



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 658**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00918695 .8**

86 Fecha de presentación : **08.03.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1161535**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2001**

54 Título: **Factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I.**

30 Prioridad: **17.03.1999 DE 199 11 992**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

73 Titular/es: **Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es: **Grummt, Ingrid y
Vingron, Martin**

74 Agente: **Arizti Acha, Mónica**

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

Factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I.

La presente invención se refiere a un factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I y a proteínas afines a éste, cuya concentración y/o actividad están correlacionadas con la tasa de proliferación celular, así como a secuencias de ADN que codifican para estas proteínas. La presente invención se refiere además a un factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I o ligandos unidos a proteínas afines a éste, por ejemplo anticuerpos, antagonistas, así como ribozimas o ARN antisentido dirigidos frente a la expresión de TIF-IA. Finalmente, la presente invención se refiere a medicamentos y a procedimientos de diagnóstico, en los que se emplean los compuestos citados anteriormente.

La síntesis de ARN ribosómicos (ARNr) mediante la ARN polimerasa I (Pol I) se regula de manera extremadamente eficaz dependiendo de señales externas, tales como por ejemplo factores de crecimiento, hormonas, nutrientes y efectores para el crecimiento y diferenciación. De manera correspondiente a esto, en células tumorales que presentan crecimiento celular incontrolado, se eleva drásticamente la tasa de síntesis del ARNr (Grummt, I.: "Regulation of Mammalian Ribosomal Gene Transcription by RNA Polymerase I.", Progr. NAR & Mol. Biol. (1999) 62, 109-154). Sin embargo, los mecanismos moleculares, que enlazan la actividad de transcripción de genes de clase I con el crecimiento celular, todavía se desconocen ampliamente. La aclaración de los procesos, mediante los cuales se transfieren señales extracelulares en el nucleolo o núcleo celular para influir allí positiva o negativamente en la tasa de transcripción, requiere por tanto el análisis estructural y funcional de los factores de proteína que participan en el proceso de transcripción, el estudio de sus interacciones así como la identificación de enzimas modificadoras, por ejemplo proteína cinasas y proteína fosfatasa, que regulan la actividad de determinados factores de transcripción dependiendo de la tasa de proliferación celular.

Un factor que es responsable de la regulación dependiente del crecimiento de la transcripción de ADNr es TIF-IA, cuya concentración y/o actividad fluctúa dependiendo de la tasa de proliferación de las células. TIF-IA ya se identificó funcionalmente en 1983 (Buttgereit *et al.*, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 8165-8180) y se caracterizó bioquímicamente en los siguientes años (Mahajan y Thompson, J. Biol. Chem. 265 (1990), 16225-16233; Schnapp *et al.*, Mol. Cell. Biol. 13 (1993), 6723-6732). Estos estudios proporcionaron los siguientes resultados importantes: (1) TIF-IA es un factor de iniciación esencial para Pol I, que parece ser homólogo funcionalmente al factor σ bacteriano. Tal como se muestra para el factor σ , TIF-IA también está asociado a la forma competente de iniciación de la Pol I, la Pol I "holoenzima", y se libera tras la reacción de iniciación de Pol I; (2) la cantidad y/o actividad de TIF-IA está correlacionada con la tasa de proliferación de las células, es decir, los extractos de células con detención del crecimiento son transcripcionalmente inactivos, sin embargo pueden complementarse mediante la adición de TIF-IA parcialmente purificado; y (3) la purificación bioquímica de TIF-IA dio como resultado que estaban presentes menos de mil moléculas de TIF-IA incluso en células que crecen exponencialmente.

El documento WO-99/06549 A2 se refiere a 5' EST para proteínas secretadas expresadas en testículos u otros tejidos.

Debido a las propiedades biológicas de TIF-IA puede partirse de que éste puede ser útil para la prevención y/o tratamiento de enfermedades, en las que es terapéuticamente conveniente una estimulación de la proliferación celular mediante una activación de la síntesis de ARNr celular, por ejemplo para ayudar en la regeneración de tejidos tras lesiones o radioterapia. Por otro lado, también puede usarse la posibilidad de la inactivación de TIF-IA para la inhibición de la proliferación o para la prevención y/o tratamiento de enfermedades, que van acompañadas de una proliferación celular elevada, por ejemplo enfermedades tumorales. Una inactivación de este tipo puede tener lugar a diferentes niveles, por ejemplo a nivel genético ("deficiencia", inhibición de la traducción mediante ARN antisentido o ribozimas) o nivel proteico (antagonistas o ligandos que inhiben a TIF-IA, inhibidores cinasa/fosfatasa, inhibición de la unión de TIF-IA a Pol I, etc.). Sin embargo, el requisito para las posibilidades terapéuticas tratadas anteriormente es que esté a disposición TIF-IA como proteína en cantidades suficientes y en la forma más pura posible o el gen que codifica para TIF-IA, lo que permite por un lado su producción recombinante, por otro lado también un tratamiento basado en terapia génica. Sin embargo, hasta ahora era extremadamente difícil incluso la purificación parcial de TIF-IA, dado que, tal como ya se expuso, la proteína está presente sólo en cantidades muy reducidas en la célula y además probablemente es muy lábil. Partiendo de varios cientos de litros de células cultivadas, si bien pudo purificarse TIF-IA a través de una combinación de nueve etapas cromatográficas, correlacionándose la actividad de TIF-IA con una proteína de 75 kDa (Schnapp *et al.*, citado anteriormente), sin embargo hasta ahora no fueron suficientes ni la pureza ni la cantidad de TIF-IA bioquímicamente purificado, para su uso terapéutico o para poder determinar secuencias de aminoácidos parciales, lo que hubiera permitido el desarrollo de sondas para el gen que codifica para TIF-IA.

Por consiguiente, la presente invención se basa en el problema técnico de proporcionar (1) la proteína TIF-IA en cantidad suficiente y forma pura y (2) el gen que codifica para TIF-IA, lo que permite por ejemplo su producción recombinante.

La solución de este problema técnico se consigue proporcionando las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

Por consiguiente, es objeto de la presente invención una secuencia de ADN, que codifica para un factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I con la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2, conteniendo la secuencia de ADN en una forma de realización preferida la secuencia de ácido nucleico mostrada en la figura 2.

La presente invención se basa en el aislamiento de una secuencia de ADNc, que codifica para TIF-IA humano. Dado que hasta ahora no era posible proporcionar TIF-IA en cantidades y pureza tales que (partiendo por ejemplo de una secuencia de aminoácidos parcial) pudieran desarrollar sondas para la clonación exitosa del gen, se introdujo en la presente invención otra estrategia para la determinación del gen que codifica para TIF-IA. A este respecto, se buscaron en bancos de genes secuencias de ADN que presentan homología con genes, que son responsables de la transcripción de Pol I en levadura. Este modo de proceder que finalmente conduce al aislamiento de un clon que codifica para TIF-IA, se describe detalladamente en los ejemplos a continuación.

La presente invención se refiere además a una secuencia de ADN, que codifica para una proteína con las propiedades biológicas de un factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I, que se diferencia de la secuencia de ADN de la figura 2 en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético, o que es un fragmento de las secuencias de ADN citadas anteriormente.

El término “hibridar” utilizado en esta solicitud se refiere a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente a condiciones de hibridación en las que se usa como disolución 5x SSPE, SDS al 1%, 1x solución de Denhardt y/o las temperaturas de hibridación se encuentran entre 35°C y 70°C, preferiblemente a 65°C. Tras la hibridación se lava preferiblemente en primer lugar con 2x SSC, SDS al 1% y después con 0,2x SSC a temperaturas entre 35°C y 70°C, preferiblemente a 65°C (para la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardt véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)). Se prefieren especialmente condiciones de hibridación rigurosas, tales como por ejemplo se describen en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

Los términos “variantes” o “fragmento” utilizados en la presente solicitud comprenden secuencias de ADN, que se diferencian con respecto a las secuencias indicadas en la figura 2 mediante delección/delecciones, inserción/inserciones, intercambio(s) y/u otras modificaciones conocidas en el estado de la técnica o comprende un fragmento de la molécula de ácido nucleico original, presentando aún la proteína codificada por estas secuencias de ADN las propiedades biológicas de TIF-IA y siendo biológicamente activa en mamíferos. A esto también pertenecen variantes de alelo. El experto conoce procedimientos para la generación de las alteraciones citadas anteriormente en la secuencia de ácido nucleico y están descritos en trabajos de referencia de biología molecular, por ejemplo en Sambrook *et al.*, citado anteriormente. El experto también puede determinar, si una proteína codificada por una secuencia de ácido nucleico modificada de ese modo dispone aún de las propiedades biológicas de TIF-IA.

Mediante la disminución o inhibición de la expresión de las secuencias de ADN descritas anteriormente, puede reducirse o eliminarse la síntesis de TIF-IA o proteínas afines, lo que por ejemplo es deseable en los estados de enfermedad descritos en la introducción. Por tanto, otra forma de realización preferible de la presente invención se refiere a un ARN antisentido, que se caracteriza porque es complementario a las secuencias de ADN citadas anteriormente y puede reducir o inhibir la síntesis de TIF-IA codificado por estas secuencias de ADN y un ribozima caracterizado porque es complementario a las secuencias de ADN citadas anteriormente y puede unirse específicamente al ARN transcrito por estas secuencias de ADN y puede escindir éste, mediante lo cual se reduce o se inhibe también la síntesis de TIF-IA codificado por estas secuencias de ADN. Preferiblemente, estos ARN antisentido y ribozimas son complementarios a un segmento codificante del ARNm. El experto puede producir y emplear, partiendo de las secuencias de ADN dadas a conocer, ARN antisentido adecuados. Modos de proceder adecuados se describen por ejemplo en los documentos EB-B1 0 223 399 o EP-A1 0 458. Los ribozimas son ARN-enzimas y están compuestos por una única cadena de ARN. Éstos pueden escindir de manera intermolecular otros ARN, por ejemplo los ARNm transcritos por las secuencias de ADN según la invención. Estos ribozimas deben disponer principalmente de dos dominios, (1) un dominio catalítico y (2) un dominio que es complementario al ARN diana y puede unirse a éste, lo que es el requisito para una escisión del ARN diana. Partiendo de los modos de proceder descritos en la bibliografía, es posible entretanto construir ribozimas específicos que cortan un ARN deseado en un punto preseleccionado, determinado (véase por ejemplo Tanner *et al.*, en: Antisense Research and Applications, CRC Press, Inc. (1993), 415-426). Preferiblemente, los ARN antisentido o ribozimas según la invención presentan una región que es complementaria al ADN diana a través de una longitud de 12 nucleótidos, preferiblemente 15 nucleótidos, más preferiblemente 20 nucleótidos.

Las secuencias de ADN según la invención o los ADN que codifican para los ribozimas o ARN antisentido descritos anteriormente pueden insertarse también en un vector o vector de expresión. Por consiguiente, la presente invención comprende también vectores o vectores de expresión que contienen estas secuencias de ADN. La denominación “vector” se refiere a un plásmido (pUC18, pBR322, pBlueScript etc.), a un virus u otro vehículo adecuado. En una forma de realización preferida, la molécula de ADN según la invención en el vector está enlazada funcionalmente con elementos reguladores, que permiten su expresión en células huésped eucariotas o procariotas. Tales vectores que contienen además de los elementos reguladores, por ejemplo un promotor, normalmente un origen de replicación y genes específicos, que permiten la selección fenotípica de una célula huésped transformada. A los elementos reguladores para la expresión en procariotas, por ejemplo *E. coli*, pertenecen el promotor lac, trp o promotor T7, y para la expresión en eucariotas el promotor AOX1 o GAL1 en levaduras y el promotor del CMV, del VS40, del VSR-40, potenciador del CMV o del VS40 para la expresión en células animales. Otros ejemplos de promotores adecuados son el promotor de la metalotioneína I y el de la polihedrina. A los vectores de expresión adecuados para *E. coli* pertenecen por ejemplo

pGEMEX, derivados de pUC, pGEX-2T, pET3b y pQE-8, prefiriéndose el último. A los vectores adecuados para la expresión en levaduras pertenecen pY100 e Ycpad1, para la expresión en células de mamífero pMSXND, pKCR, pEFBOS, cDM8 y pCEV4. A los vectores de expresión según la invención pertenecen también los vectores derivados de baculovirus para la expresión en células de insecto, por ejemplo pAcSGHisNT-A.

Pueden usarse procedimientos generales conocidos en el campo técnico para la construcción de vectores de expresión que contienen las secuencias de ADN según la invención y secuencias control adecuadas. A estos procedimientos pertenecen por ejemplo técnicas de recombinación *in vitro*, procedimientos sintéticos, así como procedimientos de recombinación *in vivo*, tal como se describen por ejemplo en Sambrook *et al.*, citado anteriormente. Las secuencias de ADN según la invención también pueden insertarse junto con un ADN que codifica para otra proteína o péptido, de modo que las secuencias de ADN según la invención pueden expresarse por ejemplo en forma de una proteína de fusión.

La presente invención se refiere también a las células huésped que contienen vectores descritos anteriormente. A estas células huésped pertenecen bacterias (por ejemplo las cepas de *E. coli* HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21 y SG13009), levaduras, preferiblemente *S. cerevisiae*, células de insecto, preferiblemente células sf9, y células animales, preferiblemente células de mamífero. Células de mamífero preferidas son células CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293 y WI38. Se conocen en el campo técnico procedimientos para la transformación de estas células huésped, para la selección fenotípica de transformantes y para la expresión de las moléculas de ADN según la invención usando los vectores descritos anteriormente.

La presente invención se refiere además a un factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I codificado por las secuencias de ADN según la invención o a proteínas con su actividad biológica así como a procedimientos para su producción recombinante usando los vectores de expresión según la invención. El procedimiento según la invención comprende cultivar las células huésped descritas anteriormente en condiciones, que permiten la expresión (preferiblemente la expresión estable) de la proteína (o proteína de fusión) y obtener la proteína a partir del cultivo o a partir de las células huésped. El experto conoce condiciones para cultivar células huésped transformadas o transfectadas. También se conocen en general procedimientos de purificación adecuados (por ejemplo cromatografía preparativa, cromatografía de afinidad, por ejemplo cromatografía de inmutafinidad, HPLC, etc.).

También son útiles ligandos frente a las proteínas según la invención descritas anteriormente (TIF-IA o proteínas afines). Estos ligandos pueden usarse por ejemplo en ensayos de diagnóstico o para fines terapéuticos, produciéndose su inhibición tras la unión a la molécula diana, es decir TIF-IA, es decir ya no puede unirse a su diana, Pol I, y por consiguiente ya no puede activar ésta. El experto conoce procedimientos para el aislamiento o la síntesis de tales ligandos. Por ejemplo, pueden seleccionarse compuestos que inhiben la actividad posiblemente útiles en extractos de productos naturales como material de partida. Tales extractos pueden proceder por ejemplo de hongos, actinomicetos, algas, insectos, protozoos, plantas y bacterias.

Según la invención, en el caso del ligando se trata de un anticuerpo o un fragmento del mismo. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, policlonales o sintéticos o fragmentos de los mismos. En este contexto, el término "fragmento" significa todas las partes del anticuerpo monoclonal (por ejemplo fragmentos Fab, Fv o "Fv de cadena sencilla"), que presentan la misma especificidad de epítipo que el anticuerpo completo. El experto conoce la producción de tales fragmentos. Preferiblemente se trata en el caso de los anticuerpos según la invención de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos según la invención pueden producirse según procedimientos convencionales, sirviendo como inmunógeno preferiblemente TIF-IA codificado por las secuencias de ADN según la invención o un fragmento sintético del mismo. El experto conoce procedimientos para la obtención de anticuerpos monoclonales.

En una forma de realización especialmente preferida, el anticuerpo monoclonal mencionado es un anticuerpo que procede de un animal (por ejemplo ratón), un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo. Los anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o similares a humanos tienen una antigenicidad potencial disminuida, sin embargo no está disminuida su afinidad frente a la diana. La producción de anticuerpos quiméricos y humanizados o anticuerpos similares a los anticuerpos humanos se ha descrito detalladamente (véanse por ejemplo Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 10029, y Verhoeven *et al.*, Science 239 (1988), 1534). Las inmunoglobulinas humanizadas presentan segmentos de estructura principal variables, que proceden esencialmente de una inmunoglobulina humana (con la denominación inmunoglobulina aceptora) y la complementariedad de los segmentos determinantes, que proceden esencialmente de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo del ratón) (con la denominación inmunoglobulina donadora). El/los segmento(s) constante(s) procede(n), en caso de que exista(n), también esencialmente de una inmunoglobulina humana. En el caso de administración a pacientes humanos, los anticuerpos humanizados (así como los humanos) ofrecen una serie de ventajas con respecto a anticuerpos de ratones u otras especies: (a) el sistema inmunitario humano no debe reconocer como extraña la estructura principal o el segmento constante del anticuerpo humanizado y por tanto debe producirse en menor medida la respuesta de anticuerpo frente a un anticuerpo inyectado de este tipo que frente a un anticuerpo de ratón completamente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño; (b) dado que el segmento efector del anticuerpo humanizado es humano, interacciona mejor con otras partes del sistema inmunitario humano, y (c) los anticuerpos humanizados inyectados presentan un tiempo de vida media, que es esencialmente equivalente al de los anticuerpos humanos que se producen de manera natural, lo que permite administrar dosis menores y menos frecuentes en comparación a los anticuerpos de otras especies.

Los anticuerpos según la invención pueden usarse por ejemplo también para la inmunoprecipitación de TIF-IA según la invención, para el asilamiento de proteínas afines a partir de bancos de expresión de ADNc o para fines de diagnóstico (véase más adelante). La presente invención se refiere también a un hibridoma, que genera el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente.

5

También se mencionan antagonistas para TIF-IA o proteínas afines con éste. Estos permiten igualmente *in vivo* una inhibición de la tasa de transcripción del ARNr. A los posibles antagonistas pertenecen péptidos, que pueden obtenerse debido a que se seleccionan por ejemplo oligopéptidos con secuencias generadas según el principio aleatorio, para poder detectar inhibidores de TIF-IA de ese modo. Tales péptidos pueden usarse directamente como principios activos o para detectar la orientación o la ubicación de un grupo funcional, que puede inhibir la actividad de TIF-IA, lo que a su vez conduce al diseño y a la comprobación de una molécula pequeña inhibidora, o mediante lo cual el péptido pasa a ser la cadena principal para la modificación química, que aumentan sus posibilidades de uso farmacológico. En el caso del péptido puede tratarse de imitadores estructurales, pero pueden usarse también programas de modulación de moléculas, para diseñar imitadores (basándose en la estructura secundaria y/o terciaria característica de TIF-IA). Entonces tales imitadores estructurales pueden usarse *in vivo* como inhibidores de TIF-IA. A los compuestos que actúan como antagonistas pertenecen también por ejemplo moléculas de TIF-IA inactivas. Si estos se administran o se expresan en concentración suficientemente elevada, esto conduce al empobrecimiento en moléculas de TIF-IA activas necesarias y debido a eso actúan como antagonistas de TIF-IA.

La presente invención permite también la realización de medidas terapéuticas en las alteraciones tratadas anteriormente de la proliferación celular o las enfermedades que están relacionadas con esto, es decir los anticuerpos, ribozimas, ARN antisentido y/o secuencias de ADN según la invención, descritos anteriormente pueden usarse también para la producción de un medicamento, por ejemplo para controlar la expresión de TIF-IA (o de la proteína afín a éste) o para intercambiar una forma mutada del gen por una forma funcional, por consiguiente, por ejemplo por un lado para la producción de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades, que están asociadas a una proliferación celular elevada o para la inhibición de la proliferación celular, especialmente enfermedades tumorales, por otro lado para la producción de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades, que están asociadas a una proliferación celular reducida o para la estimulación de la proliferación celular, por ejemplo para fomentar la generación de tejido. Por ejemplo, puede introducirse el TIF-IA según la invención en mamíferos, especialmente en seres humanos, mediante medidas habituales. Para esto puede ser favorable acoplar la proteína a una proteína no considerada como extraña por el cuerpo respectivo, por ejemplo transferrina o albúmina sérica bovina (BSA). También puede introducirse y expresarse un ribozima, una ARN antisentido o una secuencia de ADN según la invención en mamíferos, especialmente los seres humanos. Con un ligando según la invención, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, puede controlarse y regularse la expresión de TIF-IA o de las proteínas afines. También pueden usarse para esto antagonistas para TIF-IA, para atenuar o bloquear completamente de ese modo la acción de TIF-IA activo.

Por consiguiente, la presente invención se refiere también a un medicamento, que contiene las secuencias de ADN, ARN antisentido, el ribozima, el vector de expresión, la proteína y/o el anticuerpo según la invención descritos anteriormente. Estos medicamentos contienen dado el caso además un portador farmacéuticamente compatible. El experto conoce portadores adecuados y la formulación de medicamentos de este tipo. A los portadores adecuados pertenecen por ejemplo disoluciones de cloruro de sodio tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, por ejemplo emulsiones aceite/agua, agentes humectantes, disoluciones estériles etc. La administración de los medicamentos puede tener lugar por vía oral o por vía parenteral. A los procedimientos para la administración oral pertenecen la administración tópica, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. La dosificación adecuada se determina por el médico encargado y depende de diferentes factores, por ejemplo de la edad, del sexo, del peso del paciente, del estadio de la enfermedad, del tipo de administración, etc.

Preferiblemente se insertan las secuencias de ADN descritas anteriormente en un vector adecuado para la terapia génica, por ejemplo bajo el control de un promotor específico de tejido, y se introducen en las células. En una forma de realización preferida, el vector que contiene las secuencias de ADN descritas anteriormente es un virus, por ejemplo un adenovirus, virus vaccinia o adenovirus. Se prefieren especialmente retrovirus. Ejemplos de retrovirus adecuados son VLMM, VSMH, VTMM, VSR o VLG. Para fines de terapia génica pueden transportarse las secuencias de ADN según la invención también en forma de dispersiones coloidales a las células diana. A éstas pertenecen por ejemplo los liposomas o lipoplexos (Mannino *et al.*, Biotechniques 6 (1988), 682). Esta terapia génica puede aplicarse tanto para el aumento de la tasa de proliferación de las células (por ejemplo con un vector, que contiene el gen para TIF-IA activos) como para una reducción de la tasa de proliferación (con un vector, que contiene un gen para un ribozima, un ARN antisentido o una forma inactiva de TIF-IA ("desactivada")).

La presente invención permite también analizar alteraciones de la expresión de TIF-IA o proliferación celular a un nivel genético. Con una secuencia de ADN según la invención o sondas o cebadores derivados de la misma puede determinarse en mamíferos, especialmente en el ser humano, si contienen un gen de TIF-IA modificado, que conduce a una forma mutada de la proteína, que ya no es biológicamente activa, o si por ejemplo el TIF-IA se expresa demasiado poco o con demasiada intensidad. Para ello, el experto puede realizar procedimientos habituales, tales como transcripción inversa, PCR, LCR, hibridación y secuenciación. También los ligandos según la invención, por ejemplo los anticuerpos o fragmentos de los mismos, son adecuados para el diagnóstico, es decir por ejemplo para detectar la presencia y/o la concentración del TIF-IA, una forma acortada o alargada de esta proteína etc., en una muestra. Los anticuerpos pueden unirse por ejemplo en inmunoensayos en fase líquida o a un portador sólido. A este respecto los

anticuerpos pueden estar marcados de diferente manera. Los marcadores y procedimiento de marcaje adecuados son conocidos en el campo técnico. Ejemplos de inmunoensayos son ELISA y RIA.

Por consiguiente, la presente invención se refiere también a un procedimiento de diagnóstico para detectar una expresión de TIF-IA alterada, en el que se pone en contacto una muestra con la secuencia de ADN según la invención o el ligando según la invención, por ejemplo un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo y luego se determina directa o indirectamente, si la concentración, longitud y/o secuencia del factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I o del ARNm que lo codifica se diferencian en comparación con una muestra control. Las sondas que pueden usarse para este procedimiento de diagnóstico comprenden también cebadores basados en las secuencias de ADN según la invención, por ejemplo para una PCR.

Finalmente, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico para la realización del procedimiento de diagnóstico descrito anteriormente, que contiene una secuencia de ADN según la invención o los ligandos según la invención descritos anteriormente, por ejemplo un anticuerpo monoclonal o el fragmento del mismo. Según la configuración del kit de diagnóstico, la secuencia de ADN o el ligando pueden estar inmovilizados.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Comparación de las secuencias de aminoácidos de rrn3p de *S. cerevisiae* (rrn3p) y proteínas homólogas de *S. pombe* (pombe), *C. elegans* (cec36e8) y *Arabidopsis thaliana* (ATAC)

Figura 2: Secuencia de ADNc humano TIF-IA y secuencia de aminoácidos derivada

Figura 3: Análisis de transferencia tipo Northern

Para detectar las secuencias de TIF-IA se hibridaron ARN extraídos de diferentes tejidos (Clontech: 7760-1) con ADNc de TIF-IA marcado radiactivamente (clon pBS-hTIF-IA) y posteriormente se realizó una autorradiografía.

Los siguientes ejemplos explican la invención.

Ejemplo 1

Identificación de una secuencia de ADNc de TIF-IA

Se conocen productos génicos de genes de levadura, que son necesarios para la transcripción de Pol I en *S. cerevisiae*. En el caso de uno de los productos génicos, rrn3p, se trata de una proteína de 72 kDa, que está asociada con la tercera subunidad más grande de Pol I (RPA49). Ésta parece o bien no estar presente o ser transcripcionalmente inactiva en cultivos de levadura estacionarios. Tales propiedades caracterizan también a TIF-IA. Por tanto, el solicitante ha supuesto que en el caso de rrn3p y TIF-IA podría tratarse de proteínas funcionalmente homólogas. Por tanto se ha realizado una búsqueda amplia en diferentes bases de datos, para obtener información sobre la posible existencia de una proteína homóloga a rrn3p en otros organismos. Con ayuda del programa "BLAST" se han identificado homologías entre rrn3p de *S. cerevisiae* y un producto génico de *S. pombe* (ID Swissprot YAQA_SCHPO), un producto génico de *Arabidopsis thaliana* (PID:g3132470) y un producto génico de *C. elegans* (PID:g3924707). Las comparaciones de las secuencias de aminoácidos se muestran en la figura 1. Éstas se realizaron según el algoritmo de Vingron y Argos, J.Mol.Biol.218 (1991), 33-43, y muestran en mayúsculas los segmentos conservados. De esto pudo deducirse la siguiente secuencia consenso para el segmento C-terminal:

```
FNSLFKSFENTVLNTYKSRYTQFLIFYACSLDPENCDFLSKLVEVFLSSNKAXAKRQASA
RYIGSYVARAKTLNKDTIPXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXERHQIFYSGCQAIFYV
FCFRMREFLDVDRFRSQETRXXXERIVMSKLNPLKYCSPNVVLEFARIAKELGLFYVSSII
EFNDLLRS
```

Con esta secuencia "de núcleo", el solicitante ha analizado bancos de secuencias genómicas y EST humanas. A este respecto se encontraron tres segmentos de homología en la secuencia genómica de un clon "BAC" (CIT987SK-270G1, número de registro "Genbank" AF001549). En un segmento con aproximadamente 10.000 bases, que contiene las homologías encontradas, se calculó una predicción de exones con el programa "GENSCAN", que confirmó los tres segmentos homólogos encontrados en la región conservada como secuencias codificantes. Partiendo de esta secuencia se determinó el extremo 5' del gen homólogo a rrn3p con un 5'RACE de un banco de ADNc fetal humano. Mediante "paseo génico", estrategias de PCR dirigidas, técnicas de hibridación, 3'RACE, secuenciación y unión de las secciones de genes individuales se obtuvo finalmente un clon de ADNc, que codifica para TIF-IA con un peso molecular de aproximadamente 75 kDa. La secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos derivada de la misma están representadas en la figura 2. Este clon de ADNc se denominó pBS-hTIF-IA. Se depositó en la DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) bajo DSM 12707 el 25/02/1999.

ES 2 306 658 T3

Ejemplo 2

Detección de secuencias de TIF-IA en tejidos

- 5 Se sometieron a una hibridación con ADNc de pBS-hTIF-IA marcado con [α^{32} P] dCTP del ejemplo 1, filtros comerciales (Clontech: 7760-1), que contenían ARN de corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas. La hibridación tuvo lugar a 65°C en 5 x SSPE, SDS al 1%, 1 x solución de Denhardt. Tras la hibridación se lavó en primer lugar con 2 x SSC, SDS al 1% y después con 0,2 x SSC a 65°C.
- 10 Se mostró que las secuencias de TIF-IA en los más diversos tejidos se expresan con diferente intensidad.

Ejemplo 3

- 15 *Producción y purificación de un factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I según la invención*

- Se dotó el ADN de la figura 2 con ligadores BAMHI, se escindió posteriormente con BamHI y se insertó en el vector de expresión pQE-8 (Qiagen) escindido con BamHI. Se obtuvo el plásmido de expresión pQE-8/TIF-IA. Uno de este tipo codifica para una proteína de fusión de 6 restos de histidina (extremo N-terminal) y el Tif-IA según la invención de la figura 2 (extremo C-terminal). Se usó pQE-8/TIF-IA para la transformación de SG 13009 de *E. coli* (véase Gottesman, S. *et al.*, J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273). Se cultivaron las bacterias en un medio LB con ampicilina 100 μ g/ml y kanamicina 25 μ g/ml y se indujo 4 h con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 60 μ M. Mediante la adición de clorhidrato de guanidina 6 M se consiguió una lisis de las bacterias, posteriormente se realizó con el lisado una cromatografía (resina de Ni-NTA) en presencia de urea 8 M de manera correspondiente a las indicaciones del fabricante (Qiagen) del material de cromatografía. La proteína de fusión unida se eluyó en un tampón con pH 3,5. Tras su neutralización se sometió la proteína de fusión a una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 18% y se tiñó con azul Coomassie (véase Thomas, J.O. y Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).
- 20
- 25

- Se mostró que una proteína (de fusión) según la invención puede producirse en una forma altamente pura.
- 30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia de ADN, que codifica para un factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I con la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2.
2. Secuencia de ADN según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de ácido nucleico mostrada en la figura 2.
- 10 3. Secuencia de ADN, que codifica para una proteína con la propiedad biológica del factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa como factor de iniciación esencial para Pol I,
 - (a) diferenciándose la secuencia de ADN de la secuencia de ADN de la reivindicación 2 en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético; o
 - 15 (b) siendo un fragmento de la secuencia de ADN de la reivindicación 2 ó 3(a).
4. Ribozima, que es complementario a la secuencia de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 3 y que puede unirse específicamente al ARN transcrito por esta secuencia de ADN y que puede escindirlo, mediante lo cual se reduce o se inhibe la síntesis de la proteína codificada por esta secuencia de ADN.
- 20 5. ARN antisentido, que es complementario a la secuencia de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 3 y que puede unirse específicamente al ARN transcrito por esta secuencia de ADN, mediante lo cual se reduce o se inhibe la síntesis de la proteína codificada por esta secuencia de ADN.
- 25 6. Vector de expresión, que contiene la secuencia de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 3 o que codifica para el ribozima según la reivindicación 4 o el ARN antisentido según la reivindicación 5.
7. Célula huésped, que contiene el vector de expresión según la reivindicación 6.
- 30 8. Factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I aislado o proteína aislada con su actividad biológica como factor de iniciación esencial para Pol I, que está codificado/codificada por la secuencia de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 9. Procedimiento para la producción de un factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa o de una proteína con su actividad biológica según la reivindicación 8, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 7 en condiciones adecuadas y obtener la proteína a partir de la célula o del medio de cultivo.
10. Anticuerpo o fragmento del anticuerpo, que se une al factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I o una proteína con su actividad biológica según la reivindicación 8.
- 40 11. Medicamento, que contiene la secuencia de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 3, el vector de expresión según la reivindicación 6, el factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I o una proteína con su actividad biológica según la reivindicación 8.
- 45 12. Medicamento, que contiene el ribozima según la reivindicación 4, el ARN antisentido según la reivindicación 5 o el anticuerpo o el fragmento del mismo según la reivindicación 10.
- 50 13. Procedimiento de diagnóstico para detectar una expresión de TIF-IA eventualmente alterada, en el que se pone en contacto una muestra con la secuencia de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 3 o el anticuerpo o el fragmento del mismo según la reivindicación 10 y luego se determina directa o indirectamente si la concentración, longitud y/o secuencia del factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I o del ARNm que codifica para éste se diferencian en comparación con una muestra control.
- 55 14. Kit de diagnóstico para la realización del procedimiento según la reivindicación 13, que contiene la secuencia de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 3 y/o el anticuerpo o el fragmento del mismo según la reivindicación 10.

FIGURA 1

```

mnafantakrppqdIvapIdqkKxvq(sdstglvc)qpeikdevtsaa----- rzn3p
-----wpsisistnpyinkcnnqctnncpndrcvqskf(assvskndgr)lmg pombe
-----nks:stanapklspkhesedpkvkleeakptvngq cec36e8
-----mgavelasdpas)civeayvduvd ATAC

-mysrfvksaiddldkndstqIgiiaqvalpsknp---erihNDKILU/LLDILSSHIM rzn3p
qmirefvnka) d--dxaegr.faggyedIrrqtaaksp--ckdapsSLGONLLSALTCHVS pombe
ptgre:veny)kgdvtaavlyrk:enaletfequLS---eapKIQLLDQFLA7ADAPZA cec36e8
lsdtqlvqIvrka)svkcgdsd)ysemyvmarDikefkdppvVQQLITVLKALSQAVA ATAC

RZESrgtELTQSIINFEkhwE-LPPKTL5XYIYTIkilecpkwwqdvmilvsclli rzn3p
RLDSense-LVMSVLDS--VWVRDESFYRCITRFLgnliseqsfyIplvmcLiqlhJ- pombe
RTET-----LVXRLLSL--RWOKTQGSVIERFNFCEiairhlcfeevysavverIvp cec36e8
CFDVihhqkLLSALFRhk-LWD-WRPDVMDALVNLV:slavtsgayIdscImajvenIvp ATAC

p:-----KQTVch-----HDKUKYFLRHIPSSNCTIDTYLAKFFPHKNDTK rzn3p
-----YrpdSLAI-----hyehaHMLKYVLELVPAHSLFYSLIEEFYKDESL pombe
qisvteeqvt:ILTEkugnehIcmahHIIS5VLECFPLEARALLKCVKXVPMFTRPS cec36e8
ppwvmls:hsrILWXX:--dv:zvHAALLKISILVPLTPSKLVPHL?CQKPPYHKKD ATAC

RKLNVYTSMLLKRGCSE--LCFO:WLLIEK:ISIDVLEqne)delddvdddlleev rzn3p
LAOHTY:SNVLSICEYVPS--IKCPVLHAIIDY:IOIDVE:qvevdddde----- pombe
VTACVYRNLILHOKYIPAS--ISKDVWEAVFENLAXDDTHN-----w cec36e8
NSIVIVVESLLKLENSICQVGSMLGMVME:LRDLVSPqnnliql:s-----lei ATAC

diyddddlddd5gddddenogrnneeLrsgaadsqsdedsd----- rzn3p
--eedevytdDgtsnadsevitastLyE----- pombe
keeqneewksP-----lfaIndd:LiZevveqntndsedvtpeqlqrkgqniqyId cec36e8
cwUdiqgdsRgmIdne-----L-EdaagutndgdclpvgpIkq----- ATAC

----disqmdgceynvELTQC:KSLSTSLDSILCLVSTHVEEqvtpeslesgegyGVF rzn3p
rhta:ssemcstIicppSLTDT-ROLMOQLDQLLYTLFSYLDShksterd:--yLUV pombe
svctdvitfirssvdseADEENG-NORTKLNOKML-RNEKITGQkv)pkc-----ELF cec36e8
-----DTSOC-SIVSKLLDKLMVAFENLSEqmdgxId----QVF ATAC

NTLTTLKTHVLPTYTTSIQYINFMVSQQQLC-MOSFLVTLIDISafvngaeakkika rzn3p
NSLTKSPNVLVLTFRCTYQFLIFWASQIDPEF-TDIFLCVLEVC)---dpagpylr pombe
DTFLECLISTMLKATHVQVUSPIMLYFCSLSQY-EKKHLENHMOVLicmrapedarks cec36e8
ESLTKSPENFILNTYKSKPTQFLITYACSLDPENCQKFAKSLVEI----- ATAC

---lpylgayiarakk)stqIifvasyltswnRYVIEREFVDO-rqsmRFKHPYAA rzn3p
lsdany)qayvarakalekntiqIvrmctwvAYLQCCNELSDd)---SKHSVITYAI pombe
qgdaasyiaflaraxyvkksta!w!aevyw)kHYVDQFCGSSQilpglQRHUTFYST cec36e8
-----[ssnkhvaccqas]r)idecv---CYCRTCNDOTRP-----ZHQIFFSO ATAC

FOALCTIFCFRNNIFROTGN-----weceIdcFFORHVISKFNPLKFCMDHMLH rzn3p
NOSTFYIPCFRWRRLCVSDSESesmeprpnewipgle-ILHREVLERLNPGLVCSFKIYLO pombe
SOAFFLVFA7RYKSFVUXKDM:ecITP-----wGVPVANSPLIPLKYVEXPVARC cec36e8
COA:MYVLCFRMRS:LDVPRFccq)C-----PLCSILMHFLNPLMVCLPSVVAE ATAC

FARIAQDESAYCFSLiennnneRLAG:ICKadsdkkensaqenetssewe)ectqqfid rzn3p
FAKVAHMLNFMHYYSIi---eqNRKGI7RE-----gfd: pombe
FSAITRSLQLV:CMHIi-----PIEEVOKP----- cec36e8
FLQAKKGGFLIVSDS:-ifddILESELRAIgg-----for ATAC

LQSYTPIDPLFLVNYKILMKYI-----IEMSEASCEYESOGSDO---- rzn3p
MDAYFPFDPYRLTKSSIIVQPFY-----NEMQOIPGLDDGEEEDIdye pombe
FDMFFYDCYHLKESSEKFMTPMK:k!gplaedstlckalCMGAATADKSEXSAEavss cec36e8
LDTFTFPDPCLLKSSNSFISPNF-----IwshvKATYODODDMDaev ATAC

----- rzn3p
sstvmIqes-----pf---- pombe
egldfIdeddaemmgssgyrertfscqqs-----slinyatpqlqfrv---- cec36e8
ivngdeddsdeddeadIdyaInkrsitpxnsfknmerd:llrmpsrirpazspeel---- ATAC

```

Figura 1: alineación de secuencias

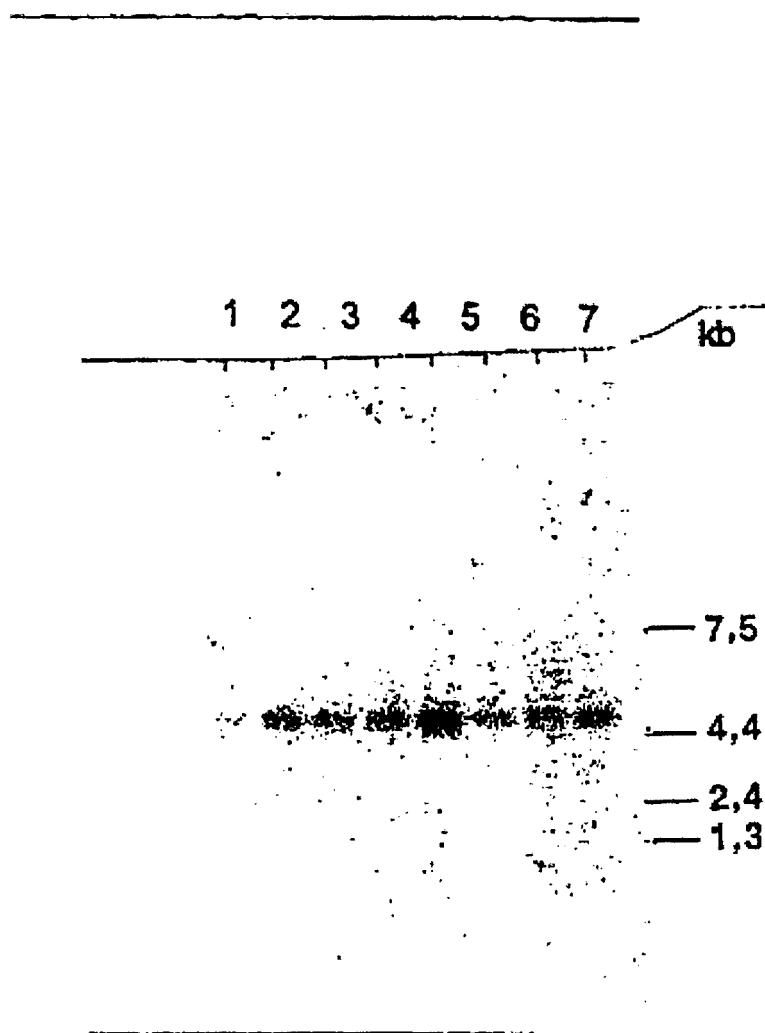
FIGURA 2

[illegible]

FIGURA 2

1321 CTTTTGGTTAACTGGCTGCACATATACCTTAATAACCAGGATTCGGGAACAAAGGCATTC
 L L V N W L H I Y L N N Q D S G T K A F -
 1381 TGCGATGTTGCTCTCCATGGACCATTCTTACTCAGCCTGCCAAGCTGTGTTCTACRCCTTT
 C D V A L H G P F Y S A C Q A V F Y ? F -
 1441 GTTTTGTAGACACAAGCAGCTTTTGAGCGGAAACCTGAAAGAAGGTTTGCAGTATCTTCAG
 V F R H K Q L L S G N L K E G L Q Y L Q -
 1501 AGTCTGAATTTTGAGCGGATAGTGATGAGCCAGCTAAATCCCCTGAAGATTTCGCTGCCC
 S L N F E R I V M S Q L N P L K I C L P -
 1561 TCAGTGGTTAACTTTTTTGCTGCAATCACAATAAGTACCAGCTCGTCTTCTGCTACACC
 S V V N F F A A I T N K Y Q L V F C Y T -
 1621 ATCATTGAGAGGAACAATCGCCAGATGCTGCCAGTCATTAGGAGTACCGCTGGAGGAGAC
 I I E R N N R Q M L P V I R S T A G G D -
 1681 TCAGTGCAGATCTGCACAAACCCGCTGGACACCTTCTTCCCCTTTGATCCCTGTGTGCTG
 S V Q I C T N P L D T F F P F D P C V L -
 1741 AAGAGGTCAAAGAAATTCATTGATCCTATTTATCAGGTGTGGGAAGACATGAGTGTGAA
 K R S K K F I D P I Y Q V W E D M S A E -
 1801 GAGCTACAGGAGTTCAAGAAACCCATGAAAAAGGACATAGTGAAGATGAAGATGATGAC
 E L Q E F K K P M K K D I V E D E D D D -
 1861 TTTCTGAAAGGCGAAGTGCCCCAGAATGATACCGTGATTGGGATCACACCAAGCTCCTTT
 F L K G E V P Q N D T V I G I T P S S F -
 1921 CACACGCATTTCCGAAGTCCTTCAAGTACTGTGGGCTCCCCACCCGTGTTGTACATGCAA
 D T H F R S P S S S V G S P P V L Y M Q -
 1981 CCCAGTCCCCTCTGACGGCAGAAATTTGTGACTGAGATGTGACATTTGGGATTCCCCATC
 P S P L *

FIGURA 3



Carril 1: corazón
Carril 2: cerebro
Carril 3: placenta
Carril 4: pulmón
Carril 5: hígado
Carril 6: músculo esquelético
Carril 7: riñón
Carril 8: páncreas

ES 2 306 658 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) DATOS GENERALES:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: Deutsches Krebsforschungszentrum

(B) CALLE: Im Neuenheimer Feld 280

(C) LUGAR: Heidelberg

(E) PAÍS: Alemania

(F) CÓDIGO POSTAL: 69120

(ii) DENOMINACIÓN DE LA INVENCION: Factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

(iv) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) SOPORTE INFORMÁTICO: disquete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release N° 1.0, versión n° 1.30 (EPA)

(v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

NÚMERO DE SOLICITUD: DE 199 11 992.9

(2) DATOS CON RESPECTO A SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2040 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) TIPO DE CADENA: no conocido

(D) TOPOLOGÍA: no conocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN:40..1992

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

GGAGCGGCCG CCCAGGTGCG GTCGCGTTAGT TCGGCCCA	ATG GCG GCA CCG CTG	54
	Met Ala Ala Pro Leu	
	1 5	
CTT CAC ACG CGT TTG CCG GGA GAT GCG GCC GCT TCG TCC TCT GCA GTT		102
Leu His Thr Arg Leu Pro Gly Asp Ala Ala Ser Ser Ser Ala Val		
	10 15 20	
AAG AAG CTG GGC GCG TCG AGG ACT GGG ATT TCA AAT ATG CGT GCA TTA		150
Lys Lys Leu Gly Ala Ser Arg Thr Gly Ile Ser Asn Met Arg Ala Leu		
	25 30 35	
GAG AAT GAC TTT TTC AAT TCT CCC CCA AGA AAA ACT GTT CGG TTT GGT		198
Glu Asn Asp Phe Phe Asn Ser Pro Arg Lys Thr Val Arg Phe Gly		
	40 45 50	
GGA ACT GTG ACA GAA GTC TTG CTG AAG TAC AAA AAG GGT GAA ACA AAT		246
Gly Thr Val Thr Glu Val Leu Lys Tyr Lys Lys Gly Glu Thr Asn		
	55 60 65	
GAC TTT GAG TTG TTG AAG AAC CAG CTG TTA GAT CCA GAC ATA AAG GAT		294
Asp Phe Glu Leu Leu Lys Asn Gln Leu Leu Asp Pro Asp Ile Lys Asp		
	70 75 80 85	

ES 2 306 658 T3

		GAC	CAG	ATC	ATC	AAC	TGG	CTG	CTA	GAA	TTC	CGT	TCT	TCT	ATC	ATG	TAC	342
		Asp	Gln	Ile	Ile	Asn	Trp	Leu	Leu	Glu	Phe	Arg	Ser	Ser	Ile	Met	Tyr	
						90					95					100		
5		TTG	ACA	AAA	GAC	TTT	GAG	CAA	CTT	ATC	AGT	ATT	ATA	TTA	AGA	TTG	CCT	390
		Leu	Thr	Lys	Asp	Phe	Glu	Gln	Leu	Ile	Ser	Ile	Ile	Leu	Arg	Leu	Pro	
					105					110					115			
		TGG	TTG	AAT	AGA	AGT	CAA	ACA	GTA	GTG	GAA	GAG	TAT	TTG	GCT	TTT	CTT	438
10		Trp	Leu	Asn	Arg	Ser	Gln	Thr	Val	Val	Glu	Glu	Tyr	Leu	Ala	Phe	Leu	
					120				125					130				
		GGT	AAT	CTT	GTA	TCA	GCA	CAG	ACT	GTT	TTC	CTC	AGA	CCG	TGT	CTC	AGC	486
		Gly	Asn	Leu	Val	Ser	Ala	Gln	Thr	Val	Phe	Leu	Arg	Pro	Cys	Leu	Ser	
					135			140					145					
15		ATG	ATT	GCT	TCC	CAT	TTT	GTG	CCT	CCC	CGA	GTG	ATC	ATT	AAG	GAA	GGC	534
		Met	Ile	Ala	Ser	His	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Val	Ile	Ile	Lys	Glu	Gly	
		150					155					160				165		
		GAT	GTA	GAT	GTT	TCA	GAT	TCT	GAT	GAT	GAA	GAT	GAT	AAT	CTT	CCT	GCA	582
20		Asp	Val	Asp	Val	Ser	Asp	Ser	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Asn	Leu	Pro	Ala	
						170					175					180		
		AAT	TTT	GAC	ACA	TGT	CAC	AGA	GCC	TTG	CAA	ATA	ATA	GCA	AGA	TAT	GTA	630
		Asn	Phe	Asp	Thr	Cys	His	Arg	Ala	Leu	Gln	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Val	
					185					190					195			
25		CCA	TCG	ACA	CCG	TGG	TTT	CTC	ATG	CCA	ATA	CTG	GTG	GAA	AAA	TTT	CCA	678
		Pro	Ser	Thr	Pro	Trp	Phe	Leu	Met	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Lys	Phe	Pro	
				200					205					210				
		TTT	GTT	CGA	AAA	TCA	GAG	AGA	ACA	CTG	GAA	TGT	TAC	GTT	CAT	NAC	TTA	726
30		Phe	Val	Arg	Lys	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Glu	Cys	Tyr	Val	His	Xaa	Leu	
				215				220					225					
		CTA	AGG	ATT	AGT	GTA	TAT	TTT	CCA	ACC	TTG	AGG	CAT	GAA	ATT	CTG	GAG	774
		Leu	Arg	Ile	Ser	Val	Tyr	Phe	Pro	Thr	Leu	Arg	His	Glu	Ile	Leu	Glu	
		230				235						240					245	
35		CTT	ATT	ATT	GAA	AAA	CTA	CTC	AAG	TTG	GAT	GTG	AAT	GCA	TCC	CGG	CAG	822
		Leu	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Asp	Val	Asn	Ala	Ser	Arg	Gln	
					250					255						260		
		GGT	ATT	GAA	GAT	GCT	GAA	GAA	ACA	GCA	ACT	CAA	ACT	TGT	GGT	GGG	ACA	870
40		Gly	Ile	Glu	Asp	Ala	Glu	Glu	Thr	Ala	Thr	Gln	Thr	Cys	Gly	Gly	Thr	
				265					270						275			
		GAT	TCC	ACG	GAA	GGA	TTG	TTT	AAT	ATG	GAT	GAA	GAT	GAA	GAA	ACT	GAA	918
		Asp	Ser	Thr	Glu	Gly	Leu	Phe	Asn	Met	Asp	Glu	Asp	Glu	Glu	Thr	Glu	
				280				285						290				
45		CAT	GAA	ACA	AAG	GCT	GGT	CCT	GAA	CGG	CTC	GAC	CAG	ATG	GTG	CAT	CCT	966
		His	Glu	Thr	Lys	Ala	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Asp	Gln	Met	Val	His	Pro	
				295			300						305					
		GTA	GCC	GAG	CGC	CTG	GAC	ATC	CTG	ATG	TCT	TTG	GTT	TTG	TCC	TAC	ATG	1014
50		Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Asp	Ile	Leu	Met	Ser	Leu	Val	Leu	Ser	Tyr	Met	
		310				315						320					325	
		AAG	GAT	GTC	TGC	TAT	GTA	GAT	GGT	AAG	GTT	GAT	AAC	GGC	AAA	ACA	AAG	1062
		Lys	Asp	Val	Cys	Tyr	Val	Asp	Gly	Lys	Val	Asp	Asn	Gly	Lys	Thr	Lys	
					330				335						340			
55		GAT	CTA	TAT	CGC	GAC	CTG	ATA	AAC	ATC	TTT	GAC	AAA	CTC	CTG	TTG	CCC	1110
		Asp	Leu	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Asn	Ile	Phe	Asp	Lys	Leu	Leu	Leu	Pro	
					345					350					355			

ES 2 306 658 T3

	ACC CAT GCC TCC TGC CAT GTA CAG TTT TTC ATG TTT TAC CTC TGT AGT	1158
	Thr His Ala Ser Cys His Val Gln Phe Phe Met Phe Tyr Leu Cys Ser	
	360 365 370	
5	TTC AAA TTG GGA TTC GCA GAG GCA TTT TTG GAA CAT CTC TGG AAA AAA	1206
	Phe Lys Leu Gly Phe Ala Glu Ala Phe Leu Glu His Leu Trp Lys Lys	
	375 380 385	
10	TTG CAG GAC CCA AGT AAT CCT GCC ATC ATC AGG CAG GCT GCT GGA AAT	1254
	Leu Gln Asp Pro Ser Asn Pro Ala Ile Ile Arg Gln Ala Ala Gly Asn	
	390 395 400 405	
	TAT ATT GGA AGC TTT TTG GCA AGA GCT AAA TTT ATT CCT CTT ATT ACT	1302
	Tyr Ile Gly Ser Phe Leu Ala Arg Ala Lys Phe Ile Pro Leu Ile Thr	
	410 415 420	
15	GTA AAA TCA TGC CTA GAT CTT TTG GTT AAC TGG CTG CAC ATA TAC CTT	1350
	Val Lys Ser Cys Leu Asp Leu Leu Val Asn Trp Leu His Ile Tyr Leu	
	425 430 435	
20	AAT AAC CAG GAT TCG GGA ACA AAG GCA TTC TGC GAT GTT GCT CTC CAT	1398
	Asn Asn Gln Asp Ser Gly Thr Lys Ala Phe Cys Asp Val Ala Leu His	
	440 445 450	
	GGA CCA TTT TAC TCA GCC TGC CAA GCT GTG TTC TAC NCC TTT GTT TTT	1446
	Gly Pro Phe Tyr Ser Ala Cys Gln Ala Val Phe Tyr Xaa Phe Val Phe	
	455 460 465	
25	AGA CAC AAG CAG CTT TTG AGC GGA AAC CTG AAA GAA GGT TTG CAG TAT	1494
	Arg His Lys Gln Leu Leu Ser Gly Asn Leu Lys Glu Gly Leu Gln Tyr	
	470 475 480 485	
30	CTT CAG AGT CTG AAT TTT GAG CGG ATA GTG ATG AGC CAG CTA AAT CCC	1542
	Leu Gln Ser Leu Phe Glu Arg Ile Val Met Ser Gln Leu Asn Pro	
	490 495 500	
	CTG AAG ATT TGC CTG CCC TCA GTG GTT AAC TTT TTT GCT GCA ATC ACA	1590
	Leu Lys Ile Cys Leu Pro Ser Val Val Asn Phe Phe Ala Ala Ile Thr	
	505 510 515	
35	AAT AAG TAC CAG CTC GTC TTC TGC TAC ACC ATC ATT GAG AGG AAC AAT	1638
	Asn Lys Tyr Gln Leu Val Phe Cys Tyr Thr Ile Ile Glu Arg Asn Asn	
	520 525 530	
40	CGC CAG ATG CTG CCA GTC ATT AGG AGT ACC GCT GGA GGA GAC TCA GTG	1686
	Arg Gln Met Leu Pro Val Ile Arg Ser Thr Ala Gly Gly Asp Ser Val	
	535 540 545	
	CAG ATC TGC ACA AAC CCG CTG GAC ACC TTC TTC CCC TTT GAT CCC TGT	1734
	Gln Ile Cys Thr Asn Pro Leu Asp Thr Phe Phe Pro Phe Asp Pro Cys	
	550 555 560 565	
45	GTG CTG AAG AGG TCA AAG AAA TTC ATT GAT CCT ATT TAT CAG GTG TGG	1782
	Val Leu Lys Arg Ser Lys Lys Phe Ile Asp Pro Ile Tyr Gln Val Trp	
	570 575 580	
50	GAA GAC ATG AGT GCT GAA GAG CTA CAG GAG TTC AAG AAA CCC ATG AAA	1830
	Glu Asp Met Ser Ala Glu Glu Leu Gln Glu Phe Lys Lys Pro Met Lys	
	585 590 595	
	AAG GAC ATA GTG GAA GAT GAA GAT GAT GAC TTT CTG AAA GGC GAA GTG	1878
	Lys Asp Ile Val Glu Asp Glu Asp Asp Phe Leu Lys Gly Glu Val	
	600 605 610	
55	CCC CAG AAT GAT ACC GTG ATT GGG ATC ACA CCA AGC TCC TTT GAC ACG	1926
	Pro Gln Asn Asp Thr Val Ile Gly Ile Thr Pro Ser Ser Phe Asp Thr	
	615 620 625	
60	CAT TTC CGA AGT CCT TCA AGT AGT GTG GGC TCC CCA CCC GTG TTG TAC	1974
	His Phe Arg Ser Pro Ser Ser Ser Val Gly Ser Pro Pro Val Leu Tyr	
	630 635 640 645	
	ATG CAA CCC AGT CCC CTC TGACGGCAGA AATTTGTGACTG AGATGTGACA	2024
	Met Gln Pro Ser Pro Leu	
	650	
65	TTTGGGATTC CCCATC	2040

ES 2 306 658 T3

(2) DATOS CON RESPECTO A SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 651 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

```

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

```

ES 2 306 658 T3

	His	Glu	Ile	Leu	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Asp	Val
					245					250					255	
5	Asn	Ala	Ser	Arg	Gln	Gly	Ile	Glu	Asp	Ala	Glu	Glu	Thr	Ala	Thr	Gln
				260					265					270		
	Thr	Cys	Gly	Gly	Thr	Asp	Ser	Thr	Glu	Gly	Leu	Phe	Asn	Met	Asp	Glu
			275					280					285			
10	Asp	Glu	Glu	Thr	Glu	His	Glu	Thr	Lys	Ala	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Asp
		290					295					300				
	Gln	Met	Val	His	Pro	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Asp	Ile	Leu	Met	Ser	Leu
	305					310					315					320
15	Val	Leu	Ser	Tyr	Met	Lys	Asp	Val	Cys	Tyr	Val	Asp	Gly	Lys	Val	Asp
					325					330					335	
	Asn	Gly	Lys	Thr	Lys	Asp	Leu	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Asn	Ile	Phe	Asp
				340					345					350		
20	Lys	Leu	Leu	Leu	Pro	Thr	His	Ala	Ser	Cys	His	Val	Gln	Phe	Phe	Met
			355					360					365			
	Phe	Tyr	Leu	Cys	Ser	Phe	Lys	Leu	Gly	Phe	Ala	Glu	Ala	Phe	Leu	Glu
25		370					375					380				
	His	Leu	Trp	Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Pro	Ser	Asn	Pro	Ala	Ile	Ile	Arg
	385					390					395					400
	Gln	Ala	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ile	Gly	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg	Ala	Lys	Phe
30					405					410					415	
	Ile	Pro	Leu	Ile	Thr	Val	Lys	Ser	Cys	Leu	Asp	Leu	Leu	Val	Asn	Trp
				420					425					430		
35	Leu	His	Ile	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gln	Asp	Ser	Gly	Thr	Lys	Ala	Phe	Cys
			435					440					445			
	Asp	Val	Ala	Leu	His	Gly	Pro	Phe	Tyr	Ser	Ala	Cys	Gln	Ala	Val	Phe
		450					455					460				
40	Tyr	Xaa	Phe	Val	Phe	Arg	His	Lys	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Asn	Leu	Lys
	465					470					475					480
	Glu	Gly	Leu	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ser	Leu	Asn	Phe	Glu	Arg	Ile	Val	Met
					485					490					495	
45	Ser	Gln	Leu	Asn	Pro	Leu	Lys	Ile	Cys	Leu	Pro	Ser	Val	Val	Asn	Phe
				500					505					510		
	Phe	Ala	Ala	Ile	Thr	Asn	Lys	Tyr	Gln	Leu	Val	Phe	Cys	Tyr	Thr	Ile
			515					520					525			
50	Ile	Glu	Arg	Asn	Asn	Arg	Gln	Met	Leu	Pro	Val	Ile	Arg	Ser	Thr	Ala
		530					535					540				
	Gly	Gly	Asp	Ser	Val	Gln	Ile	Cys	Thr	Asn	Pro	Leu	Asp	Thr	Phe	Phe
55		545				550					555					560
	Pro	Phe	Asp	Pro	Cys	Val	Leu	Lys	Arg	Ser	Lys	Lys	Phe	Ile	Asp	Pro
					565					570					575	
	Ile	Tyr	Gln	Val	Trp	Glu	Asp	Met	Ser	Ala	Glu	Glu	Leu	Gln	Glu	Phe
60				580					585					590		
	Lys	Lys	Pro	Met	Lys	Lys	Asp	Ile	Val	Glu	Asp	Glu	Asp	Asp	Asp	Phe
			595					600					605			

65

ES 2 306 658 T3

Leu	Lys	Gly	Glu	Val	Pro	Gln	Asn	Asp	Thr	Val	Ile	Gly	Ile	Thr	Pro
	610					615					620				
Ser	Ser	Phe	Asp	Thr	His	Phe	Arg	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Val	Gly	Ser
625					630					635					640
Pro	Pro	Val	Leu	Tyr	Met	Gln	Pro	Ser	Pro	Leu					
			645						650						

5

10

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Deutsches Krebsforschungszentrum
- 15 <120> Factor de transcripción TIF-IA de la ARN polimerasa I
- <130> K 2804
- <140> Documento PCT/DE 00/00767
- <141> 08/03/2000
- 20 <150> Documento DE 199 11 992.9
- <151> 17/03/1999
- <160> 2
- 25 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 2040
- <212> ADN
- 30 <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CDS
- 35 <222> (40) ... (1992)
- <400> 1

40	ggagcggccg cccaggtgcg gtcgcgttag ttcggccca atg gcg gca ccg ctg Met Ala Ala Pro Leu 1 5	54
	ctt cac acg cgt ttg ccg gga gat gcg gcc gct tcg tcc tct gca gtt Leu His Thr Arg Leu Pro Gly Asp Ala Ala Ala Ser Ser Ser Ala Val 10 15 20	102
45	aag aag ctg ggc gcg tcg agg act ggg att tca aat atg cgt gca tta Lys Lys Leu Gly Ala Ser Arg Thr Gly Ile Ser Asn Met Arg Ala Leu 25 30 35	150
50	gag aat gac ttt ttc aat tct ccc cca aga aaa act gtt cgg ttt ggt Glu Asn Asp Phe Phe Asn Ser Pro Pro Arg Lys Thr Val Arg Phe Gly 40 45 50	198
	gga act gtg aca gaa gtc ttg ctg aag tac aaa aag ggt gaa aca aat Gly Thr Val Thr Glu Val Leu Leu Lys Tyr Lys Lys Gly Glu Thr Asn 55 60 65	246
55	gac ttt gag ttg ttg aag aac cag ctg tta gat cca gac ata aag gat Asp Phe Glu Leu Leu Lys Asn Gln Leu Leu Asp Pro Asp Ile Lys Asp 70 75 80 85	294
60	gac cag atc atc aac tgg ctg cta gaa ttc cgt tct tct atc atg tac Asp Gln Ile Ile Asn Trp Leu Leu Glu Phe Arg Ser Ser Ile Met Tyr 90 95 100	342
	ttg aca aaa gac ttt gag caa ctt atc agt att ata tta aga ttg cct Leu Thr Lys Asp Phe Glu Gln Leu Ile Ser Ile Ile Leu Arg Leu Pro 105 110 115	390
65	tgg ttg aat aga agt caa aca gta gtg gaa gag tat ttg gct ttt ctt Trp Leu Asn Arg Ser Gln Thr Val Val Glu Glu Tyr Leu Ala Phe Leu 120 125 130	438

ES 2 306 658 T3

	ggt aat ctt gta tca gca cag act gtt ttc ctc aga ccg tgt ctc agc	486
	Gly Asn Leu Val Ser Ala Gln Thr Val Phe Leu Arg Pro Cys Leu Ser	
	135 140 145	
5	atg att gct tcc cat ttt gtg cct ccc cga gtg atc att aag gaa ggc	534
	Met Ile Ala Ser His Phe Val Pro Pro Arg Val Ile Ile Lys Glu Gly	
	150 155 160 165	
10	gat gta gat gtt tca gat tct gat gat gaa gat gat aat ctt cct gca	582
	Asp Val Asp Val Ser Asp Ser Asp Asp Glu Asp Asp Asn Leu Pro Ala	
	170 175 180	
	aat ttt gac aca tgt cac aga gcc ttg caa ata ata gca aga tat gta	630
	Asn Phe Asp Thr Cys His Arg Ala Leu Gln Ile Ile Ala Arg Tyr Val	
	185 190 195	
15	cca tcg aca ccg tgg ttt ctc atg cca ata ctg gtg gaa aaa ttt cca	678
	Pro Ser Thr Pro Trp Phe Leu Met Pro Ile Leu Val Glu Lys Phe Pro	
	200 205 210	
20	ttt gtt cga aaa tca gag aga aca ctg gaa tgt tac gtt cat Nac tta	726
	Phe Val Arg Lys Ser Glu Arg Thr Leu Glu Cys Tyr Val His Xaa Leu	
	215 220 225	
	cta agg att agt gta tat ttt cca acc ttg agg cat gaa att ctg gag	774
	Leu Arg Ile Ser Val Tyr Phe Pro Thr Leu Arg His Glu Ile Leu Glu	
	230 235 240 245	
25	ctt att att gaa aaa cta ctc aag ttg gat gtg aat gca tcc cgg cag	822
	Leu Ile Ile Glu Lys Leu Leu Lys Leu Asp Val Asn Ala Ser Arg Gln	
	250 255 260	
30	ggt att gaa gat gct gaa gaa aca gca act caa act tgt ggt ggg aca	870
	Gly Ile Glu Asp Ala Glu Glu Thr Ala Thr Gln Thr Cys Gly Gly Thr	
	265 270 275	
	gat tcc acg gaa gga ttg ttt aat atg gat gaa gat gaa gaa act gaa	918
	Asp Ser Thr Glu Gly Leu Phe Asn Met Asp Glu Asp Glu Glu Thr Glu	
	280 285 290	
35	cat gaa aca aag gct ggt cct gaa cgg ctc gac cag atg gtg cat cct	966
	His Glu Thr Lys Ala Gly Pro Glu Arg Leu Asp Gln Met Val His Pro	
	295 300 305	
40	gta gcc gag cgc ctg gac atc ctg atg tct ttg gtt ttg tcc tac atg	1014
	Val Ala Glu Arg Leu Asp Ile Leu Met Ser Leu Val Leu Ser Tyr Met	
	310 315 320 325	
	aag gat gtc tgc tat gta gat ggt aag gtt gat aac ggc aaa aca aag	1062
	Lys Asp Val Cys Tyr Val Asp Gly Lys Val Asp Asn Gly Lys Thr Lys	
	330 335 340	
45	gat cta tat cgc gac ctg ata aac atc ttt gac aaa ctc ctg ttg ccc	1110
	Asp Leu Tyr Arg Asp Leu Ile Asn Ile Phe Asp Lys Leu Leu Pro	
	345 350 355	
50	acc cat gcc tcc tgc cat gta cag ttt ttc atg ttt tac ctc tgt agt	1158
	Thr His Ala Ser Cys His Val Gln Phe Phe Met Phe Tyr Leu Cys Ser	
	360 365 370	
55	ttc aaa ttg gga ttc gca gag gca ttt ttg gaa cat ctc tgg aaa aaa	1206
	Phe Lys Leu Gly Phe Ala Glu Ala Phe Leu Glu His Leu Trp Lys Lys	
	375 380 385	
	ttg cag gac cca agt aat cct gcc atc atc agg cag gct gct gga aat	1254
	Leu Gln Asp Pro Ser Asn Pro Ala Ile Ile Arg Gln Ala Ala Gly Asn	
	390 395 400 405	

ES 2 306 658 T3

	tat att gga agc ttt ttg gca aga gct aaa ttt att cct ctt att act	1302
	Tyr Ile Gly Ser Phe Leu Ala Arg Ala Lys Phe Ile Pro Leu Ile Thr	
	410 415 420	
5	gta aaa tca tgc cta gat ctt ttg gtt aac tgg ctg cac ata tac ctt	1350
	Val Lys Ser Cys Leu Asp Leu Leu Val Asn Trp Leu His Ile Tyr Leu	
	425 430 435	
	aat aac cag gat tgc gga aca aag gca ttc tgc gat gtt gct ctc cat	1398
	Asn Asn Gln Asp Ser Gly Thr Lys Ala Phe Cys Asp Val Ala Leu His	
10	440 445 450	
	gga cca ttt tac tca gcc tgc caa gct gtg ttc tac Ncc ttt gtt ttt	1446
	Gly Pro Phe Tyr Ser Ala Cys Gln Ala Val Phe Tyr Xaa Phe Val Phe	
	455 460 465	
15	aga cac aag cag ctt ttg agc gga aac ctg aaa gaa ggt ttg cag tat	1494
	Arg His Lys Gln Leu Leu Ser Gly Asn Leu Lys Glu Gly Leu Gln Tyr	
	470 475 480 485	
	ctt cag agt ctg aat ttt gag cgg ata gtg atg agc cag cta aat ccc	1542
	Leu Gln Ser Leu Asn Phe Glu Arg Ile Val Met Ser Gln Leu Asn Pro	
20	490 495 500	
	ctg aag att tgc ctg ccc tca gtg gtt aac ttt ttt gct gca atc aca	1590
	Leu Lys Ile Cys Leu Pro Ser Val Val Asn Phe Phe Ala Ala Ile Thr	
	505 510 515	
25	aat aag tac cag ctc gtc ttc tgc tac acc atc att gag agg aac aat	1638
	Asn Lys Tyr Gln Leu Val Phe Cys Tyr Thr Ile Ile Glu Arg Asn Asn	
	520 525 530	
	cgc cag atg ctg cca gtc att agg agt acc gct gga gga gac tca gtg	1686
	Arg Gln Met Leu Pro Val Ile Arg Ser Thr Ala Gly Gly Asp Ser Val	
30	535 540 545	
	cag atc tgc aca aac ccg ctg gac acc ttc ttc ccc ttt gat ccc tgt	1734
	Gln Ile Cys Thr Asn Pro Leu Asp Thr Phe Phe Pro Phe Asp Pro Cys	
	550 555 560 565	
35	gtg ctg aag agg tca aag aaa ttc att gat cct att tat cag gtg tgg	1782
	Val Leu Lys Arg Ser Lys Lys Phe Ile Asp Pro Ile Tyr Gln Val Trp	
	570 575 580	
	gaa gac atg agt gct gaa gag cta cag gag ttc aag aaa ccc atg aaa	1830
	Glu Asp Met Ser Ala Glu Glu Leu Gln Glu Phe Lys Lys Pro Met Lys	
40	585 590 595	
	aag gac ata gtg gaa gat gaa gat gat gac ttt ctg aaa ggc gaa gtg	1878
	Lys Asp Ile Val Glu Asp Glu Asp Asp Phe Leu Lys Gly Glu Val	
	600 605 610	
45	ccc cag aat gat acc gtg att ggg atc aca cca agc tcc ttt gac acg	1926
	Pro Gln Asn Asp Thr Val Ile Gly Ile Thr Pro Ser Phe Asp Thr	
	615 620 625	
	cat ttc cga agt cct tca agt agt gtg ggc tcc cca ccc gtg ttg tac	1974
	His Phe Arg Ser Pro Ser Ser Ser Val Gly Ser Pro Pro Val Leu Tyr	
50	630 635 640 645	
	atg caa ccc agt ccc ctc tgacggcaga aatttgtgactg agatgtgaca	2024
	Met Gln Pro Ser Pro Leu	
	650	
55	tttgggattc cccatc	2040

<210> 2

60 <211> 651

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 306 658 T3

<400> 2

5	Met	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	His	Thr	Arg	Leu	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ala	1	5	10	15
	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Ala	Ser	Arg	Thr	Gly	Ile	Ser	20	25	30	
10	Asn	Met	Arg	Ala	Leu	Glu	Asn	Asp	Phe	Phe	Asn	Ser	Pro	Pro	Arg	Lys	35	40	45	
	Thr	Val	Arg	Phe	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Lys	50	55	60	
15	Lys	Gly	Glu	Thr	Asn	Asp	Phe	Glu	Leu	Leu	Lys	Asn	Gln	Leu	Leu	Asp	65	70	75	80
	Pro	Asp	Ile	Lys	Asp	Asp	Gln	Ile	Ile	Asn	Trp	Leu	Leu	Glu	Phe	Arg	85	90	95	
20	Ser	Ser	Ile	Met	Tyr	Leu	Thr	Lys	Asp	Phe	Glu	Gln	Leu	Ile	Ser	Ile	100	105	110	
	Ile	Leu	Arg	Leu	Pro	Trp	Leu	Asn	Arg	Ser	Gln	Thr	Val	Val	Glu	Glu	115	120	125	
25	Tyr	Leu	Ala	Phe	Leu	Gly	Asn	Leu	Val	Ser	Ala	Gln	Thr	Val	Phe	Leu	130	135	140	
30	Arg	Pro	Cys	Leu	Ser	Met	Ile	Ala	Ser	His	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Val	145	150	155	160
	Ile	Ile	Lys	Glu	Gly	Asp	Val	Asp	Val	Ser	Asp	Ser	Asp	Asp	Glu	Asp	165	170	175	
35	Asp	Asn	Leu	Pro	Ala	Asn	Phe	Asp	Thr	Cys	His	Arg	Ala	Leu	Gln	Ile	180	185	190	
	Ile	Ala	Arg	Tyr	Val	Pro	Ser	Thr	Pro	Trp	Phe	Leu	Met	Pro	Ile	Leu	195	200	205	
40	Val	Glu	Lys	Phe	Pro	Phe	Val	Arg	Lys	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Glu	Cys	210	215	220	
45	Tyr	Val	His	Xaa	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Val	Tyr	Phe	Pro	Thr	Leu	Arg	225	230	235	240
	His	Glu	Ile	Leu	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Asp	Val	245	250	255	
50	Asn	Ala	Ser	Arg	Gln	Gly	Ile	Glu	Asp	Ala	Glu	Glu	Thr	Ala	Thr	Gln	260	265	270	
	Thr	Cys	Gly	Gly	Thr	Asp	Ser	Thr	Glu	Gly	Leu	Phe	Asn	Met	Asp	Glu	275	280	285	
55	Asp	Glu	Glu	Thr	Glu	His	Glu	Thr	Lys	Ala	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Asp	290	295	300	
60	Gln	Met	Val	His	Pro	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Asp	Ile	Leu	Met	Ser	Leu	305	310	315	320

65

ES 2 306 658 T3

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

65