RNA. El empalme alternativo de RNA se produce cuando un transcrito de RNA primario experimenta empalme, generalmente para la separación de intrones, lo cual da lugar a la producción de más de una molécula de mRNA cada una de las cuales puede codificar diferentes secuencias de aminoácidos. El término “variante de empalme” se refiere también a las proteínas codificadas por las anteriores moléculas de cDNA.

El término “identidad” se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada por comparación de las secuencias. En general, el término “identidad” se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de las dos secuencias de polinucleótidos o de las dos secuencias de polipéptidos, respectivamente, en la longitud de las secuencias que están siendo comparadas.

El “% de identidad” para secuencias en donde no existe una correspondencia exacta, se puede determinar un “% de identidad”. En general, las dos secuencias a comparar son alineadas para proporcionar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de “espacios de separación” en una o ambas secuencias, para acentuar el grado de alineación. Se puede determinar un porcentaje de identidad en toda la longitud de cada una de las secuencias que están siendo comparadas (conocido como alineación global), que es particularmente adecuado para secuencias de la misma o muy similar longitud, o en longitudes definidas más cortas (conocido como alineación local) que resulta más adecuado para secuencias de longitud desigual.

El término “similitud” constituye otra medida más sofisticada de la relación entre dos secuencias de polipéptidos. En general, el término “similitud” representa una comparación entre los aminoácidos de dos cadenas de polipéptidos, sobre una base de residuo por residuo, teniendo en cuenta no solo las correspondencias exactas entre pares de residuos, uno de cada una de las secuencias que están siendo comparadas (como en el caso de “identidad”) sino también, cuando no existe una correspondencia exacta, si, sobre una base evolucionaria, uno de los residuos es o no probablemente un sustituto del otro. Esta posibilidad tiene una “puntuación” asociada a partir de la cual se puede determinar entonces el “% de similitud” de las dos secuencias.

Los métodos para comparar la identidad y similitud de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, para determinar el porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos y el porcentaje de identidad y el porcentaje de similitud entre dos secuencias de polipéptidos, se pueden emplear programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereaux *J et al.*, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984, disponibles en Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP. El programa

BESTFIT utiliza el algoritmo de “homología local” de Smith y Waterman (J Mol Biol, 147, 195-197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482-489, 1981) y encuentra la mejor individual de similitud entre dos secuencias. El programa BESTFIT es más adecuado para comparar dos secuencias de polinucleótidos o dos secuencias de polipéptidos que son de diferente longitud, asumiendo el programa que la secuencia más corta representa una porción de la secuencia más larga. En comparación, el programa GAP alinea dos secuencias, encontrando una “similitud máxima”, de acuerdo con el algoritmo de Neddleman y Wunsch (J Mol Biol, 48, 443-453, 1970). El programa GAP es más adecuado para comparar secuencias que son aproximadamente de la misma longitud y en donde cabe esperar una alineación en la longitud entera. Preferentemente, los parámetros “peso espacio” y “peso longitud” usados en cada programa son 50 y 3 para las secuencias de polinucleótidos y 12 y 4 para las secuencias de polipéptidos, respectivamente. Con preferencia, los porcentajes de identidades y similitudes se determinan cuando las dos secuencias que están siendo comparadas están alineadas de manera óptima.

En la técnica se conocen también otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias, por ejemplo, la familia de programas BLAST (Altschul S F *et al.*, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990, Altschul S F *et al.*, Nucleic Acids Res., 25: 389-3402, 1997, disponibles en The National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA y accesibles a través de la página web del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) FASTA (Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63-99, 1990; Pearson W R y Lipman D J, Proc Nat Acad Sci USA, 85, 2444-2448, 1988, disponible como parte del Wisconsin Sequence Analysis Package).

Preferentemente, se emplea la matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62 (Henikoff S y Henikoff J G, Proc. Nat. Acad Sci. USA, 89, 10915-10919, 1992) en las comparaciones de las secuencias de polipéptidos incluyendo cuando las secuencias de nucleótidos son primeramente traducidas a secuencias de aminoácidos antes de la comparación.

Preferentemente, se emplea el programa BESTFIT para determinar el porcentaje de identidad de una secuencia de polinucleótido o polipéptido indagada con respecto a una secuencia de polinucleótido o polipéptido de referencia, siendo alineadas de manera óptima la secuencia indagada y la secuencia de referencia y estableciéndose los parámetros del programa en el valor de defecto, como anteriormente se ha descrito.

El “índice de identidad” es una medida de la conexidad de secuencias que se puede utilizar para comparar una secuencia candidata (polinucleótido o polipéptido) y una secuencia de referencia. Así, por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos candidata que tiene, por ejemplo, un índice de identidad de 0,95 en comparación con una secuencia de polinucleótidos de referencia, es idéntica a la secuencia de referencia a excepción de que la secuencia de polinucleótidos candidata puede incluir en promedio hasta cinco diferencias por cada 100 nucleótidos de la secuencia de referencia. Dichas diferencias son seleccionadas del grupo consistente en al menos una delección, sustitución, incluyendo transición y transversión, o inserción de nucleótidos. Dichas diferencias pueden ocurrir en las posiciones de los terminales 5' o 3' de la secuencia de polinucleótidos de referencia o en cualquier punto entre estas posiciones terminales, dispersadas individualmente entre los nucleótidos de la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de polinucleótidos que tiene un índice de identidad de 0,95, en comparación con una secuencia de polinucleótidos de referencia, se puede cancelar, sustituir o insertar, o cualquier combinación de estas operaciones, como anteriormente se ha descrito, un promedio de hasta 5 en cada 100 de los nucleótidos de la secuencia de referencia. Lo mismo se puede decir mutatis mutandis para otros valores del índice de identidad, por ejemplo 0,96, 0,97, 0,98 y 0,99.

Similarmente, para un polipéptido una secuencia de polipéptidos candidata que tiene, por ejemplo, un índice de identidad de 0,95 en comparación con una secuencia de polipéptidos de referencia, es idéntica a la secuencia de referencia salvo que la secuencia de polipéptidos puede incluir un promedio de hasta cinco diferencias por cada 100 aminoácidos de la secuencia de referencia. Dichas diferencias se seleccionan del grupo consistente en al menos una delección, sustitución, incluyendo sustitución conservadora y no conservadora, o inserción de aminoácidos. Dichas diferencias puede ocurrir en las posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia de polipéptidos de referencia o en cualquier lugar entre estas posiciones terminales, dispersadas bien individualmente entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de polipéptidos que tiene un índice de identidad de 0,95, en comparación con una secuencia de polipéptidos de referencia, se puede cancelar, sustituir o insertar, o cualquier combinación de estas operaciones, como anteriormente se ha descrito, un promedio de hasta 5 en cada 100 de los aminoácidos de la secuencia de referencia. Lo mismo se puede decir mutatis mutandis para otros valores del índice de identidad, por ejemplo 0,96, 0,97, 0,98 y 0,99.

La relación entre el número de diferencias de nucleótidos o aminoácidos y el índice de identidad se puede expresar por la siguiente ecuación:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot I),$$

en donde:

n_a es el número de diferencias de nucleótidos o aminoácidos,

x_a es el número total de nucleótidos o aminoácidos en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, respectivamente,

l es el índice de identidad,

$\cdot$ es el símbolo para el operador de multiplicación y

en donde cualquier producto no entero de x_a y l es redondeado al entero más próximo antes de restarlo de x_a .

El término “homólogo” es un término genérico usado en la técnica para indicar una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos que posee un alto grado de conexividad de secuencias respecto a una secuencia de referencia. Dicha conexividad puede ser cuantificada determinando el grado de identidad y/o similitud entre las dos secuencias, como anteriormente se ha definido. Dentro de este término genérico caen los términos “ortólogo” y “parálogo”. El término “ortólogo” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que es el equivalente funcional del polinucleótido o polipéptido de otra especie. El término “parálogo” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que dentro de la misma especie es funcionalmente similar.

El término “proteína de fusión” se refiere a una proteína codificada por dos genes fusionados, sin relacionar, o fragmentos de los mismos. Ejemplos han sido descritos en US 5541087, 5726044. En el caso de Fc-Carp-2, que utiliza una región Fc de inmunoglobulina como una parte de una proteína de fusión, es conveniente llevar a cabo la expresión funcional de Fc-Carp-2 o fragmentos de Carp-2, para mejorar las propiedades farmacocinéticas de dicha proteína de fusión cuando se emplea para terapia y para generar un Carp-2 dímero. El constructo de DNA de Fc-Carp-2 comprende en la dirección 5' a 3', una cassette de secreción, es decir, una secuencia de señal que dispara la exportación desde una célula de mamífero, DNA que codifica un fragmento de región Fc de inmunoglobulina, como un socio de la fusión, y un DNA que codifica Carp-2 o fragmentos del mismo. En ciertos usos, sería deseable poder alterar las propiedades funcionales intrínsecas (unión de complemento, unión al receptor Fc) por mutación de los lados funcionales de Fc mientras se deja intacto el resto de la proteína de fusión o se cancela la parte Fc completamente después de la expresión.

Todas las publicaciones y referencias, incluyendo, pero no de forma limitativa, las patentes y solicitudes de patentes, citadas en esta descripción, se incorporan aquí en su totalidad solo con fines de referencia como si cada publicación o referencia individual se indicaran específica e individualmente para su incorporación aquí como referencias mostradas en su totalidad. Cualquier solicitud de patente a la cual esta solicitud reivindique prioridad también se incorpora aquí solo con fines de referencia en su totalidad, de la manera descrita anteriormente para las publicaciones y referencias.

35 Leyendas de las figuras

Tabla 1: Modelo de expresión de CARP-2

40 Como se indica en el ejemplo 2 se realizó el análisis de la expresión de mRNA del polipéptido CARP-2 en diversos tejidos y órganos humanos.

Figura 1: Análisis por transferencia Northern

45 Para analizar la expresión de CARP-2 humano en tejidos humanos, se realizó una transferencia northern (clontech). Ha sido detectada una banda de alrededor de 2 kb en corazón y músculo esquelético.

Otros ejemplos

50 Ejemplo 1

Transferencia Northern

55 Transferencia Northern en tejidos humanos (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) con fragmento génico de 1.000 pb marcado con 32P de CARP-2 hibridado sobre RNA derivado de tejido humano. El tamaño de mRNA ha sido estimado en alrededor de 2 kb y ha sido detectado en corazón y músculo esquelético (Figura 1).

Ejemplo 2

60 *Análisis de la expresión génica*

Se motearon varios mRNAs de origen humano (MTE, Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) sobre una membrana de nylon. La membrana fue hibridada con un fragmento génico de 1.000 pb marcado con 32P radioactivo de CARP-2. Han sido examinados 61 muestras individuales (indicadas en la tabla 1) de origen humano. La radioactividad ha sido escaneada y las manchas cuantificadas (todos los valores han sido normalizados al valor más alto establecido = 100%). Además de la expresión en corazón y músculo esquelético, se ha detectado CARP-2 en la glándula tiroidea. Dentro del corazón, se ha comprobado que la expresión de CARP-2 es más pronunciada en el ventrículo que el atrio y también se comprobó una alta expresión en el septo interventricular y en el ápice del corazón.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

2. Un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2, codificado por el polinucleótido de la reivindicación 1.

3. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la reivindicación 1 capaz de producir un polipéptido de la reivindicación 2 cuando dicho vector de expresión está presente en una célula hospedante compatible.

4. Una célula hospedante recombinante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 3 o una membrana de la misma que expresa el polipéptido de la reivindicación 2.

5. Un procedimiento para la producción de un polipéptido de la reivindicación 2, que comprende la etapa de cultivar una célula hospedante como la definida en la reivindicación 4 bajo condiciones suficientes para la producción de dicho polipéptido, y recuperar el polipéptido a partir del medio de cultivo.

6. Una proteína de fusión consistente en la región Fc de inmunoglobulina y en un polipéptido de la reivindicación 2.

7. Un anticuerpo inmuno-específico para el polipéptido de la reivindicación 2.

8. Un método de selección para identificar compuestos que estimulan o inhiben la función o nivel del polipéptido de la reivindicación 2, que comprende un método seleccionado del grupo consistente en:

(a) medir o detectar, de manera cuantitativa o cualitativa, la unión de un compuesto candidato al polipéptido (o a las células o membranas que expresan el polipéptido) o una proteína de fusión del mismo por medio de un marcador directa o indirectamente asociado con el compuesto candidato;

(b) medir la competición de unión de un compuesto candidato al polipéptido (o a las células o membranas que expresan el polipéptido) o una proteína de fusión del mismo en presencia de un competidor marcado;

(c) ensayar si el compuesto candidato da lugar o no a una señal generada por activación o inhibición del polipéptido, empleando sistemas de detección adecuados a las células o membranas de las células que expresan el polipéptido;

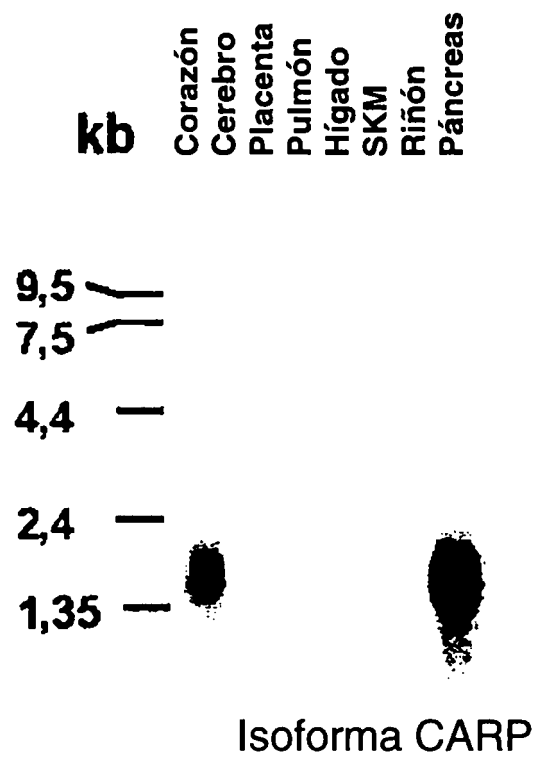
(d) mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene un polipéptido de la reivindicación 2, para formar una mezcla, medir la actividad del polipéptido en la mezcla y comparar la actividad de la mezcla con una mezcla de control que no contiene compuesto candidato; o

(e) detectar el efecto de un compuesto candidato sobre la producción de mRNA que codifica dicho polipéptido o dicho polipéptido en células, empleando por ejemplo un ensayo ELISA.

Tabla 1

Múltiples órganos humanos	*%	Múltiples órganos humanos	*%
1. cerebro entero	12,4	31. estómago	11,9
2. corteza cerebral	9,7	32. duodeno	10,4
3. lóbulo frontal	9,4	33. yeyuno	7,3
4. lóbulo parietal	10,4	34. íleo	3,1
5. lóbulo occipital	10,0	35. íleo cecum	4,6
6. lóbulo temporal	10,6	36. apéndice	3,9
7. gyrus paracentral	14,5	37. colon, ascendente	8,9
8. puente	14,0	38. colon, transversal	5,3
9. cerebelo, izquierdo	9,7	39. colon, descendente	5,8
10. cerebelo, derecho	7,5	40. recto	6,6
11. corpus callosum	6,9	41. riñón	18,8
12. amígdala	10,2	42. músculo esquelético	100,0
13. núcleo caudal	11,6	43. bazo	2,8
14. hipocampo	9,6	44. timo	1,2
15. médula oblongada	11,0	45. leucocito PB	n.d.
16. putamen	13,5	46. nódulo linfático	5,8
17. sustancia negra	13,7	47. médula ósea	17,1
18. acumbens nucleus	11,2	48. traquea	12,8
19. tálamo	14,3	49. pulmón	10,1
20. glándula pituitaria	8,5	50. placenta	9,2
21. cordón espinal	9,0	51. vejiga	4,5
22. corazón	60,4	52. útero	n.d.
23. aorta	16,0	53. próstata	16,1
24. atrio, izquierdo	29,3	54. testículo	9,2
25. atrio, derecho	27,3	55. ovario	4,2
26. ventrículo, izquierdo	60,7	56. hígado	12,4
27. ventrículo, derecho	57,6	57. páncreas	12,1
28. septo interventricular	79,7	58. glándula adrenal	12,3
29. ápice del corazón	75,7	59. glándula tiroidal	37,9
30. esófago	24,6	60. glándula salivar	18,0
		61. glándula mamaria	16,0
*) Las señales de hibridación fueron cuantificadas y representadas como porcentaje del valor más alto detectado en músculo esquelético			

Fig. 1



ES 2 272 458 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<100> Merck Patent GmbH
 <120> Proteína 2 cardiaca de módulos de anquinina
 5 <130> CARP-2FWKWS
 <140>
 <141>
 10 <160> 2
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1002
 15 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 20 <221> CDS
 <222> (1)..(1002)
 <400> 1

25 atg gac ggc acc atg gag gac tcc gag gcg gtg cag agg gcc aca gcg 48
 Met Asp Gly Thr Met Glu Asp Ser Glu Ala Val Gln Arg Ala Thr Ala
 1 5 10 15

30 ctc ate gag cag cgg ctg gca cag gag gag gag aat gag aaa ctc cga 96
 Leu Ile Glu Gln Arg Leu Ala Gln Glu Glu Glu Asn Glu Lys Leu Arg
 20 25 30

35 gga gac acá cgc cag aag ctg ccc atg gac ttg ctg gtg cig gag gat 144
 Gly Asp Thr Arg Gln Lys Leu Pro Met Aso Leu Leu Val Leu Glu Asp
 35 40 45

40

 45

 50

 55

 60

 65

ES 2 272 458 T3

gag aag cae cae ggg gct cag agt gca gcc ctg cag aag gtg aag ggc 192
 Glu Lys His His Gly Ala Gln Ser Ala Ala Leu Gln Lys Val Lys Gly
 5 50 55 60
 caá gag cgc gtg cgc aag acg tcc ctg gac ctg cgg cgg gag atc atc 240
 Gln Glu Arg Val Arg Lys Thr Ser Leu Asp Leu Arg Arg Glu Ile Ile
 10 65 70 75 80
 gat gtg ggc ggg ate cag aac ctc atc gag ctg cgg aag aaa cgc aag 288
 Asp Val Gly Gly Ile Gln Asn Leu Ile Glu Leu Arg Lys Lys Arg Lys
 15 85 90 95
 cag aag aag cgg gac gct ctg gcc gcc tcg cae gag ccg ccc cca gag 336
 Gln Lys Lys Arg Asp Ala Leu Ala Ala Ser His Glu Pro Pro Pro Glu
 20 100 105 110
 ccc gag gag ate act ggc cct gtg gat gag gag acc ttc ctg aaa gct 384
 Pro Glu Glu Ile Thr Gly Pro Val Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Ala
 25 115 120 125
 gcg gtg gag ggg aaa atg aag gtc att gag aag tic ctg gct gac ggg 432
 Ala Val Glu Gly Lys Met Lys Val Ile Glu Lys Phe Leu Ala Asp Gly
 30 130 135 140
 ggg tca gcc gac acg tgc gac cag ttc cct cgg aca gca ctg cae cga 480
 Gly Ser Ala Asp Thr Cys Asp Gln Phe Arg Arg Thr Ala Leu His Arg
 35 145 150 155 160
 gct tcc ctg gaa ggc cac atg gaa atc ctg gag aag ctt cta gat aat 528
 Ala Ser Leu Glu Gly His Met Glu Ile Leu Glu Lys Leu Leu Asp Asn
 40 165 170 175
 ggg gcc act gtg gac ttc cag gat cgg ctg gac tgc aca gcc atg cat 576
 Gly Ala Thr Val Asp Phe Gln Asp Arg Leu Asp Cys Thr Ala Met His
 45 180 185 190
 tgg gcc tgc cgc ggg ggc cac tta gag gtg gtg aaa ctt ctg caa agc 624
 Trp Ala Cys Arg Gly Gly His Leu Glu Val Val Lys Leu Leu Gln Ser
 50 195 200 205
 cat gga gca gac acc aat gtg agg gat aag ctg ctg agc acc ccg ctg 672
 His Gly Ala Asp Thr Asn Val Arg Asp Lys Leu Leu Ser Thr Pro Leu
 55 210 215 220
 cae gtg gca gtc cgg aca ggg cag gtg gag att gtg gag cac ttt cta 720
 His Val Ala Val Arg Thr Gly Gln Val Glu Ile Val Glu His Phe Leu
 60 225 230 235 240
 tcc ctg ggc ctg gaa ate aat gcc aga gac agg gaa ggg gat act gcc 768

65

ES 2 272 458 T3

Ser Leu Gly Leu Glu He Asn Ala Arg Asp Arg Glu Gly Asp Thr Ala
245 250 255
5 ctg cat gac gct gtg agg ctc aac cgc tac aaa ate atc aaa ctg ctg 816
Leu His Asp Ala Val Arg Leu Asn Arg Tyr Lys Ile He Lys Leu Leu
260 265 270
10 ctc ctg cat ggg gct gac atg atg acc aag aac ctg gca gga aag acc 864
Leu Leu His Gly Ala Asp Met Met Thr Lys Asn Leu Ala Gly Lys Thr
275 280 285
15 ccg acg gac ctg gtg cag ctc tgg cag gct gat acc cgg cae gcc ctg 912
Pro Thr Asp Leu Val Gln Leu Trp Gln Ala Asp Thr Arg His Ala Leu
290 295 300
20 gag cat cct gag ccg ggg gct gag cat aac ggg ctg gag ggg ccr aat 960
Glu His Pro Glu Pro Gly Ala Glu His Asn Gly Leu Glu Gly Pro Asn
305 310 315 320
25
gat agt ggg cga gag acc cct cag cct gtg cca gcc cag tga 1002
30 Asp Ser Gly Arg Glu Thr Pro Gln Pro Val Pro Ala Gln
325 330
35 <210> 2
<211> 333
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
40 <400> 2
Met Asp Gly Thr Met Glu Asp Sar Glu Ala Val Gln Arg Ala Thr Ala
1 5 10 15
45 Leu Ile Glu Gln Arg Leu Ala Gln Glu Glu Asn Glu Lys Leu Arg
20 25 30
50 Gly Asp Thr Arg Gln Lys Leu Pro Met Asp Leu Leu Val Leu Glu Asp
35 40 45
Glu Lys His His Gly Ala Gln Ser Ala Ala Leu Gln Lys Val Lys Gly
55 50 55 60
Gln Glu Arg Val Arg Lys Thr Ser Leu Asp Leu Arg Arg Glu Ile Ile
65 70 75 80
60 Asp Val Gly Gly Ile Gln Asn Leu Ile Glu Leu Arg Lys Lys Arg Lys
85 90 95
Gln Lys Lys Arg Asp Ala Leu Ala Ala Ser His Glu Pro Pro Pro Glu
65

ES 2 272 458 T3

	100		105		110
	Pro Glu Glu Ile Thr Gly	Pro Val Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Ala			
5	115	120	125		
	Ala Val Glu Gly Lys Met Lys Val Ile Glu Lys Phe Leu Ala Asp Gly				
	130	135	140		
10	Gly Ser Ala Asp Thr Cys Asp Gln Phe Arg Arg Thr Ala Leu His Arg				
	145	150	155	160	
	Ala Ser Leu Glu Gly His Met Glu Ile Leu Glu Lys Leu Leu Asp Asn				
15	165	170	175		
	Gly Ala Thr Val Asp Phe Gln Aso Arg Leu Asp Cys Thr Ala Met His				
	180	185	190		
20	Trp Ala Cys Arg Gly Gly His Leu Glu Val Val Lys Leu Leu Gln Ser				
	195	200	205		
	His Gly Ala Asp Thr Asn Val Arg Asp Lys Leu Leu Ser Thr Pro Leu				
25	210	215	220		
	His Val Ala Val Arg Thr Gly Gln Val Glu Ile Val Glu His Phe Leu				
	225	230	235	240	
30	Ser Leu Gly Leu Glu Ile Asn Ala Arg Asp Arg Glu Gly Asp Thr Ala				
	245	250	255		
	Leu His Asp Ala Val Arg Leu Asn Arg Tyr Lys Ile Ile Lys Leu Leu				
35	260	265	270		
	Leu Leu His Gly Ala Asp Met Met Thr Lys Asn Leu Ala Gly Lys Thr				
	275	280	285		
40	Pro Thr Asp Leu Val Gln Leu Trp Gln Ala Asp Thr Arg His Ala Leu				
	290	295	300		
	Glu His Pro Glu Pro Gly Ala Glu His Asn Gly Leu Glu Gly Pro Asn				
45	305	310	315	320	
	Asp Ser Gly Arg Glu Thr Pro Gln Pro Val Pro Ala Gln				
	325	330			

50

55

60

65