



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 263 181**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **97945277 .8**

96 Fecha de presentación : **24.09.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0932678**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.1999**

54

Título: **Una familia de genes que codifican péptidos relacionados con la apoptosis, péptidos codificados por ellos y los métodos de uso de los mismos.**

30

Prioridad: **24.09.1996 US 26603 P**
11.10.1996 US 28363 P

45

Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.12.2006**

45

Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **07.04.2011**

45

Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **07.04.2011**

73

Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72

Inventor/es: **Umansky, Samuil y**
Melkonyan, Hovsep

74

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 263 181 T5

DESCRIPCIÓN

Una familia de genes que codifican péptidos relacionados con la apoptosis, péptidos codificados por ellos y los métodos de uso de los mismos.

Área técnica

La presente invención se refiere al área del diagnóstico y las condiciones de tratamiento relacionadas con la apoptosis o muerte celular programada. Más específicamente, está relacionada con la identificación y caracterización de una nueva familia de genes, cuya expresión esta relacionada con la apoptosis.

Antecedentes de la invención

La apoptosis es un proceso fisiológico normal que conduce a la muerte de células individuales. Este proceso de muerte celular programada está relacionado con una variedad de eventos biológicos normales o patogénicos y puede ser inducido por una gran cantidad de estímulos diferentes. Durante el envejecimiento también ocurren cambios en la regulación biológica de la apoptosis y estos cambios son los responsables de muchas de las dolencias y enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Los estudios recientes sobre la apoptosis han sugerido que una gran cantidad de señales, que incluyen hormonas, privación del factor de crecimiento del suero, agentes quimioterapéuticos, radiación ionizante e infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), pueden iniciar una vía metabólica común que conduce a la muerte celular. Wyllie (1980) *Nature* 284:555-556; Kanter *et al.* (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118:392-399; Duke y Cohen (1986) *Lymphokine Res.* 5:289-299; Tomei *et al.* (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155:324-331; Kruman *et al.* (1991) *J. Cell. Physiol.* 148:267-273; Ameisen y Capron (1991) *Immunology Today* 12:102; y Sheppard y Ascher (1992) *J.AIDS* 5:143. De este modo, los agentes que modulan el control biológico de la apoptosis tienen utilidad terapéutica en una gran variedad de padecimientos.

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por la disminución del volumen celular, la condensación de la cromatina, la formación de vesículas en el citoplasma, el aumento de la permeabilidad de la membrana y la ruptura del ADN intercromosómico. Kerr *et al.* (1992) *FASEB J.* 6:2450; y Cohen y Duke (1992) *Ann. Rev. Immunol.* 10:267. Las vesículas, pequeñas esferas encapsuladas por membranas, que se desprenden de la superficie de las células apoptóticas, pueden continuar la producción de radicales superóxido que dañan las células de los tejidos adyacentes, y pueden estar involucradas en procesos inflamatorios.

Aunque la apoptosis es un evento celular normal, también puede ser inducido por condiciones patológicas y por una gran variedad de lesiones. La apoptosis se encuentra involucrada en una gran cantidad de padecimientos, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades cardiovasculares; regresión del cáncer; inmunorregulación; enfermedades virales; anemia; desórdenes neurológicos; desórdenes gastrointestinales, que incluyen, pero no se limitan a, diarrea y disentería; diabetes; pérdida del cabello; rechazo de órganos trasplantados; hipertrofia de la próstata; obesidad; desórdenes oculares; estrés; y envejecimiento.

Los genes que se ha encontrado que activan la vía de la apoptosis en células tumorales incluyen al antígeno FAS, TNF α y TNF β . Véase, p.e., Tomei y Cope *et al.* En *Apoptosis II: The Molecular Basis of Apoptosis in Disease* (1994) Cold Spring Harbor Laboratory Press. En el nemátodo *C. elegans*, las mutaciones en los genes *ced-3* y *ced-4* evitan la muerte celular autónoma durante el desarrollo. Yuan y Horvitz (1990) *Dev. Biol.* 138:33. Una mutación que active el gen *ced-9* del nemátodo evita la muerte celular durante el desarrollo, en tanto que, mutaciones que inactivan este gen estimulan la muerte celular programada. En las células de mamíferos, se ha mostrado que el gen *p-53* induce la apoptosis en algunas células, pero no en otras.

Los genes inhibidores de la apoptosis sometidos a investigación incluyen el *bcl-2* que se aisló de linfomas de células B y que bloquea la apoptosis sin afectar la proliferación celular. Véase Tsujimoto *et al.* *Science* 226:1087; Hockenberry *et al.* (1990) *Nature* 348:334. No se conoce el mecanismo mediante el cual *bcl-2* inhibe la apoptosis. *Mcl-1*, que se expresa en células mieloides muestra similaridad de secuencia con *bcl-2* y se piensa que esté involucrado en la regulación de la apoptosis. Kozopas *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3516.

Recientemente se han clonado los miembros de una extensa familia de posibles receptores de transmembrana relacionados con el gen *frizzled*, responsable de la polaridad de los tejidos de *Drosophila melanogaster*. Véase Wang *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 271:4468. Los miembros de la familia *frizzled* se encuentran en organismos tan diferentes como los nemátodos y los humanos y se expresan en diversos tejidos, así como durante el desarrollo embrionario. En *Drosophila*, las mutaciones *frizzled* afectan la polaridad de las estructuras, tales como los pelos sensoriales en la superficie del cuerpo. Se desconoce la mayor parte de las funciones exactas y la significación clínica de la familia *frizzled* en otras especies.

Resumen de la invención

La presente invención abarca polinucleótidos aislados, polipéptidos y anticuerpos derivados de, o que reaccionan con, los productos de los nuevos genes relacionados con la apoptosis. La invención también abarca usos de estas composiciones.

ES 2 263 181 T5

En concordancia con esto, un aspecto de la invención está constituido por polinucleótidos que codifican para polipéptidos de la familia SARP. Polipéptidos representativos son aquellos que tienen la secuencia aminoacídica de las ID. SEC. NO: 2, 4, 6 ó 7. La invención, del mismo modo, abarca polinucleótidos que codifican para péptidos que tienen homología sustancial con la secuencia aminoacídica de las ID. SEC. No: 2, 4, 6 ó 7.

5

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos aislados que están compuestos por una región de al menos 15 nucleótidos contiguos, en los cuales los nucleótidos son capaces de formar un dúplex estable con un polinucleótido que codifica para la secuencia de las ID. SEC. No. 1, 3, 5 ó 18.

10

Otro aspecto de la invención lo constituye el clonaje y los vectores de expresión que contienen los polinucleótidos de la invención. También se incluyen células hospederas que contienen los polinucleótidos de la invención.

15

También proporcionamos polipéptidos de al menos 11 residuos de aminoácidos de las ID. SEC. NO: 2, 4, 6 ó 7 y polipéptidos que presentan una homología sustancial con los 11 residuos de aminoácidos de las ID. SEC. NO: 2, 4, 6 ó 7. La invención también proporciona polipéptidos de fusión que contienen un polipéptido de la presente invención.

La invención también proporciona anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen específicamente a los polipéptidos de la invención. Estos anticuerpos se denominan α SARP.

20

En otro aspecto, se proporcionan métodos para detectar los polinucleótidos de la invención. Estos métodos incluyen la puesta en contacto con una muestra biológica, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo estable, y la detección de cualquier complejo estable formado.

25

Otro aspecto de la invención son los métodos para detectar la familia de proteínas SARP. Estos métodos contienen los pasos para poner en contacto una muestra biológica obtenida a partir de un individuo con un anticuerpo α SARP de la invención bajo condiciones que permiten la formación del complejo estable antígeno-anticuerpo y detectar el complejo estable formado, si existe alguno.

30

También se proporcionan métodos para la detección de enfermedades mediante el suministro de una muestra de prueba de fluido corporal; buscando en la muestra de prueba la presencia del producto génico de un gen *hsarp* diferente de SARP3; y comparando la cantidad del producto génico detectado en la muestra de prueba con la cantidad del producto génico detectado en una muestra no enferma del mismo tipo de tejido que la muestra de prueba. El análisis incluye, pero no se limita a, la hibridización de ácidos nucleicos y las interacciones antígeno-anticuerpo.

35

Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de una composición que comprende un componente que es el polinucleótido *hsarp2* (ID SEC NO:18) o el polipéptido hSARP2 (ID SEC NO:7) en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una dolencia relacionada con la apoptosis en el que dicha dolencia relacionada con la apoptosis es un cáncer.

40

Los objetos anteriores y otros de la invención se harán rápidamente evidentes para los conocedores de la técnica a partir de las figuras y descripciones detalladas siguientes en las cuales se muestran y describen solo las realizaciones preferentes de la invención, simplemente a modo de ilustración de la mejor manera de llevar a cabo la invención.

Breve descripción de las figuras

45

La figura 1A muestra un alineamiento de la secuencia aminoacídica predicha de hSARP2 y las proteínas *frizzled*. (ID. SEC. NOS: 7-9)

50

La figura 1B muestra una comparación de la secuencia aminoacídica de mSARP1 (ID. SEC. NO: 2) y varias proteínas *frizzled*. (ID. SEC. NOS: 10-14)

55

La figura 2 muestra un *Northern blot* de la expresión tejido específica de *msarp1* en varios tejidos de ratón. Los ARNs se aislaron de diferentes tejidos, se redisolieron en un gel de formaldehído-agarosa al 1,2%, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridizaron con *msarp1* en condiciones muy rigurosas.

60

La figura 3A presenta los resultados de un análisis de *Northern blot* de múltiples tejidos humanos con una sonda específica para *hsarp2*.

65

La figura 3B es una compilación de estudios de *Northern blot* que presentan la expresión tejido específica de *hsarp1* y *hsarp3* en varios tejidos humanos. La hibridización de los *Northern blot* de múltiples tejidos se realizó en condiciones muy rigurosas.

La figura 4 presenta los resultados de un análisis de *Northern blot* de líneas celulares normales y transformadas, con una sonda específica para *hsarp2*.

65

La figura 5 es un *Northern blot* que presenta la expresión de *msarp1* en células quiescentes 10T1/2 después de sembradas a baja densidad.

La figura 6, los paneles del A al C muestran el porcentaje de viables transformados de las líneas celulares MCF7 luego de diferentes tratamientos. Las células MCF7 se transformaron con un vector de expresión (pcDNA3), o con pcDNA3 que portaba el gen *hsarp2*. El panel A muestra el porcentaje de células sobrevivientes luego de 7 días de privación de suero. El panel B muestra el porcentaje de células sobrevivientes después de 24 horas de tratamiento con adriamicina, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El panel C muestra el porcentaje de células sobrevivientes después de 24 horas de tratamiento con hTNF, 50 ng/mL . El panel D muestra los niveles relativos de la expresión de *hsarp2* en cada uno de los clones MCF7 utilizados en los experimentos descritos en los ejemplos que aquí se presentan.

La figura 7 es un *Northern blot* del ARN aislados de miocitos cardíacos de rata luego de varios tratamientos, utilizando como sonda fragmentos de ADNc de *msarp1*.

La figura 8 contiene dos gráficos de barras que presentan la viabilidad de miocitos cardíacos de ratas neonatas control, transfectados con β -galactosidasa y transfectados con *msarp1*, sometidos a 24 horas de un medio libre de suero o tratamiento con adriamicina. Las cantidades de partículas virales infecciosas por célula se muestran entre paréntesis.

La figura 9 contiene una serie de gráficos que presentan (A) el efecto de la cicloheximida sobre la muerte celular inducida por privación de suero y (B) el efecto de medios condicionados a partir de las células quiescentes sobre células sometidas a la privación de suero y el tratamiento con cicloheximida.

La figura 10 presenta (A) gráficos, (B) un *Northern blot*, (C) un análisis de *Western*. Los gráficos muestran los efectos del TNF y la geramida sobre la viabilidad celular en presencia de SARPs. El *Northern blot* muestra el ARN control de células transfectadas con pcDNA3, ARN de células transfectadas con vectores recombinantes de *msarp1* o *hsarp2*. Las proteínas del medio libre de suero condicionado por células 10T1/2 y MCF7 se concentraron mediante filtración y se sometieron a un análisis de *Western* utilizando un antisuero anti-GST-mSARP1 (dilución 1:5000).

La figura 11 muestra la comparación de la expresión de *hsarp1* en células humanas normales y células epiteliales de próstata neoplásicas, a aumentos de 10X y 40X.

La figura 12 muestra la comparación de la expresión de *hsarp2* en células humanas normales y células epiteliales mamarias neoplásicas, a aumentos de 10X y 40X.

La figura 13 muestra la detección, mediante análisis de *Western*, de la β -catenina en células MCF7 transfectadas con pcDNA3, *msarp1* y *hsarp2*.

35 Método(s) para llevar a cabo la invención

En el presente documento se revela una nueva familia de genes, cuya expresión se asocia a la apoptosis. Los genes se denominan "*sarp*" (proteína secretada relacionada con la apoptosis). Los genes *msarp* se obtienen de fuentes murinas, mientras que los genes *hsarp* se obtienen de fuentes humanas. Estos genes, que incluyen a *msarp1*, *hsarp2*, *hsarp1* y *hsarp3* codifican para nuevas proteínas que pertenecen a la familia de proteínas denominadas "SARP". El gen *hsarp2* se expresa en diferentes tejidos. Cuando *hsarp2* se insertó en un vector de expresión y se transfectó en líneas celulares humanas incrementó el porcentaje de células que sufrían apoptosis en cultivo. El gen *hsarp2* se expresa en líneas celulares no transformadas que se encuentran en crecimiento exponencial, y está reprimido en células quiescentes. Se ha demostrado que la expresión incrementada de *hsarp2* incrementa la muerte celular programada en una línea celular de carcinoma de mama, en forma dependiente de la dosis. Una búsqueda mediante BLAST de la base de datos Gene Bank mostró homología significativa entre la nueva familia de genes y miembros de la familia de genes "*Frizzled Like*" (ver Fig. 1B, ID. SEC. NOS: 10-14). La familia de genes *frizzled-like* codifica para proteínas de la membrana celular, con siete dominios de transmembrana, cuya función es desconocida. Con anterioridad se ha mostrado que Wnt y las proteínas *frizzled* interactúan. Bhanot *et al.* (1996) *Nature* 382:225-230. Alineamientos múltiples de secuencia a las proteínas *frizzled-like* humanas mostraron que la nueva familia posee el mayor grado de homología en los dominios N-terminales extracelulares de las proteínas *frizzled-like*, con baja homología en la región de transmembrana. Se ha mostrado ahora que los SARPs 1 y 2 interfieren con la interacción entre Wnt y la proteína *frizzled* y modifican la apoptosis mediante la señalización de célula a célula y de las células a la matriz extracelular.

Hemos clonado una familia de genes nuevos a partir de células de ratón, y a partir de bibliotecas de ADNc de corazón y páncreas humanos. Hemos mostrado que la expresión de genes SARP1 y SARP2 se asocia a las etapas iniciales de la apoptosis. El gen de ratón, denominado *msarp1*, contiene un único marco de lectura abierto, que codifica para un producto proteico predicho de 295 aminoácidos, que se secreta. El gen *msarp1* se expresa a altos niveles en corazón, pulmón, y se encuentra activado en cardiomiocitos sometidos a lesiones que desencadenan la apoptosis. La transcripción de *msarp1* también se encuentra significativamente incrementada en células 10T1/2 que alcanzan la quiescencia, un estado en que se detiene el crecimiento celular, y que se caracteriza por el aumento de la resistencia a los estímulos apoptóticos.

La nueva familia de genes también incluye tres genes humanos, denominados *hsarp2*, *hsarp1* y *hsarp3*. El gen *hsarp1* es un homólogo cercano de *msarp1* y contiene un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para un polipéptido de 212 aminoácidos, denominado hSARP1. El gen *hsarp3* codifica para una proteína de 316 aminoácidos, denominada hSARP3, que es homóloga a hSARP2 y mSARP1. La proteína hSARP1 se expresa a altos niveles en colon, intestino delgado, páncreas y próstata. La proteína hSARP3 se expresa predominantemente en páncreas.

ES 2 263 181 T5

La secuencia del ADNc de *hsarp2* contiene 1302 nucleótidos, y codifica para un polipéptido de 314 aminoácidos que tiene una metionina en el N-terminal y una lisina en el C-terminal. La secuencia completa del ADNc comprende 301 nucleótidos en la región 5' no traducida, y 62 nucleótidos en la región 3' no traducida. El ADNc de *hsarp2* contiene un marco de lectura abierto (ORF) principal (hSARP2). El sitio de inicio ATG se encuentra en la posición 303, y el sitio de terminación está en la posición 1248. Cuando *hsarp2* se inserta en un vector de expresión y se transfecta en líneas celulares humanas, incrementa el porcentaje de células que sufren apoptosis en el cultivo.

Como se utiliza en el presente documento, el término “*sarp*”, que incluye a *msarp1*, *hsarp1*, *hsarp2*, *hsarp3*, se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican para los SARPs, y los derivados y nucleótidos complementarios de los mismos. El término “SARP”, que incluye a mSARP, hSARP1, hSARP2 y hSARP3 se refiere a las proteínas codificadas por los mismos. Otros miembros de la familia pueden obtenerse mediante los métodos descritos en los Ejemplos que se presentan en este documento.

La presente invención abarca secuencias de nucleótidos de la nueva familia de genes. Los nucleótidos incluyen, pero no se limitan a, el ADNc, el ADN derivado del genoma y el ADN o ARN sintéticos o semisintéticos. La secuencia nucleotídica de *msarp1* está contenida en la ID. SEC. No: 1; la secuencia nucleotídica de *hsarp1* está contenida en la ID. SEC. No: 3, la secuencia de *hsarp3* está contenida en la ID. SEC. NO: 5, y la secuencia nucleotídica de *hsarp2* está contenida en la ID. SEC. No: 18. Como se describe en los ejemplos del presente documento, el ARNm de esta familia de genes se ha detectado en varios tejidos y órganos humanos mediante análisis de *Northern blot*. La expresión del ARNm de *hsarp2*, por ejemplo, se detectó en la mayoría de los tejidos humanos ensayados; en células mamarias humanas no transformadas en crecimiento exponencial y en células diploides normales de fibroblastos humanos en crecimiento exponencial.

El término “polinucleótido” se utiliza para hacer referencia a la forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que contengan desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o sus análogos. Los términos “polinucleótido” y “nucleótido” como se han utilizado en este documento son utilizados indistintamente. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y puede realizar cualquier función, conocida o desconocida. El término “polinucleótido” abarca moléculas de simple cadena, doble cadena o triple hélice. A menos que se especifique o se requiera otra cosa, cualquier realización de la invención descrita en este documento que sea un polinucleótido abarca tanto la forma doble cadena, como cada una de las formas de simple cadena complementarias conocidas o predichas que componen la forma de doble cadena.

Los siguientes son algunos ejemplos de polinucleótidos aunque no los únicos: un gen, o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado con cualquier secuencia, ARN aislado con cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácido nucleico. Un polinucleótido puede abarcar nucleótidos modificados como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Los análogos de purinas y pirimidinas se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, aziridinilcitosina, 4-acetilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetil-aminometiluracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, pseudouracilo, 5-pentiluracilo y 2,6-diaminopurina. La utilización del uracilo como un sustituto de la timina en un ácido desoxirribonucleico es también considerada una forma análoga de la pirimidina.

La modificación de la estructura del nucleótido, si está presente, puede realizarse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes de tipo no nucleotídico. Un polinucleótido puede ser modificado aún más después de la polimerización, como a través de la conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos de modificación incluidos en esta definición son, por ejemplo, las caperuzas, sustituciones de uno o más de los nucleótidos que existen de manera natural por un análogo, modificaciones internucleótidos como, por ejemplo, las que tienen enlaces no cargados (p.e., metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (p.e., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), las que contienen grupos acompañantes, tales como, por ejemplo, proteínas (p.e., nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), las que contienen agentes intercalantes (p.e., acridina, psoralen, etc.), las que contienen agentes quelantes (p.e., metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), las que contienen agentes alquilantes, las que contienen enlaces modificados (p.e. ácidos nucleicos alfa anómicos) y también las formas no modificadas de el(los) polinucleótido(s).

Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes de ordinario en los azúcares pueden ser reemplazados por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos mediante grupos protectores estándar, o activados para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden ser conjugados a soportes sólidos. Los grupos hidroxilo terminales 5' o 3' pueden estar fosforilados o sustituidos con aminas o grupos caperuza orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos pueden ser derivatizados con grupos protectores estándar.

Los polinucleótidos pueden también contener formas análogas de los azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, 2'-O-metil-, 2'-O-allil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α -anómicos, azúcares epiméricos tales como la arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos no básicos tales como metil ribósido.

ES 2 263 181 T5

Como se señaló anteriormente, uno o más enlaces fosfodiéster pueden ser reemplazados por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, las realizaciones en las que el fosfato es reemplazado por P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), (O)NR₂ (“amidato”), P(O)R, P(O)OR’, CO o CH₂ (“formacetal”), en los que cada R o R’, independientemente, es H o un alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene, de manera opcional, un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en el polinucleótido tienen que ser idénticos.

Aunque se utilizarán los azúcares y bases convencionales en la aplicación del método de la invención, la sustitución por formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa en el diseño de un producto final, como lo pueden ser estructuras alternativas del esqueleto como los esqueletos de poliamida.

Un polinucleótido “antisentido” es una secuencia complementaria por completo o solo en parte, a un ARN o ADN funcional. Por ejemplo, el ARN antisentido es el complementario a las secuencias del ARNm copiado a partir del gen.

Un “fragmento” (también llamado una “región”) de un polinucleótido (p.e. un polinucleótido que codifica para un *sarp*) es un polinucleótido que codifica para al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, y con mayor preferencia aún, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos.

El término polinucleótido “recombinante” como se ha utilizado en el presente documento, se refiere a un polinucleótido de origen genómico, de ADNc, semisintético o sintético, el que, en virtud de su origen o manipulación: no está asociado con el total o una porción del polinucleótido con el que se encuentra asociado en la naturaleza; está enlazado a un polinucleótido diferente de aquel al que se encuentra ligado en la naturaleza; o no existe en la naturaleza.

Los términos “polipéptido”, “oligopéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede incluir residuos modificados de aminoácidos y puede estar interrumpido por residuos no aminoacídicos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo por formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, como la conjugación con algún componente de marcaje. La definición también incluye, por ejemplo, polipéptidos que contengan uno o más análogos de algún residuo de aminoácido (incluyendo, por ejemplo, residuos de aminoácido que no existen de manera natural, etc.) así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

Un “fragmento” de un polipéptido (también llamado una “región”) de un SARP es un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica de un SARP, que tiene al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos. Para los fines de esta invención, un fragmento de un SARP se puede identificar y caracterizar mediante una de las funciones siguientes: (a) homología a un SARP; (b) capacidad de modificar el porcentaje de células que sufren apoptosis; o (c) afectar la muerte celular. Un fragmento SARP puede poseer alguna, más de una o todas las funciones antes identificadas. Más adelante se describirán métodos para determinar estas funciones, desde (a) hasta (c).

Un “polipéptido de fusión” es un polipéptido que abarca regiones en una posición diferente de la secuencia que la que aparece en la naturaleza. Las regiones pueden existir normalmente en proteínas diferentes y quedar unidas en el polipéptido de fusión; o pueden existir normalmente en la misma proteína, pero quedar en un nuevo arreglo en el polipéptido de fusión.

Un “fragmento funcionalmente equivalente” de un polipéptido SARP o de un polinucleótido *sarp* mantiene al menos una propiedad y/o función de los polipéptidos SARP o de los polinucleótidos *sarp*. Por ejemplo, se pueden modificar las secuencias mediante la adición de nucleótidos o péptidos adicionales, como se conoce en la técnica, de modo tal que no se altere la funcionalidad de la secuencia. Otros ejemplos son la delección y/o sustitución de secuencias. De modo alternativo, se pueden modificar las secuencias mediante la sustitución de nucleótidos o residuos de aminoácidos, o una combinación de adición, delección y sustitución. Como resulta evidente para alguien avezado en la técnica, la funcionalidad de una secuencia polipeptídica incluye características y/o actividades de la secuencia tales como la antigenicidad y el efecto sobre la vía apoptótica. También resulta claro que la funcionalidad de una secuencia polipeptídica depende, en parte, de la intención con la que se le vaya a utilizar, y cualquier funcionalidad que esté preservada en un fragmento de un polinucleótido, satisface esta definición.

Por ejemplo, un “fragmento funcionalmente equivalente” de un polinucleótido *sarp* puede ser uno en el cual se preserve una capacidad de hibridización, ya que el polinucleótido deseado puede ser utilizado como sonda. De modo alternativo, un “fragmento funcionalmente equivalente” de un polinucleótido *sarp* puede implicar que el polinucleótido codifica para el fragmento de un SARP que tiene una función asociada con un SARP intacto, y preferiblemente una función asociada a la modulación de la apoptosis. Un fragmento funcionalmente equivalente de los nuevos polipéptidos o polinucleótidos puede tener una función igual, aumentada o disminuida, con relación a los polipéptidos o polinucleótidos SARP. Otras funciones de los SARP se han listado antes. Un fragmento funcionalmente equivalente tiene al menos 10 aminoácidos, con mayor preferencia aún tiene al menos 25 nucleótidos o al menos 20 aminoácidos.

Las condiciones “rigurosas” para la hibridización tanto de ADN/ADN como de ADN/ARN son como se describen en Sambrook *et al.* (1989) MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ejemplos de condiciones relevantes incluyen (en orden de aumento de “rigor”): temperaturas de

ES 2 263 181 T5

incubación de 25°C, 37°C, 50°C, y 68°C; concentraciones de tampón de 10xSSC, 6xSSC, 1xSSC (donde SSC es NaCl 0.15M y tampón citrato 15 mM) y sus equivalentes utilizando otros sistemas tampón; concentraciones de formamida de 0%, 25%, 50% y 75%; tiempos de incubación desde 5 minutos hasta 24 horas; 1, 2, ó más pasos de lavado; tiempos de incubación de los lavados de 1, 2, ó 15 minutos; y soluciones de lavado de 6xSSC, 1xSSC, 0.1xSSC, o agua desionizada.

Un “dúplex estable” de polinucleótido, o un “complejo estable” formado entre cualesquiera dos o más componentes en una reacción bioquímica se refiere a un dúplex o complejo con la durabilidad suficiente para persistir entre la formación del dúplex o complejo y su subsiguiente detección, incluyendo cualesquiera pasos de lavado opcionales u otra manipulación que pueda tener lugar en el ínterin.

El término “anticuerpo” se refiera a una proteína inmunoglobulina o un fragmento de unión a un antígeno que reconoce a un antígeno particular, de preferencia, los anticuerpos de la presente invención (denominados α SARP) no son específicos para miembros de la familia de proteínas Frizzled. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. La generación y caracterización de anticuerpos se encuentran dentro de las habilidades de un técnico ordinario. El término “anticuerpo” abarca además a proteínas que se han unido a otros compuestos mediante conjugación química, o mediante la mezcla con un excipiente o un adyuvante. El término “fragmento de unión a antígeno” incluye a cualquier péptido que se una a un SARP de manera específica. De ordinario, estos derivados incluyen fragmentos de inmunoglobulina tales como Fab, F(ab')₂, Fab', scfv (tanto en su forma monomérica como polimérica) y las cadenas H y L aisladas. El término α -SARP abarca fragmentos de unión a antígeno. Un fragmento de unión a antígeno mantiene la especificidad de la inmunoglobulina intacta, aunque la avidez y/o la afinidad puedan ser alteradas.

Los fragmentos de unión a antígeno (también llamados “derivados” en este documento) se generan de ordinario mediante ingeniería genética, aunque alternativamente pueden obtenerse también mediante otros métodos y combinaciones de métodos. Esta clasificación incluye, pero no se limita a, fragmentos de péptidos modificados y péptidos de fusión. Los compuestos preferidos incluyen fragmentos de polipéptidos de los CDRs, proteínas de fusión de los anticuerpos que comprenden a los componentes efectores de las citocinas, proteínas de fusión de anticuerpos que comprenden adyuvantes o drogas y proteínas de la región V de simple cadena. Además, los fragmentos de unión a antígeno de esta invención se pueden utilizar como reactivos para el diagnóstico y la imagenología.

Scfv puede producirse de manera recombinante o mediante síntesis. Para la producción sintética de scfv se puede utilizar un sintetizador automático. Para la producción recombinante de scfv se puede introducir un plásmido adecuado que contenga el polinucleótido que codifica para el scfv en una célula hospedera adecuada, sea eucariota, tal como levadura, células de plantas, células de insecto o células de mamíferos, o células procariontas tales como *Escherichia coli*, y la proteína expresada se puede aislar utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas.

Un sistema particularmente útil para la producción de scfv es el plásmido pET-22b(+) (Novagen, Madison, WI) en *E. coli*. pET-22b(+) contiene un dominio de unión a ión níquel que comprende 6 residuos de histidina secuenciales, lo cual permite la purificación de la proteína expresada en una resina de afinidad adecuada. Otro ejemplo de un vector adecuado es pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA), descrito anteriormente.

Las condiciones de expresión deben asegurar que el scfv adopte la estructura terciaria óptima. En dependencia del plásmido utilizado (en especial, de la actividad del promotor) y de la célula hospedera, puede resultar necesario modular la velocidad de producción. Por ejemplo, puede ser necesario el uso de un promotor más débil o la expresión a temperaturas más bajas para optimizar la producción de scfv correctamente plegado en sistemas procariontas; o puede resultar preferible expresar scfv en células eucarióticas.

También proporcionamos anticuerpos conjugados a un grupo químicamente funcional. De ordinario, el grupo es un marcador capaz de producir una señal detectable. Estos anticuerpos conjugados son útiles, por ejemplo, para los sistemas de detección e imagenología. Tales marcadores se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos, enzimas, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, sustratos, cofactores o inhibidores de compuestos bioluminiscentes. Ver como ejemplos de patentes que ilustran el uso de tales marcadores, U.S. Patent Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; and 4,366,241. Los grupos se pueden unir de manera covalente a los anticuerpos, se pueden unir de manera recombinante, o se pueden conjugar a los anticuerpos mediante un reactivo secundario, tal como un segundo anticuerpo, proteína A o un complejo biotina-avidina.

Son muy conocidos en la técnica los métodos para la producción y aislamiento de anticuerpos. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Los métodos de purificación incluyen precipitación salina (por ejemplo con sulfato de amonio), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo en una columna de intercambio aniónica o catiónica, equilibrada a pH neutro y eluida con un gradiente de pasos de fuerza iónica creciente), cromatografía de filtración en gel (incluyendo filtración en gel mediante HPLC), y cromatografía en resinas de afinidad tales como proteína A, proteína G, hidroxiapatita, y anti-inmunoglobulina. Los anticuerpos pueden purificarse también en columnas de afinidad que contengan una proteína SARP; por ejemplo, en la forma de una Ab1 o Ab3 purificada. De preferencia, los anticuerpos pueden purificarse utilizando una cromatografía de Protein-A-CL-Sepharose™ 4B seguida por una cromatografía en una columna de intercambio iónico de DEAE-Sepharose™ 4B.

ES 2 263 181 T5

Una “línea celular” o “cultivo celular” denota a células de eucariontes superiores cultivadas o mantenidas *in vitro*. Se entiende que los descendientes de una célula pueden no ser completamente idénticos (sea morfológicamente, genotípicamente, o fenotípicamente) a la célula parental.

5 Una “célula hospedera” incluye a una célula individual o a un cultivo celular que puede recibir o ha recibido vector(es) o la incorporación de moléculas de ácidos nucleicos y/o proteínas. Las células hospederas incluyen la progenie de una única célula hospedera, y la progenie puede no ser necesariamente idéntica (en términos morfológicos o en términos genómicos del complemento de ADN total) a la célula parental original, debido a mutaciones naturales, accidentales o deliberadas. Una célula hospedera incluye células transfectadas *in vivo* con polinucleótido(s) de esta
10 invención.

Un “vector” es una molécula de ácido nucleico autorreplicativa que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada a células hospederas y/o de una célula hospedera a otra. El término incluye a vectores cuya función primaria es la inserción de una molécula de ácido nucleico en una célula, la replicación de vectores cuya función primaria es la replicación de ácidos nucleicos, y los vectores de expresión, cuya función primaria es la transcripción y/o traducción
15 del ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores. En la técnica se conocen vectores de clonaje adecuados, p.e., los que se utilizan en sistemas de expresión bacterianos, de células de mamíferos, levadura, y de células de insectos. Vectores específicos y células hospederas adecuadas se discuten, por ejemplo, en Galesa y Ramji, *Vectors*, John Wiley & Sons (1994). Ejemplos de células hospederas procariontas para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Ejemplos de células hospederas eucariotas incluyen, pero no se limitan a, células de aves, insectos, plantas, y células animales tales como C057, HeLa y CHO.

Los “vectores de expresión” se definen como polinucleótidos que, cuando se introducen en una célula hospedera apropiada, pueden transcribirse y traducirse a polipéptido(s). Un “sistema de expresión” usualmente denota a una
25 célula hospedera adecuada que contiene un vector de expresión que puede cumplir la función de engendrar un producto de expresión deseado.

Una “secuencia señal” es una pequeña secuencia aminoacídica que dirige a las proteínas secretoras o de membrana recién sintetizadas a y a través de las membranas celulares, tales como las del retículo endoplasmático. Las secuen-
30 cias señal, de ordinario, se encuentran en la porción N-terminal de un polipéptido y son escindidos una vez que el polipéptido ha atravesado la membrana.

Un “producto génico” abarca cualquier producto o productos de la transcripción o traducción de un gen, incluyen-
do, sin limitación, ARNm, ARNs y proteínas.

35 “Heterólogos” quiere decir derivados de (o sea, obtenidos de) una entidad genotípicamente diferente del resto de la entidad con la que se le compara. Por ejemplo, un polinucleótido puede situarse mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una fuente diferente, y de esa manera se convierte en un polinucleótido heterólogo. Un promotor que se encuentra unido a una secuencia codificante con la cual no se encuentra unida en la
40 naturaleza es un promotor heterólogo.

El polinucleótido heterólogo puede incluir una secuencia de interés para propósitos de terapia, y puede encontrarse, de manera opcional, en forma de un *cassette* de expresión. Tal como se usa el término en este documento, un vector
45 no necesita ser capaz de replicarse la célula o sujeto blanco final. El término incluye a los vectores de clonaje para la replicación de un polinucleótido, y vectores de expresión para la traducción de una secuencia que codifica para un polinucleótido. También se incluyen vectores virales, que comprenden a un polinucleótido encapsulado o envuelto en una partícula viral.

Se pueden construir vectores de expresión adecuados de acuerdo a técnicas estándar, o pueden seleccionarse de
50 entre un gran número de vectores de clonaje que se encuentran disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonaje seleccionado puede variar de acuerdo con la célula hospedera que se pretenda utilizar, los vectores de clonaje útiles generalmente tendrán la capacidad de autorreplicarse, pueden poseer un único blanco para una endonucleasa de restricción particular, o pueden portar genes para un marcador que se puede utilizarse para seleccionar los clones que contengan el vector. Ejemplos adecuados incluyen plásmidos y bacteriófagos, p.e., pUC18, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADNs de fagos, y vectores de conexión tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros
55 vectores de clonaje se encuentran disponibles por parte de vendedores comerciales, tales como BioRad, Stratagene, e Invitrogen.

Los vectores de expresión, por lo general, son construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un poli-
60 nucleótido que codifica para un polipéptido de interés. El polinucleótido que codifica para el polipéptido se encuentra unido de manera operativa a elementos adecuados de control transcripcional, tales como promotores, *enhancers*, y terminadores. Para la expresión (o sea, la traducción) se requieren también usualmente uno o más elementos de control traduccional, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de iniciación de la traducción, y codones de parada. Estos elementos de control (transcripcionales y traduccionales) pueden obtenerse a partir de los genes *sarp* o pueden ser
65 heterólogos (o sea, derivados de otros genes u otros organismos). Una secuencia polinucleotídica que codifica para un péptido señal puede incluirse también, para permitir al péptido cruzar las membranas celulares, o alojarse en ellas, o ser secretada por la célula.

ES 2 263 181 T5

En la técnica se conoce gran cantidad de vectores de expresión adecuados para la expresión en células eucarióticas, incluyendo levadura, células de aves y de mamíferos. Un ejemplo de vector de expresión es pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA), en el cual la transcripción es manejada por el promotor/*enhancer* temprano del Citomegalovirus (CMV). Este vector también contiene sitios de reconocimiento para múltiples enzimas de restricción para la inserción del polinucleótido de interés. Otro ejemplo de un vector (sistema) de expresión es el sistema de baculovirus/insectos.

Un vector de la presente invención puede contener uno o más polinucleótidos que codifican para un polipéptido. También puede contener secuencias polinucleotídicas que codifican para otros polipéptidos que estimulan, facilitan, o modulan el resultado deseado, tales como linfocinas, que incluyen, pero no se limitan a, IL-2, IL-4, y GM-CSF. La linfocina preferida es GM-CSF. Las construcciones preferidas de GM-CSF son aquellas en que se han eliminado los elementos ricos en AU de la región 3' no traducida y las secuencias de la región 5' no traducida, que pueden formar un lazo de tipo tallo y anillo.

Los vectores que contienen a los polinucleótidos de interés se pueden introducir en la célula hospedera mediante uno de varios métodos apropiados, que incluyen electroporación, transfección utilizando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrana, u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (donde el vector es un agente infeccioso, tal como un virus vacunal, como se discute más adelante). La selección del método para la introducción de vectores o plinucleótidos dependerá, por lo común, de las características de la célula hospedera. Una vez introducido en una célula hospedera adecuada, la expresión del polipéptido puede determinarse utilizando cualquier ensayo conocido en la técnica. Por ejemplo, la presencia del polipéptido puede detectarse mediante un RIA o un ELISA del sobrenadante del cultivo (si el polipéptido es secretado) o a partir de lisados celulares.

Un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo "aislado" o "purificado" es aquel que se encuentra sustancialmente libre de materiales con los cuales está asociado en la naturaleza. Por sustancialmente libre se entiende al menos 50%, de preferencia 70%, con mayor preferencia al menos 80%, y con mayor preferencia aún al menos 90% libre de materiales con los cuales se encuentra asociado en la naturaleza.

Una "muestra" biológica abarca una variedad de tipos de muestras obtenidos de un individuo y de ordinario se utiliza en un procedimiento de diagnóstico o ensayo. La definición abarca sangre u otras muestras líquidas de origen biológico, muestras sólidas de tejidos, tales como especímenes de biopsias o cultivos de tejidos o de células derivados de los mismos y de la progenie de los mismos. La definición incluye también muestras que han sido sometidas a alguna manipulación con posterioridad a su obtención, tales como tratamiento con reactivos, solubilización, o enriquecimiento de ciertos componentes, tales como proteínas o polinucleótidos. El término abarca varios tipos de muestras clínicas obtenidas de cualquier especie, y también incluye, pero no se limita a, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados de células, suero, plasma, fluidos biológicos, y muestras de tejidos.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estabilización (o sea, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, prevención de la difusión (o sea, metástasis) de la enfermedad, demora o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejoramiento o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (sea parcial o total), sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en ausencia del tratamiento.

"Asociado a la apoptosis" se refiere a cualquier condición en la cual esté involucrada la vía de la apoptosis que conduce a la muerte celular. Estas condiciones pueden ser eventos biológicos normales o patogénicos y pueden ser iniciados por una amplia variedad de señales, que incluyen, pero no se limitan a, hormonas, privación de factor de crecimiento del suero, agentes quimioterapéuticos, radiación ionizante, e infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Los infartos son causados por una súbita insuficiencia del suministro de sangre venosa o arterial, debido a embolismos, trombosis, o presión que produce un área macroscópica de necrosis; los órganos que pueden ser afectados con mayor probabilidad son el corazón, cerebro, bazo, riñón, intestino, pulmón, y testículos. La apoptosis ocurre en los tejidos que rodean el infarto, a partir de la reperusión del área afectada por parte de la sangre; por tanto, la modulación a través un cambio inducido mediante un modificador biológico de la producción endógena o la transfección *in vivo*, puede ser eficaz en la reducción de la severidad del daño causado por los infartos y los derrames.

Los agentes quimioterapéuticos, la radiación ionizante, y la infección por VIH también inician la vía de la apoptosis. En la actualidad se utiliza una gran variedad de suplementos alimentarios en un intento para mejorar los desórdenes gastrointestinales que acompañan a la quimioterapia, la radiación y el SIDA. Estos suplementos, por lo general, contienen carbohidratos, grasas, e hidrolizados de proteínas de plantas. Véase, p. e.: Tomei y COPE *et al.* en *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death* (1991) Cold Spring Harbor Laboratory Press. PCT Publicación No. WO 95/15173, describen extractos derivados de plantas y desprovistos de lípidos, capaces de producir efectos antiapoptóticos. Por tanto, la afectación de las bases moleculares de las dolencias asociadas con la apoptosis tiene utilidad terapéutica en numerosas situaciones clínicas.

La "terapia antisentido" es un método de atenuar la expresión de los genes utilizando un polinucleótido terapéutico. El polinucleótido terapéutico referente a SARP1 o SARP2 comprende una secuencia, o una secuencia complementaria,

ES 2 263 181 T5

que es capaz de formar un híbrido estable con el gen blanco propiamente dicho o, con mayor frecuencia, con el ARN mensajero que resulta de la transcripción del mismo. De ordinario, el polinucleótido terapéutico se encuentra unido de manera operativa a un promotor adecuado. El polinucleótido antisentido no precisa ser un complemento exacto del polinucleótido blanco para ser efectivo, siempre que los híbridos estables se formen bajo condiciones fisiológicas.

5 Pueden presentarse un número moderado de mutaciones, inserciones, o deleciones, en dependencia de la longitud del polinucleótido antisentido. El polinucleótido antisentido no necesita hibridizar con la totalidad de la secuencia codificante del gen blanco, aunque se prefiere la presencia de regiones hibridizadas más largas sobre la de secuencias más cortas.

10 Una “cantidad efectiva” es una cantidad suficiente para operar los resultados clínicos beneficiosos o deseables. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más dosis. En términos de tratamiento, una “cantidad efectiva” de polinucleótido y/o polipéptido es una cantidad suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, demorar o retardar la progresión de estados de enfermedad asociados a la apoptosis o, de alguna otra forma, reduce las consecuencias patológicas de la enfermedad. La detección y la medición de estos indicadores de eficacia se discuten más adelante.

15 La cantidad efectiva la determina generalmente el médico en un análisis caso por caso y se encuentra dentro de las habilidades de un técnico. Varios factores se toman en cuenta de ordinario para determinar una dosis apropiada. Estos factores incluyen la edad, el sexo, y el peso del paciente, la dolencia que se esté tratando, la severidad de la dolencia y la forma de administración del anticuerpo. Por ejemplo, no es necesario que la concentración de scfv sea tan elevada como la de los anticuerpos nativos para que tenga efectos terapéuticos.

20 Un “individuo” es un vertebrado, de preferencia, un mamífero, con mayor preferencia, un humano. Los mamíferos incluyen a los animales de granjas y deportes, y a las mascotas.

25 La invención, por tanto, incluye nucleótidos aislados que codifican (o son complementarios a los que codifican) para polipéptidos sustancialmente idénticos a (o sea, con al menos 90% de identidad de secuencia) los SARPs, como ejemplifican las ID. SEC. NOS: 2, 4, 6, y 7, con cualesquiera sustituciones aminoacídicas, preferentemente conservativas, o una variante alélica de los mismos, o para un homólogo de SARP en una especie distinta al hombre. La invención, por lo tanto, incluye, por ejemplo, una o ambas hebras de un ADNc que codifica para un SARP, o una variante alélica del mismo, un ADN recombinante, que se encuentra incorporado a un vector, a un plásmido o virus

30 que se replica de manera autónoma, o al ADN genómico de una célula procariota o eucariota; o fragmentos de ADN genómico (p.e.: producidos mediante PCR, o mediante tratamiento del ADN humano o de otro origen con enzimas de restricción). También incluye un ADN recombinante que sea parte de un gen híbrido que codifica para un polipéptido adicional.

35 El ADN aislado puede incorporarse a un vector (o sea, un virus, fago, o plásmido) que puede introducirse mediante transfección o infección en una célula. Los vectores adecuados incluyen todos los conocidos en la técnica y no es preciso describirlos en detalle en este documento. El vector puede incluir una o más secuencias de control de la expresión, en cuyo caso la célula transfectada con el vector es capaz de expresar el polipéptido. Los vectores también pueden proporcionar promotores inducibles para la expresión de los *sarps*. Los promotores inducibles son aquellos que no permiten la expresión constitutiva del gen, sino que permiten su expresión solo bajo determinadas condiciones.

40 Tales promotores pueden ser inducidos por una gran cantidad de estímulos, que incluyen, pero no se limitan a, la exposición de una célula que contiene el vector a un ligando, ion metálico u otra sustancia química, o cambio de temperatura.

45 Estos promotores también pueden ser específicos para una célula, o sea, inducibles solo en un determinado tipo celular y, con frecuencia, solo durante un período de tiempo específico. El promotor, además, puede ser específico del ciclo celular, o sea, ser inducido o inducible solo durante una fase particular del ciclo celular. El promotor puede ser tanto específico para un tipo celular, como específico del ciclo celular. Cualquier promotor inducible conocido en la técnica resulta apropiado para su utilización en la presente invención.

50 Los polinucleótidos que contienen una secuencia deseada pueden insertarse en un vector adecuado y el vector, a su vez, puede introducirse en una célula hospedera adecuada para la replicación y la amplificación. Los polinucleótidos pueden insertarse en las células hospederas mediante cualesquiera métodos conocidos en la técnica. Las células son transformadas mediante la introducción de un polinucleótido exógeno mediante toma directa, endocitosis, transfección, *f-mating*, o electroporación. Una vez introducidos, los polinucleótidos exógenos pueden mantenerse dentro de la célula como vectores no integrados (tales como plásmidos) o integrados al genoma de la célula hospedera. El ADN amplificado puede aislarse de la célula hospedera mediante métodos estándar. Véase, p.e., Sambrook *et al.* (1989). El ARN puede obtenerse también a partir de células hospederas transformadas; puede obtenerse utilizando una ARN polimerasa dependiente de ADN.

60 La invención incluye modificaciones a las secuencias de ADN de los *sarp*, tales como deleciones, sustituciones y adiciones, en particular en las regiones no codificantes del ADN genómico. Tales cambios son útiles para facilitar el clonaje y la modificación de la expresión de los genes. Se pueden llevar a cabo varias sustituciones dentro de la región codificante que, o bien no alteren los residuos de aminoácidos codificados, o bien den como resultado

65 sustituciones conservativas de los residuos de aminoácidos. Las sustituciones de nucleótidos que no alteran los residuos de aminoácidos codificados son útiles para la optimización de la expresión de los genes en diferentes sistemas. Las sustituciones adecuadas son conocidas para los familiarizados con la técnica, y se realizan, por ejemplo, para reflejar el uso preferencial de codones en los sistemas de expresión particulares.

La invención abarca variantes funcionalmente equivalentes y derivados de los *sarps* que pueden aumentar, disminuir o no afectar de manera significativa las propiedades de los SARPs. Por ejemplo, cambios en la secuencia de ADN que no cambian la secuencia de aminoácidos codificada, así como los que dan como resultado sustituciones conservativas de residuos de aminoácidos, una o pocas deleciones o adiciones de ácidos nucleicos, y la sustitución de residuos de aminoácidos por análogos de aminoácidos son los que no afectan de manera significativa sus propiedades.

Los residuos de aminoácidos que pueden ser sustituidos de manera conservativa unos por otros incluyen, pero no se limitan a: glicina/alanina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina. Cualquier sustitución conservativa de aminoácidos que no afecte de manera significativa las propiedades de los SARPs se encuentra incluida dentro de la presente invención.

Las técnicas de manipulación de ácidos nucleicos útiles para la práctica de la presente invención se describen en una variedad de referencias, que incluyen, pero no se limitan a, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Vol. 1-3, eds. Sambrook *et al.* Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, Greene Publishing y Wiley-Interscience: New York (1987) y actualizaciones periódicas.

También dentro de la invención se encuentra un polinucleótido aislado de al menos 15 nucleótidos de longitud, de preferencia, de al menos 30, con mayor preferencia, de al menos 100 y, con la mayor preferencia, de al menos 500, que incluye (a) ADN que codifica para un SARP, (b) el complemento del anterior; o un ADN doble cadena que los incluye a ambos (a) y (b). Se pueden producir múltiples copias de este ADN aislado (que resulta útil, por ejemplo, como sonda de hibridización o cebador para PCR) por medios sintéticos o mediante la recombinación, mediante la transfección de una célula con un vector que contenga este ADN.

La invención también incluye preparaciones purificadas de los péptidos SARP, o fragmentos de esos péptidos que comprenden un polipéptido antigénico que contiene al menos 10 residuos de aminoácidos del péptido (de preferencia, al menos 11, con mayor preferencia, al menos 14, y con la mayor preferencia, al menos 18), cuyo fragmento polipeptídico contiene un epítipo del péptido de manera que un anticuerpo levantado contra el fragmento (o contra un conjugado del polipéptido y, si fuese necesario, una molécula portadora) forma un complejo inmune con el péptido en sí mismo. La purificación y aislamiento de los SARPs expresados ya sea a partir de ADN recombinante, o a partir de fuentes biológicas puede conseguirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por lo general, las proteínas sustancialmente puras son las que se encuentran libres de otras sustancias celulares contaminantes, particularmente proteínas. De preferencia, los péptidos purificados tienen más de ochenta por ciento de pureza y, con la mayor preferencia, más de noventa y cinco por ciento de pureza.

Los métodos adecuados para la purificación de proteínas se conocen en el arte e incluyen, pero no se limitan a, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de inmunoafinidad, la cromatografía de exclusión por tamaño, el HPLC y el FPLC. Cualquier protocolo de purificación que no de como resultado una degradación sustancial de la proteína es adecuado para su uso en la presente invención.

La invención comprende además los anticuerpos adecuados que se generan mediante la utilización de un SARP como antígeno o, de preferencia, péptidos que abarcan regiones de SARPs que carecen de homología sustancial con los otros productos génicos, tales como las proteínas Frizzled. Tales anticuerpos pueden ser tanto policlonales como monoclonales, y se generan mediante métodos estándar que incluyen el paso de inmunización de un animal con un antígeno que contiene una porción antigénica de al menos un SARP.

También se encuentran dentro de la invención polipéptidos híbridos que contienen: (1) un SARP o un fragmento antigénico del mismo, unido de manera covalente a (2) un segundo polipéptido. Tales polipéptidos híbridos pueden obtenerse mediante un gran número de técnicas estándar bien conocidas a los técnicos con habilidades ordinarias, que incluyen métodos de recombinación, en cuyo caso, el enlace covalente es un enlace peptídico, o una conjugación química, en cuyo caso el enlace covalente es otro tipo de enlace, como el enlace disulfuro. La unión de un SARP o un fragmento antigénico del mismo a un segundo polipéptido proporciona un medio para el aislamiento rápido del híbrido de una mezcla de proteínas, mediante el uso de una columna de afinidad a la cual el segundo polipéptido (p.e. glutatión transferasa) se une directamente. Tales polipéptidos híbridos también pueden poseer la ventaja de una inmunogenicidad incrementada con relación a SARP, o un fragmento suyo, de manera que se pueden obtener anticuerpos con más facilidad.

Tanto los nucleótidos aislados de la invención, como los anticuerpos de la invención son útiles para la detección de la expresión de SARP. Cualquier método para la detección de especies específicas de ARNm es adecuado para usar en este método. Esto se logra fácilmente utilizando PCR. De preferencia, los cebadores escogidos para el PCR corresponden a las regiones de los genes *sarp* que carecen de homología sustancial con otros genes. De manera alternativa, se pueden utilizar *Northern blots* para detectar el ARNm de *sarp* mediante el uso de sondas específicas para estos genes. Los métodos que utilizan el PCR y los *Northern blots* son conocidos en la técnica y no se describen en detalles en este documento.

Pueden ser hechos animales transgénicos no-humanos que contienen los nucleótidos *sarp*. Los métodos para la construcción de animales transgénicos se conocen en la técnica y no resulta necesario describirlos en detalle en este documento. Para una revisión de los métodos utilizados en la construcción de animales transgénicos, véase, p.e. PCT, publicación no. WO 93/04169. De preferencia, tales animales expresan *sarps* recombinantes bajo control de un promotor específico para un tipo celular y, con mayor preferencia, de un promotor específico del ciclo celular.

En otra realización, se proporcionan métodos de diagnóstico para detectar la expresión de la nueva familia de genes diferentes de SARP3, sea al nivel de proteínas, o al de ARNm. Niveles anormales de SARPs se encuentran con probabilidad en tejidos de pacientes con enfermedades asociadas a la apoptosis inadecuada; los métodos de diagnóstico, por tanto, son útiles para la detección y el monitoreo de padecimientos asociados con tales defectos de la apoptosis.

Los métodos de detección también son útiles para el monitoreo del éxito de las terapias relacionadas con SARP. Tanto los nucleótidos *sarp* aislados, como los anticuerpos de la invención son útiles en los métodos de diagnóstico. Dichos métodos de diagnóstico incluyen los pasos de proporcionar una célula de prueba (p.e. en la forma de una sección de tejido o una preparación celular) a partir de un tipo dado de tejido; poner en contacto el ARNm de la célula de prueba con una sonda de ácido nucleico que contiene una secuencia antisentido (o sea, complementaria a la hebra codificadora) de un segmento de un gen *sarp*. El segmento tiene al menos 15 nucleótidos de longitud, de preferencia, al menos 20, con mayor preferencia, al menos 30, con mayor preferencia aún, al menos 40 y, con la mayor preferencia, al menos 100 nucleótidos de longitud. La extensión de la hibridización de la sonda con el ARNm de la célula de prueba se compara con la extensión de la hibridización de la sonda con el ARNm de una célula de control normal (o sea, no apoptótica) del mismo tipo de tejido. Un incremento de la hibridización en la célula de prueba constituye una indicación de que la célula de prueba tendrá una incidencia incrementada de la apoptosis. El ensayo puede desarrollarse de modo conveniente utilizando técnicas estándar de hibridización *in situ*, o análisis de *Northern*.

Los ensayos basados en anticuerpos de la invención son comparables a los anteriormente descritos. Las proteínas de la célula de prueba, o provenientes del fluido del baño de la célula de prueba, se ponen en contacto con un anticuerpo (policlonal o monoclonal) específico para SARP, y la cantidad de inmunocomplejo formado con tales proteínas se compara con la cantidad formada por el mismo anticuerpo con las proteínas de una célula de control normal (o el fluido que baña a una célula de control normal) obtenida a partir del mismo tipo de tejido de la célula de prueba.

Aunque no formando parte de la invención, se proporcionan tratamientos para las dolencias relacionadas con la apoptosis, que incluyen la transfección *ex vivo* con la familia de genes *sarp*, en la cual las células removidas de animales que incluyen al hombre se transfectan con vectores que codifican para SARPs o *sarps* antisentido y se reintroducen en los animales. Las células transfectadas adecuadas incluyen células individuales o células contenidas dentro de tejidos. Además, la transfección *ex vivo* puede incluir la transfección de células derivadas de un animal distinto del sujeto animal o humano en el que las células se introducen finalmente. Tales injertos incluyen, pero no se limitan a, aloinjertos, xenoinjertos y trasplantes de tejido fetal.

Aunque no formando parte de la invención, también proporcionamos terapia antisentido para atenuar los niveles de SARP. No es preciso que los polinucleótidos antisentido sean exactamente complementarios a los polinucleótidos blanco para ejercer su efecto, mientras se formen híbridos estables bajo condiciones fisiológicas. Se puede presentar un número moderado de mutaciones, inserciones o deleciones, en dependencia de la longitud del polinucleótido antisentido. De preferencia, la secuencia complementaria del polinucleótido antisentido es 50% idéntica a la del blanco, incluyendo diferencias de bases, inserciones y deleciones. Con mayor preferencia, las secuencias son aproximadamente 75% idénticas; con mayor preferencia aún, son alrededor de 85% idénticas; con mayor preferencia incluso son aproximadamente 95% idénticas; y con la mayor preferencia, son completamente idénticas. No es necesario que el polinucleótido antisentido hibridice con toda la secuencia que codifica para el SARP, aunque se prefieren las hibridizaciones de regiones más largas sobre las más cortas. De preferencia la región que hibridiza tiene alrededor de 30 bases de longitud; con mayor preferencia, tiene al menos alrededor de 60 bases; con mayor preferencia aún tiene al menos alrededor de 100 bases; con mayor preferencia tiene al menos alrededor de 200 bases o más.

En lo esencial, cualquier célula o tipo de tejido puede tratarse de esta manera. Las células adecuadas incluyen, pero no se limitan a, cardiomiocitos y linfocitos. Como ejemplo, en el tratamiento de pacientes infectados por el VIH mediante el método antes descrito, se extraen los leucocitos del paciente, y se aíslan de entre ellos, las células CD4⁺. Las células CD4⁺ se transfectan luego con un vector que contiene un SARP o un antisentido a un *sarp*, y se reintroducen en el paciente. De modo alternativo, se pueden transfectar los linfocitos totales con un vector recombinante que contenga al menos un modulador de *sarp* bajo control de un promotor específico para el tipo celular, de modo que solo las células CD4⁺ expresen o disminuyan la expresión de los genes *sarp*. En este caso, un promotor ideal sería el promotor CD4, no obstante, se puede utilizar cualquier promotor adecuado que sea específico para la célula T CD4⁺.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, prácticas convencionales de biología molecular, que son del dominio dentro de la técnica. Véase, p.e., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D.M. Wei & C.C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994); "Current Protocols in Immunology" (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991).

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el objetivo de ilustrar, pero no de limitar la presente invención.

ES 2 263 181 T5

Ejemplo 1

Identificación y clonaje de los ADNsc de la familia sarp

5 Todas las líneas celulares se obtuvieron a partir de American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron y mantuvieron de acuerdo con las recomendaciones del suministrador.

10 Los especímenes de tejido para un aislamiento de ARN de ratones BALB/c machos de 20 g (Babko). Los cardiomiocitos primarios se obtuvieron a partir de ratas Sprague Dawley de un día de nacidas, de acuerdo con la técnica descrita por Simpson (1985). La isquemia se realizó en un medio RPMI libre de suero y glucosa, mediante la incubación de las células durante 8 horas, a 37°C en una atmósfera de 95% N₂/5% CO₂. La reperfusión postisquémica se estimuló mediante la adición de suero bovino fetal (FBS) hasta el 10%, glucosa hasta 2 g/L y situando las células en 5% de CO₂ a 37°C durante 16 horas. Para la infección viral, las células se incubaron con cantidades apropiadas de partículas infecciosas en medio libre de suero a 37°C durante 2 horas. Luego el medio se reemplazó por el medio de crecimiento normal (RPMI/10% FBS). Los títulos de adenovirus se determinaron mediante una dilución limitada y un ensayo de placas usando 293 células expuestas a las diluciones del virus. El número de virus capaces de infectar 80-90% de las células se determinó mediante la β -galactosidasa de las células infectadas por el virus y la tinción producida mediante X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactosidasa).

20

Síntesis de oligonucleótidos

25 Los cebadores para la secuenciación del ADN y los adaptadores del PCR se sintetizaron en un gel purificado y desalado, modelo 394, de Applied Biosystems, utilizando cartuchos Sep-Pak C18 (Water Associates). Se utilizaron oligonucleótidos de 14 bases (5' CCTGTAGATCTCCC 3', ID. SEC. NO: 15) y de 18 bases (5' ATTTTCGGAGATC TACAGG 3', ID. SEC. NO: 16) con un adaptador de EcoRI-BglII. Para las reacciones de despliegue diferencial se utilizaron un d(N10) arbitrario y un oligo(T) anclado, como TTTTTTTTTTTTTTTNS (ID. SEC. NO: 17).

30

Aislamiento de ARN

35 Se aisló el ARN de diferentes líneas celulares y tejidos utilizando el método de guanidina-isotiocianato de Chomezinski y Sacchi (1987). La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría (Sambrook *et al.*, 1989). Se sometieron muestras de 20 μ g de ARN total a electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído (Sambrook *et al.*, 1989) y se visualizaron utilizando bromuro de etidio. A continuación se transfirió el ARN utilizando 10X SSC (1X SSC es NaCl 0.15 M/ Na-citrato 0.015 M) mediante difusión a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham), de acuerdo al método de Lichtenstein *et al.* (1990). El ARN unido a membrana se entrecruzó mediante irradiación UV, como recomiendan los fabricantes.

40

Despliegue diferencial

45 Para las reacciones de despliegue diferencial se sintetizó la primera hebra de ADNc utilizando 2 μ g de ARN total aislado de células 10T1/2 en crecimiento logarítmico o quiescentes. La síntesis de la primera hebra se cebó utilizando un oligo(dT) anclado con la Reverso Transcriptasa Superscript (Gibco), de acuerdo con el protocolo del fabricante. En las reacciones de PCR se utilizaron cebadores arbitrarios d(N10) oligo(dT) anclados. Las condiciones del PCR fueron, en lo esencial, las mismas que publicaron originalmente Liang & Pardee, 1992. Los productos de ADNc amplificados mediante PCR se resolvieron en un gel de secuenciación de ADN al 6% (Sambrook *et al.*, 1989). Las bandas con despliegue diferencial se recortaron del gel, se reamplificaron utilizando los mismos cebadores y las mismas condiciones, y se insertaron en pCRScript (Stratagene).

50

Construcción de la biblioteca de ADNc

55 La biblioteca de ADNc de fibroblastos 10T1/2, basada en λ ZAP II se construyó, en lo esencial, como se describe en (Zapf *et al.*, 1990), con algunas modificaciones. Se prepararon dos mezclas de reacción de 40 μ L, que contenían 10 μ g de poli(A+)ARN desnaturalizado mediante calentamiento, tampón First Strand (Gibco BRL), DDT 10 mM, 50 unidades de ARNasa Block (Stratagene), 2 mM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), [a-³²P]dCTP 10 μ Ci, Reverso Transcriptasa II SuperScript 400 U (Gibco). Se añadió oligo(dT) 2.5 μ g a una mezcla de reacción y d(N6) 25 μ g a la otra mezcla. Ambas mezclas de reacción se incubaron durante una hora a 42°C y se detuvieron mediante calentamiento a 65°C durante 10 minutos. La síntesis de la segunda hebra se llevó a cabo mediante la adición, en primer lugar, de 362 μ L de H₂O, 80 μ L del tampón de reacción de la segunda hebra a 5X (Tris-HCl 100 mM pH(7.5), KCl 500 mM, MgCl₂ 25 mM, DTT 50 mM), y 1.5 μ L de BSA 15 mg/mL a las reacciones de la primera cadena. La síntesis de la segunda cadena se inició mediante la adición de 12 μ L de ADN polimerasa I de *E. coli* (NEB) y 2.5 μ L de ARNasa H (Pharmacia) 1 U/ μ L. Las reacciones se incubaron durante una hora, a 15°C, y durante una hora a temperatura ambiente. Las dos reacciones, ahora conteniendo ADNc doble cadena, se combinaron y ligaron a los adaptadores de EcoRI-BglII (Zapf *et al.*, 1990). Las especies de ADNc de bajo peso molecular y los adaptadores no ligados se separaron utilizando una cromatografía BioGel A-15 m (Bio Rad). La unión del ADNc a

65

ES 2 263 181 T5

λ ZAP II/EcoRI/CIAP (Stratagene) se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El empaquetamiento y la titulación se llevaron a cabo siguiendo, en lo esencial, las instrucciones del suministrador (Stratagene). Se obtuvo una biblioteca de 8×10^6 clones recombinantes independientes.

5

Clonaje de los genes con desplazamiento diferencial de células de ratón

Para aislar el ADNc de *msarp1*, se muestreó la biblioteca obtenida a partir de células 10T1/2 quiescentes utilizando como sonda el inserto del PCR. Se pasaron aproximadamente entre 2.3×10^5 y 3.0×10^5 fagos recombinantes a XL-Blue *E. coli* (Stratagene) y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (Millipore), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN se marcaron con ^{32}P de acuerdo al método descrito en Feinberg y Vogelstein (1984) *Anal. Biochem.* 137:266-267 y se utilizaron para muestrear la biblioteca, de acuerdo al método descrito en Keifer *et al.* (1991).

15 Se seleccionó a continuación el clon más abundante, *msarp1*, para análisis posteriores. Se llevó a cabo la secuenciación de ADN de *msarp1* mediante el método de los dideoxinucleótidos de Sanger y Nicholson, utilizando cebadores M 13 derechos e internamente específicos.

20 El gen *msarp1* contiene un único marco de lectura abierto que codifica para un producto proteico predicho de 295 aminoácidos (mSARP1), 252 pb de secuencia 5' no traducida, y 891 pb de secuencia 3' no traducida con dos posibles señales de poliadenilación, situadas a 637 pb y 234 pb del extremo 3'. Resulta interesante que la región 3' no traducida contiene once motivos 3'-UTR/HMG conservados, que se cree que estén involucrados en la degradación postranscripcional del ARNm (Reeves *et al.*, 1987). El alineamiento global de la secuencia de *msarp1* a *Entrez* (14.0) utilizando el paquete MacVector reveló la existencia de homología con genes que codifican para los homólogos de proteínas de ratas de siete segmentos de transmembrana del producto del gen *frizzled* de *Drosophila melanogaster*.

30 El gen *msarp1* no tiene ninguna región de transmembrana, y la región C-terminal es rica en aminoácidos básicos. El gen *msarp1* tiene un segmento de transmembrana, que puede representar un péptido señal. Los alineamientos múltiples utilizando *Entrez* y las bases de datos de secuencias del NCBI muestran una gran homología entre la región N-terminal de mSARP1 y las regiones extracelulares de los productos génicos de ratón, rata, y humano. La región C-terminal de mSARP1 contiene varios segmentos polipeptídicos pequeños que muestran homología con los sitios de las proteínas *frizzled* que se encuentran entre las regiones de transmembrana. La base de datos de EST mostró una secuencia de 400 pb de ADN aislada a partir de una biblioteca de ADNc de tejido mamario humano que mostró 75% de identidad con *msarp1*.

35

Clonaje de ADNcs humanos

40 Se obtuvieron sendas bibliotecas de ADNc de páncreas y corazón humanos a partir de Clontech, y se muestrearon utilizando el ADNc de *msarp1* como sonda. Se recuperaron dos clones de ADNc de la biblioteca de páncreas, *hsarp1* y *hsarp3*, y se sometieron a análisis posterior. Se obtuvo un clon, *hsarp2* de la biblioteca de ADNc de corazón humano. La secuencia de ADNc de *hsarp2* (ID. SEC. NO: 18) contiene 1302 nucleótidos. La secuencia completa incluye 301 nucleótidos de la región 5' no traducida y 62 nucleótidos de la región 3' no traducida. El ADNc de *hsarp2* contiene una ORF mayor (hSARP2). El sitio de inicio ATG se encuentra en la posición 303, y el sitio de terminación, en la posición 1248. El gen *hsarp2* codifica un polipéptido de 314 residuos de aminoácidos con una metionina en la posición N-terminal, y una lisina en la posición C-terminal. El clon *hsarp1* tiene 890 nucleótidos de longitud y codifica para un polipéptido que tiene alrededor de 95% de homología con *msarp1*. El ATG de *hsarp1* se encuentra en la posición 203 y hay un posible sitio de reconocimiento de péptido señal a 23 aminoácidos *downstream* del N-terminal. El clon *hsarp3* comprende 1923 nucleótidos, y codifica para un polipéptido de 316 aminoácidos, incluyendo una posible señal de secreción de 28 aminoácidos en el N-terminal.

50

Ejemplo 2

55

Expresión de nuevos genes en tipos de tejidos

Los fragmentos de ADN aislados se marcaron con [^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) en una reacción de cebado de acuerdo a Feinberg y Vogelstein (1982), *supra*. La hibridización se llevó a cabo mediante el protocolo estándar descrito en Sambrook *et al.* (1989), *supra*. Las membranas se lavaron dos veces con 2X SSC a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de dos lavados adicionales a 56°C en 0.1X SSC, SDS 0.1%, las membranas se autorradiografiaron en películas Kodak X-Omat.

Expresión de msarp1 en tejido de ratón

65

Para analizar la expresión de *msarp1* en tejidos de ratón, se prepararon *Northern blots* de varios tejidos de ratón, de acuerdo al protocolo estándar. Los resultados se muestran en la Figura 2. Se detectaron elevados niveles de expresión

en corazón y pulmón de ratón. También se revelaron cantidades detectables de transcripto en riñón. Ningún otro tejido de ratón expresó el ARN correspondiente a *msarp1*. No se detectó ninguna expresión de *msarp1* en las líneas celulares transformadas FL5.12, WI-L2, S49, HT29, MCF7.

5

Expresión de los nuevos genes en tejido humano

Para determinar la expresión de la familia de genes *sarp* en tejidos humanos se hibridaron *Northern blots* Clontech de múltiples tejidos humanos con *hsarp1*, *hsarp2*, *hsarp3* marcados, como se describió con anterioridad. Las figuras 3A (*hsarp2*) y 3B (*hsarp1* y *hsarp3*) muestran la expresión tejido específica de *hsarp1*, *hsarp2*, y *hsarp3*.

Los resultados indican que *hsarp2* se expresa en casi todos los tipos de tejidos analizados (Figura 3A). La hibridación mostró una banda de ARN de aproximadamente 5.0 kb. Los niveles más elevados de expresión de *hsarp1* se encontraron en páncreas, colon, próstata e intestino delgado, Figura 3B. Se detectaron bajos niveles de expresión en corazón, cerebro, pulmón, músculo esquelético, y próstata. El timo, el bazo, los leucocitos de sangre periférica, los testículos, los ovarios, la placenta, el hígado, el riñón y todos los tejidos fetales humanos mostraron señales débiles o inexistentes. La hibridación con todos los tejidos, excepto el cerebro reveló dos transcriptos de 2.1 kb y 1.6 kb de longitud, lo que refleja probablemente una utilización alternativa de las dos señales de poliadenilación identificadas en 3'-UTR.

20

El gen *hsarp3* se expresa, de modo predominante, en páncreas, y solo un transcripto de 2.1 kb de tamaño (Figura 3B).

Se analizó la expresión de *hsarp2* en varias líneas celulares transformadas y no transformadas. No se halló expresión de *hsarp2* en ninguna de las líneas celulares analizadas. La expresión de *hsarp2* se puede detectar en células no transformadas de glándula mamaria humana en crecimiento exponencial y se suprime cuando las células alcanzan el estado de quiescencia (Figura 4). El mismo patrón de expresión de *hsarp2* se observó en células normales de fibroblastos humanos diploides.

30

Ejemplo 3

Expresión de msarp1 en células 10T1/2

Para determinar la expresión diferencial de *msarp1*, se evaluó la transcripción del gen en células 10T1/2. Se observó una inducción significativa de *msarp1* cuando las células 10T1/2 alcanzaron el estado de quiescencia (ver Figura 5). Las células cultivadas hasta quiescencia se sembraron a baja densidad en tres placas. A diferentes momentos después de la resiembra, las células de una de las placas se extrajeron para el aislamiento de ARN, mientras que las de la segunda placa se utilizaron para un análisis del ciclo celular, y las de la tercera placa, que se mantuvieron en un medio privado de suero durante 24 horas se utilizaron para estimar el número de células muertas.

40

La Figura 5 presenta la hibridación de *Northern* de los fragmentos de ADN con despliegue diferencial con las muestras de ARN aisladas de las células 10T1/2 en diferentes fases del crecimiento: 1-3, células con crecimiento exponencial, células confluentes del 90% al 95%, y células quiescentes (G_0), respectivamente; 4-6, las células quiescentes se sembraron a baja densidad y se colectaron al cabo de 0, 2, y 6 horas, respectivamente. La Figura 5 indica que la señal correspondiente a *msarp1* desaparece poco después de la resiembra. El análisis de la segunda placa indica que las células sembradas entran en el ciclo celular 16 horas después de la resiembra. No se observó cambio en el número de células muertas en las placas privadas de suero. Estos resultados sugieren que en las primeras 2-3 horas después de la resiembra a baja densidad, las células quiescentes producen uno o varios factores antiapoptóticos, en cantidades suficientes para mantener la resistencia típica de las células quiescentes a la privación de suero.

50

Dado que se ha mostrado con anterioridad que los medios condicionados con células 10T1/2 en crecimiento exponencial también evitan la apoptosis, analizamos también la expresión de *msarp1* en células en crecimiento exponencial privadas de suero. El ARN se aisló a diferentes momentos después de la eliminación del suero. La hibridación reveló una activación significativa de la señal de *msarp1* hacia la 16ª hora después de la eliminación del suero. No se observó ninguna inducción de *msarp1* en células cultivadas en un medio libre de suero, suplementado con TPA.

55

Ejemplo 4

Expresión de msarp1 después de lesiones isquémicas de los cardiomiocitos

Hemos mostrado con anterioridad que la lesión isquémica de las células del miocardio desencadena la apoptosis durante la reperfusión. Además, hemos mostrado antes que el clon humano, *hsarp1*, se expresa en tejido de corazón adulto y no en tejido de corazón fetal. Para determinar la expresión de *msarp1* en relación con la lesión isquémica y la apoptosis, se sometió a las células del miocardio a una variedad de estímulos estresantes. El ARN aislado de estas células se sometió a electroforesis y se transfirió a una membrana para su hibridación. Las manchas hibridadas con

65

ES 2 263 181 T5

msarp1 mostraron activación de *msarp1* en todas las células estresadas. Al igual que en el caso del tejido de corazón fetal humano, no se encontró ninguna especie de ARN que correspondiese a *msarp1* en los cardiomiocitos primarios obtenidos de ratas neonatas.

5 Ejemplo 5

El péptido mSARP1 interactúa con proteínas de la superficie celular

10 El péptido mSARP1 se transfectó de manera estable a células MCF7, mediante la introducción, en primer término, de un fragmento SacI de *msarp1* en sitios EcoRV/NotI en pcDNA3. La construcción de pcDNA3 se transfectó luego a células MCF7 utilizando el reactivo LipofectAMINE (Gibco BRL), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Para la inmunotinción indirecta, las células tripsinizadas se incubaron con antisuero de conejo anti-mSARP1 a una dilución de 1:100 durante 1 hora a 4°C. Las células se lavaron 3 veces con PBS suplementado con BSA 1% y luego se incubaron con anticueros secundarios marcados con FITC 20 µg/mL (Boehringer Mannheim). Las células se analizaron en un sistema Becton-Dickinson, y los datos resultantes se analizaron utilizando el software CellQuest™ (Becton Dickinson).

20 Ejemplo 6

Efectos apoptóticos de hSARP2

25 El fragmento NotI/XbaI de *hsarp2* se insertó en los sitios NotI/XbaI del vector de expresión en mamíferos pcDNA3 (Invitrogen). Se transfectaron células MCF7 de carcinoma de glándula mamaria con esta construcción utilizando el reactivo LipofectAMINE (Gibco BRL), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se estimó el porcentaje de células vivas mediante el conteo de la cantidad relativa de células adherentes utilizando un contador Coulter (NZ). Como se muestra en la Figura 6, la expresión de *hsarp2* provoca una disminución del porcentaje de células viables. Las células también se trataron con hTNF (50 ng/mL) y adriamicina (1 µg/mL). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6.

35 Ejemplo 7

Efecto de mSARP1 sobre la muerte de cardiomiocitos

40 Se aisló el ARN de cardiomiocitos primarios de ratas neonatas a continuación de tratamientos de inducción de muerte celular, tales como privación de suero, de glucosa y de suero y glucosa. Se simuló la isquemia mediante la colocación de las células en condiciones de privación de oxígeno y de factor de crecimiento durante 8 horas, seguidas por 16 horas de incubación en ambiente normal (al que se hace referencia como “reperusión”). La hibridización del Northern que se representa en la figura 7 muestra que la expresión de *sarp1* en las células que sobrevivieron a estos tratamientos está incrementada.

45 En un segundo experimento, los cardiomiocitos sembrados a alta densidad se infectaron con virus recombinantes a multiplicidades de 50 y 100 partículas por célula. El adenovirus recombinante que contenía el *msarp1* se construyó por subclonación del fragmento correspondiente del ADNc de SacI en el sitio de NotI/EcoRV del vector adenoviral pAdLXR-1 con replicación deficiente. Se utilizó como control el virus que contenía el gen de la β-galactosidasa. Posteriormente a la infección, las células se sometieron a privación de suero por 24 horas o a tratamiento con adriamicina. 50 La viabilidad de las células se calculó como el porcentaje de las células adherentes, en las condiciones experimentales, con respecto a las de las muestras control. Los resultados presentados en la Figura 8 muestran que a continuación de la privación de suero o del tratamiento con adriamicina, la cantidad de células infectadas con virus *msarp1* viables es significativamente mayor que las infectadas con β-galactosidasa o las células control, no infectadas.

55 Ejemplo 8

Efecto de la expresión de SARP sobre la apoptosis

60 Se cultivaron células C3H/10T1/2 en medio basal de Eagle (BME) suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor, al 10%, a 37°C, en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂, sin antibióticos. Se sembraron las células a 2x10³ cells/mL y se alimentaron cada 3-4 días. Aproximadamente 2 semanas después de la siembra inicial, las células estaban completamente quiescentes, y existían pocas células mitóticas, si es que había alguna. Para analizar el efecto de la privación de suero o del tratamiento con cicloheximida, los cultivos con proliferación exponencial (aproximadamente confluentes del 75%) o quiescentes se transfirieron a un medio libre de suero, o un medio suplementado con 10 µg/mL de cicloheximida. A las 24 horas, las células apoptóticas (p.e. no adherentes) y las células no apoptóticas (p.e. adherentes) se colectaron separadamente y sus cantidades se evaluaron utilizando un contador de células (Coulter Counter ZM). El medio condicionado libre de suero se obtuvo después de 24 horas de

incubación de células 10T1/2 quiescentes en BME. El ARN se aisló mediante el método del isotiocianato de guanidina descrito en Chomezinski y Sacchi (1987) *Anal. Biochem.* 162:156-59. Se sometieron a electroforesis 20 μ g de muestras de ARN total en un gel de formaldehído y agarosa al 1.2%. Sambrook *et al.* (eds) (1989).

5 Se ha demostrado con anterioridad que las células 10T1/2 en proliferación exponencial son especialmente sensibles a la privación de suero y mueren por apoptosis. Tomei *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:853-857. La figura 9A muestra que después de 24 horas en un medio libre de suero, alrededor del 50% de las células se separan y se han encontrado en estado de apoptosis. Cuando los cultivos de células alcanzan la quiescencia dependiente de densidad, las células se tornan resistentes a la supresión de factores de crecimiento y de otros componentes del suero.

10 Del mismo modo, las células quiescentes son significativamente más resistentes a los efectos citotóxicos de la staurosporina, la menadiona y el cis-platino. Los anteriores son agentes pro-apoptóticos que poseen distintos mecanismos de acción. Durante la proliferación exponencial, la apoptosis resulta retardada por la adición de cicloheximida. Por el contrario, la inhibición de la síntesis proteica, induce rápidamente la muerte en las células quiescentes detenidas en G₀ (Figura 9A). La apoptosis de G₀ es inducida también por puromicina, así como por la inhibición de la síntesis de ARN que provoca la actinomicina D o la α -amanitina. Estos resultados implican que en los cultivos de células 10T1/2, las células poseen todos los componentes de la vía apoptótica pero la activación resulta suprimida por una proteína(s) específica(s) del estado quiescente. Este razonamiento es consistente con la observación de que el medio condicionado por células 10T1/2 quiescentes puede inhibir la muerte apoptótica tanto de células 10T1/2 en crecimiento exponencial privadas de suero, como de células 10T1/2 quiescentes tratadas con cicloheximida (Figura 9B). Estos resultados constituyen una firme evidencia de que las células 10T1/2 quiescentes secretan la(s) proteína(s) antiapoptótica(s) e influyen sobre la respuesta de las células vecinas.

25 Para clonar el ADNc correspondiente a esta especie de ARNm se muestrearon las bibliotecas de ADNc de las células 10T1/2 quiescentes, de células de corazón y páncreas humano, utilizando como sonda el fragmento de ADN con despliegue diferencial. Se identificaron cuatro recombinantes diferentes. Dos de ellos, muestreados a partir de las células 10T1/2 y las células de páncreas humano, resultaron ortólogos y fueron designados como *msarp1* y *hsarp1*. Los otros dos clones, *hsarp2* y *hsarp3*, se obtuvieron a partir de las bibliotecas de células de corazón y páncreas humanos, respectivamente. Con la excepción de *hsarp1*, estos clones de ADNc presentan un único marco de lectura abierto extendido, a partir del cual se pueden predecir proteínas de tamaño completo que comparten varias propiedades estructurales comunes. A partir del N-terminal, a los posibles péptidos señal hidrofóbicos le siguen las secuencias de las proteínas maduras, de 270-300 aminoácidos de longitud con 16 cisteínas completamente conservadas. De estas, 10 cisteínas se localizan en los primeros 110 ó 120 aminoácidos contando a partir del N-terminal, que comparten de 25% a 30% de identidad con el dominio extracelular rico en cisteína (CRD) de las proteínas *frizzled*-like. Wang *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 4468-4476. La secuenciación parcial del polipéptido hSARP1 mostró alrededor de 95% de identidad con el mSARP1.

35 Se seleccionó la línea celular MCF7 de adenocarcinoma de mama como modelo para estudiar la participación de las proteínas SARP en los procesos de apoptosis. La muerte celular programada de estas células, inducida mediante distintos agentes se encuentra bien caracterizada. Zyed *et al.* (1994) *Cancer Res.* 54:825-831. Este tipo celular no expresa *sarp1* ni *sarp2*. Se transfectaron de manera estable células MCF7 con el vector de expresión de mamíferos pcDNA3, que portaban los genes *msarp1* o *hsarp2* de tamaño completo. Los transfectantes que expresaban *msarp1* y *hsarp2* se seleccionaron mediante hibridización por *Northern*. La velocidad de crecimiento y el ciclo celular de las células MCF7 transfectadas no se diferenciaron de manera significativa de las células parentales; sin embargo, los resultados presentados en la Figura 10 (A) demuestran que la expresión de mSARP1 y hSARP2 presentan efectos opuestos sobre la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por TNF y por ceramida, un mensajero secundario de la vía apoptótica, producido por varios agentes. Hannun y Obeid (1995) *T. Biochem. Sci.* 20:73-7; y Kolesnik y Fuks (1995) *J. Exp. Med.* 181: 1949-52.

50 Debido al hecho de que los SARPs presentan los péptidos señal, pero no dominios transmembranales, se pensó que se trataba de proteínas secretadas. Esta teoría se probó de la manera siguiente. Se levantaron anticuerpos policlonales anti-mSARP1 contra la proteína recombinante GST-mSARP1 y se purificaron utilizando una columna de afinidad MBP-mSARP1. La expresión bacteriana de las proteínas de fusión GST-mSARP1 y MBP-mSARP1 se llevó a cabo utilizando los vectores pGEX-5X-2 (Pharmacia) y pMAL (NEB), respectivamente. Para los anticuerpos anti-hSARP2 se utilizó como inmunógeno un polipéptido derivado del dominio C-terminal no Frizzled-like de la proteína (167-185aa) (ID. SEC. NO: 19). Utilizando los anticuerpos anti-mSARP1 o anti-hSARP2, resultantes de la purificación por afinidad, se detectaron las proteínas secretadas en los medios condicionados tanto por las células MCF7 transformadas, como por las células 10T1/2 quiescentes no transformadas (Figura 10(C)). Los anticuerpos mSARP no interactuaron con hSARP2.

60 Los experimentos descritos identifican una nueva familia de genes capaces de modular la respuesta apoptótica de la célula a señales citotóxicas. Resulta importante resaltar el elevado grado de similitud al nivel de la secuencia que existe entre los CRDs de SARP y las regiones similares de las proteínas *frizzled*, una clase de receptores de la membrana celular con siete dominios de transmembrana. En *Drosophila melanogaster*, las proteínas *frizzled* están involucradas en la regulación del patrón y la polaridad del pelo. Adler (1992) *Cell* 69: 1073-1087. Recientemente se ha informado de la capacidad de Dfz2, un miembro de la familia de proteínas *frizzled* de funcionar como receptor de la proteína *Wingless*. Bhanoh *et al.* (1996) *Nature* 382:225-230. *Wingless* es un miembro de la familia de genes Wnt, cuyos productos están involucrados en las interacciones entre células y en las interacciones de las células con la matriz extracelular.

Nusse y Varmus (1992) *Cell* 69:1073-1087. Las proteínas secretadas SARPs están involucradas en la regulación de la interacción entre Wnt y las proteínas *frizzled*. Desde este punto de vista, resulta interesante el hecho de que la expresión de las tres familias de genes, *frizzled*, *Wnt* y *sarp*, sea tejido específica. Wang *et al.* (1996); Nusse y Varmus (1992); Gavin *et al.* (1990) *Genes and Devel* 4:2319-2332; y Chan *et al.* (1992) *J. Biol Chem.* 267:25202-25207. El papel que desempeñan las interacciones entre células y las interacciones de las células con la matriz extracelular en la regulación de la apoptosis se encuentra bien documentado. Rouslahti y Reed (1994) *Cell* 77:477-478; Bates *et al.* (1994) *Cell Biol.* 125:403-415; and Boudreau *et al.* (1995) *Science* 267:891-893. Por tanto, entre otras funciones, las tres familias de genes se encuentran involucradas en la muerte celular programada.

10 Ejemplo 9

Comparación de la expresión de hsarp en células humanas normales y neoplásicas

15 En este ejemplo, se evaluó la expresión de los genes *hsarp* en tejidos humanos normales y neoplásicos. Se evaluó la expresión de *hsarp1* en tejidos epiteliales de próstata normales y neoplásicos y se evaluó la expresión de *hsarp2* en tejidos mamarios normales y neoplásicos.

20 Los experimentos se llevaron a cabo como se describe a continuación: primero, se obtuvieron las sondas de ARN *hsarp* marcadas con digoxigenina (DIG) utilizando el juego de reactivos de marcaje RNA DIG (Boehringer Mannheim GmbH, Concord, CA) de acuerdo con el protocolo proporcionado por *Nonradioactive in Situ Hybridization Application Manual*, Segunda Edición, 1996, p. 44. Posteriormente, se hibridaron secciones de 5 μ m de tejido canceroso (epitelial de próstata o mamario) embebidas en parafina y fijadas en formalina, con la sonda de ARN apropiada, *hsarp1* o *hsarp2*, marcada con DIG. Finalmente, se realizó la detección de ARNm utilizando el juego de reactivos 25 Genius (Boehringer Mannheim GmbH, Concord, CA) de acuerdo con el protocolo proporcionado por *Nonradioactive in Situ Hybridization Application Manual*, Segunda Edición, 1996, p. 127.

30 Las figuras 11 (tejido epitelial de próstata) y 12 (tejido mamario) muestran los resultados. La expresión de *hsarp1* es elevada en las células de tumor de próstata con respecto a la del control de tejido normal, como se evidencia en el área sombreada pervasiva en la muestra de cáncer 10X y 40X comparada con la muestra normal. La expresión de *hsarp2* se encuentra disminuida en las células de tumor mamario en comparación con las del control de tejido normal. Estos resultados respaldan la actividad anti y pro apoptótica de hSARP1 y hSARP2, respectivamente. Este ejemplo muestra que la detección de productos de genes *sarp* en tejidos puede ser utilizada para diagnosticar una variedad de enfermedades asociadas con la modulación de la expresión de *hsarp*, incluyendo a distintos tipos de cáncer. Además, 35 debido a que las proteínas hSARP se secretan, las muestras de fluidos corporales pueden ser utilizadas también con propósitos de diagnóstico.

40 Si bien este ejemplo específicamente demuestra la utilización de la hibridación *in situ* utilizando una sonda de ARNm para la detección de productos de genes *hsarp*, se conocen muy bien en la técnica métodos alternativos de detección de la presencia de aminoácidos o ácidos nucleicos, tanto en tejidos como en fluidos corporales. Igualmente, una persona con habilidades en estas materias es capaz de seleccionar sondas apropiadas para la utilización en los métodos de la presente invención, basados en las secuencias reveladas en este documento o incorporadas mediante referencia.

45 Ejemplo 10

La expresión de SARPs modifica los niveles intracelulares de β -catenina

50 En los ejemplos previos, se mostró que los genes *sarp* codifican para proteínas secretadas capaces de modificar la respuesta celular a un estímulo proapoptótico. Este experimento evalúa la capacidad de las proteínas SARP para interferir con la vía de señalización Wnt-proteínas *frizzled*. Recientemente se ha demostrado que las proteínas *frizzled* funcionan como receptores de los miembros de la familia de proteínas Wnt. Yang-Snyder *et al.* (1996) *Curr Biol* 6: 1302-6; Bhanot *et al.* (1996) *Nature* 382:225-30; Orsulic *et al.* (1996) *Current Biology* 6:1363-1267; y Perrimon 55 (1996) *Cell* 86:513-516.

60 La interacción de los miembros de la familia Wnt con sus respectivos receptores *frizzled* causa la inactivación de la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3) o de su homólogo en *Drosophila* Zw-3. Pai *et al.* (1997) *Development* 124:2255-66; Cook *et al.* (1996) *EMBO J.* 15:4526-4536; y Siegfried *et al.* (1994) *Nature* 367:76-80. En ausencia de Wnt, la GSK-3 β fosforila a la β -catenina (Armadillo es su homólogo en *Drosophila*). La β -catenina fosforilada o Armadillo se degradan más rápidamente que las formas no fosforiladas de las proteínas. Perrimon (1996) *Cell* 86:513-516; Siegfried *et al.* (1994) *Nature* 367:76-80; Rubinfeld *et al.* (1996) *Science* 272:1023-6; y Yost *et al.* (1996) *Genes and Development* 10:1443-1454. Como resultado, la señalización de Wnt causa cambios en la concentración intracelular de la β -catenina o de Armadillo y este parámetro se ha utilizado para registrar la transducción de la señal 65 y la interacción entre Wnt y la proteína *frizzled*. Bhanot *et al.* (1996) *Nature* 382:225-30. Debido a que las SARPs son proteínas solubles que poseen un dominio homólogo al CRD de las proteínas *frizzled*, se ha desarrollado la hipótesis de que estas funcionan mediante la interferencia con la interacción Wnt y la proteína *frizzled*.

ES 2 263 181 T5

Recientemente se ha mostrado que la β -catenina se acumula en el cáncer de colon (Korinek *et al.* (1997) *Science* 275:1784-7; y Morin *et al.* (1997) *Science* 275:1787-90); y en melanomas (Rubinfeld *et al.* (1997) *Science* 275:1790-2), que tengan mutaciones en el supresor de tumores APC. Más aún, la regulación de la β -catenina es crítica para el efecto de supresión de tumores de la APC. Morin *et al.* (1997) *Science* 275:1787-90. Los resultados descritos en este documento muestran una correlación entre los niveles de β -catenina y la expresión de los miembros de la familia SARP que poseen actividad pro o antiapoptótica. Un nivel más elevado de β -catenina en los tumores se encuentra asociado con una reducción en la muerte celular por apoptosis, un rasgo característico de la carcinogénesis. Thompson (1995) *Science* 267:1456-1462.

Para determinar si los SARPs interfieren con la interacción Wnt-proteína *frizzled*, se comparó la expresión de la β -catenina en transfectantes MCF7. El experimento se realizó de la siguiente forma. Cultivos celulares. Se sembraron las células MCF7 de adenocarcinoma de glándula mamaria humana a 2×10^5 células/ml y se cultivaron en medio Eagle modificado (MEM) suplementado con FBS al 10%. El medio condicionado libre de suero se obtuvo después de 24 horas de incubación de células quiescentes MCF7 en MEM.

Transfección de MCF7. Se transfectaron las células MCF7 con el vector de expresión en mamíferos pcDNA3 (Invitrogen), que contenía los ADNc de *msarp1*, o de *hsarp2*, o no contenía inserción alguna, utilizando el reactivo LipofectAMINE (Gibco) de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante. Los transfectantes estables y los clones que se originaron a partir de una única célula al cabo de dos o tres semanas se seleccionaron con G418, 1 mg/ml y la expresión de los genes respectivos se confirmó mediante hibridización por *Northern*.

Inmunohistoquímica. Las células MCF7 transfectadas fijadas en paraformaldehído, que habían sido cultivadas en una cámara Lab-Tek de cuatro pozos, se muestrearon para IgG monoclonal anti- β -catenin (Transduction Laboratories). La tinción se realizó mediante el sistema avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories) utilizando diaminobenzidina como sustrato. Se utilizó como control negativo IgG aislada a partir de suero preinmune.

Western Immunoblot. Para el análisis mediante *Western*, las muestras de los medios condicionados se concentraron utilizando concentradores CENTRIPREP-10 (AMICON). Las células se recolectaron en un tampón de extracción consistente en tris-HCl 20 mM (pH 7.8), $MgCl_2$ 5 mM, sacarosa 250 mM, NP40 1%. Después de 1 hora de incubación en hielo, se clarificaron los extractos mediante centrifugación. Se determinaron las concentraciones de proteína de los extractos celulares utilizando el juego de reactivos DC Protein Assay (Bio Rad). Se sometieron a SDS/PAGE cantidades iguales de proteínas (Sambrook, J., *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Segunda Ed.) (CSHL Press), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se muestrearon con la IgG policlonal purificada por afinidad anti-GST-mSARP1 (1 μ g/mL) o la IgG monoclonal anti- β -catenina (Transduction Laboratories).

Los resultados aparecen en la figura 13, una imagen de un *Western immunoblot* que muestra que la expresión de SARP2 disminuye la concentración intracelular de β -catenina. El efecto de SARP1 en los niveles de β -catenina es más complicado. El *Western blot* no fue lo suficientemente sensible como para detectar una diferencia significativa entre SARP1 y el control, pero los datos inmunohistoquímicos revelan una mayor concentración de β -catenina en los transfectantes SARP1. Resulta claro a partir de estos resultados que la expresión de los SARPs modifica los niveles intracelulares de β -catenina, lo que apoya la idea de que los SARPs interfieren en el funcionamiento de la vía de señalización Wnt-proteínas *frizzled*.

Este ejemplo indica que los genes *sarp1* y *2* y sus productos pueden ser utilizados no solo para diagnosticar una variedad de enfermedades asociadas con la modulación de la expresión de *hsarp*, incluyendo al cáncer, sino que también interfieren activamente con la acción de estas enfermedades a nivel intracelular, y de ahí que puedan ser utilizados para tratar estas enfermedades.

Además, la presente invención abarca métodos de selección de agentes terapéuticos potenciales que modulen la interacción entre SARP y las proteínas Wnt-*frizzled* mediante la comparación del efecto de los SARPs sobre la vía de señalización Wnt-*frizzled* en presencia o ausencia del agente terapéutico en cuestión. De manera general, tales análisis de selección de medicamentos pueden ser realizados mediante (a) la combinación de una proteína Wnt y una proteína SARP1 o 2 bajo las condiciones en que estas interactúan, para formar una muestra de prueba; (b) la exposición de la dicha muestra de prueba a un agente terapéutico potencial y; (c) el monitoreo de la interacción entre la proteína SARP y la proteína *frizzled*; en donde el agente terapéutico potencial se selecciona para estudios posteriores si modifica la interacción con respecto a una muestra de prueba control a la que no se le ha añadido ningún agente terapéutico potencial.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado seleccionado entre un grupo que comprende a:

- 5
- a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que contiene una secuencia aminoacídica que tiene al menos 90% de identidad con la ID. SEC. NO:2, ID. SEC. NO:4, ID. SEC. NO:6, o ID. SEC. NO:7 con respecto a la longitud total de dichas ID. SEC. NO:2, ID. SEC. NO:4, ID. SEC. NO:6, o ID. SEC. NO:7;
 - 10 b) un polinucleótido que es un fragmento de un ácido nucleico que codifica la ID. SEC. NO:6, dicho fragmento codificando un polipéptido que incluye al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos de ID. SEC. NO. 6; y
 - 15 c) un polinucleótido que es un fragmento de la secuencia de un ácido nucleico que codifica para ID. SEC. NO:7, dicho fragmento codificando un polipéptido que incluye al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos de ID. SEC. NO:7.

20 2. El polinucleótido aislado de la Reivindicación 1, donde dicho polinucleótido es un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que codifica para ID. SEC. NO:6 o ID. SEC. NO:7, dicho fragmento codificando un polipéptido que incluye al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos de ID. SEC. NO:6 o ID. SEC. NO:7.

25 3. El polinucleótido aislado de la Reivindicación 1, donde dicho polinucleótido codifica un polipéptido que incluye una secuencia aminoacídica seleccionada entre el grupo que consiste de la ID. SEC. NO:2, ID. SEC. NO:4, ID. SEC. NO:6 e ID. SEC. NO:7.

4. Un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste de:

- 30
- a) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste de: ID. SEC. NO:1, ID. SEC. NO:3, ID. SEC. NO:5 e ID. SEC. NO:18;
 - b) un fragmento de polinucleótido de la ID. SEC. NO:5 consistente de al menos 25 nucleótidos contiguos de la región codificante de ID. SEC. NO:5;
 - 35 c) un fragmento de polinucleótido que consiste al menos de 500 nucleótidos contiguos de una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste de: ID. SEC. NO:1 e ID. SEC. NO:3;
 - d) un fragmento de polinucleótido de la ID. SEC. NO:18 que consiste al menos de 30 nucleótidos contiguos de la región codificante de la ID. SEC. NO:18;
 - 40 e) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico de (a), (b), o (c); y
 - 45 f) un polinucleótido que incluye una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con al menos 200 nucleótidos contiguos de la hebra codificadora de la ID. SEC. NO:18.

50 5. El polinucleótido aislado de la Reivindicación 4, donde dicho polinucleótido es un fragmento de una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que comprende a la ID. SEC. NO:5 y la ID. SEC. NO:18, dicho fragmento consistiendo de al menos 100 nucleótidos contiguos de la región codificante de dicha ID. SEC. NO:5 o la ID. SEC. NO:18.

55 6. El polinucleótido aislado de la Reivindicación 4, donde dicho polinucleótido es un fragmento de una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste de la ID. SEC. NO:1, la ID. SEC. NO:3, la ID. SEC. NO:5 y la ID. SEC. NO:18, dicho fragmento consistiendo al menos de 500 nucleótidos contiguos de la región codificante de dicha ID. SEC. NO:1, la ID. SEC. NO:3, la ID. SEC. NO:5, o la ID. SEC. NO:18.

60 7. El polinucleótido aislado de la Reivindicación 4, donde dicho polinucleótido incluye una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consistente de la ID. SEC. NO:1, la ID. SEC. NO:3, la ID. SEC. NO:5 y la ID. SEC. NO:18.

8. Un polipéptido aislado codificado por el polinucleótido de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3.

65 9. Un polipéptido de fusión que comprende (1) al polipéptido aislado de la Reivindicación 8, unido covalentemente a (2) un segundo polipéptido.

10. Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica según cualquiera de las Reivindicaciones 1-3.

ES 2 263 181 T5

11. Un vector de clonaje recombinante que incluye una secuencia polinucleotídica según cualquiera de las Reivindicaciones 1-7.

12. Una célula huésped transformada por el polinucleótido de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, o por el vector de una cualquiera de las Reivindicaciones 10 u 11.

13. Un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal aislado específico para una proteína codificada por el polinucleótido de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3.

14. El anticuerpo de la Reivindicación 13 que es un anticuerpo monoclonal.

15. Un método para detectar la expresión de la proteína SARP, dicha proteína SARP comprendiendo una secuencia aminoacídica seleccionada entre el grupo que comprende a la ID. SEC. NO:2, la ID. SEC. NO:4, la ID. SEC. NO:6 y la ID. SEC. NO:7, dicho método comprendiendo los pasos de:

(a) poner en contacto las proteínas de una célula de prueba con el anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 13 ó 14 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo estable entre las proteínas de la célula de prueba y el anticuerpo; y

(b) comparar la cantidad de inmunocomplejo formado con las proteínas de la célula de prueba con la cantidad de inmunocomplejo formado con las proteínas de una célula no apoptótica del mismo tipo de tejido de la célula de prueba.

16. Un método para detectar la expresión de la proteína SARP, dicha proteína SARP comprendiendo una secuencia aminoacídica seleccionada entre el grupo que incluye a la ID. SEC. NO:2, la ID. SEC. NO:4, la ID. SEC. NO:6 y la ID. SEC. NO:7, dicho método comprendiendo los pasos de:

(a) poner en contacto el ARNm de una célula de prueba con una sonda de ácido nucleico que contiene una secuencia antisentido de un segmento de longitud de al menos 15 nucleótidos, de la ID. SEC. NO:1, ID. SEC. NO:3, ID. SEC. NO:5 o ID. SEC. NO:18 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo estable entre el ARNm de la célula de prueba y la sonda de ácido nucleico; y

(b) comparar la cantidad de hibridización entre la sonda y el ARNm de la célula de prueba con la cantidad de hibridización entre la sonda y el ARNm de una célula no apoptótica del mismo tipo de tejido de la célula de prueba.

17. Un método de diagnóstico de una enfermedad asociada a la modulación de la expresión de SARP, dicha proteína SARP comprendiendo una secuencia aminoacídica seleccionada entre el grupo que consiste de la ID. SEC. NO:4, y la ID. SEC. NO:7, dicho método comprendiendo:

(a) analizar una muestra de tejido de prueba para la presencia de un producto génico de un gen *hsarp*, dicho gen *hsarp* codificando para una secuencia aminoacídica seleccionada entre el grupo que comprende a la ID. SEC. NO:4, y la ID. SEC. NO:7; y

(b) comparar la cantidad de producto génico detectado en dicha muestra de prueba con la cantidad de producto génico detectado en una muestra no enferma del mismo tipo de tejido que la muestra de prueba.

18. El método de la Reivindicación 17, donde dicho producto génico es un ARNm de un *hsarp* que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que comprende a la ID. SEC. NO:3, y la ID. SEC. NO:18, o una proteína que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada entre el grupo que comprende a la ID. SEC. NO:4, y la ID. SEC. NO:7.

19. El método de la Reivindicación 17, donde dicho producto génico es el ARNm de un *hsarp*, que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que comprende a la ID. SEC. NO:3, y la ID. SEC. NO:18, y en el cual el análisis comprende poner en contacto dicha muestra de prueba con una sonda de ácido nucleico que contiene un segmento de al menos 15 nucleótidos de longitud de dicho ARNm del *hsarp* bajo condiciones que permitan la formación de un complejo estable entre la sonda de ácido nucleico y cualquier ARNm complementario presente en dicha muestra de prueba.

20. El método de la Reivindicación 17, en el cual dicho gen *hsarp* es *hsarp1* (que codifica para la ID. SEC. NO:4) o *hsarp2* (que codifica para la ID. SEC. NO:7).

21. El método de la Reivindicación 17, en el cual dicho gen *hsarp* es *hsarp1* (que codifica para la ID. SEC. NO:4) y dicha enfermedad es un cáncer del tejido epitelial prostático.

ES 2 263 181 T5

22. El método de la Reivindicación 17, en el cual dicho gen *hsarp* es *hsarp2* (que codifica para la ID. SEC. NO:7) y dicha enfermedad es un cáncer de tejido mamario.

23. Un método para el diagnóstico de una enfermedad asociada a la modulación de la expresión de SARP, dicha proteína SARP comprendiendo una secuencia aminoacídica seleccionada entre el grupo que consiste de la ID. SEC. NO:2, la ID. SEC. NO:4, y la ID. SEC. NO:7, dicho método comprendiendo:

- (a) analizar una muestra de prueba de un fluido corporal en busca de la presencia de una proteína SARP, que posee una secuencia aminoacídica seleccionada entre el grupo que comprende a: la ID. SEC. NO:2, la ID. SEC. NO:4, y la ID. SEC. NO:7;
- (b) comparar la cantidad de proteína SARP detectada en dicha muestra de prueba con la cantidad de proteína SARP detectada en una muestra no enferma del mismo tipo de fluido de la muestra de prueba.

24. El método de la Reivindicación 23, en el cual pesquísale análisis comprende poner en contacto dicha muestra de prueba con un anticuerpo de dicha proteína, bajo condiciones que permitan la formación de un complejo estable entre dicho anticuerpo y cualquiera de dichas proteínas presentes en dicha muestra de prueba.

25. El método de la Reivindicación 23, en el cual dicha proteína SARP es hSARP1 (ID. SEC. NO:4) o hSARP2 (ID. SEC. NO:7).

26. El método de la Reivindicación 25, en el cual dicha proteína SARP es hSARP1 y dicha enfermedad es un cáncer del tejido epitelial prostático.

27. El método de la Reivindicación 25, en el cual dicha proteína SARP es hSARP2 y dicha enfermedad es un cáncer del tejido mamario.

28. Una composición que comprende un componente seleccionado entre el grupo que consiste de:

- i) un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste de:
 - a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos una identidad del 90% con la ID SEC NO:2, ID SEC NO:4 o ID SEC NO:7 en la longitud total de dichas ID SEC NO:2, ID SEC NO:4 o ID SEC NO:7;
 - b) un polinucleótido que es un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que codifica ID SEC NO:7, dicho fragmento codificando un polipéptido que consiste de al menos 10 residuos aminoácidos contiguos de ID SEC NO:7;
- ii) el polinucleótido aislado de (i) de esta reivindicación, en el que dicho polinucleótido es un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que codifica ID SEC NO:7, dicho fragmento codificando un polipéptido que consiste de al menos 15 residuos aminoácidos contiguos de ID SEC NO:7;
- iii) el polinucleótido aislado de (i) de esta reivindicación, en el que dicho polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste de ID SEC NO:2, ID SEC NO:4 y ID SEC NO:7;
- (iv) un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste de:
 - a) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de: ID. SEC. NO:1, la ID. SEC. NO:3, y la ID. SEC. NO:18;
 - b) un fragmento de polinucleótido que consiste al menos de 500 nucleótidos contiguos de una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste de: ID. SEC. NO:1 e ID. SEC. NO:3
 - c) un fragmento de polinucleótido de ID. SEC. NO:18 que consiste al menos de 30 nucleótidos contiguos de la región codificante de: ID. SEC. NO:18;
 - d) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que es totalmente complementaria de una secuencia de ácido nucleico de (a) o (b); y
 - e) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que es totalmente complementaria de al menos de 200 nucleótidos contiguos de la hebra codificadora de la ID. SEC. NO:18.

ES 2 263 181 T5

- 5
- (v) el polinucleótido aislado de (iv) de esta reivindicación, en el que dicho polinucleótido es un fragmento de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de ID. SEC. NO:18, dicho fragmento consistiendo de al menos 100 nucleótidos contiguos de la región codificante de dicha ID. SEC. NO:18;
- 10
- (vi) el polinucleótido aislado de (iv) de esta reivindicación, en el que dicho polinucleótido es un fragmento de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de ID. SEC. NO:1, ID. SEC. NO:3 y ID. SEC. NO:18, dicho fragmento consistiendo de al menos 500 nucleótidos contiguos de la región codificante de dichas de ID. SEC. NO:1, ID. SEC. NO:3 y ID. SEC. NO:18;
- 15
- (vii) el polinucleótido aislado de (iv) de esta reivindicación, en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de ID. SEC. NO:1, ID. SEC. NO:3 y ID. SEC. NO:18;
- 20
- (viii) un polinucleótido que es antisentido del polinucleótido de uno cualquiera de (i) a (vii) de esta reivindicación;
- (ix) un polipéptido aislado codificado por el polinucleótido de uno cualquiera de (i) a (iii) de esta reivindicación;
- (x) un anticuerpo monoclonal o policlonal aislado específico para una proteína codificada por el polinucleótido de uno cualquiera de (i) a (iii) de esta reivindicación:

25 para uso en medicina.

29. Uso de una composición, como se define en la Reivindicación 28 para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una dolencia relacionada con la apoptosis, en el que dicha dolencia relacionada con la apoptosis es un cáncer y en el que el componente es el polinucleótido *hsarp2* (ID. SEC. NO:18), o en el que el componente es el polipéptido hSARP2 (ID. SEC. NO:7).

30. Un método para la pesquisa de agentes terapéuticos potenciales que modulan el efecto de las proteínas SARP sobre la interacción proteína frizzled-Wnt, que comprende los pasos de:

- 35
- (a) combinar una proteína frizzled-Wnt y una proteína SARP, dicha proteína SARP comprendiendo una secuencia aminoacídica seleccionada entre el grupo que consiste de la ID. SEC. NO:2, la ID. SEC. NO:4, y la ID. SEC. NO:7, bajo condiciones en las cuales interactúan, para formar una muestra de prueba;
- 40
- (b) exponer dicha muestra de prueba a un agente terapéutico potencial y;
- (c) supervisar la interacción de la proteína SARP y la proteína frizzled-Wnt; en donde se selecciona un agente terapéutico potencial cuando el mismo modifica la interacción en comparación con una muestra de prueba de control a la cual no se ha añadido ningún agente terapéutico potencial.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

1-ARP2	1	GGIGR	SEGGRRGAALGV	AGAA	SSSEYDYV8FQSDIGPYOSGRFYTKPP	CVDIPADLR	68
humiriz-2	1	RPA	ALPH	LP	PHGKGISIP	DHGF	40
humiriz-5	1	ARPDPSAPP	SLL	LAOLV	RAAAS	KAPVCS	40
NSARP2	67	HNVS	KKMVL	SEYMAV	KOOASSWV	LNKMHAGTOM	132
humiriz-2	47	CTDI	ANOTIM	AG	LEVHOFY	VKVCSP	113
humiriz-5	41	CIRGI	GVNLT	HM	FOFN	D	108
NSARP2	133	EA	V	DS	GV	Q	172
humiriz-2	114	ERAK	Q	CC	AL	LNK	172
humiriz-5	109	CERAKA	GS	W	LL	ROY	171
NSARP2	178	K	Q	GT			191
humiriz-2	179	GGP	GGG	APP	RYAT	LEH	231
humiriz-5	172	P	G	A	S	G	231
NSARP2	200						211
humiriz-2	240	ET	F	A	R	L	301
humiriz-5	231	E	R	T	F	A	231
NSARP2	213						22
humiriz-2	308	ER	F	S	E	D	37
humiriz-5	300	RE	M	H	I	H	36
NSARP2	228						25
humiriz-2	377	W	A	N	A	V	44
humiriz-5	365	W	L	I	S	V	43
NSARP2	255						280
humiriz-2	448	K	H	D	G	T	512
humiriz-5	434	K	O	G	G	T	484
NSARP2	291						308
humiriz-2	513	A	M	S	P		504
humiriz-5	495	R	A	K	P		503
NSARP2	307						314
humiriz-2	685						585
humiriz-5	564	T	G	R	T	G	585

FIGURA 1A

FIGURA 2

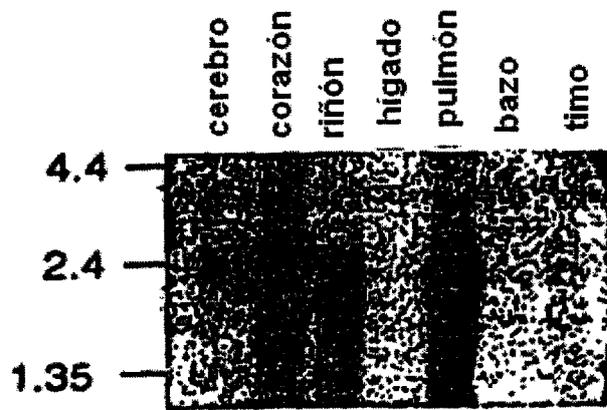


FIGURA 3A

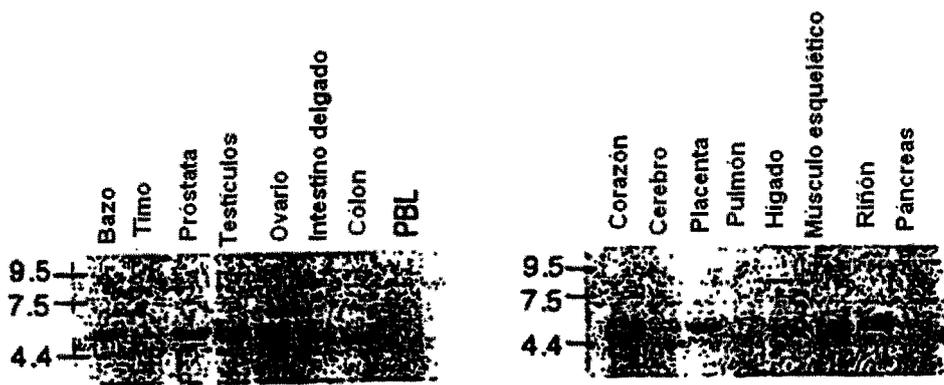


FIGURA 3B

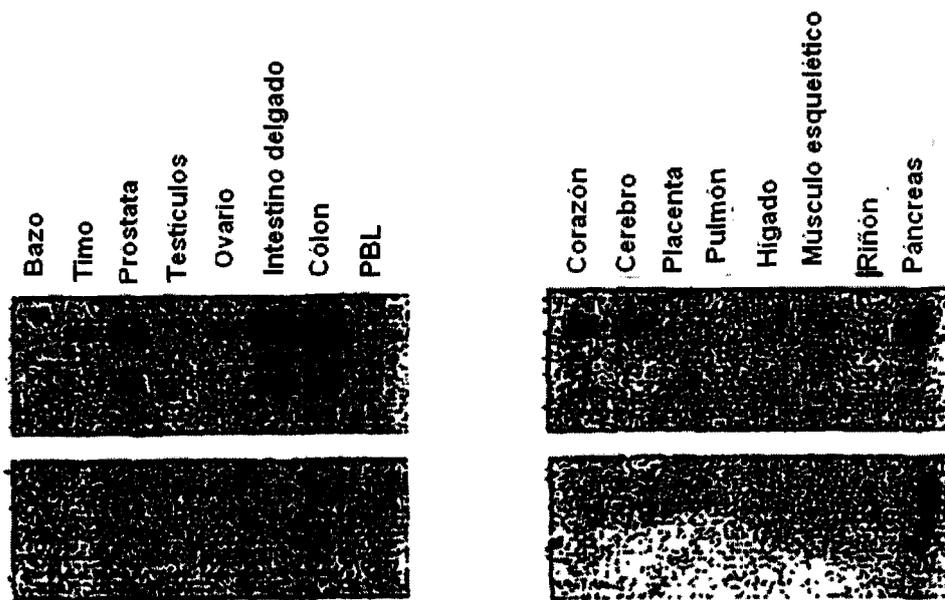
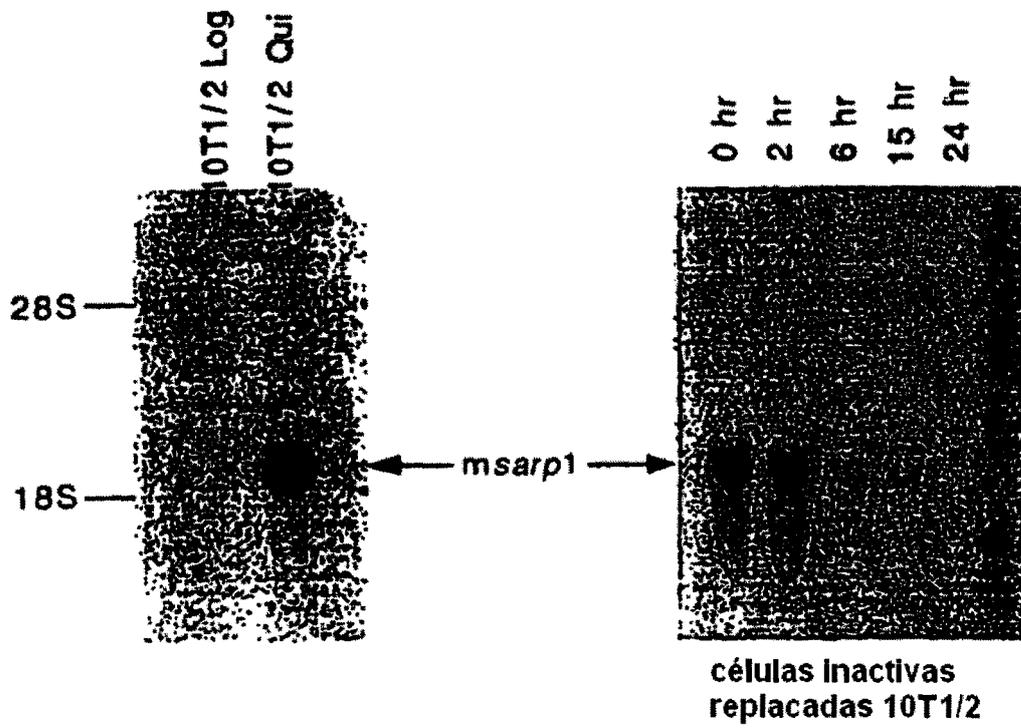


FIGURA 4



FIGURA 5



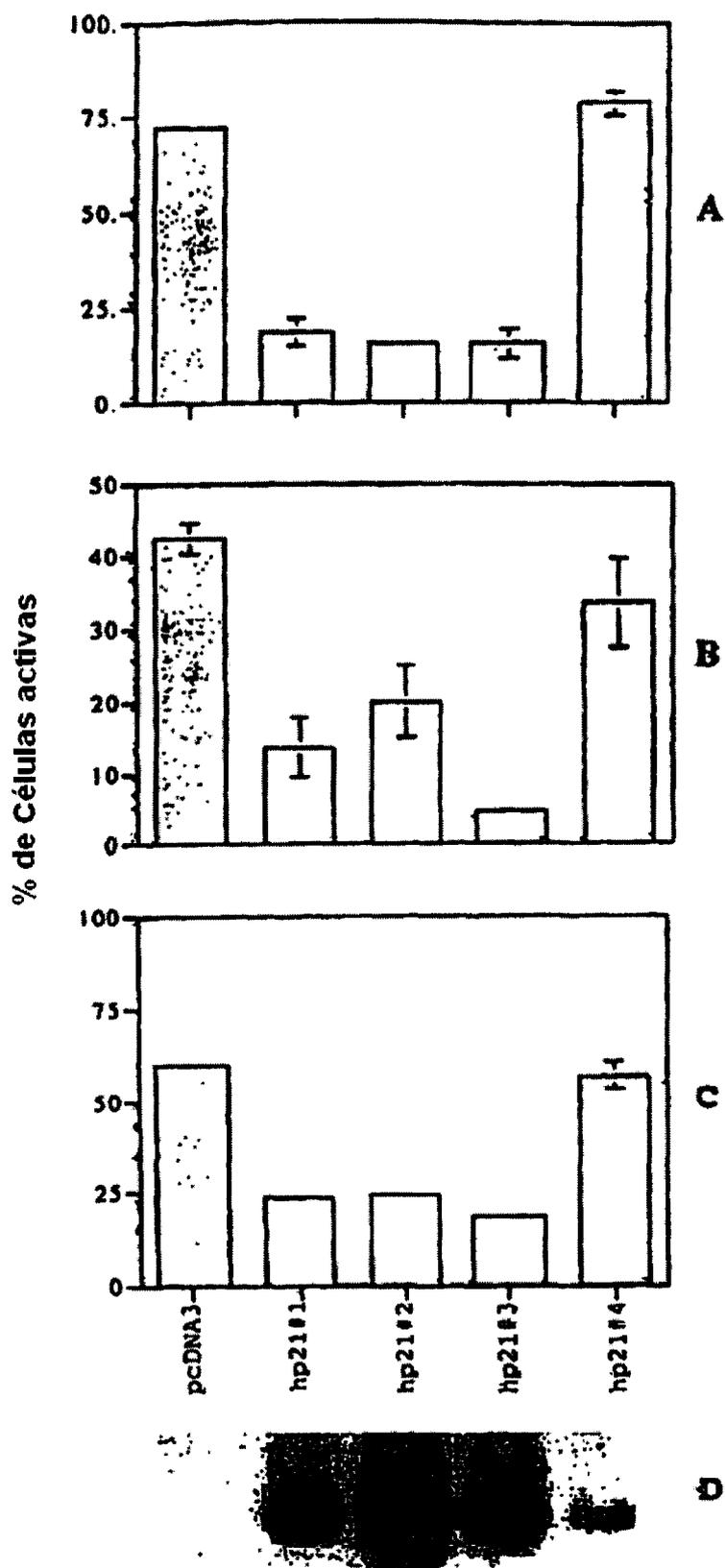
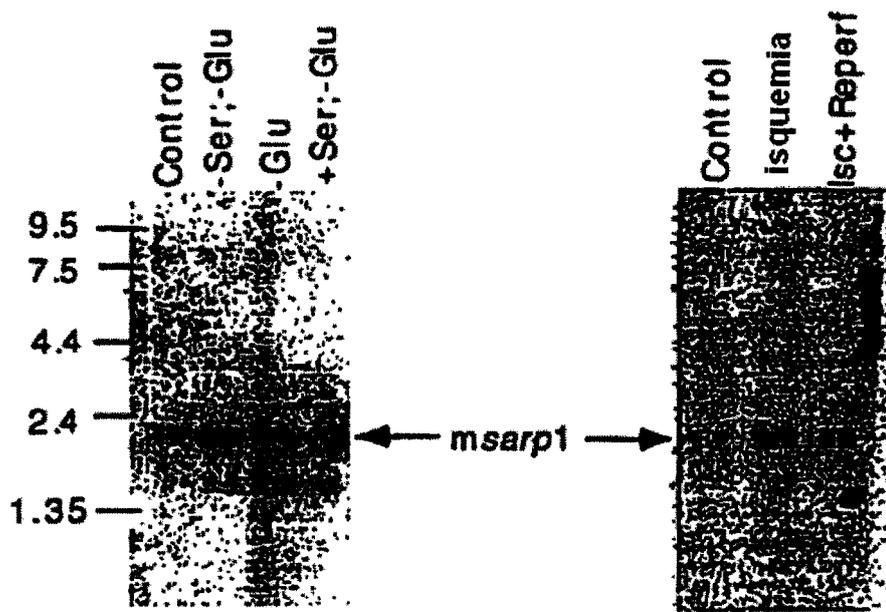


FIGURA 6

FIGURA 7



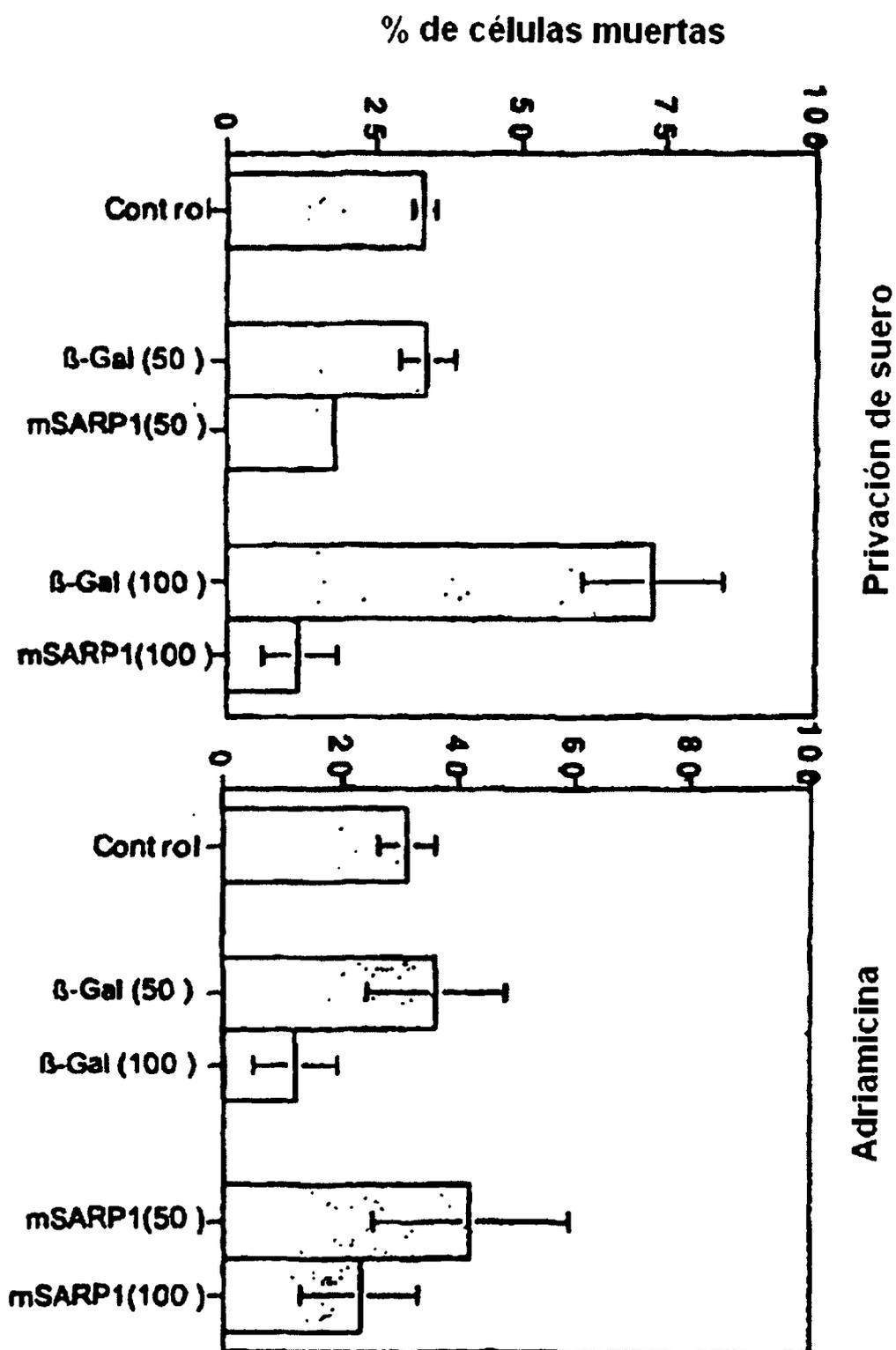


FIGURA 8

FIGURA 9

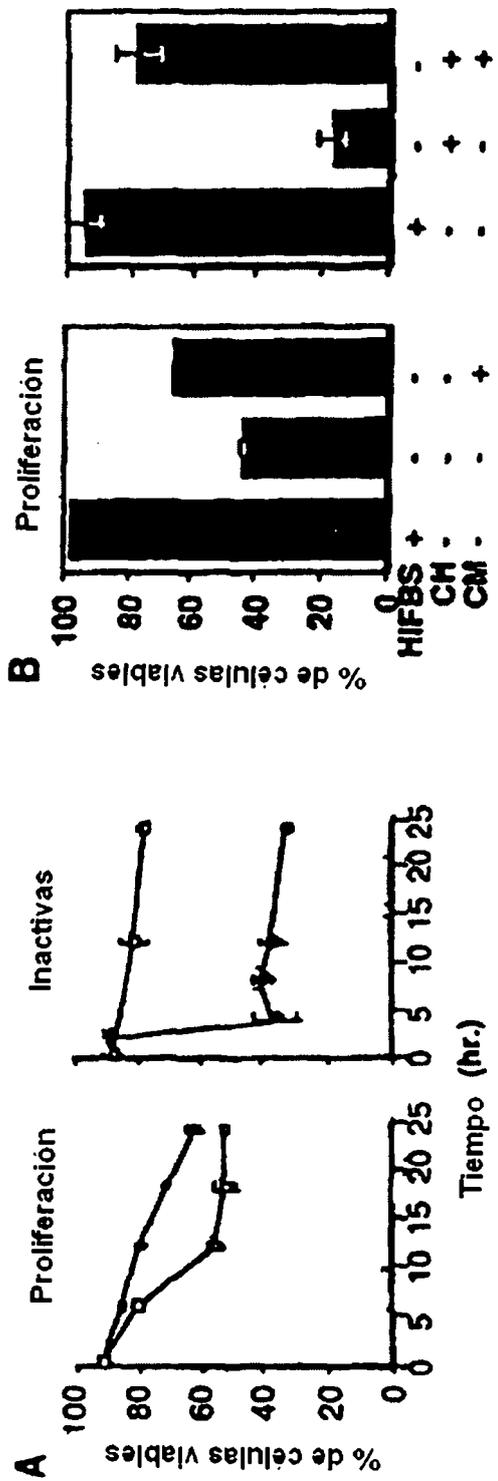


FIGURA 10

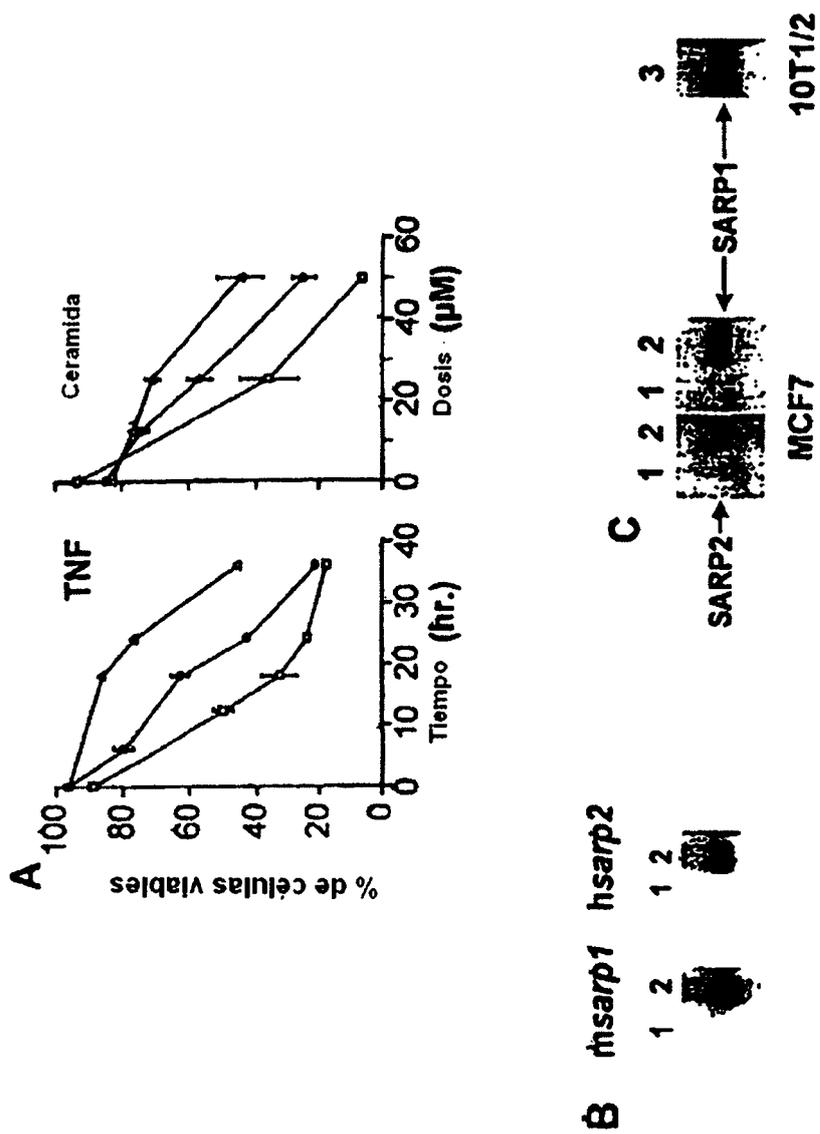


FIGURA 11

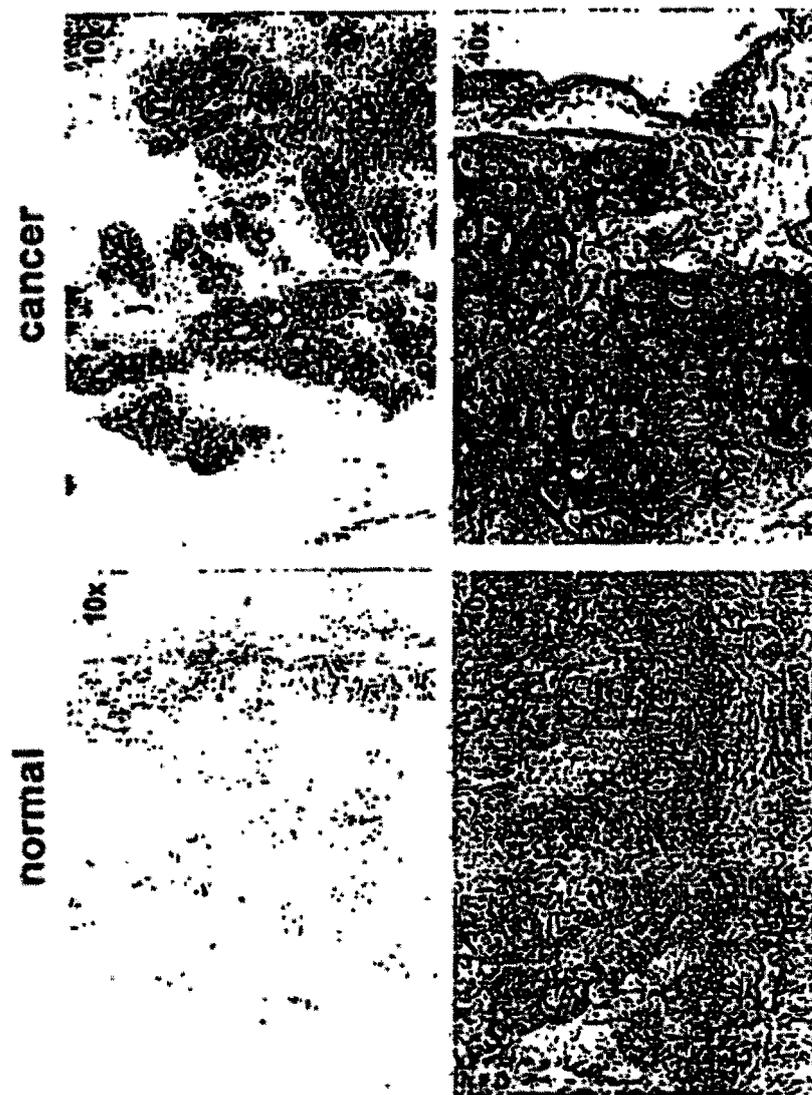


FIGURA 12

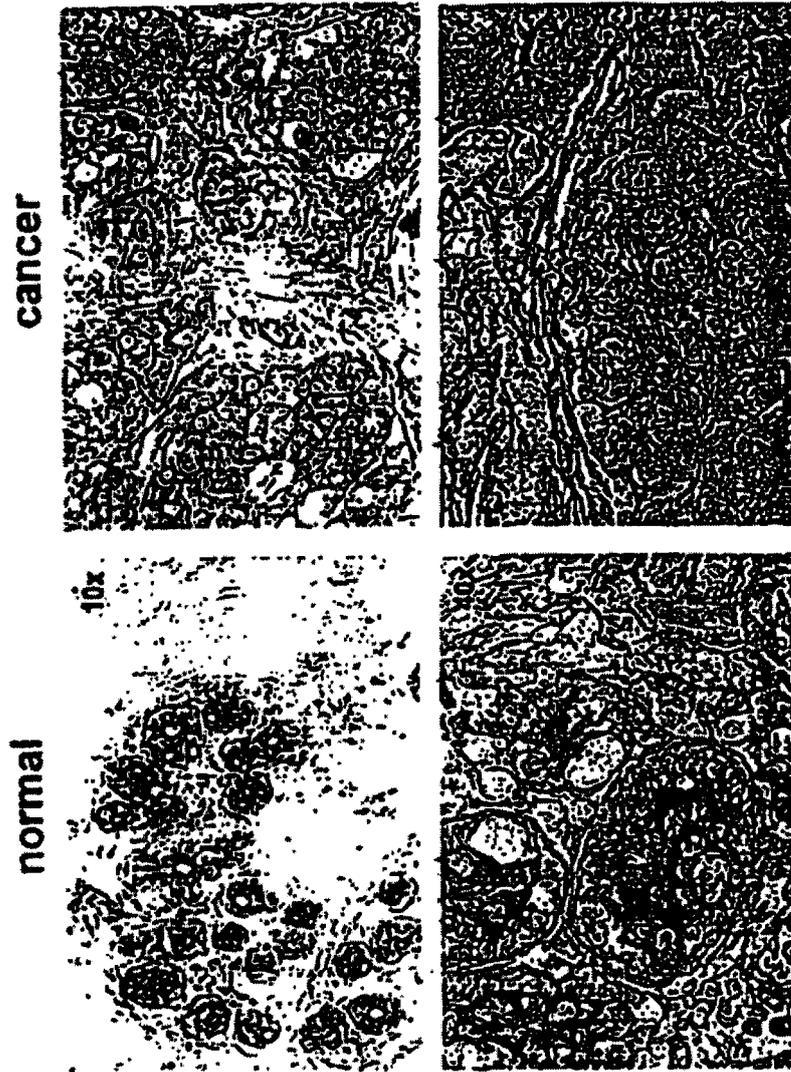
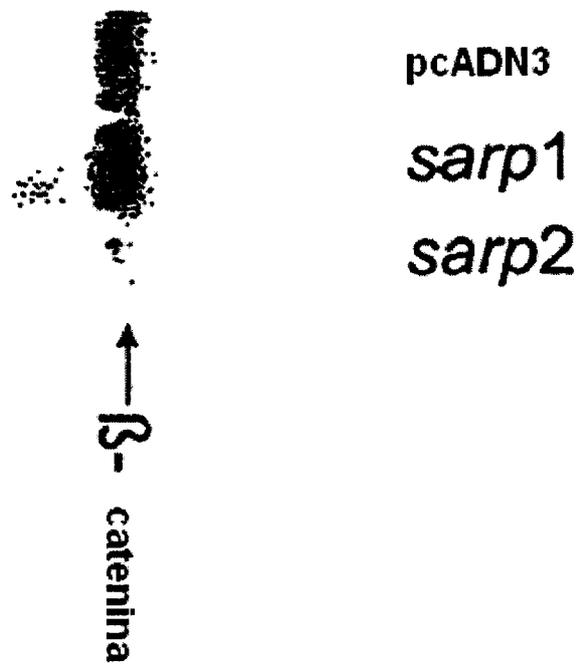


FIGURA 13



ES 2 263 181 T5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Umansky, Samuil
Melkonyan, Hovsep
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: UNA FAMILIA DE GENES QUE CODIFICAN PARA PÉPTIDOS RE-
LACIONADOS CON LA APOPTOSIS; PÉPTIDOS CODIFICADOS POR LOS MISMOS Y MÉTODOS
DE USO DE LOS MISMOS.
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 19
- (iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) DESTINATARIO: MORRISON & FOERSTER
(B) CALLE: 755 Page Mill Road
(C) CIUDAD: Palo Alto
20 (D) ESTADO: California
(E) PAÍS: Estados Unidos de América
(F) ZIP: 94304-1018
- (v) FORMULARIO EN FORMATO COMPUTACIONAL
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
(B) COMPUTADORA: Compatible con PC IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) SOFTWARE: Patente Pendiente #1.0, Versión #1.30
- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
- 35 (A) NÚMERO DE LA APLICACIÓN: US
(B) FECHA DE ENTREGA:
(C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) ABOGADO/AGENTE DE INFORMACIÓN:
- 40 (A) NOMBRE: Lehnhardt, Susan K.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 33.943
(C) REFERENCIA/NÚMERO DE DOCKET: 23647-20018.00
- 45 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
(A) TELÉFONO: (650) 813-5600
(B) TELEFAX: (650) 494-0792
- 50 (2) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- 55 (A) LONGITUD: 2030 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) NÚMERO DE HEBRAS: dos
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 65 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
(B) LOCALIZACIÓN: 253..1137
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: ID. SEC. NO:1:

ES 2 263 181 T5

AATTCGGAGA TCTACAGGCC TGTAGATCTC CGGCTCACTC TGCTCCCCCG GGTCCGAGCC 60
 CCCCCGAGCT GCGCGCGGGC TTGCAGTGCC TTGCCCGCGC CGACTTCCC GCGCCCCGCT 120
 5 TCGCGCGTTC GBCCGCCCCG TGTCCAGAGC CCCACGAGC AGAGCGAGGG AGTCCCGGAC 180
 GAGCTCGAGC TCCGGCCCCC TCTCGCTTCC CCCGCTCGGC TCCCTCGGCC CCCCAGGGGT 240
 10 CGCTAGTCCA CG ATG CCG CGG GGC CCT GCC TCG CTG CTG CTG CTA GTC 288
 Met Pro Arg Gly Pro Ala Ser Leu Leu Leu Leu Val
 1 5 10
 CTC GCC TCG CAC TGC TGC CTG GGC TCG GCG CGT GGG CTC TTC CTC TTC 336
 15 Leu Ala Ser His Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe
 15 20 25
 GGC CAG CCC GAC TTC TCC TAC AAG CGC ACG AAC TGC AAG CCC ATC CCC 384
 20 Gly Gln Pro Asp Phe Ser Tyr Lys Arg Thr Asn Cys Lys Pro Ile Pro
 30 35 40
 GCC AAC CTG CAG CTG TGC CAC GGC ATC GAG TAC CAG AAC ATG GGG CTG 432
 25 Ala Asn Leu Gln Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu
 45 50 55 60
 CCC AAC CTG CTG GGC CAC GAG ACC ATG AAG GAG GTG CTG GAG CAG GCG 480
 Pro Asn Leu Leu Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala
 65 70 75
 30 GGC GCC TGG ATT CCG CTG GTC ATG AAG CAG TGC CAC CCG GAC ACC AAG 528
 Gly Ala Trp Ile Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys
 80 85 90
 35 AAG TTC CTG TGC TCG CTC TTC GCC CCT GTC TGT CTC GAC GAC CTA GAT 576
 Lys Phe Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp
 95 100 105
 GAG ACC ATC CAG CCG TGT CAC TCG CTC TGC GTG CAG GTG AAG GAC CGC 624
 40 Glu Thr Ile Gln Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg
 110 115 120
 TGC GCC CCG GTC ATG TCC GCC TTC GGC TTC CCC TGG CCA GAC ATG CTG 672
 45 Cys Ala Pro Val Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu
 125 130 135 140
 GAG TGC GAC CGT TTC CCG CAG GAC AAC GAC CTC TGC ATC CCC CTC GCT 720
 Glu Cys Asp Arg Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala
 145 150 155

ES 2 263 181 T5

AGT AGC GAC CAC CTC CTG CCG GCC ACA GAG GAA GCT CCC AAG GTG TGT 768
 Ser Ser Asp His Leu Leu Pro Ala Thr Glu Glu Ala Pro Lys Val Cys
 160 165 170

5

GAA GCC TGC AAA ACC AAG AAT GAG GAC GAC AAC GAC ATC ATG GAA ACC 816
 Glu Ala Cys Lys Thr Lys Asn Glu Asp Asp Asn Asp Ile Met Glu Thr
 175 180 185

10

CTT TGT AAA AAT GAC TTC GCA CTG AAA ATC AAA GTG AAG GAG ATA ACG 864
 Leu Cys Lys Asn Asp Phe Ala Leu Lys Ile Lys Val Lys Glu Ile Thr
 190 195 200

15

TAC ATC AAC AGA GAC ACC AAG ATC ATC CTG GAG ACA AAG AGC AAG ACC 912
 Tyr Ile Asn Arg Asp Thr Lys Ile Ile Leu Glu Thr Lys Ser Lys Thr
 205 210 215 220

20

ATT TAC AAG CTG AAC GGC GTG TCC GAA AGG GAC CTG AAG AAA TCC GTG 960
 Ile Tyr Lys Leu Asn Gly Val Ser Glu Arg Asp Leu Lys Lys Ser Val
 225 230 235

25

CTG TGG CTC AAA GAC AGC CTG CAG TGC ACC TGT GAG GAG ATG AAC GAC 1008
 Leu Trp Leu Lys Asp Ser Leu Gln Cys Thr Cys Glu Glu Met Asn Asp
 240 245 250

30

ATC AAC GCT CCG TAT CTG GTC ATG GGA CAG AAG CAG GGC GGC GAA CTG 1056
 Ile Asn Ala Pro Tyr Leu Val Met Gly Gln Lys Gln Gly Gly Glu Leu
 255 260 265

35

GTG ATC ACC TCC GTG AAA CGG TGG CAG AAG GGC CAG AGA GAG TTC AAG 1104
 Val Ile Thr Ser Val Lys Arg Trp Gln Lys Gly Gln Arg Glu Phe Lys
 270 275 280

40

CGC ATC TCC CGC AGC ATC CGC AAG CTG CAA TGC TAGTTTCCCA GTGGGGTGGC 1157
 Arg Ile Ser Arg Ser Ile Arg Lys Leu Gln Cys
 285 290 295

45

TTCTCTCCAT CCAGGCCCTG AGCTCTGTAG ACCACTTGCC TCCGGACCTC ATTTCCGGTT 1217

TCCCAAGCAC AGTCCGGGAA AGCTACAGCC CCAGCTTGGG GCGGCTTGGC CTGCCTCCTG 1277

CATGTGTGTA TCCCTAACAT GTCCTGAGTT ATAAGGCCCT AGGAGGCCTT GGAAOCCAT 1337

AGCTGTTTTT ACGGAAAGCG AAAAGCCCAT CCAGATCTTG TACAAATATT CAARCTAATA 1397

AAATCATGAC TATTTTTATG AAGTTTTAGA ACAGCTCGTT TTAAGGTTAG TTTTGAATAG 1457

50

CTGTAGTACT TTGACCCGAG GGGCATTTC TCTCTTGGT CAGTCFGTTG GCTTATACCG 1517

TGCACTTAGG TTGCCATGTC AGGCGAATTG TTTCTTTTTT TTTTTTTTTT TCCCTCTGTG 1577

55

GTCTAAGCTT GTGGGTCCCA GACTTAGTTG AGATAAAGCT GGCTGTTATC TCAANGPCTT 1637

ES 2 263 181 T5

5
10
15

CCTCAGTTCC AGCCTGAGAA TCGGCATCTA AGTCTTCAA CATTTCGTTG CTCGTTTTAT 1697
 GCCCTCATGA GCTCTGACCA TTGCATGCGT TCCCATCCCA GCTACAGAAC TTCAGTTTTAT 1757
 AAGCACACAG TAACCATTCC TCATTGCATG ATGCCCTCAA ATAAAAAGTG AATACAGTCT 1817
 ATAAATTGAC GAGTATTTTA AGCTTTGTTT AAAACATCTT TTAATTCAAT TTTTAAATCA 1877
 TTTTTTTTGC AAACATAATC ATTGTAGCTT ACCTGTAATA TAGGTAGTAG TTGACCTGGA 1937
 AAAGTTGTAA AAATATTGCT TTAACCGACA CTGTAATAT TTCAGATAAA CATTATATTC 1997
 TTTGTATATA AACTCCTGTA GATCTCCGAA TTC 2030

(3) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:2:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 295 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:2:

30
35
40
45
50
55
60
65

Met Pro Arg Gly Pro Ala Ser Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala Ser His
 1 5 10 15
 Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Lys Arg Thr Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
 35 40 45
 Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
 50 55 60
 Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
 85 90 95
 Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
 100 105 110
 Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
 115 120 125
 Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
 130 135 140

ES 2 263 181 T5

Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
145 150 155 160
 5 **Leu Leu Pro Ala Thr Glu Glu Ala Pro Lys Val Cys Glu Ala Cys Lys**
165 170 175
 10 **Thr Lys Asn Glu Asp Asp Asn Asp Ile Met Glu Thr Leu Cys Lys Asn**
180 185 190
 15 **Asp Phe Ala Leu Lys Ile Lys Val Lys Glu Ile Thr Tyr Ile Asn Arg**
195 200 205
 20 **Asp Thr Lys Ile Ile Leu Glu Thr Lys Ser Lys Thr Ile Tyr Lys Leu**
210 215 220
 25 **Asn Gly Val Ser Glu Arg Asp Leu Lys Lys Ser Val Leu Trp Leu Lys**
225 230 235 240
 30 **Asp Ser Leu Gln Cys Thr Cys Glu Glu Met Asn Asp Ile Asn Ala Pro**
245 250 255
 35 **Tyr Leu Val Met Gly Gln Lys Gln Gly Gly Glu Leu Val Ile Thr Ser**
260 265 270
 40 **Val Lys Arg Trp Gln Lys Gly Gln Arg Glu Phe Lys Arg Ile Ser Arg**
275 280 285
 45 **Ser Ile Arg Lys Leu Gln Cys**
290 295

40 (4) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 870 pares de bases.
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: dos
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 55 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 235..870

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:3:

60 **GGCTCATTCT GCTCCCCCGG GTCGGAGCCC CCCGGAGCTG CCGCCGGGCT TGCAGGGCCT 60**
CGCCCGCGCT GTCCTCCCGG TGTCCCGCTT CTCGCGCCC CAGCCGCCGG CTGCCAGCTT 120
TTCGGGCCCC CGAGTCGCAC CCAGCGAAGA GAGGGGGCCC GGGACAAGCT CGAACTOOGG 180

65

ES 2 263 181 T5

CCGCCTCGCC CTTAACCAGC TCCGTCCCTC TACCCCTAG GGGTCGGCC CACG ATG 237
 Met

5
 CTG CAG GGC CCT GGC TCG CTG CTG CTG CTC TTC CTC GCC TCG CAC TGC 285
 Leu Gln Gly Pro Gly Ser Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser His Cys
 300 305 310

10
 TGC CTG GGC TCG GCG CGC GGG CTC TTC CTC TTT GGC CAG CGC GAC TTC 333
 Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp Phe
 315 320 325

15
 TCC TAC AAG CGC AGC AAT TGC AAG CCC ATC CCG GCC AAC CTG CAG CTG 381
 Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln Leu
 330 335 340

20
 TGC CAC GGC ATC GAA TAC CAG AAC ATG CCG CTG CCC AAC CTG CTG GGC 429
 Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Gly
 345 350 355 360

25
 CAC GAG ACC ATG AAG GAG GTG CTG GAG CAG GCC GGC GCT TGG ATC CCG 477
 His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile Pro
 365 370 375

30
 CTG GTC ATG AAG CAG TGC CAC CCG GAC ACC AAG AAG TTC CTG TGC TCG 525
 Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys Ser
 380 385 390

35
 CTC TTC GCC CCC GTC TGC CTC GAT GAC CTA GAC GAG ACC ATC CAG CCA 573
 Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln Pro
 395 400 405

40
 TGC CAC TCT CGN TGC GTG CAG GTG AAG GAT CGC TGC GCC CCG GTC ATG 621
 Cys His Ser Xaa Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val Met
 410 415 420

45
 TCC GCC TTC GGC TTC CCC TGG CCC GAC ATG CTT GAG TGC GAC CGT TTC 669
 Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg Phe
 425 430 435 440

50
 CCC CAG GAC AAC GAC CTT TGC ATC CCC CTC GCT AGC AGC GAC CAC CTC 717
 Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His Leu
 445 450 455

55
 CTG CCA GCC ACC GAG GAA GCT CCA AAG GTA TGT GAA GCC TGC AAA AAT 765
 Leu Pro Ala Thr Glu Glu Ala Pro Lys Val Cys Glu Ala Cys Lys Asn
 460 465 470

60
 AAA AAT GAT GAT GAC AAC GAC ATA ATG GAA ACG CTT TGT AAA AAT GAT 813
 Lys Asn Asp Asp Asp Asn Asp Ile Met Glu Thr Leu Cys Lys Asn Asp
 475 480 485

65
 TTT GCA CTG AAA ATA AAA GTG AAG GAG ATA ACC TAC ATC AAC CGT CGA 861
 Phe Ala Leu Lys Ile Lys Val Lys Glu Ile Thr Tyr Ile Asn Arg Arg
 490 495 500

CGC GGC CGC 870
 Arg Gly Arg
 505

ES 2 263 181 T5

(5) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 212 aminoácidos.

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:4:

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

ES 2 263 181 T5

(6) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1984 pares de bases.

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE HEBRAS: dos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(C) NOMBRE/CLAVE: CDS

(D) LOCALIZACIÓN: 216..1166

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:5:

20	AAGCTTGATA TCGAATTCGC GGCCTCGTCG ACGGGAGGCG CCAGGATCAG TGGGGGCACC	60
	CGCAGCGCAG GCTGCCACCC ACCTGGGGGA CCTCCGGCGC GCGGGGGCG GCGGCTGGGT	120
25	AGAGTCAGGG CCGGGGGCGC ACGCCGAAC ACCTGGGCCG CCGGGCACCG AGCGTGGGG	180
	GGCTGCGCGG CCGGACCCTG GAGAGGGCGC AGCCG ATG CCG GCG GCG GCG GCG	233
	Met Arg Ala Ala Ala Ala	
	215	
30	GCG GGG GGC GTG CGG ACG GCC GCG CTG GCG CTG CTG CTG GGG GCG CTG	281
	Ala Gly Gly Val Arg Thr Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu	
	220 225 230	
35	CAC TGG GCG CCG GCG CGC TGC GAG GAG TAC GAC TAC TAT GGC TGG CAG	329
	His Trp Ala Pro Ala Arg Cys Glu Glu Tyr Asp Tyr Tyr Gly Trp Gln	
	235 240 245 250	
40	GCC GAG CCG CTG CAC GGC CGC TCC TAC TCC AAG CCG CCG CAG TGC CTT	377
	Ala Glu Pro Leu His Gly Arg Ser Tyr Ser Lys Pro Pro Gln Cys Leu	
	255 260 265	
45	GAC ATC CCT GCC GAC CTG CCG CTC TGC CAC ACG GTG GGC TAC AAG CGC	425
	Asp Ile Pro Ala Asp Leu Pro Leu Cys His Thr Val Gly Tyr Lys Arg	
	270 275 280	

ES 2 263 181 T5

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

ATG CGG CTG CCC AAC CTG CTG GAG CAC GAG AGC CTG GCC GAA GTG AAG 473
 Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Glu His Glu Ser Leu Ala Glu Val Lys
 285 290 295

CAG CAG GCG AGC AGC TGG CTG CCG CTG CTG GCC AAG CGC TGC CAC TCG 521
 Gln Gln Ala Ser Ser Trp Leu Pro Leu Leu Ala Lys Arg Cys His Ser
 300 305 310

GAT ACG CAG GTC TTC CTG TGC TCG CTC TTT GCG CCC GTC TGT CTC GAC 569
 Asp Thr Gln Val Phe Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp
 315 320 325 330

CCG CCC ATC TAC CCG TGC CGC TCG CTG TGC GAG GCC GTG GGC GCC GGC 617
 Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Ala Val Arg Ala Gly
 335 340 345

TGC GCG CCG CTC ATG GAG GCC TAC GGC TTC GCC TGG CCT GAG ATG CTG 665
 Cys Ala Pro Leu Met Glu Ala Tyr Gly Phe Pro Trp Pro Glu Met Leu
 350 355 360

CAC TGC CAC AAG TTC CCC CTG GAC AAC GAC CTC TGC ATC GGC GTG CAG 713
 His Cys His Lys Phe Pro Leu Asp Asn Asp Leu Cys Ile Ala Val Gln
 365 370 375

TTC GGG CAC CTG CCC GCC ACC GCG CCT CCA GTG ACC AAG ATC TGC GCC 761
 Phe Gly His Leu Pro Ala Thr Ala Pro Pro Val Thr Lys Ile Cys Ala
 380 385 390

CAG TGT GAG ATG GAG CAC AGT GCT GAC GGC CTC ATG GAG CAG ATG TGC 809
 Gln Cys Glu Met Glu His Ser Ala Asp Gly Leu Met Glu Gln Met Cys
 395 400 405 410

TCC AGT GAC TTT GTG GTC AAA ATG CGC ATC AAG GAG ATC AAG ATA GAG 857
 Ser Ser Asp Phe Val Val Lys Met Arg Ile Lys Glu Ile Lys Ile Glu
 415 420 425

AAT GGG GAC CGG AAG CTG ATT GGA GCC CAG AAA AAG AAG AAG CTG CTC 905
 Asn Gly Asp Arg Lys Leu Ile Gly Ala Gln Lys Lys Lys Lys Leu Leu
 430 435 440

AAG CCG GGC CCC CTG AAG CGC AAG GAC ACC AAG GGG CTG GTG CTG CAC 953
 Lys Pro Gly Pro Leu Lys Arg Lys Asp Thr Lys Arg Leu Val Leu His
 445 450 455

ATG AAG AAT GGC GCG GGC TGC CCC TGC CCA CAG CTG GAC AGC CTG GCG 1001
 Met Lys Asn Gly Ala Gly Cys Pro Cys Pro Gln Leu Asp Ser Leu Ala
 460 465 470

GGC AGC TTC CTG GTC ATG GGC CGC AAA GTG GAT GGA CAG CTG CTG CTC 1049
 Gly Ser Phe Leu Val Met Gly Arg Lys Val Asp Gly Gln Leu Leu Leu
 475 480 485 490

ES 2 263 181 T5

ATG GCC GTC TAC CGC TGG GAC AAG AAG AAT AAG GAG ATG AAG TTT GCA 1097
Met Ala Val Tyr Arg Trp Asp Lys Lys Asn Lys Glu Met Lys Phe Ala
495 500 505

GTC AAA TTC ATG TTC TCC TAC CCC TGC TCC CTC TAC TAC CCT TTC TTC 1245
Val Lys Phe Met Phe Ser Tyr Pro Cys Ser Leu Tyr Tyr Pro Phe Phe
510 515 520

TAC GGG GCG GCA GAG CCC CAC TGAAGGGCAC TCCTCCTTGC OCTGCCAGCT 1196
Tyr Gly Ala Ala Glu Pro His
525

GTGCCTTGCT TGCCCTCTGG CCCC GCCCCA ACTTCCAGGC TGACCCCGCC CTACTGGAGG 1256

GTGTTTTAC GAATGTTGTT ACTGGCACA GGCCTAAGGG ATGGGCACGG AGCCAGGCT 1316

GTCTTTTTTG ACCCAGGGGT CCTGGGGTCC CTGGGATGTT GGGCTTCTC TCTCAGGAGC 1376

AGGGCTTCTT CATCTGGGTG AAGACCTCAG GGTCTCAGAA AGTAGGCAGG GGAGGAGAGG 1436

GTAAGGGAAA GGTGGAGGGG CTCAGGGCAC CCTGAGGGGG AGGTTTCAGA GTAGAAGGTG 1496

ATGTCAGCTC CAGTCCCCCT CTGTGGGTGG TGGGGCCTCA CCTTGAAGAG GGAAGTCTCA 1556

ATATTAGGCT AAGCTATTTG GGAAGTCTT CCCCACGGCC CCTGTAAGCG TCATCCTAGC 1616

CCCCCTTAGG AAAGGAGTTA GGGTCTCAGT GCCTCCAGCC ACACCCCTTG CCTTCCCCAG 1676

CTTGCCCATTT TCCTGCCCC AAGGCCCAGA GCTCCCCCA GACTGGAGAG CAAGCCAGC 1736

CCAGCCTCGG CATAGACCCC CTTCTGGTCC GCCCGTGGCT CGATTGGCGG GATTCAATCC 1796

TCAGCCTCTG CTTCTCCCTT TTATCCCAAT AAGTTATTGC TACTGCTGTG AGGCCATAGG 1856

TACTAGACAA CCAATACATG CAGGGTTGGG TTTTCTAATT TTTTAACTT TTTAATTAAA 1916

TCAAAGGTG ACGCGCGGCC GCGGAATTCC TGCAGCCCGG GGGATCCCCG GGTAAOGAGC 1976
TCGAATTC 1984

45 (7) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 317 aminoácidos.

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:6:

60

65

ES 2 263 181 T5

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

ES 2 263 181 T5

Lys Glu Met Lys Phe Ala Val Lys Phe Met Phe Ser Tyr Pro Cys Ser
 290 295 300

Leu Tyr Tyr Pro Phe Phe Tyr Gly Ala Ala Glu Pro His
 305 310 315

(8) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 314 aminoácidos.

(B) TIPO: aminoácidos

(C) NÚMERO DE HEBRAS: una

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:7:

Met Gly Ile Gly Arg Ser Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
 1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Val Gly Ser Ala Ser
 20 25 30

Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser
 35 40 45

Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp
 50 55 60

Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn
 65 70 75 80

Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser
 85 90 95

Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe
 100 105 110

Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro
 115 120 125

Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met
 130 135 140

Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Pro Thr Glu
 165 170 175

Ala Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu
 180 185 190

ES 2 263 181 T5

Leu Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala
 195 200 205
 5 **Leu Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Lys Lys**
 210 215 220
 10 **Ile Val Pro Lys Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile Lys Lys**
 225 230 235 240
 15 **Lys Asp Leu Lys Lys Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala Asp Cys**
 245 250 255
 20 **Pro Cys His Gln Leu Asp Asn Leu Ser His His Phe Leu Ile Met Gly**
 260 265 270
 25 **Arg Lys Val Lys Ser Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys Trp Asp**
 275 280 285
 30 **Lys Lys Asn Lys Glu Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys Asn His**
 290 295 300
Glu Cys Pro Thr Phe Gln Ser Val Phe Lys
 305 310

(9) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:8:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 565 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

40 (C) NÚMERO DE HEBRAS: una

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:8:

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

ES 2 263 181 T5

Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser
 100 105 110

5 Ile Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe
 115 120 125

10 Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His
 130 135 140

15 Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Leu Leu Thr Thr Ala Pro Pro Pro Gly Leu Gln Pro Gly Ala
 165 170 175

20 Gly Gly Thr Pro Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ala Pro Pro Arg Tyr
 180 185 190

25 Ala Thr Leu Glu His Pro Phe His Cys Pro Arg Val Leu Lys Val Pro
 195 200 205

Ser Tyr Leu Ser Tyr Lys Phe Leu Gly Glu Arg Asp Cys Ala Ala Pro
 210 215 220

30 Cys Glu Pro Ala Arg Pro Asp Gly Ser Met Phe Phe Ser Gln Glu Glu
 225 230 235 240

35 Thr Arg Phe Ala Arg Leu Trp Ile Leu Thr Trp Ser Val Leu Cys Cys
 245 250 255

Ala Ser Thr Phe Phe Thr Val Thr Thr Tyr Leu Val Asp Met Gln Arg
 260 265 270

40 Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr
 275 280 285

45 Met Val Ser Val Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Val Leu Gln Glu Arg Val
 290 295 300

50 Val Cys Asn Glu Arg Phe Ser Glu Asp Gly Tyr Arg Thr Val Val Gln
 305 310 315 320

Gly Thr Lys Lys Glu Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe
 325 330 335

55 Phe Ser Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp
 340 345 350

60 Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn
 355 360 365

65

ES 2 263 181 T5

Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr
370 375 380

5
Ile Thr Ile Leu Ala Met Gly Gln Ile Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly
385 390 395 400

10
Val Cys Phe Val Gly Leu Asn Ser Leu Asp Pro Leu Arg Gly Phe Val
405 410 415

15
Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu
420 425 430

20
Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp
435 440 445

25
Gly Thr Lys Thr Glu Lys Leu Glu Arg Leu Met Val Arg Ile Gly Val
450 455 460

30
Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Ile Val Ile Ala Cys Tyr
465 470 475 480

35
Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg Glu His Trp Glu Arg Ser Trp Val Ser
485 490 495

40
Gln His Cys Lys Ser Leu Ala Ile Pro Cys Pro Ala His Tyr Thr Pro
500 505 510

45
Arg Met Ser Pro Asp Phe Thr Val Tyr Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr
515 520 525

50
Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr
530 535 540

55
Leu His Ser Trp Arg Lys Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser Arg His
545 550 555 560

60
Gly Glu Thr Thr Val
565

(10) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 585 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: una
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:9:

ES 2 263 181 T5

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

ES 2 263 181 T5

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

ES 2 263 181 T5

(11) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 666 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) NÚMERO DE HEBRAS: una

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:10:

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

ES 2 263 181 T5

Tyr Phe Arg Arg Glu Glu Leu Ser Phe Ala Arg Tyr Phe Ile Gly Leu
 195 200 205
 5
 Ile Ser Ile Ile Cys Leu Ser Ala Thr Leu Phe Thr Phe Leu Thr Phe
 210 215 220
 10
 Leu Ile Asp Val Thr Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe
 225 230 235 240
 15
 Tyr Ala Val Cys Tyr Met Met Val Ser Leu Ile Phe Phe Ile Gly Phe
 245 250 255
 20
 Leu Leu Glu Asp Arg Val Ala Cys Asn Ala Ser Ser Pro Ala Gln Tyr
 260 265 270
 25
 Lys Ala Ser Thr Val Thr Gln Gly Ser His Asn Lys Ala Cys Thr Met
 275 280 285
 30
 Leu Phe Met Val Leu Tyr Phe Phe Thr Met Ala Gly Ser Val Trp Trp
 290 295 300
 35
 Val Ile Leu Thr Ile Thr Trp Phe Leu Ala Ala Val Pro Lys Trp Gly
 305 310 315 320
 40
 Ser Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ala Leu Leu Phe His Ala Ser Ala Trp
 325 330 335
 45
 Gly Ile Pro Gly Thr Leu Thr Ile Ile Leu Leu Ala Met Asn Lys Ile
 340 345 350
 50
 Glu Gly Asp Asn Ile Ser Gly Val Cys Phe Val Gly Leu Tyr Asp Val
 355 360 365
 55
 Asp Ala Leu Arg Tyr Phe Val Leu Ala Pro Leu Cys Leu Tyr Val Val
 370 375 380
 60
 Val Gly Val Ser Leu Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Leu Asn Arg Val
 385 390 395 400
 65
 Arg Ile Glu Ile Pro Leu Glu Lys Glu Asn Gln Asp Lys Leu Val Lys
 405 410 415
 Phe Met Ile Arg Ile Gly Val Phe Ser Ile Leu Tyr Leu Val Pro Leu
 420 425 430
 Leu Val Val Ile Gly Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Tyr Arg Gly Ile
 435 440 445
 70
 Trp Glu Thr Thr Trp Ile Gln Glu Arg Cys Arg Glu Tyr His Ile Pro
 450 455 460
 75
 Cys Pro Tyr Gln Val Thr Gln Met Ser Arg Pro Asp Leu Ile Leu Phe
 465 470 475 480

ES 2 263 181 T5

Leu Met Lys Tyr Leu Met Ala Leu Ile Val Gly Ile Pro Ser Ile Phe
 485 490 495
 5 Trp Val Gly Ser Lys Lys Thr Cys Phe Glu Trp Ala Ser Phe Phe His
 500 505 510
 10 Gly Arg Arg Lys Lys Glu Ile Val Asn Glu Ser Arg Gln Val Leu Gln
 515 520 525
 15 Glu Pro Asp Phe Ala Gln Ser Leu Leu Arg Asp Pro Asn Thr Pro Ile
 530 535 540
 20 Ile Arg Lys Ser Arg Gly Thr Ser Thr Gln Gly Thr Ser Thr His Ala
 545 550 555 560
 25 Ser Ser Thr Gln Leu Ala Met Val Asp Asp Gln Arg Ser Lys Ala Gly
 565 570 575
 30 Ser Val His Ser Lys Val Ser Ser Tyr His Gly Ser Leu His Arg Ser
 580 585 590
 35 Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Pro Cys Ser Tyr Arg Gly Met Glu Glu Arg
 595 600 605
 40 Leu Pro His Gly Ser Met Ser Arg Leu Thr Asp His Ser Arg His Ser
 610 615 620
 45 Ser Ser His Arg Leu Asn Glu Gln Ser Arg His Ser Ser Ile Arg Asp
 625 630 635 640
 50 Leu Ser Asn Asn Pro Met Thr His Ile Thr His Gly Thr Ser Met Asn
 645 650 655
 55 Arg Val Ile Glu Glu Asp Gly Thr Ser Ala
 660 665

(12) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 537 aminoácidos.

(B) TIPO: aminoácidos

(C) NÚMERO DE HEBRAS: una

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:11:

ES 2 263 181 T5

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

ES 2 263 181 T5

Ile Phe Leu Leu Met Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp
 305 310 315 320

5 Val Ile Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Leu Lys Trp Gly
 325 330 335

10 His Glu Ala Ile Glu Met His Ser Ser Tyr Phe His Ile Ala Ala Trp
 340 345 350

15 Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Val Ile Leu Ile Met Arg Leu Val
 355 360 365

20 Asp Ala Asp Glu Leu Thr Gly Leu Cys Tyr Val Gly Asn Gln Asn Leu
 370 375 380

25 Asp Ala Leu Thr Gly Phe Val Val Ala Pro Leu Phe Thr Tyr Leu Val
 385 390 395 400

Ile Gly Thr Leu Phe Ile Ala Ala Gly Leu Val Ala Leu Phe Lys Ile
 405 410 415

30 Arg Ser Asn Leu Gln Lys Asp Gly Thr Lys Thr Asp Lys Leu Glu Arg
 420 425 430

35 Leu Met Val Lys Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala
 435 440 445

40 Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Ile Ser Asn Trp Ala Leu
 450 455 460

45 Phe Arg Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Asn Met Ala Val Glu Met Leu Lys
 465 470 475 480

Ile Phe Met Ser Leu Leu Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp
 485 490 495

50 Ser Ala Lys Thr Leu His Thr Trp Gln Lys Cys Ser Asn Arg Leu Val
 500 505 510

Asn Ser Gly Lys Val Lys Arg Glu Lys Arg Gly Asn Gly Trp Val Lys
 515 520 525

55 Pro Gly Lys Gly Asn Glu Thr Val Val
 530 535

(13) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 709 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: una
- 65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

ES 2 263 181 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:12:

5 Met Glu Arg Ser Pro Phe Leu Leu Ala Cys Ile Leu Leu Pro Leu Val
 1 5 10 15

10 Arg Gly His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys
 20 25 30

15 Met Lys Met Thr Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His
 35 40 45

20 Tyr Asp Gln Gly Ile Ala Ala Val Glu Met Gly His Phe Leu His Leu
 50 55 60

25 Ala Asn Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Met Phe Leu Cys Gln Ala
 65 70 75 80

30 Phe Ile Pro Thr Cys Thr Glu Gln Ile His Val Val Leu Pro Cys Arg
 85 90 95

35 Lys Leu Cys Glu Lys Ile Val Ser Asp Cys Lys Lys Leu Met Asp Thr
 100 105 110

40 Phe Gly Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asn Arg Leu Pro His
 115 120 125

45 Cys Asp Asp Thr Val Pro Val Thr Ser His Pro His Thr Glu Leu Ser
 130 135 140

50 Gly Pro Gln Lys Lys Ser Asp Gln Val Pro Arg Asp Ile Gly Phe Trp
 145 150 155 160

55 Cys Pro Lys His Leu Arg Thr Ser Gly Asp Gln Gly Tyr Arg Phe Leu
 165 170 175

60 Gly Ile Glu Gln Cys Ala Pro Pro Cys Pro Asn Met Tyr Phe Lys Ser
 180 185 190

65 Asp Glu Leu Asp Phe Ala Lys Ser Phe Ile Gly Ile Val Ser Ile Phe
 195 200 205

70 Cys Leu Cys Ala Thr Leu Phe Thr Phe Leu Thr Phe Leu Ile Asp Val
 210 215 220

75 Arg Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Tyr Tyr Ser Val Cys
 225 230 235 240

80 Tyr Ser Ile Val Ser Leu Met Tyr Phe Val Gly Phe Leu Leu Gly Asn
 245 250 255

ES 2 263 181 T5

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

ES 2 263 181 T5

Ala Pro Gly Pro His Arg Leu Lys Val Ile Ser Lys Ser Met Gly Thr
 545 550 555 560

5 Ser Thr Gly Ala Thr Thr Asn His Gly Thr Ser Ala Met Ala Ile Ala
 565 570 575

10 Asp His Asp Tyr Leu Gly Gln Glu Thr Ser Thr Glu Val His Thr Ser
 580 585 590

15 Pro Glu Ala Ser Val Lys Glu Gly Arg Ala Asp Arg Ala Asn Thr Pro
 595 600 605

Ser Ala Lys Asp Arg Asp Cys Gly Glu Ser Ala Gly Pro Ser Ser Lys
 610 615 620

20 Leu Ser Gly Asn Arg Asn Gly Arg Glu Ser Arg Ala Gly Gly Leu Lys
 625 630 635 640

25 Glu Arg Ser Asn Gly Ser Glu Gly Ala Pro Ser Glu Gly Arg Val Ser
 645 650 655

30 Pro Lys Ser Ser Val Pro Glu Thr Gly Leu Ile Asp Cys Ser Thr Ser
 660 665 670

Gln Ala Ala Ser Ser Pro Glu Pro Thr Ser Leu Lys Gly Ser Thr Ser
 675 680 685

35 Leu Pro Val His Ser Ala Ser Arg Ala Arg Lys Glu Gln Gly Ala Gly
 690 695 700

Ser His Ser Asp Ala
 705

(14) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:13:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 572 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácidos
 - 50 (C) NÚMERO DE HEBRAS: una
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:13:

Met Arg Gly Pro Gly Thr Ala Ala Ser His Ser Pro Leu Gly Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu Pro Thr Asp Thr Arg Ala
 20 25 30

65

ES 2 263 181 T5

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

ES 2 263 181 T5

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

(15) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 685 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: una
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 263 181 T5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:14:

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

ES 2 263 181 T5

Ile Arg Leu Gly Leu Phe Thr Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Ala Val
 530 535 540
 5 Val Val Ala Cys Leu Phe Tyr Glu Gln His Asn Arg Pro Arg Trp Glu
 545 550 555 560
 10 Ala Thr His Asn Cys Pro Cys Leu Arg Asp Leu Gln Pro Asp Gln Ala
 565 570 575
 Arg Arg Pro Asp Tyr Ala Val Phe Met Leu Lys Tyr Phe Met Cys Leu
 580 585 590
 15 Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val Trp Ser Gly Lys Thr Leu
 595 600 605
 20 Glu Ser Trp Arg Ala Leu Cys Thr Arg Cys Cys Trp Ala Ser Lys Gly
 610 615 620
 Ala Ala Val Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Ser Gly
 25 625 630 635 640
 Pro Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly His Gly Gly Gly Gly Gly Ser Leu
 645 650 655
 30 Tyr Ser Asp Val Ser Thr Gly Leu Thr Trp Arg Ser Gly Thr Ala Ser
 660 665 670
 Ser Val Ser Tyr Pro Lys Gln Met Pro Leu Ser Gln Val
 35 675 680 685

(16) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:15:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 45 (C) NÚMERO DE HEBRAS: una
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:15:

50 **CCTGTAGATC TCCC** 14

(17) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:16:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases.
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 60 (C) NÚMERO DE HEBRAS: una
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:16:

65 **ATTCGGAGA TCTACAGG** 18

ES 2 263 181 T5

(18) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases.

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE HEBRAS: una

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:17:

TTTTTTTTT TTTTNS

17

(19) INFORMACIÓN DE LA ID. SEC. NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1308 pares de bases.

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE HEBRAS: una

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NO:18:

GAATTCCGGT CCGGAGTCAG TGCCGCGCGC CCGCCGCCCC GGGCCTTGCT GCTCGCCGCA 60
CCTCCGGGAG CCGGGGGGCA CCCAGCCCGC AGCGCGGCTT CCGCGCCGCG GCGGCTCCG 120
ACCGCAGGCC GAGGGCCGCG ACTGGCCGGG GGGACCGGCG AGCAGCTTGC GCGGGGGGAG 180
CGGGCAACGC TGGGACTGTC GCCTTTTGTG CCGGAGGTC CTTGGAAGTT TCGGGCAGGA 240
CGCGCCCGGG GAGGCGGCGG AGGCAGCCCC GAGTGGGGG AGAACGGGC GCAGAGCGGG 300
CATGGGCATC GGGCGCAGCG AGGGGGGCCG CCGCGGGCA GCGCTGGGCG TGCTGCTGGC 360
GCTGGGCGCG GCGCTTCTGG CCGTGGGCTC GGCCAGGGAG TAGGACTAAG TGAGCTTGCA 420
GTCCGACATC GGCCCGTACC AGAGCGGGCG CTCTACACC AAGCCACCTC AGTGGGTGGA 480
CATCCCCGCG GACCTGCGGC TGTGCCACAA CGTGGGCTAC AAGAAGATGG TGCTGGGCAA 540
CCTGCTGGAG CACGAGACCA TGGCGGAGGT GAAGCAGCAG GCCAGCAGCT GGGTGGCCCT 600
GCTCAACAAG AACTGCCACG CCGGCACCCA GGTCTTGCTC TGCTGGCTCT TCGCCCGCGT 660
CTGCTGGAC CCGCCCATCT ACCCGTGTGG CTGGCTCTGC GAGGCGGTGC GCGACTGGTG 720
CGAGCCGGTC ATGCAGTTCT TCGGCTTCTA CTGGGCCGAG ATGCTTAGGT GTGACAGTT 780

