



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 541**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)	C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 16/32 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)	A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)	C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03730791 .5**

96 Fecha de presentación : **03.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1513934**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2005**

54 Título: **Genes y polipéptidos relacionados con cánceres de colon humanos.**

30 Prioridad: **06.06.2002 US 386985 P**
30.09.2002 US 415209 P
28.02.2003 US 451013 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.06.2011

73 Titular/es: **ONCOTHERAPY SCIENCE, Inc.**
2-1, Sakado 3-chome
Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012, JP

72 Inventor/es: **Nakamura, Yusuke;**
Furukawa, Yoichi;
Tahara, Hideaki y
Tsunoda, Takuya

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

DESCRIPCIÓN

Genes y polipéptidos relacionados con cánceres de colon humanos

Campo técnico

- 5 La presente descripción se refiere al campo de la ciencia biológica, más específicamente al campo de la investigación del cáncer. En particular, la presente descripción se refiere a genes novedosos, *RNF43*, *CXADRL1*, y *GCUD1*, implicados en el mecanismo de proliferación de las células, así como a polipéptidos codificados por los genes. Los genes y polipéptidos de la presente descripción pueden usarse, por ejemplo, en el diagnóstico de una enfermedad proliferativa celular, y como moléculas diana para desarrollar fármacos contra la enfermedad.

Técnica anterior

- 10 Los cánceres gástricos y cánceres colorrectales son las causas principales de muerte por cáncer a nivel mundial. A pesar del reciente progreso en estrategias de diagnóstico y terapéuticas, el pronóstico de los pacientes con cánceres avanzados sigue siendo muy malo. Aunque estudio moleculares han revelado la participación de alteraciones en genes supresores tumorales y/u oncogenes en la carcinogénesis, todavía siguen sin aclararse los mecanismos precisos.
- 15 Tecnologías de micromatrices de ADNc han permitido obtener perfiles exhaustivos de la expresión génica en células malignas y las normales correspondientes (Okabe *et al.*, Cancer Res 61:2129-37 (2001); Kitahara *et al.*, Cancer Res 61: 3544-9 (2001); Lin *et al.*, Oncogene 21:4120-8 (2002); Hasegawa *et al.*, Cancer Res 62:7012-7 (2002)). Este enfoque permite dar a conocer la naturaleza compleja de las células cancerosas, y ayuda a comprender el mecanismo de la carcinogénesis. La identificación de los genes que están desregulados en los tumores puede llevar
- 20 a un diagnóstico más preciso y exacto de los cánceres individuales, y a desarrollar dianas terapéuticas novedosas (Bienz y Clevers, Cell 103:311-20 (2000)). Para dar a conocer los mecanismos que subyacen a los tumores desde un punto de vista de todo el genoma, y descubrir moléculas diana para el diagnóstico y el desarrollo de fármacos terapéuticos novedosos, los presentes inventores han analizado los perfiles de expresión de células tumorales usando una micromatriz de ADNc de 23040 genes (Okabe *et al.*, Cancer Res. 61:2129-37 (2001); Kitahara *et al.*, Cancer Res 61:3544-9 (2001); Lin *et al.*, Oncogene 21:4120-8 (2002); Hasegawa *et al.*, Cancer Res 62:7012-7 (2002)).

- Estudios diseñados para revelar los mecanismos de la carcinogénesis han facilitado ya la identificación de dianas moleculares para agentes antitumorales. Por ejemplo, inhibidores de farnesiltransferasa (FTI) que se desarrollaron originalmente para inhibir la ruta de señalización de crecimiento relacionada con Ras, cuya activación depende de la
- 30 farnesilación postraducciona, han sido eficaces para tratar tumores dependientes de Ras en modelos animales (He *et al.*, Cell 99:335-45 (1999)). Se han llevado a cabo ensayos clínicos en seres humanos usando una combinación de fármacos anticancerígenos y anticuerpo monoclonal anti-HER2, trastuzumab, para antagonizar el receptor de protooncogén HER2/neu; y han obtenido una respuesta clínica y supervivencia global mejoradas de los pacientes con cáncer de mama (Lin *et al.*, Cancer Res 61:6345-9 (2001)). Se ha desarrollado un inhibidor de tirosina cinasa, STI-571, que inactiva selectivamente las proteínas de fusión bcr-abl, para tratar leucemias mielógenas crónicas en
- 35 las que la activación constitutiva de bcr-abl tirosina cinasa desempeña un papel crucial en la transformación de leucocitos. Se diseñan agentes de estas clases para suprimir la actividad oncogénica de productos génicos específicos (Fujita *et al.*, Cancer Res 61:7722-6 (2001)). Por tanto, los productos génicos comúnmente regulados por incremento en las células cancerosas pueden servir como posibles dianas para desarrollar agentes anticancerígenos
- 40 novedosos.

El documento WO 00/50588 describe la identificación de genes que se expresan conjuntamente con genes de cáncer de colon genes conocidos. El documento WO 01/66689 describe muchas secuencias de nucleótidos y sus respectivas secuencias de aminoácidos como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de diversos cánceres.

- Se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) reconocen péptidos de epítomos derivados de
- 45 antígenos asociados a tumores (TAA) que se presentan en la molécula del CMH de clase I, y lisan las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia MAGE como el primer ejemplo de TAA, se han descubierto muchos otros TAA usando enfoques inmunológicos (Boon, Int J Cancer 54: 177-80 (1993); Boon y van der Bruggen, J Exp Med 183: 725-9 (1996); van der Bruggen *et al.*, Science 254: 1643-7 (1991); Brichard *et al.*, J Exp Med 178: 489-95 (1993); Kawakami *et al.*, J Exp Med 180: 347-52 (1994)). Algunos de los TAA descubiertos se encuentran ahora en
- 50 fase de desarrollo clínico como dianas de inmunoterapia. Los TAA descubiertos hasta el momento incluyen MAGE (van der Bruggen *et al.*, Science 254: 1643-7 (1991)), gp100 (Kawakami *et al.*, J Exp Med 180: 347-52 (1994)), SART (Shichijo *et al.*, J Exp Med 187: 277-88 (1998)), y NY-ESO-1 (Chen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997)). Por otro lado, se ha mostrado que productos génicos que se había demostrado que se sobreexpresaban específicamente en células tumorales, se reconocen como dianas que inducen respuestas inmunitarias celulares.
- 55 Tales productos génicos incluyen p53 (Umano *et al.*, Brit J Cancer 84: 1052-7 (2001)), HER2/neu (Tanaka *et al.*, Brit J Cancer 84: 94-9 (2001)), CEA (Nukaya *et al.*, Int J Cancer 80: 92-7 (1999)), etc.

A pesar del progreso significativo en investigación básica y clínica referente a los TAA (Rosenbeg *et al.*, Nature Med 4: 321-7 (1998); Mukherji *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 92: 8078-82 (1995); Hu *et al.*, Cancer Res 56: 2479-83

(1996)), sólo se encuentra disponible un número limitado de TAA candidatos para el tratamiento de adenocarcinomas, incluyendo el cáncer colorrectal. Los TAA que se expresan abundantemente en células cancerosas, y al mismo tiempo cuya expresión se limita a las células cancerosas serían candidatos prometedores a dianas inmunoterapéuticas. Además, se espera que la identificación de nuevos TAA que inducen respuestas inmunitarias antitumorales específicas y potentes fomente el uso clínico de la estrategia de vacunación con péptidos en diversos tipos de cáncer (Boon y van der Bruggen, *J Exp Med* 183: 725-9 (1996); van der Bruggen *et al.*, *Science* 254: 1643-7 (1991); Brichard *et al.*, *J Exp Med* 178: 489-95 (1993); Kawakami *et al.*, *J Exp Med* 180: 347-52 (1994); Shichijo *et al.*, *J Exp Med* 187: 277-88 (1998); Chen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1914-8 (1997); Harris, *J Natl Cancer Inst* 88: 1442-5 (1996); Butterfield *et al.*, *Cancer Res* 59: 3134-42 (1999); Vissers *et al.*, *Cancer Res* 59: 5554-9 (1999); van der Burg *et al.*, *J Immunol* 156: 3308-14 (1996); Tanaka *et al.*, *Cancer Res* 57: 4465-8 (1997); Fujie *et al.*, *Int J Cancer* 80: 169-72 (1999); Kikuchi *et al.*, *Int J Cancer* 81: 459-66 (1999); Oiso *et al.*, *Int J Cancer* 81: 387-94 (1999)).

Repetidamente se ha notificado que las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de ciertos donantes sanos estimuladas con péptidos producen niveles significativos de IFN- γ en respuesta al péptido, pero raramente ejercen citotoxicidad contra las células tumorales de una manera limitada a HLA-A24 o -A0201 en ensayos de liberación de ^{51}Cr (Kawano *et al.*, *Cancer Res* 60: 3550-8 (2000); Nishizaka *et al.*, *Cancer Res* 60: 4830-7 (2000); Tamura *et al.*, *Jpn J Cancer Res* 92: 762-7 (2001)). Sin embargo, tanto HLA-A24 como HLA-A0201 son uno de los alelos HLA populares la población japonesa, así como caucásica (Date *et al.*, *Tissue Antigens* 47: 93-101 (1996); Kondo *et al.*, *J Immunol* 155: 4307-12 (1995); Kubo *et al.*, *J Immunol* 152: 3913-24 (1994); Imanishi *et al.*, *Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop y Conference Oxford University Press, Oxford*, 1065 (1992); Williams *et al.*, *Tissue Antigen* 49: 129 (1997)). Por tanto, los péptidos antigénicos de cánceres presentados por estos HLA pueden ser especialmente útiles para el tratamiento de cánceres entre la población japonesa y caucásica. Además, se sabe que la inducción de CTL de baja afinidad *in vitro* habitualmente resulta del uso de péptido a alta concentración, generando un alto nivel de complejos de CMH/péptido específicos en células presentadoras de antígenos (CPA), que activarán eficazmente estos CTL (Alexander-Miller *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4102-7 (1996)).

Sumario de la invención

La invención en el presente documento proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

La invención proporciona además un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 ó 108.

La invención proporciona un método *in vitro* para diagnosticar cáncer de colon, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) detectar el nivel de expresión del gen que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en una muestra biológica de espécimen; y (b) relacionar un aumento del nivel de expresión con cáncer de colon.

La invención proporciona una composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon, comprendiendo dicha composición una cantidad farmacéuticamente eficaz de un ARN de interferencia pequeño frente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 como principio activo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona una composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon, comprendiendo dicha composición una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 como principio activo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona un método *in vitro* para inducir una inmunidad antitumoral, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto un polipéptido que consiste en el aminoácido de SEQ ID NO: 6 con células presentadoras de antígenos, o introducir un polinucleótido que codifica para el polipéptido o un vector que comprende el polinucleótido en células presentadoras de antígenos.

La invención proporciona un método *in vitro* para inducir una inmunidad antitumoral, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto un polipéptido seleccionado del grupo de polipéptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 y 108 con células presentadoras de antígenos, o introducir un polinucleótido que codifica para el polipéptido o un vector que comprende el polinucleótido en células presentadoras de antígenos.

La invención proporciona una composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido que consiste en el aminoácido de SEQ ID NO: 6, o un polinucleótido que codifica para el polipéptido como principio activo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona una composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 80, 97 y 108, o un polinucleótido que codifica para el polipéptido como principio activo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona el uso de un ARN de interferencia pequeño frente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon.

5 La invención proporciona el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon.

La invención proporciona el uso de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o un polinucleótido que codifica para el polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer de colon.

10 La invención proporciona el uso de un polipéptido seleccionado del grupo de polipéptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 y 108, o un polinucleótido que codifica para el polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer de colon.

15 La invención proporciona el uso de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido o un vector que comprende dicho polinucleótido, para la preparación de una composición farmacéutica para inducir inmunidad antitumoral.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de (a) un ARN de interferencia pequeño frente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o (b) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

20 La invención proporciona el uso de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 y 108, un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido, o un vector que comprende dicho polinucleótido para la preparación de una composición farmacéutica para inducir inmunidad antitumoral.

25 La invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 80, 97 y 108.

Un objetivo de la presente descripción es proporcionar proteínas novedosas involucradas en el mecanismo de proliferación de células de cáncer gástrico o colorrectal y los genes que codifican para las proteínas, así como métodos para producir y usar las mismas en el diagnóstico y tratamiento de cáncer gástrico o cáncer colorrectal.

30 Para dar a conocer el mecanismo de la carcinogénesis gástrica y colorrectal e identificar marcadores diagnósticos novedosos y/o dianas farmacológicas para el tratamiento de estos tumores, los presentes inventores analizaron los perfiles de expresión de genes en la carcinogénesis gástrica y colorrectal usando micromatriz de ADNc de todo el genoma que contiene 23040 genes. Desde el punto de vista farmacológico, suprimir las señales oncogénicas es más fácil en la práctica que activar efectos supresores tumorales. Por tanto, los presentes inventores investigaron genes que se regulaban por incremento durante la carcinogénesis gástrica y colorrectal.

35 Entre los transcritos que comúnmente se regulaban por incremento en cánceres gástricos, se identificaron genes humanos novedosos *CXADRL1* (receptor de coxsackie y adenovirus tipo 1) y *GCUD1* (regulado por incremento en el cáncer gástrico) en la banda cromosómica 3q13 y 7p14, respectivamente. La transferencia génica de *CXADRL1* o *GCUD1* promovía la proliferación de células. Además, la reducción de la expresión de *CXADRL1* o *GCUD1* mediante transfección de sus S-oligonucleótidos antisentido específicos o ARN de interferencia pequeños inhibía el crecimiento de las células de cáncer gástrico. Muchos fármacos anticancerígenos, tales como inhibidores de la síntesis de ADN y/o ARN, supresores metabólicos, e intercaladores de ADN, no sólo son tóxicos para las células cancerosas, sino también para células que crecen con normalidad. Sin embargo, agentes que suprimen la expresión de *CXADRL1* pueden no afectar de manera adversa a otros órganos debido al hecho de que la expresión normal del gen está limitada a los testículos y ovarios, y por tanto, puede ser de gran importancia para tratar el cáncer.

45 Además, entre los transcritos que comúnmente se regulaban por incremento en cánceres colorrectales, se identificó el gen *RNF43* (*Ring finger protein 43* (proteína de tipo dedo-Ring)) asignado a la banda cromosómica 17pter-p13.1. Además, un ensayo de selección de dos híbridos de levadura reveló que la proteína RNF43 estaba asociada con NOTCH2 o STRIN.

50 NOTCH2 es una proteína receptora transmembrana grande que es un componente de un mecanismo de señalización entre células conservado evolutivamente. NOTCH2 es un miembro proteico de la ruta de señalización de Notch y se notifica que está implicada en la glomerulogénesis en el riñón y el desarrollo de vasculatura en el corazón y los ojos (McCright *et al.*, Development 128: 491-502 (2001)). Tres proteínas Delta/Serrate/Lag-2 (DSL), Delta1, Jaggaed1 y Jaggaed2, se notifican como ligandos funcionales para NOTCH2 (Shimizu *et al.*, Mol Cell Biol 20: 6913-22 (2000)). La señal inducida por la unión al ligando en la ruta de señalización de Notch se transmite de manera intracelular mediante un proceso que implica proteólisis del receptor y translocación nuclear del dominio intracelular de la proteína NOTCH (véanse las revisiones Artavanis-Tsakonas *et al.*, Annu Rev Cell Biol 7: 427-52

(1999); Weinmaster, Curr Opin Genet Dev 10: 363-9 (2000)). Además, la reducción de la expresión de RNF43 expresión mediante transfección S-oligonucleótidos antisentido específicos o ARN de interferencia pequeños correspondientes a RNF43 inhibía el crecimiento de células de cáncer colorrectal. Tal como ya se ha descrito anteriormente, muchos fármacos anticancerígenos, no son sólo tóxicos para las células cancerosas, sino también para células que crecen con normalidad. Sin embargo, agentes supresores de la expresión de RNF43 pueden no afectar adversamente a otros órganos debido al hecho de que la expresión normal del gen se limita al feto, más específicamente al pulmón del feto y al riñón del feto, y por tanto puede ser de gran importancia para tratar el cáncer.

Por tanto, la presente descripción proporciona genes novedosos aislados, *CXADRL1*, *GCUD1* y *RNF43*, que son candidatos a marcadores de diagnóstico para el cáncer así como posibles dianas prometedoras para desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico y agentes anticancerígenos eficaces. Además, la presente descripción proporciona polipéptidos codificados por estos genes, así como la producción y el uso de los mismos. Más específicamente, la presente descripción proporciona lo siguiente:

La presente descripción proporciona polipéptidos humanos novedosos, *CXADRL1*, *GCUD1* y *RNF43*, o un equivalente funcional de los mismos, que promueven la proliferación celular y se regulan por incremento en enfermedades proliferativas celulares, tales como cánceres gástricos y colorrectales.

En una realización preferida, el polipéptido de *CXADRL1* incluye una proteína putativa de 431 aminoácidos con aproximadamente el 37% de identidad con CXADR (receptor de coxsackie y adenovirus). *CXADRL1* se codifica por el marco de lectura abierto de SEQ ID NO: 1 y contiene dos dominios de inmunoglobulina en los codones 29-124 y 158-232, así como un dominio transmembrana en los codones 246-268. El polipéptido de *CXADRL1* incluye preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. La presente descripción proporciona también una proteína aislada codificada a partir de al menos una parte de la secuencia de polinucleótido de *CXADRL1*, o secuencias de polinucleótido al menos el 30%, y más preferiblemente al menos el 40% complementarias a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1.

Por otro lado, en una realización preferida, el polipéptido de *GCUD1* incluye una proteína putativa de 414 aminoácidos codificada por el marco de lectura abierto de SEQ ID NO: 3. El polipéptido de *GCUD1* incluye preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. La presente descripción proporciona también una proteína aislada codificada a partir de al menos una parte de la secuencia de polinucleótido de *GCUD1*, o secuencias de polinucleótido al menos el 15%, y más preferiblemente al menos el 25% complementarias a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3.

Además, en una realización preferida, el polipéptido de *RNF43* incluye una proteína putativa de 783 aminoácidos codificada por el marco de lectura abierto de SEQ ID NO: 5. El polipéptido de *RNF43* incluye preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 y contiene un motivo de tipo dedo-Ring en los codones 272-312. El polipéptido de *RNF43* mostró una homología del 38% con el homólogo de proteína de tipo dedo-Ring DKFZp566H073.1 (número de registro de GenBank: T08729). La presente descripción también proporciona una proteína aislada codificada a partir de al menos una parte de la secuencia de polinucleótido de *RNF43*, o secuencias de polinucleótido al menos el 30%, y más preferiblemente al menos el 40% complementarias a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5.

La presente descripción proporciona además genes humanos novedosos, *CXADRL1* y *GCUD1*, cuyas expresiones se encuentran notablemente elevadas en una gran mayoría de cánceres gástricos en comparación con mucosas no cancerosas correspondientes. Además de los cánceres gástricos, *CXADRL1* y *GCUD1* se expresaban altamente también en cáncer colorrectal y cáncer de hígado. Este gen *CXADRL1* aislado incluye una secuencia de polinucleótido tal como se describe en SEQ ID NO: 1. En particular, el ADNc de *CXADRL1* incluye 3423 nucleótidos que contienen un marco de lectura abierto de 1296 nucleótidos (SEQ ID NO: 1). La presente descripción abarca además polinucleótidos que se hibridan con y que son al menos el 30%, y más preferiblemente al menos el 40% complementarios a la secuencia de polinucleótido expuesta en SEQ ID NO: 1, hasta el punto que codifican para una proteína *CXADRL1* o un equivalente funcional de la misma. Ejemplos de tales polinucleótidos son mutantes alélicos y degenerados de SEQ ID NO: 1. Por otro lado, el gen *GCUD1* aislado incluye una secuencia de polinucleótido tal como se describe en SEQ ID NO: 3. En particular, el ADNc de *GCUD1* incluye 4987 nucleótidos que contienen un marco de lectura abierto de 1245 nucleótidos (SEQ ID NO: 3). La presente descripción abarca además polinucleótidos que se hibridan con y que son al menos el 15%, y más preferiblemente al menos el 25% complementarios a la secuencia de polinucleótido expuesta en SEQ ID NO: 3, hasta el punto que pueden codificar para una proteína *GCUD1* o un equivalente funcional de la misma. Ejemplos de tales polinucleótidos son degeneraciones y mutantes alélicos de SEQ ID NO:3.

Además, la presente descripción proporciona un gen humano novedoso *RNF43*, cuya expresión se encuentra notablemente elevada en una gran mayoría de los cánceres colorrectales en comparación con mucosas no cancerosas correspondientes. Además de los cánceres colorrectales, *RNF43* también se expresaba altamente en cáncer de pulmón, cáncer gástrico y cáncer de hígado. El gen *RNF43* aislado incluye una secuencia de polinucleótido tal como se describe en SEQ ID NO: 5. En particular, el ADNc de *RNF43* incluye 5345 nucleótidos que contienen un marco de lectura abierto de 2352 nucleótidos (SEQ ID NO: 5). La presente descripción abarca además

polinucleótidos que se hibridan con y que son al menos el 30%, y más preferiblemente al menos el 40% complementarios a la secuencia de expuesta en SEQ ID NO: 5, hasta el punto de que codifican para una proteína RNF43 o un equivalente funcional de la misma. Ejemplos de tales polinucleótidos son degeneraciones y mutantes alélicos de SEQ ID NO: 5.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, un gen aislado es un polinucleótido cuya estructura no es idéntica a la de ningún polinucleótido que se produce de manera natural o a la de ningún fragmento de un polinucleótido genómico que se produce de manera natural que abarca más de tres genes separados. Por tanto, la expresión incluye, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómico que se produce de manera natural en el genoma del organismo en el que se produce de manera natural; (b) un polinucleótido
- 10 incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procariota o eucariota de tal manera que la molécula resultante no sea idéntica a ningún ADN genómico o vector que se produce de manera natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica para un polipéptido de fusión.
- 15 Por consiguiente, en un aspecto, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica para un polipéptido descrito en el presente documento o un fragmento del mismo. Preferiblemente, el polipéptido aislado incluye una secuencia de nucleótidos que es al menos el 60% idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3 ó 5. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico aislada es al menos el 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, idéntica a la secuencia de nucleótidos
- 20 mostrada en SEQ ID NO: 1, 3 ó 5. En el caso de un polinucleótido aislado que es más largo que o de longitud equivalente a la secuencia de referencia, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 3 ó 5, la comparación se realiza con la longitud completa de la secuencia de referencia. Cuando el polinucleótido aislado es más corto que la secuencia de referencia, por ejemplo, más corto que SEQ ID NO: 1, 3 ó 5, la comparación se realiza con un segmento de la secuencia de referencia de la misma longitud (excluyendo cualquier bucle requerido por el cálculo de homología).
- 25 La presente descripción proporciona también un método de producción de una proteína transfectando o transformando una célula huésped con una secuencia de polinucleótido que codifica para la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43, y expresar la secuencia de polinucleótido. Además, la presente descripción proporciona vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43, y células huésped que albergan un polinucleótido que codifica para la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43. Tales vectores y
- 30 células huésped pueden usarse para producir la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43.

También se proporciona por la presente descripción un anticuerpo que reconoce la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43. En parte, también se proporciona un polinucleótido antisentido (por ejemplo, ADN antisentido), ribozima, y ARNip (ARN de interferencia pequeño) del gen *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43*.

- 35 La presente descripción proporciona además un método para el diagnóstico de enfermedades proliferativas celulares que incluye determinar un nivel de expresión del gen en una muestra biológica de espécimen, comparando el nivel de expresión del gen *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43* con el de una muestra normal, y definir que un alto nivel de expresión del gen *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43* en la muestra significa tener una enfermedad proliferativa celular tal como cáncer. La enfermedad diagnosticada por el nivel de expresión de *CXADRL1* o *GCUD1* es de manera adecuada un cáncer gástrico, colorrectal y de hígado; y la detectada por el nivel de expresión de
- 40 *RNF43* es cáncer colorrectal, de pulmón, gástrico y de hígado.

Además, se proporciona un método de selección de un compuesto para tratar una enfermedad proliferativa celular. El método incluye poner en contacto el polipéptido de CXADRL1, GCUD1 o RNF43 con compuestos de prueba y seleccionar compuestos de prueba que se unen al polipéptido de CXADRL1, GCUD1 o RNF43.

- 45 La presente descripción proporciona además un método de selección de un compuesto para tratar una enfermedad proliferativa celular, incluyendo el método poner en contacto el polipéptido de CXADRL1, GCUD1 o RNF43 con un compuesto de prueba, y seleccionar el compuesto de prueba que suprime el nivel de expresión o la actividad biológica del polipéptido de CXADRL1, GCUD1 o RNF43.

- 50 Alternativamente, la presente descripción proporciona un método de selección de un compuesto para tratar una enfermedad proliferativa celular, incluyendo el método poner en contacto CXADRL1 y AIP1 en presencia de un compuesto de prueba, y seleccionar el compuesto de prueba que inhibe la unión de CXADRL1 y AIP1.

Además, la presente descripción proporciona un método de selección de un compuesto para tratar una enfermedad proliferativa celular, incluyendo el método poner en contacto RNF43 y NOTCH2 o STRIN en presencia de un compuesto de prueba, y seleccionar el compuesto de prueba que inhibe la unión de RNF43 y NOTCH2 o STRIN.

- 55 La presente descripción proporciona también una composición farmacéutica para tratar una enfermedad proliferativa celular, tal como cáncer. La composición farmacéutica puede ser, por ejemplo, un agente anticancerígeno. La composición farmacéutica puede describirse como al menos una parte de los S-oligonucleótidos antisentido o ARNip de la secuencia de polinucleótido de *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43* mostrada y descrita en SEQ ID NO: 1, 3 ó 5, respectivamente. Un S-oligonucleótido antisentido adecuado tiene la secuencia de nucleótidos seleccionada del

grupo de SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29 ó 31. El S-oligonucleótido antisentido de *CXADRL1* incluyendo aquéllos que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 23 ó 25 pueden usarse de manera adecuada para tratar el cáncer gástrico; el S-oligonucleótido antisentido de *GCUD1* incluyendo aquéllos que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27 ó 29 de manera adecuada para tratar el cáncer gástrico, colorrectal o de hígado; y el S-oligonucleótido antisentido de *RNF43* incluyendo aquéllos que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 31 de manera adecuada para cáncer colorrectal, de pulmón, gástrico o hígado. Un ARNip pequeño consiste en un conjunto de nucleótidos seleccionándose las secuencias de nucleótidos del grupo de SEQ ID NO: 40 y 41, 42 y 43, o 62 y 63. El ARNip de *CXADRL1* que consiste en un conjunto de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 40 y 41, o 42 y 43 puede usarse de manera adecuada para tratar el cáncer gástrico, colorrectal o de hígado; y el ARNip de *RNF43* que consiste en un conjunto de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 62 y 63 de manera adecuada para el cáncer de pulmón, gástrico o de hígado. Las composiciones farmacéuticas pueden ser también aquéllas que comprenden los compuestos seleccionados por los presentes métodos de selección de compuestos para tratar enfermedades proliferativas celulares.

El ciclo de acción de la composición farmacéutica es de manera deseable inhibir el crecimiento de las células cancerosas. La composición farmacéutica puede aplicarse a mamíferos incluyendo seres humanos y mamíferos domesticados.

La presente descripción proporciona además métodos para tratar una enfermedad proliferativa celular usando la composición farmacéutica proporcionada por la presente descripción.

Además, la presente descripción proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer, comprendiendo el método la etapa de administrar el polipéptido de *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43*. Se espera que se induzca inmunidad antitumoral mediante la administración del polipéptido de *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43*. Por tanto, la presente descripción proporciona también un método para inducir inmunidad antitumoral, comprendiendo el método la etapa de administrar el polipéptido de *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43*, así como una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer que comprende el polipéptido de *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43*.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1a a 1d representan la expresión de *A5928* (*CXADRL1*) y *C8121* (*GCUD1*) en cánceres gástricos. La figura 1a representa las razones de expresión relativa (cáncer/sin cáncer) de *A5928* en 14 cánceres gástricos primarios examinados mediante micromatriz de ADNc. Su expresión estaba regulada por incremento (razón de intensidad de Cy3: Cy5, >2,0) en 14 de los 14 cánceres gástricos que pasaron a través del filtro de límite de corte (la señales tanto de Cy3 como de Cy5 era superiores a 25.000). La figura 1b representa las razones de expresión relativa (cáncer/sin cáncer) de *C8121* en 12 cánceres gástricos primarios examinados mediante micromatriz de ADNc. Su expresión estaba regulada por incremento (razón de intensidad de Cy3: Cy5, >2,0) en 10 de los 12 cánceres gástricos que pasaron el filtro de límite de corte. La figura 1c representa la expresión de *CXADRL1* analizada mediante RT-PCR semicuantitativa usando 10 casos de cáncer gástrico. La figura 1d representa la expresión de *GCUD1* analizada mediante RT-PCR semicuantitativa usando 9 casos de cáncer gástrico. La expresión de *GAPDH* sirvió como control interno tanto para los análisis de expresión de *CXADRL1* como de *GCUD1*.

Las figuras 2a y 2b representan la expresión de *CXADRL1* en diversos tejidos humanos y la estructura de proteína y motivos de proteína predichos de *CXADRL1*. La figura 2a es una fotografía que representa la expresión de *CXADRL1* en diversos tejidos humanos analizados mediante análisis de tipo Northern de múltiples tejidos. La figura 2b representa la estructura de proteína predicha de *CXADRL1*. El ADNc de *CXADRL1* consiste en 3.423 nucleótidos con un ORF de 1.296 nucleótidos y está compuesto por 7 exones.

Las figuras 3a a 3c representan el efecto promotor del crecimiento de *CXADRL1*. La figura 3a es una fotografía que representa el resultado de ensayos de formación de colonias de células NIH3T3 transfectadas con *CXADRL1*. La figura 3b representa la expresión de *CXADRL1* exógeno en células NIH3T3-*CXADRL1* analizadas mediante RT-PCR semicuantitativa. La expresión de *GAPDH* sirvió como control interno. Todos de n.º 2, n.º 5, n.º 6, y n.º 7 indican células NIH3T3 transfectadas con *CXADRL1*. La figura 3c representa el número de células NIH3T3. El crecimiento de células NIH3T3-*CXADRL1* fue estadísticamente mayor que el de células (NIH3T3-LacZ) control en medios de cultivo que contenían el FBS al 10% (P<0,05).

La figura 4 representa el efecto inhibidor del crecimiento de S-oligonucleótidos antisentido diseñados para suprimir *CXADRL1* en células MKN-1. Se demostraron que *CXADRL1*-AS4 y *CXADRL1*-AS5 suprimían el crecimiento de las células MKN-1.

Las figuras 5A a 5C representan el efecto supresor del crecimiento del ARNip de *CXADRL1* sobre las células St-4. La figura 5A presenta fotografías que representan la expresión de *CXADRL1* y *GAPDH* (control) en células St-4 transfectadas de manera simulada o con ARNip de *CXADRL1* n.º 7. La figura 5B representa fotografías que representan el resultado de la tinción de Giemsa de células viables tratadas con ARNip del control o ARNip de *CXADRL1* n.º 7. La figura 5C representa el resultado del ensayo de MTT en células transfectadas con el plásmido control o plásmidos que expresaban ARNip de *CXADRL1*7.

La figura 6 representa una fotografía que demuestra el resultado de análisis de inmunotransferencia de células que expresan proteína CXADRL1 marcada con Flag exógena con antisueros anti-CXADRL1 o anticuerpo anti-Flag.

La figura 7 representa la interacción entre CXADRL1 y AIP1 examinada mediante un sistema de dos híbridos de levadura. La figura 7 es una fotografía que representa la interacción de CXADRL1 con AIP1 examinada mediante el sistema de dos híbridos.

La figura 8 representa la citotoxicidad específica de péptido de la línea de CTL generada mediante estimulación con CXADRL1-207. La línea de CTL mostraba una alta actividad citotóxica sobre células diana (T2) tratadas con pulsos de CXADRL1-207, mientras que no se detectó actividad citotóxica significativa sobre las mismas células diana (T2) tratadas con pulsos sin péptidos.

La figura 9 representa la actividad citotóxica de clon de CTL frente a CXADRL1-207 sobre SNU475, MKN74 y SNU-C4. El clon de CTL frente a CXADRL1-207 mostró alta actividad citotóxica sobre SNU475 que expresa tanto CXADRL1 como HLA-A*0201. Por otro lado, el clon de CTL frente a CXADRL1-207 no mostró actividad citotóxica significativa sobre MKN74, que expresa CXADRL1 pero no HLA-A*0201. Además, este clon de CTL no mostró actividad citotóxica significativa sobre SNU-C4, que expresa HLA-A*0201 pero no CXADRL1.

La figura 10 representa el resultado del ensayo de inhibición de diana fría. El clon de CTL frente a CXADRL1-207 reconoce específicamente CXADRL1-207 de una manera limitada a HLA-A*0201. Se preparó SNU475 marcado con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ como diana caliente, mientras que se usó T2 pulsado con péptido de CXADRL1-207 (péptido +) como diana fría (Inhibidores). Se fijó la razón de E/T a 20. Se inhibió la actividad citotóxica sobre SNU475 mediante la adición de T2 pulsado con el péptido idéntico, mientras que casi nada de inhibición mediante la adición de T2 sin pulsos con péptido.

La figura 11 representa el resultado del ensayo de bloqueo que muestra el efecto de los anticuerpos generados frente a HLA clase I, HLA clase II, CD4, y CD8 sobre la actividad citotóxica del clon de CTL frente a CXADRL1-207. El clon de CTL frente a CXADRL1-207 mostró actividad citotóxica de manera limitada a HLA clase I y CD8. Para examinar las características del clon de CTL generado con el péptido de CXADRL1, se sometieron a prueba anticuerpos frente a HLA clase I, HLA clase II, CD4, y CD8 para determinar su capacidad para inhibir la actividad citotóxica. El eje horizontal revela el % de inhibición de la citotoxicidad. La citotoxicidad del clon de CTL en dianas de SNU475 se redujo significativamente cuando se usaron anticuerpos anti clase I y CD8. Este resultado indica que el clon de CTL reconoce el péptido derivado de CXADRL1 de una manera dependiente de HLA clase I y CD8.

La figura 12 es una fotografía que representa el resultado del análisis de transferencia de tipo Northern de *GCUD1* en diversos tejidos humanos. El transcrito de *GCUD1* tiene un tamaño de aproximadamente 3,5 kb.

La figura 13 muestra una fotografía que representa la ubicación subcelular de GCUD1 observada mediante inmunohistoquímica de células transfectadas con pcDNA3.1myc/His-GCUD1. La proteína GCUD1 marcada con cMyc expresada a partir del plásmido se ubicaba en el citoplasma.

La figura 14 es una fotografía que muestra el efecto promotor del crecimiento de GCUD1 sobre células NIH3T3 examinadas mediante ensayos de formación de colonias.

La figura 15 representa el efecto inhibidor del crecimiento de S-oligonucleótidos antisentido diseñados para suprimir *GCUD1* en células MKN-28. Se reveló que GCUD1-AS5 y GCUD1-AS8 suprimían el crecimiento de las células MKN-28.

La figura 16 representa una fotografía que muestra la purificación de la proteína GCUD1 recombinante.

La figura 17 representa una fotografía que demuestra el resultado del análisis de inmunotransferencia de células que expresan proteína GCUD1 marcada con Flag exógena con antisueros anti-GCUD1 o anticuerpo anti-Flag.

Las figuras 18A y 18B representan la citotoxicidad específica de péptido de línea de CTL generada mediante estimulación con GCUD1-196 (A) o GCUD1-272 (B). La línea de CTL mostró alta actividad citotóxica sobre células diana (T2) tratadas con pulsos de GCUD1-196 o GCUD1-272, mientras que no se detectó actividad citotóxica significativa sobre las mismas células diana (T2) tratadas con pulsos sin péptidos.

La figura 19 representa la actividad citotóxica de clon de CTL frente a GCUD1-196 sobre SNU475 y MKN45. El clon de CTL frente a GCUD1-196 mostró alta actividad citotóxica sobre SNU475 que expresa tanto GCUD1 como HLA-A*0201. Por otro lado, clon de CTL frente a GCUD1-196 no mostró actividad citotóxica significativa sobre MKN45, que expresa GCUD1 pero no HLA-A*0201.

La figura 20 representa el resultado del ensayo de inhibición de diana fría. El clon de CTL frente a GCUD1-196 reconoce específicamente GCUD1-196 de una manera limitada a HLA-A*0201. Se preparó SNU475 marcado con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ como diana caliente, mientras que se usó T2 tratado con pulsos de GCUD1-196 (péptido +) como diana fría (inhibidores). Se fijó la razón E/T a 20. Se inhibió la actividad citotóxica sobre SNU475 mediante la adición de T2

tratado con pulsos con el péptido idéntico, mientras que casi sin inhibición mediante la adición de T2 sin pulsos de péptido.

La figura 21 representa el resultado del ensayo de bloqueo que muestra el efecto de anticuerpos generados frente a HLA clase I, HLA clase II, CD4, y CD8 sobre la actividad citotóxica del clon de CTL frente a GCUD1-196. El clon de CTL frente a GCUD1-196 mostró actividad citotóxica de manera limitada a HLA clase I y CD8. Para examinar las características del clon de CTL generado con péptido de GCUD1, se sometieron a prueba anticuerpos frente a HLA clase I, HLA clase II, CD4, y CD8 para determinar su capacidad para inhibir la actividad citotóxica. El eje horizontal revela el % de inhibición de la citotoxicidad. La citotoxicidad del clon de CTL en dianas de SNU475 se redujo significativamente cuando se usaron anticuerpos anti clase I y CD8. Este resultado indica que el clon de CTL reconoce el péptido derivado de GCUD1 de una manera dependiente de HLA clase I y CD8.

Las figuras 22a y 22b representan la expresión de *FLJ20315* en cáncer de colon. La figura 22a representa las razones de expresión relativa (cáncer/sin cáncer) de *FLJ20315* en 11 casos de cáncer de colon primario examinados mediante micromatriz de ADNc. Su expresión estaba regulada por incremento (razón de intensidad de Cy3: Cy5, >2,0) en 10 de los 11 casos de cáncer de colon que pasaron el filtro de límite de corte (señales tanto de Cy3 como de Cy5 superiores a 25.000). La figura 22b representa la expresión de *FLJ20315* analizada mediante RT-PCR semicuantitativa usando 18 casos de cáncer de colon adicionales (T, tejido tumoral; N, tejido normal). La expresión de *GAPDH* sirvió como control interno.

La figura 23a representa una fotografía que muestra el resultado del análisis de transferencia de tipo Northern de tejido fetal de *RNF43* en diversos tejidos fetales humanos. La figura 23b representa la estructura de proteína predicha de RNF43.

Las figuras 24a y 24b muestran fotografías que representan la ubicación subcelular de la proteína RNF43 marcada con myc. La figura 24a es una fotografía que representa el resultado de análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la proteína RNF43 marcada con myc usando extractos de células COS7 transfectadas o bien con pcDNA3.1-myc/His-RNF43 o bien con plásmidos control (control). La figura 24b presenta fotografías de las células transfectadas que se tiñeron con anticuerpo de ratón anti-myc y se visualizaron mediante anticuerpo secundario conjugado con FITC. Los núcleos se sometieron a contratinción con DAPI.

Las figuras 25a a 25c representan el efecto de *RNF43* sobre el crecimiento celular. La figura 25a es una fotografía que representa el resultado del ensayo de formación de colonias de *RNF43* en células NIH3T3. La figura 25b presenta fotografías que representan la expresión de RNF43 en células control (COS7-pcDNA) y COS7-RNF43 que se estableció mediante la transfección de células COS7 con pcDNA-RNF43. La figura 25c representa el resultado de la comparación en el crecimiento celular entre células COS7-RNF43 que expresan de manera estable *RNF43* exógeno y células control.

Las figuras 26a y 26b representan el efecto inhibidor del crecimiento de S-oligonucleótidos antisentido diseñados para suprimir *RNF43*. La figura 26a presenta fotografías que representan la expresión de RNF43 en células LoVo tratadas durante 12 h o bien con control (RNF43-S1) o bien con S-oligonucleótidos antisentido (RNF43-AS1) analizada mediante RT-PCR semicuantitativa. La figura 26b representa la viabilidad celular de células LoVo tras el tratamiento con el control o S-oligonucleótidos antisentido medida mediante ensayo de MTT. El ensayo de MTT se llevó a cabo por triplicado.

Las figuras 27A a 27C representan el efecto supresor del crecimiento de los ARNip de RNF43. La figura 27A presenta fotografías que representan el efecto de los de ARNip de RNF43 sobre la expresión de RNF43. La figura 27B presenta fotografías que representan el resultado de tinción de Giemsa de células viables tras el tratamiento con ARNip del control o ARNip de RNF43. La figura 27C representa el resultado del ensayo de MTT en células transfectadas con el plásmido control o plásmidos que expresan ARNip de RNF43. *, una diferencia significativa ($p < 0,05$) tal como se determina mediante una prueba de diferencias mínimas significativas protegida de Fisher.

Las figuras 28A y 28B representan la expresión de la proteína RNF43 marcada. La figura 28A es una fotografía que representa el resultado del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la proteína RNF43 marcada con Flag secretada en los medios de cultivo de células COS7 transfectadas con pFLAG-5CMV-RNF43 (carril 2) o vector control (carril 1). La figura 28B es una fotografía que representa el resultado del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la proteína RNF43 marcada con Myc en los medios de cultivo de células COS7 transfectadas con pcDNA3.1-Myc/His-RNF43 (carril 2) o vector control (carril 1).

Las figuras 29A y 29B representan el efecto promotor del crecimiento de medios acondicionados que contienen la proteína RNF43 marcada con Myc o marcada con Flag. La figura 29A presenta fotografías que representan la morfología de células NIH3T3 cultivadas en medios control (1) o en medios acondicionados de células COS7 transfectadas con vector control (2), pcDNA3.1-Myc/His-RNF43 (3), o pFLAG-5CMV-RNF43 (4). La figura 29B representa el número de células NIH3T3 cultivadas en los medios indicados descritos en la figura 29A. Los datos se muestran como medios de experimentos por triplicado para cada grupo; barras, \pm DE. *, diferencia significativa cuando se compara con el control, ($p < 0,05$).

Las figuras 30A a 30C representan la preparación de proteína recombinante N-terminal (N1) y C-terminal (C1) de RNF43. La figura 30A representa la estructura esquemática de la proteína recombinante RNF43-N12 y -C1. La figura 30B es una fotografía que representa la expresión de la proteína RNF43-N1 marcada con NusTM en *E. coli* con (carril 2) o sin (carril 1) 0,2 mM de IPTG. La figura 30C es una fotografía que representa la expresión de la proteína RNF43-N1 marcada con NusTM en *E. coli* con (carril 2) o sin (carril 1) 1 mM de IPTG.

La figura 31A y 31B representan la interacción entre RNF43 y NOTCH2 examinada mediante un sistema de dos híbridos de levadura. La figura 31A representa la estructura predicha y la región de interacción de NOTCH2. (a) muestra la estructura de longitud completa predicha de la proteína NOTCH2, y (b) muestra la región responsable predicha de la interacción (ECD, dominio extracelular; TM, dominio transmembrana; ICD, dominio intracelular). La figura 31B es una fotografía que representa la interacción de RNF43 con NOTCH2 examinada mediante el sistema de dos híbridos.

Las figuras 32A y 32B representan la interacción entre RNF43 y STRIN examinada mediante el sistema de dos híbridos de levadura. La figura 32A representa la estructura predicha y la región de interacción de STRIN. (a) muestra la estructura de longitud completa predicha de la proteína STRIN, y (b) muestra la región responsable predicha de la interacción (RING, dominio RING). La figura 32B es una fotografía que representa la interacción de RNF43 con STRIN examinada mediante el sistema de dos híbridos.

La figura 33 representa la citotoxicidad específica de péptido de la línea de CTL generada mediante estimulación con ARN43-721. La línea de CTL mostró alta actividad citotóxica sobre células diana (TISI) sometidas a pulsos con RNF43-721 (línea cuadrada), mientras que no se detectó actividad citotóxica significativa sobre las mismas células diana (TISI) sometidas a pulsos sin péptidos (línea triangular). Se demostró que la línea de CTL tenía una citotoxicidad específica de péptido.

La figura 34 representa la citotoxicidad específica de péptido de clones de CTL generados mediante estimulación con RNF43-721. Se sometió a prueba la actividad citotóxica de 13 clones de CTL frente a RNF43-721 sobre dianas sometidas a pulsos (TISI) tal como se describe en los materiales y métodos. Los clones de CTL frente a RNF43-721 establecidos tenían una actividad citotóxica muy potente sobre células diana (TISI) sometidas a pulsos con los péptidos sin mostrar ninguna actividad citotóxica significativa sobre las mismas células diana (TISI) que no se habían sometido a pulsos con ningún péptido.

La figura 35 representa la actividad citotóxica del clon 45 de CTL frente a RNF43-721 sobre HT29, WiDR y HCT116. El clon de CTL frente a RNF43-721 reconoce y lisa células tumorales que expresan de manera endógena RNF43 de un modo limitado a HLA. Todos de HT29, WiDR y HCT116 expresan de manera endógena RNF43, y el clon 45 de CTL frente a RNF43-721 sirvió como célula efectora. TISI se usó como diana que no expresa RNF43. El clon 45 de CTL frente a RNF43-721 mostró alta actividad citotóxica sobre HT29 (línea triangular en negro) y WiDR (línea de rombo) que expresan tanto RNF43 como HLA-A24. Por otro lado, el clon 45 de CTL frente a RNF43-721 no mostró actividad citotóxica significativa sobre HCT116 (línea triangular en blanco), que expresa RNF43 pero no HLA-A24, y TISI (línea cuadrada en blanco), que expresa HLA-A24 pero no RNF43. Además, el clon 45 de CTL frente a RNF43-721 no mostró actividad citotóxica sobre TISI sometidas a pulsos con péptido irrelevante (línea discontinua cuadrada en negro) y SNU-C4 (línea circular en negro) que expresa RNF43 pero poco HLA-A24.

La figura 36 representa el resultado del ensayo de inhibición de diana fría. El clon de CTL frente a RNF43-721 reconoce específicamente RNF43-721 de una manera limitada a HLA-A24. Se preparó HT29 marcado con Na₂⁵¹CrO₄ como diana caliente, mientras que TISI sometido a pulsos de RNF43-721 (péptido +) se usó como diana fría (inhibidores). Se fijó la razón E/T a 20. Se inhibió la actividad citotóxica sobre HT29 mediante la adición de TISI sometido a pulsos con el péptido idéntico (línea cuadrada en negro), mientras que casi no se produjo inhibición mediante la adición de TISI sin pulsos con péptido (línea cuadrada en blanco).

La figura 37 representa el resultado del ensayo de bloqueo que muestra el efecto de anticuerpos generados frente a HLA clase I, HLA clase II, CD3, CD4 y CD8 sobre la actividad citotóxica del clon de CTL frente a RNF43-721. El clon de CTL frente a RNF43-721 mostraba actividad citotóxica de manera limitada a HLA clase I, CD3 y CD8. Para examinar las características del clon de CTL generado con el péptido de RNF43, se sometieron a prueba anticuerpos frente a HLA clase I, HLA clase II, CD3, CD4 y CD8 para determinar su capacidad para inhibir la actividad citotóxica. El eje horizontal revela el % de inhibición de la citotoxicidad. La citotoxicidad del clon de CTL en dianas de WiDR se redujo significativamente cuando se usaron anticuerpos anti clase I, CD3 y CD8. Este resultado indica que el clon de CTL reconoce el péptido derivado de RNF43 de una manera dependiente de HLA clase I, CD3 y CD8.

Las figuras 38A y 38B representan la citotoxicidad específica de péptido de las líneas de CTL generadas con RNF43-11-9 (A) o RNF43-11-10 (B). Estas líneas de CTL mostraban alta actividad citotóxica sobre células diana (T2) sometidas a pulsos con RNF43-11-9 o RNF43-11-10, mientras que no se observó actividad citotóxica significativa sobre las mismas células diana (T2) sometidas a pulsos sin péptidos.

Las figuras 39A y 39B representan la citotoxicidad específica de péptido de clones de CTL generados mediante estimulación con RNF43-11-9 (A) o RNF43-11-10 (B). Se sometió a prueba la actividad citotóxica de 4 clones de

CTL frente a RNF43-11-9 o 7 clones frente a RNF43-11-10 sobre dianas sometidas a pulsos con péptido (T2) tal como se describe en los materiales y métodos. Los clones de CTL frente a RNF43-11-9 y RNF43-11-10 establecidos tenían actividades citotóxicas muy potentes sobre células diana (T2) sometidas a pulsos con los péptidos sin mostrar ninguna actividad citotóxica significativa sobre las mismas células diana (T2) que no se sometieron a impulsos con ningún péptido.

Las figuras 40A y 40B representan la actividad citotóxica del clon 90 de CTL frente a RNF43-5 y del clon 25 de CTL frente a RNF43-17 sobre HT29 y DLD-1. El clon 90 de CTL frente a RNF43-5 y el clon 25 de CTL frente a RNF43-17 reconocen y lisan células tumorales que expresan de manera endógena RNF43 de un modo limitado a HLA. Todos los HT29 y DLD-1 expresan de manera endógena RNF43, y el clon 90 de CTL frente a RNF43-5 y el clon 25 de CTL frente a RNF43-17 sirvieron como célula efectora. T2 se usó como la diana que no expresa RNF43. El clon 90 de CTL frente a RNF43-5 y el clon 25 de CTL frente a RNF43-17 mostraron alta actividad citotóxica sobre DLD-1 que expresa tanto RNF43 como HLA-A*0201. Por otro lado, el clon 90 de CTL frente a RNF43-5 y el clon 25 de CTL frente a RNF43-17 no mostraron actividad citotóxica significativa sobre HT29, que expresa RNF43 pero no HLA-A*0201.

La figura 41 representa el resultado del ensayo de inhibición de diana fría. El clon de CTL frente a RNF43-11-9 CTL reconoce específicamente RNF43-11-9 de una manera limitada a HLA-A2. Se preparó CT116 marcado con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ como diana caliente, mientras que se usó T2 sometido a pulsos con RNF43-11-9 (péptido +) como diana fría (inhibidores). Se fijó la razón E/T a 20. Se inhibió la actividad citotóxica sobre HCT116 mediante la adición de T2 sometido a pulsos con el péptido idéntico, mientras que no se observó casi nada de inhibición mediante la adición de TISI sin pulsos de péptido.

Descripción detallada

Las palabras “un”, “una”, y “el”, “la” tal como se usa en el presente documento significan “al menos uno” a menos que se indique específicamente lo contrario.

La presente descripción identifica los genes humanos novedosos *CXADRL1* y *GCUD1* cuya expresión se encuentra notablemente elevada en el cáncer gástrico en comparación con tejidos no cancerosos correspondientes. El ADNc de *CXADRL1* ADNc consiste en 3423 nucleótidos que contienen un marco de lectura abierto de 1296 nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1. El marco de lectura abierto codifica para una proteína putativa de 431 aminoácidos. *CXADRL1* se asocia con AIP1. AIP1 (proteína 1 de interacción con atropina-1) es una proteína que se asocia con atropina-1, un gen responsable de una enfermedad hereditaria, la atrofia dentatorubral-palidoluisiana. AIP1 codifica para una proteína deducida de 1455 aminoácidos que contiene dominio similar a guanilato cinasa, dos dominios WW y cinco dominios PDZ. El homólogo de ratón de AIP1 se mostró interaccionar con activina tipo IIA. Sin embargo, la función de AIP1 sigue aún por resolver. La secuencia de aminoácidos predicha mostraba una identidad de aproximadamente el 37% con CXADR (receptor de coxsackie y adenovirus). Por tanto esta proteína se denominó *CXADRL1* (receptor de coxsackie y adenovirus de tipo 1). Por otro lado, el ADNc de *GCUD1* consiste en 4987 nucleótidos que contienen un marco de lectura abierto de 1245 nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 3. El marco de lectura abierto codifica para una proteína putativa de 414 aminoácidos. Puesto que la expresión de la proteína estaba regulada por incremento en el cáncer gástrico, la proteína se denominó *GCUD1* (regulada por incremento en cáncer gástrico).

Además, la presente descripción abarca un gen humano novedoso *RNF43* cuya expresión se encuentra notablemente elevada en el cáncer colorrectal en comparación con tejido no canceroso correspondiente. El ADNc de *RNF43* consiste en 5345 nucleótidos que contienen un marco de lectura abierto de 2352 nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 5. El marco de lectura abierto codifica para una proteína putativa de 783 aminoácidos. *RNF43* se asocia con NOTCH2 y STRIN. NOTCH2 se notifica como una proteína receptora transmembrana grande que es un componente de un mecanismo de señalización intracelular conservado evolutivamente. NOTCH2 es un miembro de proteína de la ruta de señalización de Notch y se notifica que está implicada en la glomerulogénesis en el riñón y el desarrollo de vasculatura en el corazón y los ojos. Además, tres proteínas Delta/Serrate/Lag-2 (DSL), Delta1, Jaggaed1 y Jaggaed2, se notifican como ligandos funcionales para NOTCH2. STRIN codifica para una proteína putativa que comparte el 79% de identidad con Trif de ratón. La función de STRIN o Trif sigue aún por aclarar.

Consecuentemente, la expresión exógena de *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43* en células confirió un aumento en el crecimiento celular, mientras que la supresión de su expresión con S-oligonucleótidos antisentido o ARN de interferencia pequeño (ARNip) dio como resultado una inhibición del crecimiento significativa de células cancerosas. Estos hallazgos sugieren que *CXADRL1*, *GCUD1* y *RNF43* proporcionan actividades oncogénicas a las células cancerosas, y que la inhibición de la actividad de estas proteínas podría ser una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer.

La presente descripción abarca un gen humano novedoso *CXADRL1*, que incluye una secuencia de polinucleótido tal como se describe en SEQ ID NO: 1, así como degenerados y mutantes del mismo, hasta el punto de que codifican para una proteína *CXADRL1*, que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o su equivalente funcional. Los ejemplos de polipéptidos funcionalmente equivalentes a *CXADRL1* incluyen, por ejemplo, proteínas

homólogas de otros organismos correspondientes a la proteína CXADRL1 humana, así como mutantes de proteínas CXADRL1 humanas.

La presente descripción abarca también un gen humano novedoso *GCUD1*, que incluye una secuencia de polinucleótido tal como se describe en SEQ ID NO: 3, así como degenerados y mutantes del mismo, hasta el punto de que codifican para una proteína GCUD1, que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 o su equivalente funcional. Los ejemplos de polipéptidos funcionalmente equivalentes a GCUD1 incluyen, por ejemplo, proteínas homólogas de otros organismos correspondientes a la proteína GCUD1 humana, así como mutantes de proteínas GCUD1 humanas.

Además, la presente descripción abarca un gen humano novedoso *RNF43*, que incluye una secuencia de polinucleótido tal como se describe en SEQ ID NO: 5, así como degenerados y mutantes del mismo, hasta el punto de que codifican para una proteína RNF43, que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 o su equivalente funcional. Los ejemplos de polipéptidos funcionalmente equivalentes a RNF43 incluyen, por ejemplo, proteínas homólogas de otros organismos correspondientes a la proteína RNF43 humana, así como mutantes de proteínas RNF43 humanas.

En la presente descripción, la expresión “funcionalmente equivalente” significa que el polipéptido objeto tiene la actividad de promover la proliferación celular como la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 y de conferir actividad oncogénica a células cancerosas. Si el polipéptido objeto tiene una actividad de proliferación celular o no puede juzgarse introduciendo el ADN que codifica para el polipéptido objeto en una célula que expresa el polipéptido respectivo, y detectando la promoción de la proliferación de las células o el aumento en la actividad de formación de colonias. Tales células incluyen, por ejemplo, células NIH3T3 para CXADRL1 y GCUD1; y células NIH3T3, células SW480, y células COS7 para RNF43. Alternativamente, puede juzgarse si el polipéptido objeto es funcionalmente equivalente a CXADRL1 detectando su capacidad de unión a AIP1. Además, puede juzgarse si el polipéptido objeto es funcionalmente equivalente a RNF43 detectando su capacidad de unión a NOTCH2 o STRIN

Un experto en la técnica conoce bien métodos para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a una proteína dada e incluyen métodos conocidos para introducir mutaciones en la proteína. Por ejemplo, un experto en la técnica puede preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana introduciendo una mutación apropiada en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de estas proteínas mediante mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh *et al.*, Gene 152:271-5 (1995); Zoller y Smith, Methods Enzymol 100:468-500 (1983); Kramer *et al.*, Nucleic Acids Res. 12:9441-9456 (1984); Kramer y Fritz, Methods Enzymol 154: 350-67 (1987); Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82: 488,92 (1985); Kunkel, Methods Enzymol 85:2763-6 (1988)). Las mutaciones de aminoácidos pueden producirse también en la naturaleza. El polipéptido de la presente descripción incluye aquellas proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana en la que uno o más aminoácidos están mutados, siempre que los polipéptidos mutados resultantes sean funcionalmente equivalentes a la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana. El número de aminoácidos que van a mutarse en un mutante de este tipo es generalmente de 10 aminoácidos o menos, preferiblemente 6 aminoácidos o menos, y más preferiblemente 3 aminoácidos o menos.

Se ha sabido que proteínas mutadas o modificadas, proteínas que tienen secuencias de aminoácidos modificadas mediante sustitución, delección, inserción y/o adición de uno o más residuos de aminoácido de una cierta secuencia de aminoácidos, conservan la actividad biológica original (Mark *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 81: 5662-6 (1984); Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 10: 6487-500 (1982); Dalbadie-McFarland *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 79: 6409-13 (1982)).

El residuo de aminoácido que va a mutarse se muta preferiblemente en un aminoácido diferente en el que se conservan las propiedades de la cadena lateral de aminoácido (un proceso conocido como sustitución conservativa de aminoácidos). Ejemplos de propiedades de las cadenas laterales de aminoácido son aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene grupo aromático (H, F, Y, W). Obsérvese que las letras entre paréntesis indican los códigos de una letra de los aminoácidos.

Un ejemplo de un polipéptido en el que se añaden uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana es una proteína de fusión que contiene la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana. Las proteínas de fusión son fusiones de la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana y otros péptidos o proteínas, y se incluyen en la presente descripción. Pueden prepararse proteínas de fusión mediante técnicas bien conocidas por un experto en la técnica, tal como uniendo el ADN que codifica para la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana de la descripción con ADN que codifica para otros péptidos o proteínas, de modo que coincidan los marcos, insertando el ADN de fusión en un vector de expresión y expresándolo en un huésped. No existe ninguna limitación en cuanto a los péptidos o proteínas fusionados a la proteína de la presente descripción.

Los péptidos conocidos que pueden usarse como péptidos que se fusionan a la proteína de la presente descripción incluyen, por ejemplo, FLAG (Hopp *et al.*, Biotechnology 6: 1204-10 (1988)), 6xHis que contiene seis residuos de His (histidina), 10xHis, aglutinina (HA) de *Influenza*, fragmento de c-myc humano, fragmento de VSP-GP, fragmento p181HIV, etiqueta de T7, etiqueta de VHS, etiqueta de E, fragmento antigénico de SV40T, etiqueta de Ick, fragmento de α -tubulina, etiqueta de B, fragmento de proteína C y similares. Ejemplos de proteínas que pueden fusionarse a una proteína de la descripción incluyen GST (glutación-S-transferasa), aglutinina (HA) de *Influenza*, región constante de inmunoglobulina, β -galactosidasa, MBP (proteína de unión a maltosa) y similares.

Pueden prepararse proteínas de fusión mediante fusión de ADN comercialmente disponible, que codifica para los péptidos o proteínas de fusión comentados anteriormente, con el ADN que codifica para el polipéptido de la presente descripción y que expresa el ADN preparado.

Un método alternativo conocido en la técnica para aislar polipéptidos funcionalmente equivalentes es, por ejemplo, el método que usa una técnica de hibridación (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning 2ª ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989)). Un experto en la técnica puede aislar fácilmente un ADN que tiene alta homología con la totalidad o parte de la secuencia de ADN que codifica para la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana (es decir, SEQ ID NO:1, 3 ó 5), y aislar polipéptidos funcionalmente equivalentes a la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana a partir del ADN aislado. Los polipéptidos de la presente descripción incluyen aquéllos que se codifican por el ADN que se hibrida con la totalidad o parte de la secuencia de ADN que codifica para la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana y son funcionalmente equivalentes a la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana. Estos polipéptidos incluyen homólogos de mamífero correspondientes a la proteína derivada de ser humano (por ejemplo, un polipéptido codificado por un gen de mono, rata, conejo y bovino). Para aislar un ADNc altamente homólogo al ADN que codifica para la proteína CXADRL1 humana a partir de animales, es particularmente preferible usar tejidos de testículo o de ovario. Alternativamente, para aislar un ADNc altamente homólogo al ADN que codifica para la GCUD1 humana a partir de animales, es particularmente preferible usar tejidos de testículo, ovario o cerebro. Además, para aislar un ADNc altamente homólogo al ADN que codifica para la proteína RNF43 humana a partir de animales, es particularmente preferible usar tejido de pulmón fetal o riñón fetal.

Las condiciones de hibridación para aislar un ADN que codifica para un polipéptido funcionalmente equivalente a la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana pueden seleccionarse de manera rutinaria por un experto en la técnica. Por ejemplo, la hibridación puede realizarse llevando a cabo hibridación previa a 68°C durante 30 min. o más tiempo usando "tampón Rapid-hyb" (Amersham LIFE SCIENCE), añadiendo una sonda marcada, y calentando a 68°C durante 1 hora o más tiempo. La etapa de lavado siguiente puede llevarse a cabo, por ejemplo, en condiciones de baja rigurosidad. Condiciones de baja rigurosidad es, por ejemplo, 42°C, 2X SSC, SDS al 0,1%, o preferiblemente 50°C, 2X SSC, SDS al 0,1%. Más preferiblemente, se usan condiciones de alta rigurosidad. Condiciones de alta rigurosidad es, por ejemplo, lavar 3 veces en 2X SSC, SDS al 0.01% a temperatura ambiente durante 20 min., luego lavar 3 veces en 1x SSC, SDS al 0,1% a 37°C durante 20 min., y lavar dos veces en 1x SSC, SDS al 0,1% a 50°C durante 20 min. Sin embargo, varios factores, tales como la temperatura y la concentración de sal, pueden influir en la rigurosidad de la hibridación y un experto en la técnica puede seleccionar de manera adecuada los factores para lograr la rigurosidad requerida.

En lugar de hibridación, un método de amplificación génica, por ejemplo, el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), puede utilizarse para aislar un ADN que codifica para un polipéptido funcionalmente equivalente a la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana, usando un cebador sintetizado basándose en la información de secuencia del ADN que codifica para la proteína (SEQ ID NO: 1, 3 ó 5).

Polipéptidos que son funcionalmente equivalentes a la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana codificada por el ADN aislado a través de las técnicas de hibridación anteriores o técnicas de amplificación génica, normalmente tienen una alta homología con la secuencia de aminoácidos de la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana. "Alta homología" se refiere normalmente a una homología del 40% o superior, preferiblemente del 60% o superior, más preferiblemente del 80% o superior, incluso más preferiblemente del 95% o superior. La homología de un polipéptido puede determinarse mediante el siguiente algoritmo en "Wilbur y Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80: 726-30. (1983)".

Un polipéptido de la presente descripción puede tener variaciones en la secuencia de aminoácidos, el peso molecular, punto isoelectrico, la presencia o ausencia de cadenas de azúcar, o la forma, dependiendo de la célula o el huésped usados para producirlo o el método de purificación utilizado. No obstante, siempre que tenga una función equivalente a la de la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana de la presente descripción, está dentro del alcance de la presente descripción.

Los polipéptidos de la presente descripción pueden prepararse como proteínas recombinantes o proteínas naturales, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Puede prepararse una proteína recombinante insertando un ADN, que codifica para el polipéptido de la presente descripción, (por ejemplo, el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3 ó 5), en un vector de expresión apropiado, introduciendo el vector en una célula huésped apropiada, obteniendo el extracto, y purificando el polipéptido sometiendo el extracto a cromatografía, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase inversa, filtración en gel, o

cromatografía de afinidad utilizando una columna a la que se fijan anticuerpos frente a la proteína de la presente descripción, o combinando más de una de las columnas mencionadas anteriormente.

Además, cuando se expresa el polipéptido de la presente descripción dentro de células huésped (por ejemplo, células animales y *E. coli*) como una proteína de fusión con proteína glutatión-S-transferasa o como una proteína recombinante complementada con múltiples histidinas, la proteína recombinante expresada puede purificarse usando una columna de glutatión o columna de níquel. Alternativamente, cuando el polipéptido de la presente descripción se expresa como una proteína marcada con c-myc, múltiples histidinas, o FLAG, puede detectarse y purificarse usando anticuerpos, frente a c-myc, His, o FLAG, respectivamente.

Tras purificar la proteína de fusión, es posible también excluir regiones distintas del polipéptido objetivo cortando con trombina o factor-Xa según se requiera.

Puede aislarse una proteína natural mediante métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, poniendo en contacto la columna de afinidad, en la que están unidos anticuerpos que se unen a la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 descrita a continuación, con el extracto de tejidos o células que expresan el polipéptido de la presente descripción. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales.

La presente descripción abarca también péptidos parciales del polipéptido de la presente descripción. El péptido parcial tiene una secuencia de aminoácidos específica para el polipéptido de la presente descripción, y consiste en al menos 7 aminoácidos, preferiblemente 8 aminoácidos o más, y más preferiblemente 9 aminoácidos o más. El péptido parcial puede usarse, por ejemplo, para preparar anticuerpos frente al polipéptido de la presente descripción, seleccionar un compuesto que se une al polipéptido de la presente descripción, y seleccionar aceleradores o inhibidores del polipéptido de la presente descripción.

Un péptido parcial de la descripción puede producirse mediante ingeniería genética, mediante métodos conocidos de síntesis peptídica, o mediante digestión del polipéptido de la descripción con una peptidasa apropiada. Para la síntesis peptídica, por ejemplo, pueden usarse síntesis en fase sólida o síntesis en fase líquida.

Además, la presente descripción proporciona polinucleótidos que codifican para el polipéptido de la presente descripción. Los polinucleótidos de la presente descripción pueden usarse para la producción *in vivo* o *in vitro* producción del polipéptido de la presente descripción tal como se describió anteriormente, o pueden aplicarse en terapia génica para enfermedades atribuidas a una anomalía genética en el gen que codifica para la proteína de la presente descripción. Cualquier forma del polinucleótido de la presente descripción puede usarse siempre que codifique para el polipéptido de la presente descripción, incluyendo ARNm, ARN, ADNc, ADN genómico, polinucleótidos sintetizados químicamente. Los polinucleótidos de la presente descripción incluyen un ADN que comprende secuencias de nucleótidos dadas así como sus secuencias degeneradas, siempre que el ADN resultante codifique para un polipéptido de la presente descripción.

El polinucleótido de la presente descripción puede prepararse mediante métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, el polinucleótido de la presente descripción puede prepararse mediante: preparación de una biblioteca de ADNc a partir de células que expresan el polipéptido de la presente descripción, y realizando la hibridación usando una secuencia parcial del ADN de la presente descripción (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 3 ó 5) como sonda. Una biblioteca de ADNc puede prepararse, por ejemplo, mediante el método descrito en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); alternativamente, pueden usarse bibliotecas de ADNc comercialmente disponibles. Una biblioteca de ADNc puede prepararse también mediante: extracción de los ARN de células que expresan el polipéptido de la presente descripción, síntesis de los oligo-ADN basándose en la secuencia del ADN de la presente descripción (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 3 ó 5), realización de PCR usando los oligo-ADN como cebadores, y amplificación de los ADNc que codifican para la proteína de la presente descripción.

Además, secuenciando los nucleótidos del ADNc obtenido, puede determinarse de manera rutinaria la región de traducción codificada por el ADNc, y puede obtenerse fácilmente la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la presente descripción. Además, examinando la biblioteca de ADN genómico usando el ADNc obtenido o partes del mismo como sonda, puede aislarse el ADN genómico.

Más específicamente, los ARNm pueden prepararse en primer lugar a partir de una célula, tejido u órgano (por ejemplo, testículo u ovario para CXADRL1; testículo, ovario, o cerebro para GCUD1; y pulmón fetal, o riñón fetal para RNF43) en los que se expresa el polipéptido objeto de la descripción. Pueden usarse métodos conocidos para aislar los ARNm; por ejemplo, puede prepararse el ARN total mediante ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin *et al.*, Biochemistry 18:5294-9 (1979)) o método AGPC (Chomczynski y Sacchi, Anal Biochem 162:156-9 (1987)). Además, puede purificarse el ARNm a partir del ARN total usando el kit de purificación de ARNm (Pharmacia) y similares, o, alternativamente, puede purificarse el ARNm directamente mediante el kit de preparación de ARNm QuickPrep (Pharmacia).

El ARNm obtenido se usa para sintetizar ADNc usando transcriptasa inversa. Puede sintetizarse ADNc usando un kit comercialmente disponible, tal como el kit de síntesis de ADNc de cadena directa con transcriptasa inversa de VMA (Seikagaku Kogyo). Alternativamente, puede sintetizarse ADNc y amplificarse siguiente el método 5'-RACE (Frohman *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 85: 8998-9002 (1988); Belyavsky *et al.*, Nucleic Acids Res 17: 2919-32

(1989)), se usa un cebador y similar, descrito en el presente documento, el kit 5'-Ampli FINDER RACE (Clontech), y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se prepara un fragmento de ADN deseado a partir de los productos de PCR y se ligan con un ADN vector. Los vectores recombinantes se usan para transformar *E. coli* y similares, y se prepara un vector recombinante deseado a partir de una colonia seleccionada. La secuencia de nucleótidos del ADN deseado puede verificarse mediante métodos convencionales, tales como terminación de cadena de didesoxinucleótido.

La secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de la descripción puede diseñarse para expresarse más eficazmente teniendo en cuenta la frecuencia de utilización de codón en el huésped que va a usarse para la expresión (Grantham *et al.*, Nucleic Acids Res 9: 43-74 (1981)). La secuencia del polinucleótido de la presente descripción puede alterarse mediante un kit comercialmente disponible o un método convencional. Por ejemplo, la secuencia puede alterarse mediante digestión con enzimas de restricción, inserción de un oligonucleótido sintético o un fragmento de polinucleótido apropiado, adición de un ligador, o inserción del codón de iniciación (ATG) y/o el codón de terminación (TAA, TGA o TAG).

Específicamente, el polinucleótido de la presente descripción abarca el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3 ó 5.

Además, la presente descripción proporciona un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3 ó 5, y codifica para un polipéptido funcionalmente equivalente a la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 de la descripción descrita anteriormente. Un experto en la técnica puede elegir de manera apropiada condiciones rigurosas. Por ejemplo, pueden usarse condiciones de baja rigurosidad. Más preferiblemente, pueden usarse condiciones de alta rigurosidad. Estas condiciones son las mismas que las descritas anteriormente. El ADN de hibridación anterior es preferiblemente un ADNc o un ADN cromosómico.

La presente descripción proporciona también un vector en el que se inserta un polinucleótido de la presente descripción. Un vector de la presente descripción es útil para mantener un polinucleótido, especialmente un ADN, de la presente descripción en la célula huésped, para expresar el polipéptido de la presente descripción, o para administrar el polinucleótido de la presente descripción para terapia génica.

Cuando *E. coli* es una célula huésped y el vector se amplifica y produce en una gran cantidad en *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5a, HB101 o XL1Blue), el vector debe tener un "ori" que va a amplificarse en *E. coli* y un gen marcador para seleccionar una *E. coli* transformada (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos seleccionado mediante un fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol o similares). Por ejemplo, pueden usarse vectores de la serie M13, vectores de la serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc. Además, también pueden usarse pGEM-T, pDIRECT y pT7 para subclonar y extraer ADNc así como los vectores descritos anteriormente. Cuando se usa un vector para producir la proteína de la presente descripción, un vector de expresión es especialmente útil. Por ejemplo, un vector de expresión que va a expresarse en *E. coli* debe tener las características anteriores para amplificarse en *E. coli*. Cuando se usa *E. coli*, tal como JM109, DH5a, HB101 o XL1 Blue, como célula huésped, el vector debe tener un promotor, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward *et al.*, Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), el promotor araB (Better *et al.*, Science 240: 1041-3 (1988)), o el promotor de T7 o similares, que pueden expresar eficazmente el gen deseado en *E. coli*. A ese respecto, pueden usarse pGEX-5X-1 (Pharmacia), "sistema QIAexpress" (Qiagen), pEGFP y pET (en este caso, el huésped es preferiblemente BL21 que expresa ARN polimerasa de T7), por ejemplo, en lugar de los vectores anteriores. Adicionalmente, el vector puede contener también una secuencia señal para la secreción del polipéptido. Una secuencia señal a modo de ejemplo que dirige el polipéptido que va a secretarse al periplasma de *E. coli* es la secuencia señal de pelB (Lei *et al.*, J Bacteriol 169: 4379 (1987)). Los medios para introducir los vectores en las células diana huésped incluyen, por ejemplo, el método de cloruro de calcio y el método de electroporación.

Además de *E. coli*, por ejemplo, pueden usarse vectores de expresión derivados de mamíferos (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen) y pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insecto (por ejemplo, "sistema de expresión de baculovirus Bac-to-BAC" (GIBCO BRL), pBacPAK8), vectores de expresión derivados de plantas (por ejemplo, pMH1, pMH2), vectores de expresión derivados de virus animales (por ejemplo, pHSV, pMV, pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (por ejemplo, pZlpneo), vector de expresión derivado de levadura (por ejemplo, "kit de expresión de *Pichia*" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01), y vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608, pKTH50) para producir el polipéptido de la presente descripción.

Con el fin de expresar el vector en células animales, tales como células CHO, COS o NIH3T3, el vector debe tener un promotor necesario para la expresión en tales células, por ejemplo, el promotor de SV40 (Mulligan *et al.*, Nature 277: 108 (1979)), el promotor de MMLV-LTR, el promotor de EF1a (Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990)), el promotor de CMV y similares, y preferiblemente un gen marcador para seleccionar transformantes (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos seleccionado mediante un fármaco (por ejemplo, neomicina, G418)). Los ejemplos de vectores conocidos con estas características incluyen, por ejemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

Además, pueden usarse métodos para expresar un gen de manera estable y, al mismo tiempo, para amplificar el número de copias del gen en las células. Por ejemplo, puede introducirse un vector que comprende el gen de DHFR complementario (por ejemplo, pCHO1) en células CHO en las que está delecionada la ruta de síntesis de ácido nucleico, y luego amplificarse mediante metotrexato (MTX). Además, en el caso de la expresión transitoria de un gen, puede usarse el método en el que un vector que comprende un origen de replicación de SV40 (pcD, etc.) se transforma en células COS que comprenden el gen que expresa el antígeno T de SV40 en el cromosoma.

Un polipéptido de la presente descripción obtenido tal como anteriormente puede aislarse del interior o el exterior (tal como el medio) de las células huésped, y purificarse como un polipéptido homogéneo sustancialmente puro. La expresión "sustancialmente puro" tal como se usa en el presente documento en referencia a un polipéptido dado significa que el polipéptido está sustancialmente libre de otras macromoléculas biológicas. El polipéptido sustancialmente puro es al menos el 75% (por ejemplo, al menos el 80, 85, 95 o el 99%) puro en peso seco. La pureza puede medirse mediante cualquier método convencional apropiado, por ejemplo mediante cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliácridamida o análisis de HPLC. El método para el aislamiento y purificación de polipéptidos no se limita a ningún método específico; de hecho, puede usarse cualquier método convencional.

Por ejemplo, cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, precipitación con sal, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliácridamida, electroforesis de punto isoelectrónico, diálisis y recristalización pueden seleccionarse de manera apropiada y combinarse para aislar y purificar el polipéptido.

Los ejemplos de cromatografía incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Estas cromatografías pueden realizarse mediante cromatografía líquida, tal como HPLC y FPLC. Por tanto, la presente descripción proporciona polipéptidos altamente purificados preparados mediante los métodos anteriores.

Un polipéptido de la presente descripción puede modificarse opcionalmente o delecionarse parcialmente tratándolo con una enzima de modificación de proteínas apropiada antes o después de la purificación. Las enzimas de modificación de proteínas útiles incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimiotripsina, lisil-endopeptidasa, proteína cinasa, glucosidasa, etc.

La presente descripción proporciona un anticuerpo que se une al polipéptido de la descripción. El anticuerpo de la descripción puede usarse en cualquier forma, tal como anticuerpos monoclonales o policlonales, e incluye antisuero obtenido inmunizando un animal tal como un conejo con el polipéptido de la descripción, todas las clases de anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados producidos mediante recombinación genética.

Un polipéptido de la descripción usado como antígeno para obtener un anticuerpo puede derivarse de cualquier especie animal, pero preferiblemente se deriva de un mamífero tal como un ser humano, ratón o rata, más preferiblemente de un ser humano. Puede obtenerse un polipéptido derivado de ser humano a partir de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos dadas a conocer en el presente documento.

Según la presente descripción, el polipéptido que va a usarse como antígeno de inmunización puede ser una proteína completa o un péptido parcial de la proteína. Un péptido parcial puede comprender, por ejemplo, el fragmento amino (N)-terminal o carboxilo (C)-terminal de un polipéptido de la presente descripción. Más específicamente, puede usarse un polipéptido de CXADRL1 que abarca los codones desde 235 hasta 276, desde 493 hasta 537 o desde 70 hasta 111 como péptidos parciales para producir anticuerpos frente a CXADRL1 de la presente descripción.

Alternativamente, para la producción de anticuerpos frente al polipéptido de la presente descripción, pueden usarse péptidos que comprenden una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos.

- RNF43 ; SEQ ID No: 80, 97 ó 108
- CXADRL1; SEQ ID No: 124
- GCUD1; SEQ ID No: 164

En el presente documento, un anticuerpo se define como una proteína que reacciona o bien con la longitud completa o bien con un fragmento de un polipéptido de la presente descripción.

Un gen que codifica para un polipéptido de la descripción o su fragmento puede insertarse en un vector de expresión conocido, que entonces se usa para transformar una célula huésped tal como se describe en el presente documento. El polipéptido deseado o su fragmento pueden recuperarse del exterior o el interior de las células huésped mediante cualquier método convencional, y puede usarse posteriormente como antígeno. Alternativamente,

pueden usarse como antígeno células completas que expresan el polipéptido o sus lisados, o un polipéptido sintetizado químicamente.

5 Puede inmunizarse cualquier mamífero con el antígeno, pero preferiblemente se tiene en cuenta la compatibilidad con las células progenitoras usadas para la fusión celular. En general, se usan animales de Rodentia, Lagomorpha, o Primates. Los animales de Rodentia incluyen, por ejemplo, ratón, rata y hámster. Los animales de Lagomorpha incluyen, por ejemplo, conejo. Los animales de Primates incluyen, por ejemplo, un mono catarrino (mono del viejo mundo) tal como *Macaca fascicularis*, mono rhesus, babuino sagrado y chimpancé.

10 En la técnica se conocen métodos para inmunizar animales con antígenos. La inyección intraperitoneal o inyección subcutánea de antígenos es un método convencional para la inmunización de mamíferos. Más específicamente, los antígenos pueden diluirse y suspenderse en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, etc. Si se desea, puede mezclarse la suspensión antigénica con una cantidad apropiada de un adyuvante convencional, tal como adyuvante completo de Freund, preparado en emulsión, y luego administrarse a animales mamíferos. Preferiblemente, esto va seguido de varias administraciones de antígeno mezclado con una cantidad de manera apropiada de adyuvante incompleto de Freund cada 4 a 21 días. También
15 puede usarse para la inmunización un portador apropiado. Tras la inmunización tal como anteriormente, se examina el suero mediante un método convencional para determinar un aumento en la cantidad de anticuerpos deseados.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales frente a los polipéptidos de la presente descripción extrayendo sangre del mamífero inmunizado examinado para determinar el aumento de anticuerpos deseados en el suero, y separando el suero de la sangre mediante cualquier método convencional. Los anticuerpos policlonales incluyen suero que
20 contiene los anticuerpos policlonales, así como la fracción que contiene los anticuerpos policlonales puede aislarse del suero. Puede prepararse inmunoglobulina G o M a partir de una fracción que reconoce sólo el polipéptido de la presente descripción usando, por ejemplo, una columna de afinidad acoplada con el polipéptido de la presente descripción, y purificando adicionalmente esta fracción usando una columna de proteína A o de proteína G.

25 Para preparar anticuerpos monoclonales, se extraen células inmunitarias del mamífero inmunizado con el antígeno y se comprueba el aumento del nivel de anticuerpos deseados en el suero tal como se describió anteriormente, y se someten a fusión celular. Las células inmunitarias usadas para la fusión celular se obtienen preferiblemente del bazo. Otras células progenitoras preferidas que van a fusionarse con el inmunocito anterior incluyen, por ejemplo, células de mieloma de mamíferos, y más preferiblemente células de mieloma que tienen una propiedad adquirida para la selección de células fusionadas mediante fármacos.

30 El inmunocito y las células de mieloma anteriores pueden fusionarse según métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein *et al.* (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

Pueden seleccionarse hibridomas resultantes obtenidos mediante la fusión celular cultivándolos en un medio de selección convencional, tal como medio HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo celular se continúa normalmente en el medio HAT durante varios días a varias semanas, siendo el tiempo suficiente
35 para permitir que todas las demás células, a excepción del hibridoma deseado (células no fusionadas), mueran. Entonces, se realiza la dilución limitante convencional para seleccionar y clonar una célula de hibridoma que produce el anticuerpo deseado.

Además del método anterior, en el que se inmuniza un animal no humano con un antígeno para preparar un hibridoma, pueden inmunizarse linfocitos humanos tales como los infectados por el virus EB con un polipéptido,
40 células que expresa polipéptidos, o sus lisados *in vitro*. Entonces, los linfocitos inmunizados se fusionan con células de mieloma derivadas de ser humano que pueden dividirse indefinidamente, tales como U266, para proporcionar un hibridoma que produce un anticuerpo humano deseado que puede unirse al polipéptido (solicitud de patente japonesa publicada no examinada n.º (JP-A) Sho 63-17688).

Los hibridomas obtenidos se trasplantan posteriormente en la cavidad abdominal de un ratón y se extraen las ascitis.
45 Los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden purificarse mediante, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, una columna de proteína A o de proteína G, cromatografía de intercambio iónico con DEAE, o una columna de afinidad a la que se acopla el polipéptido de la presente descripción. El anticuerpo de la presente descripción no sólo puede usarse para la purificación y detección del polipéptido de la presente descripción, sino también como candidato a agonistas y antagonistas del polipéptido de la presente descripción. Además, este anticuerpo puede
50 aplicarse al tratamiento con anticuerpos para enfermedades relacionadas con el polipéptido de la presente descripción. Cuando el anticuerpo obtenido va a administrarse al organismo humano (tratamiento con anticuerpos), es preferible un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para reducir la inmunogenicidad.

Por ejemplo, pueden inmunizarse animales transgénicos que tienen un repertorio de genes de anticuerpos humanos con un antígeno seleccionado de un polipéptido, células que expresan polipéptidos, o sus lisados. Entonces se
55 extraen de los animales células que producen anticuerpos y se fusionan con células de mieloma para obtener un hibridoma, a partir del cual pueden prepararse anticuerpos humanos frente al polipéptido (véanse los documentos WO92-03918, WO93-2227, WO94-02602, WO94-25585, WO96-33735 y WO96-34096).

Alternativamente, una célula inmunitaria, tal como un linfocito inmunizado, que produce anticuerpos, puede immortalizarse mediante un oncogén y usarse para preparar anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales así obtenidos pueden prepararse también de manera recombinante usando técnicas de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck y Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por ejemplo, puede clonarse un ADN que codifica para un anticuerpo a partir de una célula inmunitaria, tal como un hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, insertarse en un vector apropiado e introducirse en células huésped para preparar un anticuerpo recombinante. La presente descripción proporciona también anticuerpos recombinantes preparados tal como se describió anteriormente.

Además, un anticuerpo de la presente descripción puede ser un fragmento de un anticuerpo o anticuerpo modificado, siempre que se una a uno o más de los polipéptidos de la descripción. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo puede ser Fab, F(ab')₂, Fv, o Fv de cadena sencilla (scFv), en los que los fragmentos Fv de las cadenas H y L están ligados mediante un ligador apropiado (Huston *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-83 (1988)). Más específicamente, puede generarse un fragmento de anticuerpo tratando un anticuerpo con una enzima, tal como papaína o pepsina. Alternativamente, puede construirse un gen que codifica para el fragmento de anticuerpo, insertarse en un vector de expresión y expresarse en una célula huésped apropiada (véanse, por ejemplo, Co *et al.*, *J Immunol* 152: 2968-76 (1994); Better y Horwitz, *Methods Enzymol* 178: 476-96 (1989); Pluckthun y Skerra, *Methods Enzymol* 178: 497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121: 652-63 (1986); Rousseaux *et al.*, *Methods Enzymol* 121: 663-9 (1986); Bird y Walker, *Trends Biotechnol* 9: 132-7 (1991)).

Un anticuerpo puede modificarse mediante conjugación con una variedad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). La presente descripción proporciona anticuerpos modificados de este tipo. El anticuerpo modificado puede obtenerse modificando químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación son convencionales en el campo.

Alternativamente, un anticuerpo de la presente descripción puede obtenerse como un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de anticuerpo no humano y la región constante derivada de anticuerpo humano, o como un anticuerpo humanizado, que comprende la región determinante de complementariedad (CDR) derivada de anticuerpo no humano, la región de entramado (FR) derivada de anticuerpo humano y la región constante. Tales anticuerpos pueden prepararse usando tecnología conocida.

Los anticuerpos obtenidos tal como anteriormente pueden purificarse hasta la homogeneidad. Por ejemplo, la separación y purificación del anticuerpo puede realizarse según métodos de separación y purificación usados para proteínas generales. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y aislarse mediante el uso combinado y seleccionado de manera apropiada de cromatografías en columna, tales como cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, precipitación con sales, diálisis, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, isoelectroenfoque y otros (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero no se limitan a los mismos. Puede usarse una columna de proteína A y una columna de proteína G como columna de afinidad. Las columnas de proteína A a modo de ejemplo que van a usarse incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F.F. (Pharmacia).

La cromatografía a modo de ejemplo, con la excepción de la de afinidad incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Los procedimientos cromatográficos pueden llevarse a cabo mediante cromatografía en fase líquida, tal como HPLC y FPLC.

Por ejemplo, pueden usarse medición de la absorbancia, ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoanálisis (RIA) y/o inmunofluorescencia para medir la actividad de unión a antígeno del anticuerpo de la descripción. En ELISA, el anticuerpo de la presente descripción se inmoviliza en una placa, se aplica un polipéptido de la descripción a la placa y entonces se aplica una muestra que contiene un anticuerpo deseado, tal como sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpos o anticuerpos purificados. Entonces se aplica un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario y está marcado con una enzima, tal como fosfatasa alcalina, y se incuba la placa. A continuación, tras lavar, se añade a la placa un sustrato enzimático, tal como p-nitrofenil-fosfato, y se mide la absorbancia para evaluar la actividad de unión a antígeno de la muestra. Puede usarse un fragmento del polipéptido, tal como un fragmento C-terminal o N-terminal, como antígeno para evaluar la actividad de unión del anticuerpo. Puede usarse BIAcore (Pharmacia) para evaluar la actividad del anticuerpo según la presente descripción.

Los métodos anteriores permiten la detección o medición del polipéptido de la descripción, mediante la exposición del anticuerpo de la descripción a una muestra que se supone que contiene el polipéptido de la descripción, y detectando o midiendo el complejo inmunitario formado por el anticuerpo y el polipéptido.

Debido a que el método de detección o medición del polipéptido según la descripción puede detectar o medir específicamente un polipéptido, el método puede ser útil en una variedad de experimentos en los que se usa el polipéptido.

5 La presente descripción proporciona también un polinucleótido que se hibrida con el polinucleótido que codifica para la proteína CXADRL1, GCU1 o RNF43 humana (SEQ ID NO: 1, 3 ó 5) o la cadena complementaria de la misma, y que comprende al menos 15 nucleótidos. El polinucleótido de la presente descripción es preferiblemente un polinucleótido que se hibrida específicamente con el ADN que codifica para el polipéptido de la presente descripción. La expresión “hibridar específicamente” tal como se usa en el presente documento significa que no se produce hibridación cruzada significativamente con ADN que codifica para otras proteínas, en las condiciones de hibridación
10 habituales, preferiblemente en condiciones de hibridación rigurosas. Tales polinucleótidos incluyen sondas, cebadores, nucleótidos y derivados de nucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido y ribozimas), que se hibridan específicamente con ADN que codifica para el polipéptido de la descripción o su cadena complementaria. Además, tal polinucleótido puede utilizarse para la preparación de chip de ADN.

15 La presente descripción incluye un oligonucleótido antisentido que se hibrida con cualquier sitio dentro de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3 ó 5. Este oligonucleótido antisentido es preferiblemente contra al menos 15 nucleótidos continuos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3 ó 5. Se prefiere incluso más el oligonucleótido antisentido mencionado anteriormente, que contiene un codón de iniciación en los al menos 15 nucleótidos continuos mencionados anteriormente. Más específicamente, tales oligonucleótidos antisentido incluyen aquellos que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 23 ó 25 para suprimir la expresión de
20 CXADRL1; SEQ ID NO: 27 ó 29 para GCU1; y SEQ ID NO: 31 para RNF43.

Pueden usarse como oligonucleótidos antisentido derivados o productos modificados de oligonucleótidos antisentido. Los ejemplos de tales productos modificados incluyen modificaciones con fosfonatos de alquilo inferior tales como de tipo fosfonato de metilo o de tipo fosfonato de etilo, modificaciones con fosforotioato y modificaciones con fosforamidato.

25 La expresión “oligonucleótidos antisentido” tal como se usa en el presente documento significa no sólo aquéllos en los que los nucleótidos correspondientes a los que constituyen una región especificada de un ADN o ARNm son totalmente complementarios, sino también los que tienen un apareamiento erróneo de uno o más nucleótidos, siempre que el ADN o ARNm y el oligonucleótido antisentido puedan hibridar específicamente con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3 ó 5.

30 Tales polinucleótidos están contenidos como aquéllos que tienen, en la “región de secuencia de al menos 15 nucleótidos continuos”, una homología de al menos el 70% o superior, preferiblemente al 80% o superior, más preferiblemente del 90% o superior, incluso más preferiblemente el 95% o superior. Puede usarse el algoritmo expuesto en el presente documento para determinar la homología. Tales polinucleótidos son útiles como sondas para el aislamiento o la detección de ADN que codifica para el polipéptido de la descripción tal como se expone en
35 un ejemplo posterior o como cebador usado para amplificaciones.

Los derivados de oligonucleótidos antisentido de la presente descripción actúan sobre células que producen el polipéptido de la descripción uniéndose al ADN o ARNm que codifica para el polipéptido, inhibiendo su transcripción o traducción, promoviendo la degradación del ARNm e inhibiendo la expresión del polipéptido de la descripción, dando como resultado de ese modo la inhibición de la función del polipéptido.

40 Puede prepararse un derivado de oligonucleótido antisentido de la presente descripción en una preparación externa, tal como un linimento o un emplasto, mediante mezclado con un material de base adecuado que es inactivo contra los derivados.

Además, según se necesite, los derivados pueden formularse en comprimidos, polvos, gránulos, cápsulas, cápsulas de liposomas, inyecciones, disoluciones, gotas nasales y agentes de liofilización añadiendo excipientes, agentes
45 isotónicos, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, analgésicos, y similares. Estos pueden prepararse siguiendo métodos habituales.

El derivado de oligonucleótido antisentido se administra al paciente mediante aplicación directa sobre el sitio de enfermedad o mediante inyección en un vaso sanguíneo, de modo que alcanzará el sitio de enfermedad. Puede usarse también un medio de montaje antisentido para aumentar la durabilidad y permeabilidad de la membrana.
50 Ejemplos son liposomas, poli-L-lisina, lípidos, colesterol, lipofectina o derivados de estos.

La dosificación del derivado de oligonucleótido antisentido de la presente descripción puede ajustarse de manera adecuada según el estado del paciente y usarse en cantidades deseadas. Por ejemplo, puede administrarse un intervalo de dosis de 0,1 a 100 mg/kg, preferiblemente de 0,1 a 50 mg/kg.

55 La presente descripción también incluye ARN de interferencia pequeños (ARNip) que comprenden una combinación de un ácido nucleico de cadena sentido y un ácido nucleico de cadena antisentido de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3 ó 5. Más específicamente, tal ARNip para suprimir la expresión de RNF43 incluye aquellos cuya cadena sentido comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 40, 41, 42 ó 43. Alternativamente, el ARNip

para suprimir la expresión de CXADRL1 incluye aquellos cuya cadena sentido comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 62 ó 63.

El término "ARNip" se refiere a una molécula de ARN bicatenaria que impide la traducción de un ARNm diana. Se usan técnicas convencionales para introducir ARNip en células, incluyendo aquellas en las que se usa ADN como molde para transcribir ARN. El ARNip comprende una secuencia de ácido nucleico sentido y una secuencia de ácido nucleico antisentido del polinucleótido que codifica para la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana (SEQ ID NO: 1, 3 ó 5). El ARNip se construye de manera que un único transcrito (ARN bicatenario) tiene tanto las secuencias sentido como antisentido complementaria del gen diana, por ejemplo, una horquilla.

El método se usa para alterar la expresión génica de una célula, es decir, regular por incremento la expresión de CXADRL1, GCUD1 o RNF43, por ejemplo, como resultado de la transformación maligna de las células. La unión de ARNip al transcrito de CXADRL1, GCUD1 o RNF43 en la célula diana da como resultado una reducción de la producción de proteínas por la célula. La longitud del oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos y puede ser tan largo como el transcrito que se produce de manera natural. Preferiblemente, el oligonucleótido tiene 19-25 nucleótidos de longitud. Lo más preferiblemente, el oligonucleótido tiene menos de 75, 50, 25 nucleótidos de longitud. Los ejemplos de oligonucleótidos de ARNip de CXADRL1, GCUD1 o RNF43 que inhiben la expresión en células de mamífero incluyen oligonucleótidos que contienen cualquiera de SEQ ID NO: 112-114. Estas secuencias son la secuencia diana de las siguientes secuencias de ARNip respectivamente.

SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 40,41 (RNF43);

SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 42, 43 (RNF43); y

SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 62, 63 (CXADRL1).

La secuencia de nucleótidos de los ARNip puede diseñarse usando un programa informático de diseño de ARNip disponible en el sitio web de Ambion (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html). El programa informático selecciona secuencias de nucleótidos para el ARNip basándose en el siguiente protocolo:

Selección de sitios diana de ARNip:

1. Comenzando con el codón de iniciación AUG del transcrito objeto, explorar en el sentido de 3' para detectar secuencias de dinucleótidos AA. Registrar la aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes en 3' como posibles sitios diana de ARNip. Tuschl, *et al.* no recomiendan el diseño de ARNip frente a las regiones no traducidas en 5' y 3' (UTR) y regiones cerca del codón de iniciación (alrededor de 75 bases) puesto que éstas pueden ser más ricas en sitios de unión de proteínas reguladoras. Las proteínas de unión a UTR y/o los complejos de iniciación de la traducción pueden interferir con la unión del complejo ARNip-endonucleasa.

2. Comparar los posibles sitios diana con la base de datos del genoma humano y no tener en consideración ninguna secuencia diana con homología significativa con otras secuencias codificantes. La búsqueda de homología puede realizarse usando BLAST, que puede encontrarse en el servidor del NCBI en: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

3. Seleccionar secuencias dianas que cumplen los requisitos para la síntesis. En Ambion, pueden seleccionarse preferiblemente varias secuencias diana a lo largo de la longitud del gen para su evaluación.

El oligonucleótido antisentido o ARNip de la descripción inhiben la expresión del polipéptido de la descripción y por tanto es útil para suprimir la actividad biológica del polipéptido de la descripción. Además, inhibidores de la expresión que comprenden el oligonucleótido antisentido o ARNip de la descripción son útiles en el momento en que pueden inhibir la actividad biológica del polipéptido de la descripción. Por tanto, una composición que comprende el oligonucleótido antisentido o ARNip de la presente descripción es útil en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular tal como el cáncer.

Además, la presente descripción proporciona un método para diagnosticar una enfermedad proliferativa celular usando el nivel de expresión de los polipéptidos de la presente descripción como marcador de diagnóstico.

Este método de diagnóstico comprende las etapas de: (a) detectar el nivel de expresión del gen CXADRL1, GCUD1 o RNF43 de la presente descripción; y (b) relacionar un aumento del nivel de expresión con la enfermedad proliferativa celular, tal como cáncer.

Los niveles de expresión del gen CXADRL1, GCUD1 o RNF43 en una muestra particular pueden estimarse cuantificando ARNm correspondiente a o proteína codificada por el gen CXADRL1, GCUD1 o RNF43. Los expertos en la técnica conocen métodos de cuantificación para ARNm. Por ejemplo, los niveles de ARNm correspondientes al gen CXADRL1, GCUD1 o RNF43 pueden estimarse mediante transferencia de tipo Northern o RT-PCR. Puesto que las secuencias de nucleótidos de longitud completa de los genes CXADRL1, GCUD1 o RNF43 se muestran en SEQ ID NO: 1, 3 ó 5, cualquier experto en la técnica puede diseñar las secuencias de nucleótidos de sondas o cebadores para cuantificar el gen CXADRL1, GCUD1 o XNF43.

Además, el nivel de expresión del gen *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43* puede analizarse basándose en la actividad o cantidad de proteína codificada por el gen. Se muestra a continuación un método para determinar la cantidad de la proteína *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43*. Por ejemplo, un método de inmunoensayo es útil para la determinación de las proteínas en materiales biológicos. Puede usarse cualquier material biológico para la determinación de la proteína o su actividad. Por ejemplo, se analiza una muestra de sangre para la estimación de la proteína codificada mediante un marcador sérico. Por otro lado, puede seleccionarse un método adecuado para la determinación de la actividad de una proteína codificada por el gen *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43* según la actividad de cada proteína que va a analizarse.

Los niveles de expresión del gen *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43* en un espécimen (muestra de prueba) se estiman y comparan con los de una muestra normal. Cuando una comparación de este tipo muestra que el nivel de expresión del gen diana es superior al de la muestra normal, se considera que el sujeto está afectado por una enfermedad proliferativa celular. Puede determinarse al mismo tiempo el nivel de expresión del gen *CXADRL1*, *GCUD1* o *RNF43* en los especímenes de la muestra normal y objeto. Alternativamente, pueden determinarse intervalos normales de los niveles de expresión mediante un método estadístico basado en los resultados obtenidos analizando el nivel de expresión del gen en especímenes previamente recogidos de un grupo control. El resultado obtenido comparando la muestra de un sujeto se compara con el intervalo normal; cuando el resultado no se encuentra dentro del intervalo normal, se considera que el sujeto está afectado por la enfermedad proliferativa celular. En la presente descripción, la enfermedad proliferativa celular que va a diagnosticarse es preferiblemente cáncer. Más preferiblemente, cuando se estima el nivel de expresión del gen *CXADRL1* o *GCUD1* y se compara con los de una muestra normal, la enfermedad proliferativa celular que va a diagnosticarse es cáncer gástrico, colorrectal o de hígado, y cuando se estima el gen *RNF43* para determinar su nivel de expresión, entonces la enfermedad que va a diagnosticarse es cáncer de colorrectal, de pulmón, gástrico o de hígado.

En la presente descripción, se proporciona también un agente de diagnóstico para diagnosticar una enfermedad proliferativa celular, tal como cáncer incluyendo cánceres gástrico, colorrectal, de pulmón y de hígado. El agente de diagnóstico de la presente descripción comprende un compuesto que se une a un polinucleótido o un polipéptido de la presente descripción. Preferiblemente, puede usarse un oligonucleótido que se hibrida con el polinucleótido de la presente descripción, o un anticuerpo que se une al polipéptido de la presente descripción como tal compuesto.

Además, la presente descripción proporciona un método de selección de un compuesto para tratar una enfermedad proliferativa celular usando el polipéptido de la presente descripción. Una realización de este método de selección comprende las etapas de: (a) poner en contacto un compuesto de prueba con un polipéptido de la presente descripción, (b) detectar la actividad de unión entre el polipéptido de la presente descripción y el compuesto de prueba, y (c) seleccionar un compuesto que se une al polipéptido de la presente descripción.

El polipéptido de la presente descripción que va a usarse para la selección puede ser un polipéptido recombinante o una proteína derivada de la naturaleza, o un péptido parcial de la misma. Puede usarse cualquier compuesto de prueba, por ejemplo, extractos celulares, sobrenadante de cultivo celular, productos de microorganismos fermentadores, extractos de organismos marinos, extractos de plantas, proteínas purificadas o brutas, péptidos, compuestos no peptídicos, compuestos micromoleculares sintéticos y compuestos naturales. El polipéptido de la presente descripción que va a ponerse en contacto con un compuesto de prueba puede ser, por ejemplo, un polipéptido purificado, una proteína soluble, una forma unida a un portador, o una proteína de fusión fusionada con otros polipéptidos.

Como método de selección de proteínas, por ejemplo, que se unen al polipéptido de la presente descripción usando el polipéptido de la presente descripción, pueden usarse muchos métodos bien conocidos por un experto en la técnica. Tal selección puede realizarse mediante, por ejemplo, un método de inmunoprecipitación, específicamente, de la siguiente manera. El gen que codifica para el polipéptido de la presente descripción se expresa en células animales y demás insertando el gen en un vector de expresión para genes foráneos, tal como pSV2neo, pcDNA1 y pCD8. El promotor que va a usarse para la expresión puede ser cualquier promotor que pueda usarse comúnmente e incluye, por ejemplo, el promotor temprano de SV40 (Rigby en Williamson (ed.), Genetic Engineering, vol. 3. Academic Press, Londres, 83-141 (1982)), el promotor EF-1a (Kim *et al.*, Gene 91: 217-23 (1990)), el promotor CAG (Niwa *et al.*, Gene 108: 193-200 (1991)), el promotor LTR de VRS (Cullen, Methods in Enzymology 152: 684-704 (1987)), el promotor SRa (Takebe *et al.*, Mol Cell Biol 8: 466 (1988)), el promotor temprano inmediato de CMV (Seed y Aruffo, Proc Natl Acad Sci USA 84:3365-9 (1987)), el promotor tardío de SV40 (Gheysen y Fiers, J Mol Appl Genet 1: 385-94(1982)), el promotor tardío de adenovirus (Kaufman *et al.*, Mol Cell Biol 9: 946 (1989)), el promotor TK de VHS, etc. La introducción del gen en células animales para expresar un gen foráneo puede realizarse según cualquier método, por ejemplo, el método de electroporación (Chu *et al.*, Nucleic Acids Res 15:1311-26 (1987)), el método de fosfato de calcio (Chen y Okayama, Mol Cell Biol 7: 2745-52 (1987)), el método de DEAE dextrano (Lopata *et al.*, Nucleic Acids Res 12: 5707-17 (1984); Sussman y Milman, Mol Cell Biol 4: 1642-3 (1985)), el método de Lipofectin (Derijard, B Cell 7: 1025-37 (1994); Lamb *et al.*, Nature Genetics 5: 22-30 (1993); Rabindran *et al.*, Science 259: 230-4 (1993)), etc. El polipéptido de la presente descripción puede expresarse como una proteína de fusión que comprende un sitio de reconocimiento (epítipo) de un anticuerpo monoclonal introduciendo el epítipo del anticuerpo monoclonal, cuya especificidad se ha revelado, en el extremo N- o C-terminal del polipéptido de la presente descripción. Puede usarse un sistema de epítipo-anticuerpo comercialmente disponible (Experimental Medicine 13: 85-90 (1995)). Están disponibles comercialmente vectores que pueden expresar una proteína de fusión

con, por ejemplo, β -galactosidasa, proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, proteína fluorescente verde (GFP) y demás mediante el uso de sus múltiples sitios de clonación.

También se notifica una proteína de fusión preparada introduciendo sólo pequeños epítomos que consisten en de varios a docenas de aminoácidos de modo que no cambia la propiedad del polipéptido de la presente descripción mediante la fusión. Pueden usarse epítomos, tales como polihistidina (etiqueta de His), HA agregada de *Influenza*, c-myc humano, FLAG, glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-GP), proteína del gen 10 de T7 (etiqueta de T7), glicoproteína del virus del herpes simple humano (etiqueta de VHS), etiqueta de E (un epítomo en fago monoclonal) y similares, y anticuerpos monoclonales que los reconocen, como sistema de epítomo-anticuerpo para la selección de proteínas que se unen al polipéptido de la presente descripción (Experimental Medicine 13: 85-90 (1995)).

En inmunoprecipitación, se forma un complejo inmunitario añadiendo estos anticuerpos a lisado celular preparado usando un detergente apropiado. El complejo inmunitario consiste en el polipéptido de la presente descripción, un polipéptido que comprende la capacidad de unión con el polipéptido y un anticuerpo. La inmunoprecipitación puede realizarse también usando anticuerpos contra el polipéptido de la presente descripción, además de usar anticuerpos contra los epítomos anteriores, anticuerpos que pueden prepararse tal como se describió anteriormente.

Puede precipitarse un complejo inmunitario, por ejemplo, mediante Proteína A sepharose o Proteína G sepharose cuando el anticuerpo es un anticuerpo de IgG de ratón. Si el polipéptido de la presente descripción se prepara como una proteína de fusión con un epítomo, tal como GST, puede formarse un complejo inmunitario de la misma manera que en el uso del anticuerpo contra el polipéptido de la presente descripción, usando una sustancia que se une específicamente a estos epítomos, tal como glutatión-Sepharose 4B.

La inmunoprecipitación puede realizarse siguiendo o según, por ejemplo, los métodos de la bibliografía (Harlow y Lane, Antibodies, 511-52, Cold Spring Harbor Laboratory publications, Nueva York (1988)).

Se usa comúnmente SDS-PAGE para el análisis de proteínas inmunoprecipitadas y la proteína unida puede analizarse mediante el peso molecular de la proteína usando geles con una concentración apropiada. Puesto que la proteína unida al polipéptido de la presente descripción es difícil de detectar mediante un método de tinción común, tal como tinción con Coomassie o tinción con plata, la sensibilidad de detección para la proteína puede mejorarse cultivando células en medio de cultivo que contiene isótopo radiactivo, ^{35}S -metionina o ^{35}S -cisteína, marcando las proteínas en las células y detectando las proteínas. La proteína diana puede purificarse directamente del gel de SDS-poliacrilamida y puede determinarse su secuencia, cuando se ha revelado el peso molecular de una proteína.

Como método para seleccionar proteínas que se unen al polipéptido de la presente descripción usando el polipéptido, por ejemplo, puede usarse análisis de inmunotransferencia de tipo West-Western (Skolnik *et al.*, Cell 65: 83-90 (1991)). Específicamente, puede obtenerse una proteína que se une al polipéptido de la presente descripción preparando una biblioteca de ADNc a partir de células, tejidos, órganos (por ejemplo, tejidos tales como testículo y ovario para seleccionar proteínas que se unen a CXADRL1; testículo, ovario y cerebro para seleccionar proteínas que se unen a GCUD1; y pulmón fetal, y riñón fetal para aquellas que se unen a RNF43), o células cultivadas que se espera que expresen una proteína que se une al polipéptido de la presente descripción usando un vector de fago (por ejemplo, ZAP), expresando la proteína en LB-agarosa, fijando la proteína expresada en un filtro, haciendo reaccionar el polipéptido de la presente descripción purificado y marcado con el filtro anterior, y detectando las placas que expresan proteínas unidas al polipéptido de la presente descripción según el marcador. El polipéptido de la descripción puede marcarse utilizando la unión entre biotina y avidina, o utilizando un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la presente descripción, o un péptido o polipéptido (por ejemplo, GST) que está fusionado al polipéptido de la presente descripción. Pueden usarse también métodos que usan radioisótopos o fluorescencia y similares.

Alternativamente, en otra realización del método de selección de la presente descripción, puede usarse un sistema de dos híbridos que utiliza células ("sistema de dos híbridos MATCHMAKER", "kit de ensayo de dos híbridos MATCHMAKER de mamífero", "sistema de un híbrido MATCHMAKER" (Clontech); "sistema de vector de dos híbridos HybriZAP" (Stratagene); las referencias "Dalton y Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)", "Fields y Sternglanz, Trends Genet 10: 286-92 (1994)").

En el sistema de dos híbridos, el polipéptido de la descripción se fusiona con la región de unión a SRF o la región de unión a GAL4 y se expresa en células de levadura. Se prepara una biblioteca de ADNc a partir de células que se espera que expresen una proteína que se une al polipéptido de la descripción, de manera que la biblioteca, cuando se expresa, está fusionada a la región de activación de la transcripción VP16 o GAL4. Se introduce entonces la biblioteca de ADNc en las células de levadura anteriores y se aísla el ADNc derivado de la biblioteca a partir de los clones positivos detectados (cuando se expresa una proteína que se une al polipéptido de la descripción en células de levadura, la unión de los dos activa un gen indicador, lo que hace que puedan detectarse clones positivos). Puede prepararse una proteína codificada por el ADNc introduciendo el ADNc aislado anteriormente en *E. coli* y expresando la proteína.

Como gen indicador, puede usarse, por ejemplo, el gen Ade2, el gen lacZ, el gen CAT, el gen de luciferasa y similares, además del gen HIS3.

Puede seleccionarse también un compuesto que se une al polipéptido de la presente descripción usando cromatografía de afinidad. Por ejemplo, el polipéptido de la descripción puede inmovilizarse en un portador de una columna de afinidad, y se aplica a la columna un compuesto de prueba, que contiene una proteína que puede unirse al polipéptido de la descripción. En el presente documento un compuesto de prueba puede ser, por ejemplo, extractos celulares, lisados celulares, etc. Tras cargar el compuesto de prueba, se lava la columna, y pueden prepararse los compuestos unidos al polipéptido de la descripción.

Cuando el compuesto de prueba es una proteína, se analiza la secuencia de aminoácidos de la proteína obtenida, se sintetiza un oligo-ADN basándose en la secuencia y se examinan bibliotecas de ADNc usando el oligo-ADN como sonda para obtener un ADN que codifica para la proteína.

Puede usarse un biosensor que usa el fenómeno de resonancia de plasmón superficial como medio para detectar o cuantificar el compuesto unido en la presente descripción. Cuando se usa un biosensor de este tipo, la interacción entre el polipéptido de la descripción y un compuesto de prueba puede observarse en tiempo real como una señal de resonancia de plasmón superficial, usando sólo una cantidad minúscula de polipéptido y sin marcaje (por ejemplo, BIAcore, Pharmacia). Por tanto, es posible evaluar la unión entre el polipéptido de la descripción y un compuesto de prueba usando un biosensor tal como BIAcore.

El experto en la técnica conoce bien los métodos de selección de moléculas que se unen cuando el polipéptido inmovilizado de la presente descripción se expone a compuestos químicos sintéticos, o bancos de sustancias naturales, o una biblioteca de presentación de péptidos en fago al azar, y los métodos de selección usando alto rendimiento basándose en técnicas de química combinatoria (Wrighton *et al.*, Science 273: 458-64 (1996); Verdine, Nature 384: 11-13 (1996); Hogan, Nature 384: 17-9 (1996)) para aislar no sólo proteínas sino también compuestos químicos que se unen a la proteína de la presente descripción (incluyendo agonista y antagonista).

Alternativamente, el método de selección de la presente descripción puede comprender las siguientes etapas:

- a) poner en contacto un compuesto candidato con una célula en la que se han introducido un vector que comprende la región reguladora de la transcripción de uno o más genes marcadores y un gen indicador que se expresa bajo el control de la región reguladora de la transcripción, seleccionándose el uno o más genes marcadores del grupo que consiste en CXADRL1, GCUD1 y RNF43,
- b) medir la actividad de dicho gen indicador; y
- c) seleccionar un compuesto que reduce el nivel de expresión de dicho gen indicador en comparación con un control.

Se conocen bien en la técnica células huésped y genes indicadores adecuados. El constructo indicador requerido para la selección puede prepararse usando la región reguladora de la transcripción de un gen marcador. Cuando los expertos en la técnica conocen la región reguladora de la transcripción de un gen marcador, puede prepararse un constructo indicador usando la información de secuencia previa. Cuando la región reguladora de la transcripción de un gen marcador sigue sin identificarse, puede aislarse un segmento de nucleótidos que contiene la región reguladora de la transcripción de una biblioteca de genoma basándose en la información de secuencia de nucleótidos del gen marcador.

Un compuesto aislado mediante la selección es un candidato a fármaco que estimula o inhibe la actividad del polipéptido de la presente descripción, para tratar o prevenir enfermedades atribuidas a, por ejemplo, enfermedades proliferativas celulares, tales como cáncer. Un compuesto en el que una parte de la estructura del compuesto obtenido mediante el presente método de selección que tiene la actividad de unión al polipéptido de la presente descripción se convierte mediante adición, delección y/o sustitución, se incluye en los compuestos obtenidos mediante el método de selección de la presente descripción.

En una realización adicional, la presente descripción proporciona métodos para seleccionar agentes candidatos que son posibles dianas en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular. Tal como se trató en detalle anteriormente, controlando los niveles de expresión de CXADRL1, GCUD1 o RNF43, puede controlarse la aparición y evolución de o bien cáncer gástrico, o bien cáncer colorrectal, de pulmón, gástrico o de hígado. Por tanto, los agentes candidatos, que son posibles dianas en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular, pueden identificarse a través de selecciones que usan los niveles de expresión y las actividades de CXADRL1, GCUD1 o RNF43 como índices. En el contexto de la presente descripción, tal selección puede comprender, por ejemplo, las siguientes etapas:

- a) poner en contacto un compuesto candidato con una célula que expresa CXADRL1, GCUD1 o RNF43; y
- b) seleccionar un compuesto que reduce el nivel de expresión de CXADRL1, GCUD1 o RNF43 en comparación con el nivel de expresión detectado en ausencia del compuesto de prueba.

Las células que expresan al menos uno de CXADRL1, GCUD1 o RNF43 incluyen, por ejemplo, líneas celulares establecidas a partir de cánceres gástrico, colorrectal, de pulmón o de hígado; tales células pueden usarse para la selección anterior de la presente descripción. El nivel de expresión puede estimarse mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica. En el método de selección, puede seleccionarse un compuesto que reduce el nivel de expresión de al menos uno de CXADRL1, GCUD1 o RNF43 como agente candidato.

En otra realización del método de selección de un compuesto para tratar una enfermedad proliferativa celular de la presente descripción, el método utiliza la actividad biológica del polipéptido de la presente descripción como índice. Puesto que las proteínas CXADRL1, GCUD1 y RNF43 de la presente descripción tienen la actividad de estimular la proliferación celular, puede seleccionarse un compuesto que estimula o inhibe esta actividad de una de estas proteínas de la presente descripción usando esta actividad como índice. Este método de selección incluye las etapas de: (a) poner en contacto un compuesto de prueba con el polipéptido de la presente descripción, (b) detectar la actividad biológica del polipéptido de la etapa (a); y (c) seleccionar un compuesto que suprime la actividad biológica del polipéptido en comparación con la actividad biológica detectada en ausencia del compuesto de prueba.

Puede usarse cualquier polipéptido para la selección siempre que comprenda la actividad biológica de la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43. Tal actividad biológica incluye actividad de proliferación celular de la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana, la actividad de RNF43 de unirse a NOTCH2 o STRIN. Por ejemplo, puede usarse también una proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 humana y polipéptidos funcionalmente equivalentes a estas proteínas. Tales polipéptidos pueden expresarse de manera endógena o exógena por las células.

Puede usarse cualquier compuesto de prueba, por ejemplo, extractos celulares, sobrenadante de cultivo celular, productos de microorganismos fermentadores, extractos de organismos marinos, extractos vegetales, proteínas purificadas o brutas, péptidos, compuestos no peptídicos, compuestos micromoleculares sintéticos, compuestos naturales.

El compuesto aislado mediante esta selección es un candidato a agonista o antagonista del polipéptido de la presente descripción. El término "agonista" se refiere a moléculas que activan la función del polipéptido de la presente descripción uniéndose al mismo. Asimismo, el término "antagonista" se refiere a moléculas que inhiben la función del polipéptido de la presente descripción uniéndose al mismo. Además, un compuesto aislado mediante esta selección es un candidato a compuesto que inhibe la interacción *in vivo* del polipéptido de la presente descripción con moléculas (incluyendo ADN y proteínas).

Cuando la actividad biológica que va a detectarse en el presente método es proliferación celular, puede detectarse, por ejemplo, preparando células que expresan el polipéptido de la presente descripción, cultivando las células en presencia de un compuesto de prueba y determinando la velocidad de proliferación celular, midiendo el ciclo celular y similares, así como midiendo la actividad de formación de colonias tal como se describe en los ejemplos.

El compuesto aislado mediante las selecciones anteriores es un candidato a fármaco que inhibe la actividad del polipéptido de la presente descripción y puede aplicarse al tratamiento de enfermedades asociadas con el polipéptido de la presente descripción, por ejemplo, enfermedades proliferativas celulares incluyendo cáncer. Más particularmente, cuando se usa la actividad biológica de la proteína CXADRL1 o GCUD1 como índice, los compuestos seleccionados mediante el presente método sirven como candidatos a fármacos para el tratamiento de cáncer gástrico, colorrectal o de hígado. Por otro lado, cuando se usa la actividad biológica de la proteína RNF43 como índice, los compuestos seleccionados mediante el presente método sirven como candidatos a fármacos para el tratamiento de cáncer colorrectal, de pulmón, gástrico o de hígado.

Además, también se incluye en los compuestos que pueden obtenerse mediante el método de selección de la presente descripción un compuesto en el que una parte de la estructura del compuesto que inhibe la actividad de la proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 se convierte mediante adición, delección y/o sustitución.

En una realización adicional del método para seleccionar un compuesto para tratar una enfermedad proliferativa celular de la presente descripción, el método utiliza la capacidad de unión de RNF43 a NOTCH2 o STRIN. Se reveló que la proteína RNF43 de la presente descripción se asociaba con NOTCH2 y STRIN. Estos hallazgos sugieren que la proteína RNF43 de la presente descripción ejerce la función de proliferación celular a través de su unión a moléculas, tales como NOTCH2 y STRIN. Por tanto, se espera que la inhibición de la unión entre la proteína RNF43 y NOTCH2 o STRIN conduzca a la supresión de la proliferación celular, y que compuestos que inhiben la unión sirvan como productos farmacéuticos para tratar una enfermedad proliferativa celular tal como cáncer. Preferiblemente, la enfermedad proliferativa celular tratada mediante el compuesto seleccionado mediante el presente método es cáncer colorrectal, de pulmón, gástrico o de hígado.

Este método de selección incluye las etapas de: (a) poner en contacto un polipéptido de la presente descripción con NOTCH2 o STRIN en presencia de un compuesto de prueba; (b) detectar la unión entre el polipéptido y NOTCH2 o STRIN; y (c) seleccionar el compuesto que inhibe la unión entre el polipéptido y NOTCH2 o STRIN.

El polipéptido RNF43 de la presente descripción y NOTCH2 o STRIN que van a usarse para la selección pueden ser un polipéptido recombinante o una proteína derivada de la naturaleza, o pueden ser también un péptido parcial de los mismos siempre que conserven la capacidad de unión entre sí. El polipéptido RNF43, NOTCH2 o STRIN que van

a usarse en la selección pueden ser, por ejemplo, un polipéptido purificado, una proteína soluble, una forma unida a un portador, o una proteína de fusión fusionada con otros polipéptidos.

Puede usarse cualquier compuesto de prueba, por ejemplo, extractos celulares, sobrenadante de cultivo celular, productos de microorganismos fermentadores, extractos de organismos marinos, extractos vegetales, proteínas purificadas o brutas, péptidos, compuestos no peptídicos, compuestos micromoleculares sintéticos y compuestos naturales.

Como método de selección de compuestos que inhiben la unión entre la proteína RNF43 y NOTCH2 o STRIN, pueden usarse muchos métodos bien conocidos por un experto en la técnica. Puede llevarse a cabo una selección de este tipo como un sistema de ensayo *in vitro*, por ejemplo, en un sistema acelar. Más específicamente, en primer lugar, se unen o bien el polipéptido RNF43, o bien NOTCH2 o STRIN a un soporte, y se añade la otra proteína junto con una muestra de prueba para la misma. A continuación, se incuba la mezcla, se lava y se detecta y/o mide la otra proteína unida al soporte.

Del mismo modo, puede aislarse un compuesto que interfiere en la asociación de CXADRL1 y AIP1 mediante la presente descripción. Se espera que la inhibición de la unión entre CXADRL1 y AIP1 conduzca a la supresión de la proliferación celular, y que compuestos que inhiben la unión sirvan como productos farmacéuticos para tratar una enfermedad proliferativa celular tal como cáncer.

Los ejemplos de soportes que pueden usarse para unirse a proteínas incluyen polisacáridos insolubles, tales como agarosa, celulosa y dextrano; y pueden usarse resinas sintéticas, tales como poliacrilamida, poliestireno y silicio; preferiblemente perlas y placas disponibles comercialmente (por ejemplo, placas de múltiples pocillos, chip de biosensor, etc.) preparadas a partir de los materiales anteriores. Cuando se usan perlas, pueden cargarse en una columna.

La unión de una proteína a un soporte puede realizarse según métodos de rutina, tales como unión química y adsorción física. Alternativamente, puede unirse una proteína a un soporte a través de anticuerpos que reconocen específicamente la proteína. Además, la unión de una proteína a un soporte puede realizarse también por medio de unión de avidina y biotina.

La unión entre las proteína se lleva a cabo en un tampón, por ejemplo, pero sin limitarse a, tampón fosfato y tampón Tris, siempre que el tampón no inhiba la unión entre las proteínas.

En la presente descripción, puede usarse un biosensor que usa el fenómeno de resonancia de plasmón superficial como medio para detectar o cuantificar la proteína unida. Cuando se usa un biosensor de este tipo, puede observarse la interacción entre las proteínas en tiempo real como una señal de resonancia de plasmón superficial, usando sólo una cantidad minúscula de polipéptido y sin marcaje (por ejemplo, BIAcore, Pharmacia). Por tanto, es posible evaluar la unión entre el polipéptido RNF43 y NOTCH2 o STRIN usando un biosensor tal como BIAcore.

Alternativamente, o bien el polipéptido RNF43, o bien NOTCH2 o STRIN, pueden marcarse, y el marcador de la proteína unida puede usarse para detectar o medir la proteína unida. Específicamente, tras el marcaje previo de una de las proteínas, se pone en contacto la proteína marcada con la otra proteína en presencia de un compuesto de prueba y, entonces, se detectan o miden las proteínas unidas según el marcador tras un lavado.

Pueden usarse sustancias de marcaje tales como radioisótopos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I), enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano, β -galactosidasa, β -glucosidasa), sustancias fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FTTC), rodamina), y biotina/avidina, para el marcaje de una proteína en el presente método. Cuando la proteína se marca con un radioisótopo, la detección o medición puede llevarse a cabo mediante centelleo líquido. Alternativamente, pueden detectarse o medirse proteínas marcadas con enzimas añadiendo un sustrato de la enzima para detectar el cambio enzimático del sustrato, tal como generación de color, con un absorciómetro. Además, en el caso en el que se usa una sustancia fluorescente como marcador, la proteína unida puede detectarse o medirse usando un fluorofotómetro.

Además, la unión del polipéptido RNF43 y NOTCH2 o STRIN también puede detectarse o medirse usando anticuerpos frente al polipéptido RNF43 y NOTCH2 o STRIN. Por ejemplo, tras poner en contacto el polipéptido RNF43 inmovilizado sobre un soporte con un compuesto de prueba y NOTCH2 o STRIN, se incuba la mezcla y se lava, y la detección o medición puede realizarse usando un anticuerpo frente a NOTCH2 o STRIN. Alternativamente, pueden inmovilizarse NOTCH2 o STRIN sobre un soporte, y puede usarse un anticuerpo frente a RNF43 como anticuerpo.

En caso de usar un anticuerpo en la presente selección, el anticuerpo se marca preferiblemente con una de las sustancias de marcaje mencionadas anteriormente, y se detecta o se mide basándose en la sustancia de marcaje. Alternativamente, puede usarse el anticuerpo frente al polipéptido RNF43, NOTCH2 o STRIN, como anticuerpo primario que va a detectarse con un anticuerpo secundario que está marcado con una sustancia de marcaje. Además, el anticuerpo unido a la proteína en la selección de la presente descripción puede detectarse o medirse usando una columna de proteína G o de proteína A.

Alternativamente, en otra realización del método de selección de la presente descripción, puede usarse un sistema de dos híbridos que utiliza células ("sistema de dos híbridos MATCHMAKER", "kit de ensayo de dos híbridos MATCHMAKER de mamífero", "sistema de un híbrido MATCHMAKER" (Clontech); "sistema de vector de dos híbridos HybriZAP" (Stratagene); las referencias "Dalton y Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)", "Fields y Sternglanz, Trends Genet 10: 286-92 (1994)").

En el sistema de dos híbridos, el polipéptido RNF43 de la descripción se fusiona con la región de unión a SRF o la región de unión a GAL4 y se expresa en células de levadura. La unión de NOTCH2 o STRIN al polipéptido RNF43 de la descripción se fusiona a la región de activación de la transcripción VP16 o GAL4 y también se expresa en las células de levadura en presencia de un compuesto de prueba. Cuando el compuesto de prueba no inhibe la unión entre el polipéptido RNF43 y NOTCH2 o STRIN, la unión de los dos activa un gen indicador, lo que hace que puedan detectarse clones positivos.

Como gen indicador pueden usarse, por ejemplo, el gen Ade2, el gen lacZ, el gen CAT, el gen de luciferasa y similares, además del gen HIS3.

El compuesto aislado mediante la selección es un candidato a fármaco que inhibe la actividad de la proteína RNF43 de la presente descripción y puede aplicarse al tratamiento de enfermedades asociadas con la proteína RNF43, por ejemplo, enfermedades proliferativas celulares tales como cáncer, más particularmente cáncer colorrectal, de pulmón, gástrico o de hígado. Además, también se incluyen en los compuestos que pueden obtenerse mediante el método de selección de la presente descripción compuestos en los que una parte de la estructura del compuesto que inhibe la unión entre la proteína RNF43 y NOTCH2 o STRIN se convierte mediante adición, delección, sustitución y/o inserción.

Cuando se administra el compuesto aislado mediante los métodos de la descripción como un producto farmacéutico para seres humanos y otros mamíferos, tales como ratones, ratas, cobayas, conejos, pollos, gatos, perros, ovejas, cerdos, ganado, monos, babuinos, chimpancés, para tratar una enfermedad proliferativa celular (por ejemplo, cáncer), el compuesto aislado puede administrarse directamente o puede formularse en una forma farmacéutica usando métodos de preparación farmacéuticos conocidos. Por ejemplo, según las necesidades, los fármacos pueden tomarse por vía oral, como comprimidos recubiertos con azúcar, cápsulas, elixires y microcápsulas, o por vía no oral, en forma de inyecciones de disoluciones o suspensiones estériles con agua o cualquier otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, los compuestos pueden mezclarse con medio o portadores farmacológicamente aceptables, específicamente, agua esterilizada, solución salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionantes, agentes de suspensión, tensioactivos, estabilizantes, agentes aromatizantes, excipientes, vehículos, conservantes, aglutinantes y similares, en una forma de dosis unitaria requerida para la implementación de fármacos generalmente aceptados. La cantidad de principios activos en estas preparaciones produce una dosificación adecuada dentro del intervalo indicado adquirible.

Ejemplos de aditivos que pueden mezclarse con los comprimidos y las cápsulas son aglutinantes tales como gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto y goma arábiga; excipientes tales como celulosa cristalina; agentes de hinchamiento tales como almidón de maíz, gelatina y ácido alginico; lubricantes tales como estearato de magnesio; edulcorantes tales como sacarosa, lactosa o sacarina; agentes aromatizantes tales como menta, aceite de *Gaultheria adenoithrix* y cereza. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, también puede incluirse adicionalmente un portador líquido, tal como aceite, en los componentes anteriores. Pueden formularse materiales compuestos estériles para inyecciones siguiendo implementaciones de fármacos normales usando vehículos tales como agua destilada usada para inyecciones.

Pueden usarse solución salina fisiológica, glucosa y otros líquidos isotónicos incluyendo adyuvantes, tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio, como disoluciones acuosas para inyecciones. Estos pueden usarse conjuntamente con solubilizantes adecuados, tales como alcohol, específicamente etanol, polialcoholes tales como propilenglicol y polietilenglicol, tensioactivos no iónicos, tales como polisorbato 80 (TM) y HCO-50.

Pueden usarse aceite de sésamo o aceite de semilla de soja como líquido oleaginoso y pueden usarse conjuntamente con benzoato de bencilo o alcohol bencílico como solubilizantes y pueden formularse con un tampón, tal como tampón fosfato y tampón acetato de sodio; un analgésico, tal como clorhidrato de procaína; un estabilizante, tal como alcohol bencílico, fenol; y un antioxidante. La inyección preparada puede cargarse en una ampolla adecuada.

Pueden usarse métodos bien conocidos por un experto en la técnica para administrar el compuesto farmacéutico dado a conocer a pacientes, por ejemplo como inyecciones intraarteriales, intravenosas, percutáneas y también como administraciones intranasales, transbronquiales, intramusculares u orales. La dosificación y el método de administración varían según el peso corporal y la edad de un paciente y el método de administración; sin embargo, un experto en la técnica puede seleccionarlos de manera rutinaria. Si dicho compuesto puede codificarse mediante un ADN, el ADN puede insertarse en un vector para terapia génica y administrarse el vector para llevar a cabo la terapia. La dosificación y el método de administración pueden variar según el peso corporal, la edad y los síntomas de un paciente, aunque un experto en la técnica puede seleccionarlos de manera adecuada.

Por ejemplo, aunque existen algunas diferencias según los síntomas, la dosis de un compuesto que se une con el polipéptido de la presente descripción y regula su actividad es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg al día, preferiblemente de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 50 mg al día y más preferiblemente de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 20 mg al día, cuando se administra por vía oral a un adulto normal (peso de 60 kg).

Cuando se administra por vía parenteral, en forma de una inyección a un adulto normal (peso de 60 kg), aunque existen algunas diferencias según el paciente, el órgano diana, los síntomas y el método de administración, es conveniente inyectar por vía intravenosa una dosis de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 30 mg al día, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg al día y más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg al día. Además, en el caso de otros animales también, es posible administrar una cantidad convertida a 60 kg de peso corporal.

Además, la presente descripción proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad proliferativa celular, tal como cáncer, usando un anticuerpo frente al polipéptido de la presente descripción. Según el método, se administra una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo frente al polipéptido de la presente descripción. Puesto que la expresión de la proteína CXADRL1, GCUD1 y RNF43 está regulada por incremento en células cancerosas, y la supresión de la expresión de estas proteínas conduce a la disminución de la actividad de proliferación celular, se espera que puedan tratarse o prevenirse enfermedades proliferativas celulares mediante la unión del anticuerpo y estas proteínas. Por tanto, se administra un anticuerpo frente al polipéptido de la presente descripción a una dosificación suficiente para reducir la actividad de la proteína de la presente descripción, que está en el intervalo de 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg al día. El intervalo de dosificación para seres humanos adultos es generalmente de desde aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 17,5 g/día, preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 g/día, y lo más preferiblemente de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 3 g/día.

Alternativamente, puede usarse un anticuerpo que se une a un marcador de superficie celular específico para células tumorales como herramienta para la administración del fármaco. Por ejemplo, se administra el anticuerpo conjugado con un agente citotóxico a una dosificación suficiente para dañar células tumorales.

La presente descripción también se refiere a un método de inducción de inmunidad antitumoral que comprende la etapa de administrar proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 o un fragmento inmunológicamente activo de las mismas, o un polinucleótido que codifica para la proteína o fragmentos de la misma. La proteína CXADRL1, GCUD1 o RNF43 o los fragmentos inmunológicamente activos de las mismas son útiles como vacunas frente a enfermedades proliferativas celulares. En algunos casos, las proteínas o los fragmentos de las mismas pueden administrarse en una forma unida al receptor de células T (TCR) o presentarse por una célula presentadora de antígeno (CPA), tal como un macrófago, una célula dendrítica (CD) o células B. Debido a la fuerte capacidad de presentación de antígeno de las CD, el uso de CD es lo más preferible entre las CPA.

En la presente descripción, vacuna frente a una enfermedad proliferativa celular se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad antitumoral tras su inoculación en animales. Según la presente descripción, se sugirió que los polipéptidos que comprendían la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 ó 108 eran péptidos de epítomos restringidos por HLA-A*24 o HLA-A*0201 que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica frente a células de cáncer colorrectal, de pulmón, gástrico o de hígado que expresan RNF43. Según la presente descripción, se sugirió que los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 eran péptidos de epítomos restringidos por HLA-A*0201 que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica frente a células de cáncer colorrectal, gástrico o de hígado que expresan CXADRL1. Según la presente descripción, se sugirió que los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 eran péptidos de epítomos restringidos por HLA-A*0201 que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica frente a células de cáncer colorrectal, gástrico o de hígado que expresan GCUD1. Por tanto, la presente descripción también abarca un método de inducción de inmunidad antitumoral usando polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97, 108, 124 ó 164. En general, la inmunidad antitumoral incluye respuestas inmunitarias tales como las siguientes:

- inducción de linfocitos citotóxicos frente a tumores,
- inducción de anticuerpos que reconocen tumores, e
- inducción de la producción de citocinas antitumorales.

Por tanto, cuando una determinada proteína induce una cualquiera de estas respuestas inmunitarias tras su inoculación en un animal, se considera que la proteína tiene un efecto de inducción de inmunidad antitumoral. La inducción de la inmunidad antitumoral mediante una proteína puede detectarse observando *in vivo* o *in vitro* la respuesta del sistema inmunitario en el huésped frente a la proteína.

Por ejemplo, se conoce bien un método para detectar la inducción de linfocitos T citotóxicos. Una sustancia extraña que entra en el organismo vivo se presenta a células T y B mediante la acción de células presentadoras de antígeno (CPA). Las células T que responden al antígeno presentado por CPA de una manera específica de antígeno se

diferencian en células T citotóxicas (o linfocitos T citotóxicos; CTL) debido a la estimulación por el antígeno, y entonces proliferan (esto se denomina activación de células T). Por tanto, puede evaluarse la inducción de CTL por un determinado péptido presentando el péptido a una célula T mediante una CPA, y detectando la inducción de CTL. Además, la CPA tiene el efecto de activar células T CD4+, células T CD8+, macrófagos, eosinófilos y células NK. Puesto que las células T CD4+ y las células T CD8+ son también importantes en la inmunidad antitumoral, puede evaluarse la acción de inducción de inmunidad antitumoral del péptido usando el efecto de activación de estas células como indicadores.

Se conoce bien en la técnica un método para evaluar la acción de inducción de CTL usando células dendríticas (CD) como CPA. La CD es una CPA representativa que tiene la acción de inducción de CTL más fuerte entre las CPA. En este método, se pone en contacto inicialmente el polipéptido de prueba con la CD, y entonces se pone en contacto esta CD con células T. La detección de células T que tienen efectos citotóxicos frente a las células de interés tras el contacto con CD muestra que el polipéptido de prueba tiene una actividad de inducción de las células T citotóxicas. La actividad de CTL frente a tumores puede detectarse, por ejemplo, usando la lisis de células tumorales marcadas con ^{51}Cr como indicador. Alternativamente, también se conoce bien el método de evaluar el grado de daño de células tumorales usando la actividad de captación de ^3H -timidina o la liberación de LDH (lactosa deshidrogenasa) como indicador.

Aparte de las CD, también pueden usarse células mononucleares de sangre periférica (CMSP) como CPA. Se notifica que la inducción de CTL puede potenciarse cultivando CMSP en presencia de GM-CSF e IL-4. De manera similar, se ha mostrado que se inducen CTL cultivando CMSP en presencia de hemocianina de lapa californiana (KLH) e IL-7.

Los polipéptidos de prueba que se confirma que poseen actividad de inducción de CTL mediante estos métodos son polipéptidos que tienen un efecto de activación de CD y actividad de inducción de CTL posterior. Por tanto, los polipéptidos que inducen CTL frente a células tumorales son útiles como vacunas frente a tumores. Además, las CPA que adquieren la capacidad de inducir CTL frente a tumores poniéndose en contacto con los polipéptidos son útiles como vacunas frente a tumores. Además, los CTL que adquieren citotoxicidad debido a la presentación de los antígenos polipeptídicos mediante CPA también pueden usarse como vacunas frente a tumores. Tales métodos terapéuticos para tumores usando inmunidad antitumoral debida a CPA y CTL se denominan inmunoterapia celular.

Generalmente, cuando se usa un polipéptido para inmunoterapia celular, se sabe que la eficacia de la inducción de CTL aumenta combinando una pluralidad de polipéptidos que tienen diferentes estructuras y poniéndolos en contacto con CD. Por tanto, cuando se estimulan CD con fragmentos de proteínas, es ventajoso usar una mezcla de múltiples tipos de fragmentos.

Alternativamente, la inducción de inmunidad antitumoral mediante un polipéptido puede confirmarse observando la inducción de la producción de anticuerpos frente a tumores. Por ejemplo, cuando se inducen anticuerpos frente a un polipéptido en un animal de laboratorio inmunizado con el polipéptido, y cuando se suprime el crecimiento de células tumorales mediante esos anticuerpos, puede determinarse que el polipéptido tiene la capacidad de inducir inmunidad antitumoral.

Se induce inmunidad antitumoral administrando la vacuna de esta descripción, y la inducción de inmunidad antitumoral permite el tratamiento y la prevención de enfermedades proliferativas celulares, tales como cánceres gástrico, colorrectal, de pulmón y de hígado. La terapia contra el cáncer o la prevención de la aparición del cáncer incluye cualquiera de las etapas, tales como inhibición del crecimiento de células cancerosas, involución del cáncer y supresión de la aparición del cáncer. También se incluyen en la terapia o prevención del cáncer la disminución de la mortalidad de individuos que tienen cáncer, la disminución de marcadores tumorales en la sangre, el alivio de síntomas detectables que acompañan al cáncer y similares. Preferiblemente, tales efectos terapéuticos y preventivos son estadísticamente significativos. Por ejemplo, en observación, a un nivel de significación del 5% o inferior, en el que el efecto terapéutico o preventivo de una vacuna frente a enfermedades proliferativas celulares se compara con un control sin administración de vacuna. Por ejemplo, pueden usarse la prueba de la t de Student, la prueba de la U de Mann-Whitney o ANOVA para los análisis estadísticos.

La proteína mencionada anteriormente que tiene actividad inmunológica o un vector que codifica para la proteína puede combinarse con un adyuvante. Un adyuvante se refiere a un compuesto que potencia la respuesta inmunitaria frente a la proteína cuando se administra junto (o de manera sucesiva) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Los ejemplos de adyuvantes incluyen toxina del cólera, toxina de *Salmonella*, alumbre y similares, pero no se limitan a los mismos. Además, la vacuna de esta descripción puede combinarse de manera apropiada con un portador farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de tales portadores son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón fosfato, líquido de cultivo y similares. Además, la vacuna puede contener, según sea necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. La vacuna se administra sistémica o localmente. La administración de la vacuna puede realizarse mediante una única administración, o reforzarse mediante múltiples administraciones.

Cuando se usan CPA o CTL como vacuna de esta descripción, pueden tratarse o prevenirse tumores, por ejemplo, mediante el método *ex vivo*. Más específicamente, se recogen CMSP del sujeto que recibe el tratamiento o la

prevención, se ponen en contacto las células con el polipéptido *ex vivo* y, tras la inducción de CPA o CTL, pueden administrarse las células al sujeto. También pueden inducirse CPA introduciendo un vector que codifica para el polipéptido en CMSP *ex vivo*. Pueden clonarse CPA o CTL inducidos *in vitro* antes de su administración. Clonando y haciendo crecer células que tienen alta actividad de daño de células dianas, puede realizarse más eficazmente la inmunoterapia celular. Además, pueden usarse las CPA y CTL aislados de esta manera para la inmunoterapia celular no sólo frente a individuos de los que se derivan las células, sino también frente a tipos similares de tumores de otros individuos.

Además, se proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad proliferativa celular, tal como cáncer, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido de la presente descripción. La composición farmacéutica puede usarse para generar inmunidad antitumoral. La expresión normal de CXADRL1 se limita a testículos y ovario; la expresión normal de GCUD1 se limita a testículos, ovario y cerebro; y la expresión normal de RNF43 se limita al feto, más específicamente al riñón y pulmón fetales. Por tanto, la supresión de estos genes puede no afectar de manera adversa a otros órganos. Por tanto, los polipéptidos CXADRL1 y GCUD1 son preferibles para tratar una enfermedad proliferativa celular, especialmente cáncer gástrico, colorrectal o de hígado; y el polipéptido RNF43 también es preferible para tratar enfermedad proliferativa celular, especialmente cánceres colorrectal, de pulmón, gástrico y de hígado. Además, puesto que se reveló que los fragmentos peptídicos de RNF43 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 y 108, respectivamente, inducían una respuesta inmunitaria frente a RNF43, los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 ó 108 son ejemplos preferibles de polipéptidos que pueden usarse en una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad proliferativa celular, especialmente cánceres colorrectal, de pulmón, gástrico y de hígado. Además, puesto que se reveló que los fragmentos peptídicos de CXADRL1 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, respectivamente, inducían una respuesta inmunitaria frente a CXADRL1, los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 son ejemplos preferibles de polipéptidos que pueden usarse en una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad proliferativa celular, especialmente cánceres colorrectal, de pulmón, gástrico y de hígado. Además, puesto que se reveló que los fragmentos peptídicos de GCUD1 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 164, respectivamente, inducían una respuesta inmunitaria frente a GCUD1, los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 son ejemplos preferibles de polipéptidos que pueden usarse en una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad proliferativa celular, especialmente cánceres colorrectal, de pulmón, gástrico y de hígado. En la presente descripción, el polipéptido o fragmento del mismo se administra a una dosificación suficiente para inducir inmunidad antitumoral, que está en el intervalo de 0,1 mg a 10 mg, preferiblemente de 0,3 mg a 5 mg, más preferiblemente de 0,8 mg a 1,5 mg. Las administraciones se repiten. Por ejemplo, puede administrarse 1 mg del péptido o fragmento del mismo 4 veces cada dos semanas para inducir la inmunidad antitumoral.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente descripción y para ayudar a un experto habitual a preparar y usar la misma. Los ejemplos no pretenden de ningún modo limitar de otra manera el alcance de la descripción.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta descripción. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o las pruebas de la presente descripción, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Cualquier patente, solicitud de patente y publicación citada en el presente documento se incorpora como referencia.

Mejor modo de llevar a cabo la descripción

La presente descripción se ilustra en detalle mediante los siguientes ejemplos, pero no se limita a esos ejemplos.

1. Materiales y métodos

(1) Pacientes y muestras de tejido

Todos los tejidos de cáncer gástrico y colorrectal, así como tejidos no cancerosos correspondientes se obtuvieron con consentimiento informado de muestras quirúrgicas de pacientes que se sometieron a cirugía.

(2) Micromatriz de ADNc de todo el genoma

En este estudio se usó una micromatriz de ADNc de todo el genoma interna que comprendía 23040 genes. Se amplificó ARN total tratado mediante ADNasa I extraído de tejido microdisecado con el kit de transcripción Ampliscribe T7 (Epicentre Technologies) y se marcó durante la transcripción inversa con colorante Cy (Amersham) (ARN de tejido no canceroso con Cy5 y ARN de tumor con Cy3). Se llevaron a cabo hibridación, lavado y detección tal como se describió anteriormente (Ono *et al.*, Cancer Res. 60: 5007-11 (2000)), y se midió la intensidad de fluorescencia de Cy5 y Cy3 para cada punto diana usando un software Array Vision (Amersham Pharmacia). Tras restar la señal de fondo, se calculó el promedio de valores por duplicado para cada punto. Después, se normalizaron todas las intensidades de fluorescencia en un portaobjetos para ajustar la intensidad media de Cy5 y Cy3 de 52

genes de mantenimiento para cada portaobjetos. Se excluyeron de una investigación adicional los genes con intensidades inferiores a 25.000 unidades de fluorescencia tanto para Cy3 como para Cy5, y se seleccionaron aquellos con razones de señal de Cy3/Cy5 > 2,0 para una evaluación adicional.

(3) Líneas celulares

- 5 Se obtuvieron células 293 de riñón embrionario humanas (HEK293) de TaKaRa. Se obtuvieron células COS7, células NIH3T3, línea celular de cáncer de cuello uterino humana HeLa, líneas celulares de cáncer gástrico humanas MKN-1 y MKN-28I, línea celular de hepatoma humana Alexander, y líneas celulares de cáncer de colon humanas LoVo, HCT116, DLD-1 y SW480, de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD). Se obtuvieron línea celular de hepatoma humana SNU475 y líneas celulares de cáncer de colon humanas SNUC4 y
- 10 SNUC5, del banco de líneas celulares de Corea. Se hicieron crecer todas las células en monocapas en medios apropiados: medio de Eagle modificado por Dulbecco para COS7, NIH3T3, HEK293, y Alexander; RPMI1640 para MKN-1, MKN-28, SNU475, SNUC4, DLD-1 y SNUC5; medio 5A McCoy para HCT116; L-15 de Leibovitz para SW480; F-12 de HAM para LoVo; y medio esencial mínimo de Eagle para HeLa (Life Technologies, Grand Island, NY). Se complementaron todos los medios con suero bovino fetal al 10% y disolución de antibiótico/antimicótico al 1% (Sigma). El Dr. Tsuruo del Instituto del Cáncer en Japón proporcionó amablemente una línea celular de cáncer gástrico humana St-4. Se hicieron crecer las células St-4 en monocapas en RPMI1640 complementado con suero bovino fetal al 10% y disolución de antibiótico/antimicótico al 1% (Sigma).

- Las células T2 (HLA-A*0201) y EHM (HLA-A3/3), líneas celulares de linfoblastoides B humanas, fueron generosos regalos del Prof. Shiku (Univ. Mie). HT29 (línea celular de carcinoma de colon; HLA-A24/01), WiDR (línea celular de carcinoma de colon; HLA-A24/01), y HCT116 (línea celular de carcinoma de colon; HLA-A02/OI), DLD-1 (línea celular de carcinoma de colon; HLA-A24/01), SNU475 (línea celular de carcinoma hepatocelular; HLA-A*0201), MKN45 (línea celular de cáncer gástrico; HLA-A2 negativa), MKN74 (línea celular de cáncer gástrico; HLA-A2 negativa) también se adquirieron de la ATCC. Las células TISI (HLA-A24/24) fueron generosos regalos de Takara Shuzo Co, Ltd. (Otsu, Japón). Exploraciones de RT-PCR revelaron una fuerte expresión de CXADRL1 en SNU475 y
- 25 MKN74. Exploraciones de RT-PCR revelaron una fuerte expresión de GCUD1 en SNU475 y MKN45.

(4) Preparación de ARN y RT-PCR

- Se extrajo ARN total con el kit Qiagen RNeasy (Qiagen) o el reactivo Trizol (Life Technologies) según los protocolos de los fabricantes. Se sometieron a transcripción inversa alícuotas de diez microgramos de ARN total para ADNc monocatenarios usando un cebador poli-dT₁₂₋₁₈ (Amersham Pharmacia Biotech) con transcriptasa inversa Superscript II (Life Technologies). Se diluyó cada preparación de ADNc monocatenario para su amplificación mediante PCR posterior mediante experimentos de RT-PCR convencionales llevados a cabo en volúmenes de 20 µl de tampón de PCR (TaKaRa). Se realizó la amplificación en las siguientes condiciones: desnaturalización durante 4 min a 94°C, seguido por 20 (para GAPDH), 35 (para CXADRL1), 30 (para GCUD1), 30 (para RNF43) ciclos de 94°C durante 30 s, 56°C durante 30 s, y 72°C durante 45 s, en un sistema de GeneAmp PCR 9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Las secuencias de cebadores fueron; para GAPDH: directo, 5'-ACAACAGCCTCAAGATCATCAG (SEQ ID NO: 7) e inverso, 5'-GGTCCACCACTGACACGTTG (SEQ ID NO: 8); para CXADRL1: directo, 5'-AGCTGAGACATTTGTTCTCTTG (SEQ ID NO: 9) e inverso: 5'-TATAAACCAGCTGAGTCCAGAG (SEQ ID NO: 10); para GCUD1 directo: 5'-TTCCCGATATCAACATCTACCAG (SEQ ID NO: 11) e inverso: 5'-AGTGTGTGACCTCAATAAGGCAT (SEQ ID NO: 12), para RNF43 directo; 5'-CAGGCTTTGACGCACAGGACTGGTAC-3' (SEQ ID NO: 13) e inverso; 5'-CTTTGTGATCATCCTGGCTTCGGTGCT 3' (SEQ ID NO: 14).
- 40

(5) Análisis de transferencia de tipo Northern

- Se hibridaron transferencias de múltiples tejidos humanas (Clontech, Palo Alto, CA) con productos de PCR marcados con ³²P de CXADRL1, GCUD1 o RNF43. Se realizaron la prehibridación, hibridación y lavado según las recomendaciones del proveedor. Se autorradiografiaron las transferencias con pantallas intensificadoras a -80°C durante de 24 a 72 h.
- 45

(6) Amplificación rápida de extremos de ADNc en 5' (5' RACE)

- Se llevaron a cabo experimentos de 5' RACE usando el kit de amplificación de ADNc Marathon (Clontech) según las instrucciones del fabricante. Para la amplificación de la parte en 5' de CXADRL1, se usaron cebadores inversos específicos del gen (5'-GGTTGAGATTTAAGTTCTCAAA-3' (SEQ ID NO: 15)) y el cebador AP-1 suministrado con el kit. Se sintetizó el molde de ADNc a partir de ARNm de testículos humano (Clontech). Se clonaron los productos de PCR usando el kit de clonación TA (Invitrogen) y se determinaron sus secuencias con el secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems).
- 50

(7) Construcción de plásmidos que expresan CXADRL1, GCUD1, y FLJ20315

- 55 Se amplificaron las regiones codificantes enteras de CXADRL1, GCUD1 y RNF43 mediante RT-PCR usando un conjunto de cebadores específicos del gen; para CXADRL1, 5'-AGTTAAGCTTGCCGGGATGACTTCTCAGCGTTCCCTCTGG-3' (SEQ ID NO: 16) y 5'-

ATCTCGAGTACCAAGGACCCGGCCCGACTCTG-3' (SEQ ID NO: 17), para GCUD15'-GCGGATCCAGGATGGCTGGCTGCAGCTCCTCCAAG-3' (SEQ ID NO: 18) y 5'-TAGAATTCTTAAAGAACTTAATCTCCGTGTCAACAC-3' (SEQ ID NO: 19), para RNF43,5'-TGCAGATCTGCAG CTGGTAG CATGAG TGGTG-3' (SEQ ID NO: 20) y 5'-GAGGAGCTGTGTGAACA GGCTGTGTGAGATGT-3' (SEQ ID NO: 21). Se clonaron los productos de PCR en un sitio de clonación apropiado del vector o bien pcDNA3.1 (Invitrogen) o bien pcDNA3.1myc/His (Invitrogen).

(8) Inmunotransferencia

Células transfectadas con pcDNA3.1myc/His-CXADRL1, pcDNA3.1myc/His-GCUD1, pcDNA3.1myc/His-RNF43 o pcDNA3.1myc/His-LacZ se lavaron dos veces con PBS y se recogieron en tampón de lisis (NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, DTT 1 mM, y 1X cóctel inhibidor de proteasa completo (Boehringer)). Tras la homogenización, se centrifugaron las células a 10.000xg durante 30 min., se normalizó el sobrenadante con respecto a la concentración de proteína mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad). Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE al 10% y se inmunotransfirieron con anticuerpo de ratón anti-myc (SANTA CRUZ). Anticuerpo de cabra conjugado con HRP anti-IgG de ratón (Amersham) sirvió como anticuerpo secundario para el sistema de detección ECL (Amersham).

(9) Tinción inmunohistoquímica

Células transfectadas con pcDNA3.1myc/His-CXADRL1, pcDNA3.1myc/His-GCUD1, pcDNA3.1myc/His-RNF43 o pcDNA3.1myc/His-LacZ se fijaron con PBS que contenía paraformaldehído al 4% durante 15 min, después se volvieron permeables con PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% durante 2,5 min. a TA. Posteriormente se cubrieron las células con BSA al 2% en PBS durante 24 h a 4°C para bloquear la hibridación no específica. Se usó anticuerpo monoclonal de ratón anti-myc (Sigma) a una dilución de 1:1000 como anticuerpo primario, y se visualizó la reacción tras incubación con anticuerpo secundario conjugado con rodamina anti-ratón (Leinco e ICN). Se contratiñeron los núcleos con diclorhidrato de 4',6'-diamidin-2'-fenilindol (DAPI). Se obtuvieron imágenes fluorescentes en un microscopio ECLIPSE E800.

(10) Ensayo de formación de colonias

Células transfectadas con plásmidos que expresaban cada gen o plásmidos control se incubaron con una concentración apropiada de Geneticin durante de 10 a 21 días. Se fijaron las células con metanol al 100% y se tiñeron mediante disolución Giemsa. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

(11) Establecimiento de células que sobreexpresan CXADRL1 o RNF43

Células NIH3T3, COS7 y LoVo transfectadas con o bien pcDNA3.1myc/His-CXADRL1, pcDNA3.1myc/His-RNF43, pcDNA3.1myc/His-LacZ o bien plásmidos control, respectivamente, se mantuvieron en medios que contenían una concentración apropiada de Geneticin. Dos semanas tras la transfección, se seleccionaron colonias individuales supervivientes, y se examinó la expresión de cada gen mediante RT-PCR semicuantitativa.

(12) Exploración del efecto de oligonucleótidos antisentido sobre el crecimiento celular

Se transfectaron células sembradas en placas de 10 cm (2X10⁵ células/placa) o bien con plásmido, o bien con oligonucleótidos S sintéticos de CXADRL1, GCUD1, o RNF43 usando el reactivo LIPOFECTIN (GIBCO BRL). Después se cultivaron las células con la adición de una concentración apropiada de Geneticin durante de seis a doce días. Entonces se fijaron las células con metanol al 100% y se tiñeron mediante disolución Giemsa. Las secuencias de los oligonucleótidos S fueron las siguientes: CXADRL1-S4, 5'-TCTGCACGGTGAGTAG-3' (SEQ ID NO: 22); CXADRL1-AS4, 5'-CTACTCACCGTGCAGA-3' (SEQ ID NO: 23); CXADRL1-S5, 5'-TTCTGTAGGTGTTGCA-3' (SEQ ID NO: 24); CXADRL1-AS5, 5'-TGCAACACCTACAGAA-3' (SEQ ID NO: 25); GCUD1-S5, 5'-CTTTTCAGGATGGCTG-3' (SEQ ID NO: 26); GCUD1-AS5, 5'-CAGCCATCCTGAAAAG-3' (SEQ ID NO: 27); GCUD1-S8, 5'-AGGTTGAGGTAAGCCG-3' (SEQ ID NO: 28); GCUD1-ASB, 5'-CGGCTTACCTCAACCT-3' (SEQ ID NO: 29); RNF43-S1, 5'-TGGTAGCATGAGTGGT-3' (SEQ ID NO: 30); y RNF43-AS1, 5'-ACCACTCATGCTACCA-3' (SEQ ID NO: 31).

(13) Ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Se transfectaron por triplicado células sembradas en placas a una densidad de 5X10⁵ células/placa de 100 mm con oligonucleótidos S sentido o antisentido diseñados para suprimir la expresión de CXADRL1, GCUD1 o RNF43. Setenta y dos horas tras la transfección, se sustituyó el medio por medio reciente que contenía 500 µg/ml de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) (Sigma) y se incubaron las placas durante cuatro horas a 37°C. Posteriormente, se lisaron las células mediante la adición de 1 ml de HCl 0,01 N/SDS al 10% y se midió la absorbancia de los lisados con un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de prueba de 570 nm (referencia, 630 nm). Se representó la viabilidad celular mediante la absorbancia en comparación con la de las células control.

(14) Construcción de psiH1BX3.0

Dado que se notificó que el gen de H1RNA se transcribía mediante la ARN polimerasa III, que produce transcritos cortos con uridinas en el extremo 3', se amplificó mediante PCR un fragmento genómico del gen de H1RNA que contenía su región de promotor usando un conjunto de cebadores [5'-TGGTAGCCAAGTGCAGGTTATA-3' (SEQ ID NO: 32), y 5'-CCAAAGGGTTTCTGCAGTTTCA-3' (SEQ ID NO: 33)] y ADN de placenta humano como molde. Se purificaron los productos y se clonaron en vector de plásmido pCR2.0 usando el kit de clonación TA (Invitrogen) según el protocolo del proveedor. Se purificaron los fragmentos BamHI y XhoI que contenía en gen de H1RNA y se clonaron en plásmido pcDNA3.1(+) en la posición de nucleótido desde 1257 hasta 56, plásmido que se amplificó mediante PCR con un conjunto de cebadores, 5'-TGCGGATCCAGAGCAGATTGTACTGAGAGT-3' (SEQ ID NO: 34) y 5'-CTCTATCTCGAGTGAGGCGGAAAGAACCA-3' (SEQ ID NO: 35), y después se digirió con BamHI y XhoI. Se usó el ADN ligado como molde para PCR con cebadores, 5'-TTTAAGCTTGAAGACCATTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC-3' (SEQ ID NO: 36) y 5'-TTTAAGCTTGAAGACATGGGAAAGAGTGGTCTCA-3' (SEQ ID NO: 37). Se digirió el producto con HindIII, y posteriormente se autoligó para producir el plásmido vector psiH1BX3.0. Como control, se preparó psiH1BX-EGFP clonando oligonucleótidos bicatenarios de 5'-AACCGAAGCAGCAGCACTTCTTCTTCAAGAGAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (SEQ ID NO: 38) y 5'-AAAAGAAGCAGCAGCACTTCTTCTTCTTGAAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (SEQ ID NO: 39) en el sitio BbsI del vector psiHIBX.

(15) Exploración del efecto de silenciación génica de ARNip de RNF43 o CXADRL1

Se preparó un plásmido que expresaba o bien ARNip de RNF43 o bien ARNip de CXADRL1 mediante clonación de oligonucleótidos bicatenarios en vector psiH1BX3.0. Los oligonucleótidos usados como ARNip de RNF43 fueron:

5'-TCCCGTCACCGGATCCAACTCAGTTCAAGAGACTGAGTTGGATCCGGTGAC-3' (SEQ ID NO: 40) y

5'-AAAAGTCACCGGATCCAACTCAGTCTCTTGAAGTGGATCCGGTGAC-3' (SEQ ID NO: 41) como ARNip16-4;

5'-TCCCGCTATTGCACAGAACGCGAGTTCAAGAGACTGCGTTCTGTGCAATAGC-3' (SEQ ID NO: 42) y

5'-AAAAGCTATTGCACAGAACGCGAGTCTCTTGAAGTGGTCTGTGCAATAGC-3' (SEQ ID NO: 43) como ARNip1834;

5'-TCCCCAGAAAGCTGTTATCAGAGTTCAAGAGACTCTGATAACAGCTTTCTG-3' (SEQ ID NO: 44) y

5'-AAAACAGAAAGCTGTTATCAGAGTCTCTTGAAGTCTGATAACAGCTTTCTG-3' (SEQ ID NO: 45) como ARNip1;

5'-TCCCTGAGCCACCTCCAATCCACTTCAAGAGAGTGGATTGGAGGTGGCTCA-3' (SEQ ID NO: 46) y

5'-AAAATGAGCCACCTCCAATCCACTTCTTGAAGTGGATTGGAGGTGGCTCA-3' (SEQ ID NO: 47) como ARNip14;

5'-TCCCCTGCACGGACATCAGCCTATTCAAGAGATAGGCTGATGTCCGTGCAG-3' (SEQ ID NO: 48) y

5'-AAAAGTGCACGGACATCAGCCTATTCTTGAATAGGCTGATGTCCGTGCAG-3' (SEQ ID NO: 49) como ARNip15. Los oligonucleótidos usados como ARNip de CXADRL1 fueron: 5'-TCCCGTGTGACAGAGAGCCCTGGGATTCAAGAGATCCCAGGGCTCTCTGACAC-3' (SEQ ID NO: 50) y 5'-AAAAGTGTGACAGAGAGCCCTGGGATCTCTTGAATCCCAGGGCTCTCTGACAC-3' (SEQ ID NO: 51) como ARNip n.º 1; 5'-TCCCCCTCAATGTGATTTGGATGTTCAAGAGACATCCAAATGCAATTGAGG-3' (SEQ ID NO: 52) y 5'-AAAACCTCAATGTGATTTGGATGTTCTTGAACATCCAAATGCAATTGAGG-3' (SEQ ID NO: 53) como ARNip n.º 2; 5'-TCCCTGTGATTTGGATGGTCACTTTCAAGAGAAGTGACCATCCAAATGACA-3' (SEQ ID NO: 54) y 5'-AAAATGTGATTTGGATGGTCACTTCTTGAAGTGAACATCCAAATGACA-3' (SEQ ID NO: 55) como ARNip n.º 3; 5'-TCCCTGCCAACCAACCTGAACAGTTCAAGAGACTGTTCAAGTTGGTTGGCA-3' (SEQ ID NO: 56) y 5'-AAAATGCCAACCAACCTGAACAGTCTCTTGAAGTGTTCAGGTTGGTTGGCA-3' (SEQ ID NO: 57) como ARNip n.º 4; 5'-TCCCCAACCTGAACAGGTCATCTTCAAGAGAGATGACCTGTTCAAGTTGG-3' (SEQ ID NO: 58) y 5'-AAAACCAACCTGAACAGGTCATCTCTTGAAGATGACCTGTTCAAGTTGG-3' (SEQ ID NO: 59) como ARNip n.º 5; 5'-TCCCCCTGAACAGGTCATCTGTTTCAAGAGAACAGGATGACCTGTTCAAGG-3' (SEQ ID NO: 60) y 5'-AAAACCTGAACAGGTCATCTGTTTCTTGAAGAGATGACCTGTTCAAGG-3' (SEQ ID NO: 61) como ARNip n.º 6; y 5'-TCCCCAGGTCATCTGTATCAGGTTCAAGAGACGTGATACAGGATGACCTG-3' (SEQ ID NO: 62) y 5'-AAAACAGGTCATCTGTATCAGGTTCTTGAACCTGATACAGGATGACCTG-3' (SEQ ID NO: 63) como ARNip n.º 7 de CXADRL.

Se transfectaron plásmidos psiHIBX-RNF43, psiHIBX-CXADRL1 o psiH1BX-control en células SNUC4 o St-4 usando el reactivo FuGENE6 (Roche) según las recomendaciones del proveedor. Se extrajo ARN total de las células 48 horas tras la transfección.

(16) Construcción de regiones recombinantes amino-terminal y carboxilo-terminal de la proteína RNF43

Se amplificaron las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal de RNF43 mediante RT-PCR usando los siguientes conjuntos de cebadores: 5'-GAAGATCTGCAGCGGTGGAGTCTGAAAG-3' (SEQ ID NO: 64) y 5'-GGAATTCGGACTGGGAAATGAATCTCCCTC-3' (SEQ ID NO: 65) para la región amino-terminal; y 5'-GGAGATCTCCTGATCAGCAAGTCACC-3' (SEQ ID NO: 66) y 5'-GGAATTCACAGCCTGTTACACAGCTCCTC-3' (SEQ ID NO: 67) para la región carboxilo-terminal. Se digirieron los productos con BamHI-EcoRI y se clonaron en el sitio BamHI-EcoRI del vector pET43.1a(+) (Novagen). Se transfectaron los plásmidos en células BL21trxB(DE3)pLysS de *E. coli* (Stratagene). Se extrajo proteína RNF43 recombinante de células cultivadas a 25°C durante 16 h tras la adición de IPTG 0,2 mM.

(17) Experimento de dos híbridos de levadura

Se realizó un ensayo de dos híbridos de levadura usando el sistema MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid 3 (Clontech) según los protocolos del fabricante. Se clonó la secuencia codificante completa de RNF43 en el sitio EcoRI-BamHI del vector pAS2-1 como cebo para la exploración de una biblioteca de ADNc de testículos humano (Clontech). Para confirmar la interacción en levadura, se usó pAS2-RNF43 como vector cebo, pACT2-NOTCH2 y pACT2-STRIN como vector presa.

Se clonó la región citoplasmática de CXADRL1 en el sitio EcoRI del vector pAS2-1 como cebo para la exploración de una biblioteca de ADNc de testículos humano (Clontech). Para confirmar la interacción en levadura, se usó pAS2-CXADRL1 para el vector cebo, y pACT2-AIP1 para el vector presa.

(18) Preparación de anticuerpo específico para CXADRL

Se prepararon antisueros anti-CXADRL mediante inmunización con polipéptidos sintéticos de CXADRL1 que abarcaban codones desde 235 hasta 276 para Ac-1, desde 493 hasta 537 para Ac-2, o desde 70 hasta 111 para Ac-3. Se purificaron los sueros usando proteína CXADRL1 con etiqueta de His recombinante preparada en *E. coli* transfectada con plásmido pET-CXADRL. La proteína extraída de células que expresaban CXADRL1 con etiqueta de Flag se separó adicionalmente mediante SDS-PAGE al 10% y se inmunotransfirió o bien con sueros anti-CXADRL1 o bien con anticuerpo anti-Flag. Anticuerpo de cabra conjugado con HRP anti-IgG de conejo o de oveja conjugado con HRP anti-IgG de ratón sirvieron como anticuerpo secundario, respectivamente, para el sistema de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La inmunotransferencia con antisueros anti-CXADRL mostró una banda de 50 kD de CXADRL1 con etiqueta de FLAG, patrón que fue idéntico al detectado con anticuerpo anti-FLAG.

(19) Preparación de proteína GCUD1 recombinante

Para generar un anticuerpo específico frente a GCUD1, se preparó proteína GCUD1 recombinante. Se amplificó la región codificante entera de GCUD1 mediante RT-PCR con un conjunto de cebadores, 5'-GCGGATCCAGGATGGCTGCAGCTCCTCCAAG-3' (SEQ ID NO: 68) y 5'-CTGAATTCCTTAAAGAACTTAATCTCGTGTCAACAC-3' (SEQ ID NO: 69). Se purificó el producto, se digirió con BamHI y EcoRI, y se clonó en un sitio de clonación apropiado de pGEX6P-2. El plásmido resultante se denominó pGEX-GCUD1. Se transformó el plásmido pGEX-GCUD1 en *E. coli* DH10B. Se indujo la producción de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG, y se purificó la proteína con Glutathione Sepharose™ 4B (Amersham Pharmacia) según los protocolos del fabricante.

(20) Preparación de anticuerpo específico para GCUD1

Se purificó anticuerpo policlonal frente a GCUD1 a partir de sueros. Se separaron proteínas a partir de células transfectadas con plásmidos que expresaban GCUD1 con etiqueta de Flag mediante SDS-PAGE al 10% y se inmunotransfirieron con anticuerpo anti-GCUD1 o anti-Flag. Anticuerpo de cabra conjugado con HRP anti-IgG de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o conjugado con HRP anti-Flag sirvió como anticuerpo secundario, respectivamente, para el sistema de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La inmunotransferencia con el anticuerpo anti-GCUD1 mostró una banda de 47 kD de GCUD1 con etiqueta de FLAG, patrón que fue idéntico al detectado con el anticuerpo anti-FLAG.

(21) Análisis estadístico

Se sometieron los datos a análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de la F de Scheffé.

(22) Preparación de péptidos

Se predijeron péptidos de 9 meros y 10 meros de RNF43, CXADRL1 o GCUD1 que se unen a la molécula de HLA-A24 o HLA-A*0201 con ayuda del software de predicción de unión (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform). Estos péptidos los sintetizó Mimotopes, San Diego, LA, según el método de síntesis en fase sólida convencional y se purificaron mediante HPLC en fase inversa. Se determinaron la pureza

(>90%) y la identidad de los péptidos mediante HPLC analítica y análisis de espectrometría de masas, respectivamente. Se disolvieron los péptidos en dimetilsulfóxido (DMSO) a 20 mg/ml y se almacenaron a -80°C.

(23) Inducción de CTL *in vitro*

Se usaron células dendríticas (CD) derivadas de monocitos como células presentadoras de antígeno (CPA) para inducir respuestas de CTL frente péptidos presentados en HLA. Se generaron CD *in vitro* tal como se describe en otra parte (Nukaya *et al.*, Int J Cancer 80: 92-7 (1999); Tsai *et al.*, J Immunol 158: 1796-802 (1997)). Específicamente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de un voluntario sano con HLA-A*0201 o HLA-A24 usando una disolución Ficoll-Plaque (Pharmacia), y se separó la fracción monocítica de CMSP mediante adherencia a un frasco de cultivo tisular de plástico (Becton Dickinson). Se cultivó esta fracción monocítica durante siete días en medio AIM-V (Invitrogen) que contenía suero autólogo (SA) inactivado por calor al 2%, 1000 U/ml de GM-CSF (proporcionado por Kirin Brewery Company), y 1000 U/ml de IL-4 (Genzyme) para obtener una fracción de DC. Los 20 µg/ml de péptidos candidatos se aplicaron mediante pulsos sobre esta población de células enriquecida en CD en presencia de 3 µg/ml de β2-microglobulina durante 4 h a 20°C en AIM-V. Entonces se irradiaron (5500 rad) estas células presentadoras de antígeno tratadas con pulsos de péptidos y se mezclaron a una razón de 1:20 con células T CD8+ autólogas, obtenidas mediante selección positiva con Dynabeads M-450 CD8 (Dyna) y Detachabead (Dyna). Se establecieron estos cultivos en placas de 48 pocillos (Coming); cada pocillo contenía 1,5x10⁴ células presentadoras de antígeno tratadas con pulsos de péptidos, 3x10⁵ células T CD8+ y 10 ng/ml de IL-7 (Genzyme) en 0,5 ml de AIMV con SA al 2%. Tres días después, se complementaron esos cultivos con IL-2 (CHIRON) hasta una concentración final de 20 UI/ml. En los días 7 y 14, se reestimularon adicionalmente las células T con las células presentadoras de antígeno tratadas con pulsos de péptidos autólogas que se prepararon cada vez de la misma manera descrita anteriormente. Se recogieron células linfoides en el cultivo en el día 21 y se sometieron a prueba para determinar la citotoxicidad frente a células T2 o TISI tratadas con pulsos de péptidos.

(24) Expansión de CTL

Células linfoides cultivadas con citotoxicidad significativa demostrada frente a células T2 o TISI tratadas con pulsos de péptidos se expandieron adicionalmente en cultivo usando un método similar al descrito por Riddell, *et al.* (Walter *et al.*, N Engl J Med 333:1038-1044, 1995; Riddell *et al.*, Nature Med. 2:216-223, 1996). Se resuspendieron 5 x 10⁴ células linfoides en 25 ml de AIM-V complementado con SA al 5% que contenía 25 x 10⁶ CMSP irradiadas (3300 rad), 5 x 10⁶ células EHM irradiadas (8000 rad), y 40 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Un día tras el inicio de los cultivos, se añadieron 120 UI/ml de IL-2 a los cultivos. Los cultivos comprendían AIM-V reciente complementado con SA al 5% y 30 UI/ml de IL-2 en los días 5, 8 y 11.

(25) Establecimiento de clones de CTL

Se usaron algunas de las células linfoides con citotoxicidad potente para obtener clones de CTL. Se diluyeron las suspensiones celulares hasta una densidad de 0,3, 1 y 3 CTL/células linfoides por pocillo en una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 (Nalge Nunc International). Se cultivaron estas células en 150 µl/pocillo de AIM-V complementado con SA al 5% que contenía 7x10⁴ células/pocillo de CMSP alogénicas, 1x10⁴ células/pocillo de EHM, 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3, y 125 U/ml de IL-2. Diez días después, se añadieron, 50 µl/pocillo de IL-2 al medio hasta una concentración final de 125 U/ml. Se sometió a prueba la actividad citotóxica de CTL cultivados en el día 14, y se expandieron clones de CTL usando el mismo método que el descrito anteriormente.

(26) Ensayo de citotoxicidad

Se marcaron células diana con 100 µCi de Na₂⁵¹CrO₄ (Perkin Elmer Life Sciences) durante 1 h a 37°C en una incubadora de CO₂. Cuando se usaron dianas tratadas mediante pulsos de péptidos, se incubaron células diana con la adición de 20 µg/ml del péptido durante 16 h a 37°C antes del marcaje con Na₂⁵¹CrO₄. Se aclararon las células diana y se mezclaron con efectores a un volumen final de 0,2 ml en placas de microtitulación de fondo redondo. Se centrifugaron las placas (4 minutos a 800 x g) para aumentar el contacto entre células y se colocaron en una incubadora de CO₂ a 37°C. Tras 4 h de incubación, se recogieron 0,1 ml del sobrenadante de cada pocillo y se determinó la radiactividad con un contador gamma. En caso de evaluar la citotoxicidad frente a células diana que expresan endógenamente RNF43 o CXADRL1 o GCDU1, se sometió a prueba la actividad citolítica en presencia de un exceso de 30 veces de células K562 sin marcar para reducir cualquier lisis no específica debida a efectores de tipo NK. Se confirmó la especificidad de antígeno mediante el ensayo de inhibición de diana fría, que utilizó células TISI o T2 sin marcar que se trataron con pulsos de péptido (20 µg/ml durante 16 h a 37°C) para competir por el reconocimiento de células HT29 o SNU475 marcadas con ⁵¹Cr. Se examinó la restricción de MHC mediante ensayo de bloqueo, midiendo la inhibición de la citotoxicidad mediante anticuerpo anti-HLA clase I (W6/32) y anticuerpo anti-HLA clase II, anticuerpo anti-CD4 y anticuerpo anti-CD8 (DAKO).

Se determinó el porcentaje de citotoxicidad específica calculando el porcentaje de liberación de ⁵¹Cr específica mediante la siguiente fórmula: {(cpm de la liberación de la muestra de prueba - cpm de la liberación espontánea)/(cpm de la liberación máxima - cpm de la liberación espontánea)} X 100. Se determinó la liberación espontánea incubando las células diana solas en ausencia de efectores, y se obtuvo la liberación máxima incubando

las dianas con HCl 1 N. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, y los errores estándar de las medias fueron sistemáticamente inferiores al 10% del valor de la media.

2. Resultados

(1) Identificación de dos genes humanos novedosos, CXADRL1 y GCUD1, regulados comúnmente por incremento en cánceres gástricos

Mediante una micromatriz de ADNc de todo el genoma que contenía 23040 genes, se compararon perfiles de expresión de 20 cánceres gástricos con mucosas no cancerosas correspondientes. Entre los genes comúnmente regulados por incremento en los análisis de micromatriz, se encontró que un gen con un número de registro propio A5928 correspondiente a un EST, Hs.6658 de la agrupación UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>), se sobreexpresaba en un intervalo entre 4,09 y 48,60 (figura 1a). Dado que un marco de lectura abierto de este gen codificaba para una proteína idéntica en aproximadamente un 37% a la de CXADR (receptor de virus Coxsackie y adenovirus), este gen se denominó CXADRL1 (similar a receptor de virus Coxsackie y adenovirus 1). CXADRL1 también se regulaba por incremento en 6 de 6 casos de cáncer colorrectal y 12 de 20 casos de CHC. Además, también se centró la atención en un gen con un número de registro propio de C8121, correspondiente al producto génico KIAA0913 (Hs.75137) de la agrupación UniGene, debido a su expresión significativamente potenciada en nueve de doce tejidos de cáncer gástrico en comparación con las mucosas gástricas no cancerosas correspondientes mediante micromatriz (figura 1b). Este gen con el número de registro propio C8121 se denominó GCUD1 (regulado por incremento en cáncer gástrico). GCUD1 también se regulaba por incremento en 5 de 6 casos de cáncer colorrectal, 1 de 6 casos de CHC, 1 de 14 casos de cáncer de pulmón (carcinoma de células escamosas), 1 de 13 casos de seminomas testiculares. Para aclarar los resultados de la micromatriz de ADNc, se examinó la expresión de estos transcritos en cánceres gástricos mediante RT-PCR semicuantitativa para confirmar una expresión aumentada de CXADRL1 en los 10 tumores (figura 1c) y una expresión elevada de GCUD1 en siete de nueve cánceres (figura 1d).

(2) Aislamiento y estructura de un gen novedoso CXADRL1

Un análisis de transferencia tipo Northern de múltiples tejidos usando un producto de PCR de CXADRL1 como sonda reveló la expresión de un transcrito de 3,5 kb en testículos y ovarios (figura 2a). Dado que A5928 era menor que el gen detectado en la transferencia tipo Northern, se llevaron a cabo experimentos de 5'RACE para determinar la secuencia codificante entera del gen de CXADRL1. El supuesto ADNc de longitud completa consistía en 3423 nucleótidos, con un marco de lectura abierto de 1296 nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que codificaba para una proteína de 431 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) (número de registro de GenBank: AB071618). El primer ATG estaba flanqueado por una secuencia (CCCGGGATGA) (SEQ ID NO: 70) que coincidía con la secuencia consenso para el inicio de traducción en eucariotas, por un codón de parada en el marco en sentido 5'. Usando el programa BLAST para buscar homologías en las bases de datos del NCBI (el Centro Nacional de Información de Biotecnología), se identificó una secuencia genómica con el número de registro de GenBank AC068984, secuencia que se había asignado a la banda cromosómica 3q13. La comparación del ADNc y la secuencia genómica reveló que CXADRL1 consistía en 7 exones (figura 2b).

Una búsqueda de motivos de proteína usando la herramienta Simple Modular Architecture Research Tool (SMART, <http://smart.emblheidelberg.de>) reveló que la proteína predicha contenía dos dominios de inmunoglobulina (codones 29-124 y 158-232) y un dominio transmembrana (codones 246-268), lo que sugiere que CXADRL1 podría pertenecer a la superfamilia de inmunoglobulinas.

(3) Efecto de CXADRL1 sobre el crecimiento celular

Se realizó un ensayo de formación de colonias transfectando células NIH3T3 con un plásmido que expresaba CXADRL1 (pcDNA3.1myc/His-CXADRL1). Las células transfectadas con pcDNA3.1myc/His-CXADRL1 produjeron notablemente más colonias que las células transfectadas con control (figura 3a). Para investigar adicionalmente este efecto promotor del crecimiento de CXADRL1, se establecieron células NIH3T3 que expresaban de manera estable CXADRL1 exógeno (figura. 3b). La tasa de crecimiento de células NIH3T3-CXADRL1 fue significativamente superior a la de células NIH3T3 originales en medios de cultivo que contenían FBS al 10% (figura 3c).

(4) Supresión de la expresión de CXADRL1 en células de cáncer gástrico humanas mediante oligonucleótidos S antisentido

Se transfectaron seis pares de oligonucleótidos S control y antisentido correspondientes a CXADRL1 en células de cáncer gástrico MKN-1, que habían mostrado el mayor nivel de expresión de CXADRL1 entre las seis líneas celulares de cáncer gástrico examinadas. Seis días tras la transfección, se midió la viabilidad de las células transfectadas mediante ensayo de MTT. Las células viables transfectadas con oligonucleótidos S antisentido (CXADRL1-AS4 o -AS5) fueron notablemente menos numerosas que las transfectadas con oligonucleótidos S control (CXADRL1-S4 o -S5) (figura 4). Se obtuvieron resultados coincidentes en tres experimentos independientes.

(5) Construcción de plásmidos que expresan ARNip de CXADRL1 y su efecto sobre el crecimiento de células de cáncer gástrico

- 5 Se construyeron plásmidos que expresaban diversos ARNip de CXADRL1 y se examinaron para determinar su efecto sobre la expresión de CXADRL1. Entre los ARNip construidos, psiH1BX-CXADRL7 suprimió significativamente la expresión de CXADRL1 en células St-4 (figura 5A). Para someter a prueba si la supresión de CXADRL1 podía dar como resultado la supresión del crecimiento en células de cáncer de colon, se transfectaron células St-4 con psiH1BX-CXADRL7 o vector control. El número de células viables transfectadas con psiH1BX-CXADRL7 fue menor que el número de células control viables (figura 5B y 5C).

(6) Preparación de anticuerpo anti-CXADRL1

- 10 Para examinar la expresión y explorar la función de CXADRL1, se prepararon antisueros frente a CXADRL1. La inmunotransferencia con anticuerpo anti-CXADRL1 detectó una banda de 50 kD de CXADRL1 con etiqueta de FLAG, que era casi idéntica en cuanto al tamaño a la detectada con anticuerpo anti-FLAG (figura 6).

(7) Identificación de una proteína que interacciona con CXADRL1 mediante el sistema de exploración de dos híbridos de levadura

- 15 Para aclarar la función de CXADRL1, se buscaron proteínas que interaccionan con CXADRL1 usando un sistema de exploración de dos híbridos de levadura. Entre los clones positivos identificados, la región C-terminal de AIP1 nuclear (proteína que interacciona con atropina 1) interaccionó con CXADRL1 mediante transformación simultánea usando pAS2.1-CXADRL1 y pACT2-AIP1 (figura 7) en las células de levadura. Los clones positivos contenían codones entre 808 y 1008, lo que indica que la región responsable de la interacción en AIP1 está dentro de esta región.

(8) Predicción de péptidos candidatos derivados de CXADRL1

La tabla 1 muestra los péptidos candidatos (SEQ ID NO: 115-154) en el orden de alta afinidad de unión. En total se seleccionaron y examinaron cuarenta péptidos tal como se describe a continuación.

Tabla 1 Predicción de péptidos candidatos derivados de CXADRL1

HLA-A*0201 9 meros				HLA-A*0201 10 meros			
Rango	secuencia	Puntuación	Posición	Rango	secuencia	Puntuación	Posición
1	YLWEKLDNT	1314,7	176	1	YLWEKLDNTL	3344	176
2	LLLLSLHGV	1006,2	11	2	LINLnVIWMV	280,45	52
3	INLNVIWMMVMMV	49,262	53	3	ALSSgLYQCV	104,33	207
4	WMVTPLSNA	37,961	59	4	ALININVIWM	62,845	51
5	CLVNNLPDI	23,995	120	5	ILLCsSEEGI	32,155	162
6	SLHGVAASL	21,362	15	6	VLPCtFTTSA	32,093	41
7	VIIIFCIAL	18,975	252	7	LLLSIHGVAA	31,249	12
8	LINLMVIWM	14,69	52	8	SIYAnGTHLV	30,603	356
9	AVLPCTFTT	13,993	40	9	QLSDtGTyQC	20,369	111
10	ALSSGLYQC	11,426	207	10	GLYQcVASNA	15,898	211
11	VMSRSNGSV	11,101	384	11	PLLLISLHGV	13,022	10
12	SIFINNTQL	10,868	104	12	IQVArGQPAV	11,988	32
13	KVHRNTDSV	10,437	327	13	FINNtQLSDT	10,841	106
14	RIGAVPVMV	9,563	413	14	LVPGqHKTLV	10,346	364
15	NIGVTGLTV	9,563	132	15	NLPDiGGRNI	8,555	124

16	SIYANGTHL	9,399	356	16	VLVPpSAPHC	8,446	140
17	LLCSSEEGI	8,691	163	17	AVIIIfICIAL	7,103	251
18	LLSLHGVA	8,446	13	18	VIIIfICIALI	5,609	252
19	IIFICIALIL	7,575	254	19	ILGAfFYWRS	5,416	261
20	TMPATNVSI	7,535	97	20	GLTVIVPPSA	4,968	137

(9) Estimulación de las células T y establecimiento de clones de CTL usando los péptidos candidatos

Se cultivaron células linfoides usando estos péptidos candidatos derivados de CXADRL1 de la manera descrita en "Materiales y métodos". Se expandieron las células linfoides resultantes que mostraban actividad citotóxica detectable, y se establecieron clones de CTL. Se propagaron los clones de CTL a partir de las líneas de CTL descritas anteriormente usando métodos de dilución limitante. Los clones de CTL inducidos con CXADRL1-207 (ALSSGLYQC) (SEQ ID NO: 124) mostraron las mayores actividades citotóxicas frente a la diana tratada con pulsos de péptidos en comparación con aquellas frente a dianas no tratadas con pulsos de ningún péptido. La actividad citotóxica de este clon de CTL se muestra en la figura 8. Este clon de CTL tenía una actividad citotóxica muy potente frente a la diana tratada con pulsos de péptidos sin mostrar ninguna actividad citotóxica frente a la diana no tratada con pulsos de ningún péptido.

(10) Actividad citotóxica frente a líneas celulares tumorales que expresan de manera endógena CXADRL1 como diana

Se examinaron los clones de CTL preparados frente a péptidos predichos para determinar su capacidad para reconocer y destruir las células tumorales que expresan de manera endógena CXADRL1. La figura 9 muestra los resultados del clon de CTL 75 preparado frente a CXADRL1-207 (ALSSGLYQC) (SEQ ID NO: 124). El clon de CTL 75 mostró potente actividad citotóxica frente a SNU475 que expresan CXADRL1 y HLA-A*0201, sin embargo no mostró frente a MKN74 que expresan CXADRL1 pero no HLA-A*0201, y no mostró frente a SNU-C4 que expresan HLA-A*0201 pero no CXADRL1.

(11) Especificidad de los CTL establecidos

También se realizó el ensayo de inhibición de diana fría para confirmar la especificidad del clon de CTL frente a CXADRL1-207. Se usaron células SNU475 marcadas con ⁵¹Cr como diana caliente, mientras que se usaron células T2 tratadas con pulsos de CXADRL1-207 (SEQ ID NO: 124) sin marcaje con ⁵¹Cr como diana fría. La lisis celular específica frente a células SNU475 se inhibió significativamente cuando se añadieron células T2 tratadas con pulsos de CXADRL1-207 (SEQ ID NO: 124) en el ensayo a diversas razones (figura 10). Estos resultados se indicaron como porcentaje de lisis específica a la razón de E/T de 20.

Con respecto al clon de CTL frente a CXADRL1-207, para examinar las características de esos clones de CTL, se sometieron a prueba anticuerpos frente a HLA clase I, HLA clase II, CD4 y CD8 para determinar su capacidad para inhibir la actividad citotóxica. La citotoxicidad del clon de CTL frente a células SNU475 se inhibió significativamente cuando se usaron anticuerpo anti-HLA clase I y anticuerpo anti-CD8 (figura 11), lo que indica que el clon de CTL reconoce el péptido derivado de CXADRL1 de una manera de HLA clase I y CD8.

(12) Expresión y caracterización de gen humano novedoso GCUD1

El análisis de transferencia de tipo Northern de múltiples tejidos usando ADNc de GCUD1 como sonda mostró un transcrito de 5,0 kb expresado específicamente en testículos, ovarios y cerebro (figura 12). Aunque la secuencia de nucleótidos de KIAA0913 (número de registro de GenBank: XM-014766), correspondiente a GCUD1, consistía en 4987 nucleótidos, experimentos de RT-PCR usando tejidos de testículos, ovarios y cáncer revelaron un transcrito que consistía en 4987 nucleótidos que contenía un marco de lectura abierto de 1245 nucleótidos (SEQ ID NO: 3) (número de registro de GenBank: AB071705). Además, se buscó la secuencia genómica correspondiente a GCUD1 en bases de datos genómica para encontrar una secuencia preliminar asignada a la banda cromosómica 7p14 (número de registro de GenBank: NT-007819). La comparación entre la secuencia de ADNc y la secuencia genómica reveló que el gen de GCUD1 consistía en 8 exones.

(13) Localización subcelular de GCUD1

Se clonó la región codificante entera correspondiente a GCUD1 en el vector pCDNA3.1myc/His y se transfectó transitoriamente el constructo en células COS7. La tinción inmunocitoquímica de las células COS7 reveló que la proteína GCUD1 con etiqueta estaba presente en el citoplasma (figura 13).

(14) Efecto de GCUD1 sobre el crecimiento celular

Para analizar el efecto de GCUD1 sobre el crecimiento celular, se realizó un ensayo de formación de colonias transfectando células NIH3T3 con un plásmido que expresaba GCUD1 (pcDNA3.1myc/His-GCUD1). En comparación con un plásmido control (pcDNA3.1myc/His-LacZ), pcDNA3.1myc/His-GCUD1 indujo notablemente más colonias en las células NIH3T3 (figura 14). Este resultado se confirmó mediante tres experimentos independientes.

(15) Supresión del crecimiento de células de cáncer gástrico mediante oligonucleótidos S antisentido diseñados para reducir la expresión de GCUD1

Para someter a prueba si la supresión de GCUD1 podía dar como resultado la muerte celular de células de cáncer gástrico, se sintetizaron diversos oligonucleótidos S antisentido diseñados para suprimir la expresión de GCUD1. Seis días tras la transfección de los oligonucleótidos S antisentido respectivos, se midió la viabilidad de las células transfectedas mediante ensayo de MTT. Las células viables transfectedas con oligonucleótidos S antisentido (GCUD1-AS5 o -AS8) fueron notablemente menos numerosas que las transfectedas con oligonucleótidos S control (GCUD1-S5 o -S8) en células MKN-28 (figura 15). Este resultado se confirmó mediante tres experimentos independientes. Se observaron resultados similares con células MKN-1.

(16) Preparación de anticuerpo anti-GCUD1

Para examinar la expresión y explorar la función de GCUD1, se prepararon antisueros frente a GCUD1. Se extrajo proteína recombinante de GCUD1 y se purificó a partir de células bacterianas que expresaban proteína de fusión GST-GCUD1 (figura 16). Se usó la proteína recombinante para la inmunización de tres conejos. La inmunotransferencia con sueros anti-GCUD1 pero no con sueros preinmunitarios mostró una banda de 47 kD de GCUD1 con etiqueta de FLAG, que era casi idéntica en cuanto al tamaño a la detectada con anticuerpo anti-FLAG (figura 17).

(17) Predicción de péptidos candidatos derivados de GCUD1

La tabla 2 (GCUD1) muestra los péptidos candidatos (SEQ ID NO: 155-194) en el orden de alta afinidad de unión. En total se seleccionaron y examinaron cuarenta péptidos tal como se describe a continuación.

Tabla 2 Predicción de péptidos candidatos derivados de GCUD1

HLA-A*0201 9 meros				HLA-A*0201 10 meros			
Rango	secuencia	Puntuación	Posición	Rango	secuencia	Puntuación	Posición
1	SIFKPFIFV	369,77	303	1	FIFVdDVKLV	374,37	308
2	WLWGAEMGA	189,68	75	2	LIVDrDEAWV	366,61	158
3	IMISRPWL	144,26	68	3	FLTTaSGVSV	319,94	272
4	LLGMDLVRL	83,527	107	4	TMLEIEKQGL	234,05	371
5	FIFVDDVKL	49,993	308	5	ALLGmDLVRL	181,79	106
6	VCIDSEFFL	31,006	265	6	AIMIsRPWL	59,775	67
7	KPFIFVDDV	25,18	306	7	GVCIDSEFFL	59,628	264
8	IVDRDEAWV	22,761	159	8	KLVPkTQSPC	17,388	315
9	TLRDKASGV	21,672	257	9	FNFSvVFSPV	14,682	220
10	KMDAEHPEL	21,6	196	10	YISIDQVPRT	10,841	56
11	ALDVIVSLL	19,653	126	11	GEGEfNFSEV	10,535	216
12	YAQSQGWWT	19,639	207	12	WAAEkVTEGV	8,927	175
13	KLRSTMLEL	13,07	367	13	VLPQnRSSPC	8,446	281
14	YLIVDRDEA	11,198	157	14	AAAPpSYCFV	7,97	2

15	AAPPSYCFV	7,97	3	15	TMMNLRDKA	6,505	253
16	GMDLVRGL	6,171	109	16	EVGDIFYDCV	5,227	397
17	KVTEGVRCI	6,026	179	17	AEMGaNEHGV	5,004	79
18	CIDSEFFLT	4,517	266	18	GLVVfGKNSA	4,968	20
19	TVQTMNTL	4,299	250	19	QLSLtTKMDA	4,968	190
20	EMGANEHGV	3,767	80	20	RSIFkPFIFV	4,745	302

(18) Estimulación de las células T y establecimiento de clones de CTL usando los péptidos candidatos

Se cultivaron células linfoides usando estos péptidos candidatos derivados de GCUD1 de la manera descrita en "Materiales y métodos". Se expandieron las células linfoides resultantes que mostraban actividad citotóxica detectable, y se establecieron clones de CTL. Se propagaron clones de CTL a partir de las líneas de CTL descritas anteriormente usando métodos de dilución limitante. Los clones de CTL inducidos con GCUD1-196 (KMDAEHPPEL) (SEQ ID NO: 164) y GCUD1-272 (FLTTASGVSV) (SEQ ID NO: 177) mostraron las mayores actividades citotóxicas frente a la diana tratada con pulsos de péptidos cuando se compararon con aquellas frente a dianas no tratadas con pulsos de ningún péptido. En la figura 18 se muestra la actividad citotóxica de esos clones de CTL. Cada clon de CTL tenía una actividad citotóxica muy potente frente a la diana tratada con pulsos de péptidos sin mostrar ninguna actividad citotóxica frente a la diana no tratada con pulsos de ningún péptido.

(19) Actividad citotóxica frente a líneas celulares tumorales que expresan de manera endógena GCUD1 como diana

Se examinaron los clones de CTL preparados frente a péptidos predichos para determinar su capacidad para reconocer y destruir las células tumorales que expresaban de manera endógena GCUD1. La figura 19 muestra los resultados del clon de CTL 23 preparado frente a GCUD1-196 (SEQ ID NO: 164). El clon de CTL 23 mostró una potente actividad citotóxica frente a SNU475 que expresan GCUD1 y HLA-A*0201, sin embargo no mostró frente a MKN45 que expresan GCUD1 pero no HLA-A*0201.

(20) Especificidad de CTL establecidos

También se realizó un ensayo de inhibición de diana fría para confirmar la especificidad del con de CTL frente a GCUD1-196. Se usaron células SNU475 marcadas con ⁵¹Cr como diana caliente, mientras que se usaron células T2 tratadas con pulsos de GCUD1-196 sin marcaje con ⁵¹Cr como diana fría. Se inhibió significativamente la lisis celular específica frente a células SNU475, cuando se añadieron células T2 tratadas con pulsos de GCUD1-196 (SEQ ID NO: 164) en el ensayo a diversas razones (figura 20). Estos resultados se indicaron como porcentaje de lisis específica a la razón de E/T de 20.

Con respecto al clon de CTL frente a GCUD1-196 (SEQ ID NO: 164), para examinar las características de esos clones de CTL, se sometieron a prueba anticuerpos frente a HLA clase I, HLA clase II, CD4 y CD8 para determinar su capacidad para inhibir la actividad citotóxica. La citotoxicidad del clon de CTL frente a células SNU475 se inhibió significativamente cuando se usaron anticuerpo anti-HLA clase I y anticuerpo anti-CD8 (figura 21), lo que indica que el clon de CTL reconoce el péptido derivado de GCUD1 de una manera de HLA clase I y CD8.

(21) Identificación del gen FLJ20315 comúnmente regulado por incremento en cáncer de colon humano

Se compararon perfiles de expresión de 11 tejidos de cáncer de colon con tejidos mucosos no cancerosos del colon correspondientes a los mismos usando la micromatriz de ADNc que contenía 23040 genes. Según este análisis, los niveles de expresión de varios genes eran con frecuencia elevados en tejidos cancerosos en comparación con tejidos no cancerosos correspondientes. Entre ellos, un gen con un número de registro propio de B4469 correspondiente a un EST (FLJ20315), Hs.18457 en la agrupación UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>), se regulaba por incremento en los tejidos cancerosos en comparación con la mucosa no cancerosa correspondiente en un intervalo de aumento de entre 1,44 y 11,22 (figura 22a). FLJ20315 también se regulaba por incremento en 6 de 18 casos de cáncer gástrico, 12 de 20 casos de CHC, 11 de 22 casos de cáncer de pulmón (adenocarcinoma), 2 de 2 casos de seminomas testiculares y 3 de 9 casos de cáncer de próstata. Para aclarar los resultados de la micromatriz, se examinó la expresión de estos transcritos en muestras de cáncer de colon adicionales mediante RT-PCR semicuantitativa para confirmar el aumento de la expresión de FLJ20315 en 15 de los 18 tumores (figura 22b).

(22) Expresión y estructura de RNF43

Búsquedas de homología adicionales de la secuencia de FLJ20315 en bases de datos públicas usando el programa BLAST en el Centro Nacional de Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) identificaron EST incluyendo XM_097063, BF817142 y una secuencia genómica con un número de registro de GenBank NT-010651 asignada a la banda cromosómica 17pter-p13.1. Como resultado, se obtuvo una secuencia ensamblada de

5345 nucleótidos que contenía un marco de lectura abierto de 2352 nucleótidos (SEQ ID NO: 5) que codificaba para una proteína de 783 aminoácidos (SEQ ID NO: 6) (número de registro de GenBank: AB081837). El gen se denominó RNF43 (proteína de tipo dedo Ring 43). El primer ATG estaba flanqueado por una secuencia (AGCATGC) que coincidía con la secuencia consenso para el inicio de traducción en eucariotas, y por un codón de parada en el marco en sentido 5'. La comparación del ADNc y la secuencia genómica reveló que este gen consistía en 11 exones. Un análisis de transferencia de tipo Northern usando transferencias de tipo Northern de múltiples tejidos adultos humanos con un producto de PCR de RNF43 como sonda no logró detectar ninguna banda (datos no mostrados). Sin embargo, se detectó que se expresaba un transcrito de 5,2 kb en pulmón fetal y riñón fetal usando una transferencia de tipo Northern de tejido fetal humano con el mismo producto de PCR como sonda (figura 23a). Una búsqueda de motivos de proteína con la herramienta Simple Modular Architecture Research Tool (SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de>) reveló que la proteína predicha contenía un motivo de dedo Ring (codones 272-312) (figura 23b).

(23) Localización subcelular de la proteína RNF43 con etiqueta de myc

Para investigar la localización subcelular de la proteína RNF43, se transfectó de manera transitoria un plásmido que expresaba una proteína RNF43 con etiqueta de myc (pDNAMyc/His-RNF43) en células COS7. Un análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando extractos de las células y anticuerpo anti-myc reveló una banda de 85,5 KDa correspondiente a la proteína con etiqueta (figura 24a). La posterior tinción inmunohistoquímica de las células con el mismo anticuerpo indicó que la proteína estaba principalmente presente en el núcleo (figura 24b). Se observó una localización subcelular similar de la proteína RNF43 en células de cáncer de colon humanas SW480.

(24) Efecto de RNF43 sobre el crecimiento celular

Se realizó un ensayo de formación de colonias transfectando células NIH3T3 con un plásmido que expresaba RNF43 (pcDNA-RNF43). Las células transfectadas con pcDNA-RNF43 produjeron un número significativamente mayor de colonias que las células control (figura 25a). También se mostró actividad aumentada de formación de colonias mediante RNF43 en células SW480 en las que la expresión endógena de RNF43 era muy baja (datos no mostrados). Para investigar adicionalmente este efecto de fomentación del crecimiento, se establecieron células COS7 que expresaban de manera estable RNF43 exógena (COS7-RNF43) (figura 25b). La tasa de crecimiento de células COS7-RNF43 fue significativamente superior a la de células COS7-control en medios de cultivo que contenían FBS al 10% (figura 25c).

(25) Supresión del crecimiento de células de cáncer de colon mediante oligonucleótidos S antisentido diseñado para reducir la expresión de RNF43

Para someter a prueba si la supresión de la expresión de RNF43 podía dar como resultado el retardo del crecimiento y/o la muerte celular de células de cáncer de colon, se sintetizaron cinco pares de oligonucleótidos S control y antisentido correspondientes a RNF43 y se transfectaron en células de cáncer de colon LoVo, que mostraron un nivel superior de expresión de RNF43 entre las 11 líneas celulares de cáncer de colon examinadas. Entre los cinco oligonucleótidos S antisentido, RNF43-AS1 suprimió significativamente la expresión de RNF43 en comparación con oligonucleótidos S control (RNF43-S1) 12 horas tras la transfección (figura 26a). Seis días tras la transfección, el número de células supervivientes transfectadas con RNF43-AS1 fue significativamente inferior al de las transfectadas con RNF43-S1 lo que sugiere que la supresión de la expresión de RNF43 redujo el crecimiento y/o la supervivencia de células transfectadas (figura 26b). Se obtuvieron resultados coincidentes en tres experimentos independientes.

(26) Construcción de plásmidos que expresan ARNip de RNF43 y su efecto sobre el crecimiento de células de cáncer de colon

En células de mamífero, se ha mostrado recientemente que el ARN de interferencia pequeño (ARNip) compuesto por ARN bicatenario de 20 ó 21 meros (ARNbc) con 19 nucleótidos complementarios y dímeros de timidina o uridina complementarios en el extremo 3' terminal, tiene un efecto de silenciamiento génico específico del gen sin inducir cambios globales en la expresión génica. Por tanto, se construyeron plásmidos que expresaban diversos ARNip de RNF43 para examinar su efecto sobre la expresión de RNF43. Entre los diversos ARNip de RNF43, psiH1BX-RNF16-4 y psiH1BX-RNF1834 suprimieron significativamente la expresión de RNF43 en células SNUC4 (figura 27A). Para someter a prueba si la supresión de RNF43 da como resultado la supresión del crecimiento de células de cáncer de colon, se transfectaron células SNUC4 con psiH1BX-RNF16-4, psiH1BX-RNF1834 o vector control. En línea con los datos de oligonucleótidos S antisentido, el número de células viables transfectadas con psiH1BX-RNF16-4 o psiH1BX-RNF1834 fue inferior al número de células control viables (figura 27B, 27C).

(27) Secreción de proteína RNF43 con etiqueta de Flag en medios cultivo de células COS7 con proteína RNF43 con etiqueta de Flag exógena

Dado que una búsqueda de motivos de proteína con la secuencia de aminoácidos de RNF43 usando la herramienta Simple Modular Architecture Research Tool (SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de>) predijo un péptido señal y un dominio de dedo Ring, se examinó la secreción de la proteína RNF43. Se transfectó plásmido que expresaba RNF43 con etiqueta de Flag (pFLAG-RNF43) o RNF43 con etiqueta de myc (pcDNA3.1-Myc/His-RNF43), o vector control en

células COS7, y se cultivaron las células en medios complementados con un 0,5 % de suero bovino de ternera durante 48 horas. Un análisis de transferencia tipo Western con anticuerpo anti-Flag o anticuerpo anti-Myc detectó RNF43 con etiqueta de Flag o proteína con etiqueta de Myc en los medios que contenían células transfectadas con pFLAG-RNF43 o pcDNA3.1-Myc/His-RNF43, respectivamente, pero no en los medios que contenían células con vector control (figura 28A y 28B).

(28) Efecto de medios cultivados de células transfectadas con pFLAG-RNF43 sobre células NIH3T3

Dado que la expresión exógena de RNF43 confirió un efecto promotor del crecimiento sobre células NIH3T3, se examinó si RNF43 con etiqueta de Flag secretada también tenía un efecto proliferativo sobre células NIH3T3. Se cultivaron células NIH3T3 sin cambiar los medios, o con medios condicionados de células transfectadas con células transfectadas con control, o aquellas con pFlag-RNF43. Tal como se esperaba, las células transfectadas o bien con pFlag-RNF43 o bien con pcDNA3.1-Myc/His-RNF43 cultivadas en medios condicionados mostraron una tasa de crecimiento significativamente superior en comparación con células no tratadas o células transfectadas con vector control cultivadas en medios condicionados (figura 29A y 29B). Estos datos sugieren que RNF43 puede ejercer su efecto promotor del crecimiento de una manera autocrina.

(29) Preparación de proteína RNF43 amino-terminal y carboxilo-terminal recombinante

Para generar un anticuerpo específico frente a RNF43, se construyó un plásmido que expresaba proteína RNF43 con etiqueta de Nus (figura 30A). Tras la transformación del plásmido en células BL21trxB(DE3)pLysS de *E. coli*, se observó mediante SDS-PAGE la producción de una proteína recombinante en el extracto bacteriano con el tamaño esperado (figuras 30B y 30C).

(30) Identificación de proteínas que interaccionan con RNF43 mediante sistema de exploración de dos híbridos de levadura

Para aclarar el mecanismo oncogénico de RNF43, se buscaron proteínas que interaccionaban con RNF43 usando un sistema de exploración de dos híbridos de levadura. Entre los clones positivos identificados, NOTCH2 o STRIN interaccionaron con RNF43 mediante transformación simultánea de una célula de levadura con pAS2.1-RNF43 y pACT2-NOTCH2 (figura 31B), o pAS2.1-RNF43 y pACT2-STRIN (figura 32B). Las regiones responsables de la interacción en NOTCH2 y STRIN se indican en la figura 31A y la figura 32A, respectivamente.

(31) Predicción de péptidos de unión a HLA-A24 derivados de RNF43

Se exploró la secuencia de aminoácidos de RNF43 para seleccionar péptidos con una longitud de 9 ó 10 aminoácidos, péptidos que se unen a HLA-A24 usando el software de predicción de unión (http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform). La tabla 3 muestra los péptidos predichos (SEQ ID NO: 71-90) en el orden de alta afinidad de unión. En total se seleccionaron veinte péptidos y se examinaron tal como se describe a continuación.

Tabla 3

Péptidos de RNF43 predichos que se unen a HLA-A24

(http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform)

Posición de inicio	Secuencia de AA (9 meros)	Afinidad de unión ^{*1}	Posición de inicio	Secuencia de AA (10 meros)	Afinidad de unión
RNF43-331	SYQEPGRRL	360	RNF43-449	SYCTERSGYL	200
RNF43-350	HYHLPAAAYL	200	RNF43-350	HYHLPAAAYIL	200
RNF43-639	LFNLQKSSL	30	RNF43-718	CYSNSQPVLW	200
RNF43-24	GFGRTGLVL	20	RNF43-209	IFVILASVL	36
RNF43-247	RYQASCRQA	15	RNF43-313	VFNITEGDSF	15
RNF43-397	RAPGEQQRL	14	RNF43-496	TFCSSLSSDF	12
RNF43-114	RAPRPCLSL	12	RNF43-81	KLMQSHPLYL	12
RNF43-368	RPPRPGPFL	12	RNF43-54	KMDPTGKLNIL	9
RNF43-45	KAVIRVIPL	12	RNF43-683	HYTPSVAYPW	8
RNF43-721	NSQPVLWCL	10	RNF43-282	GQELRVISCL	4

En la tabla, la posición de inicio indica la ubicación de los aminoácidos desde el extremo N-terminal de RNF43.

(32) Estimulación de células T usando los péptidos predichos

- 5 Se generaron CTL frente a esos péptidos derivados de RNF43 según el método descrito en “Materiales y métodos”. Se expandieron los CTL resultantes que mostraban actividad citotóxica detectable, y se establecieron líneas celulares de CTL.

Las actividades citotóxicas de líneas de CTL inducidas mediante estimulación con péptidos de 9 meros (SEQ ID NO: 71-80) se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Citotoxicidad de líneas CTL (9 meros)

Posición de inicio	Secuencias de AA	Afinidad de unión	Citotoxicidad				Clones de CTL establecidos
			X20		X2		
			Pep(+)	Pep(-)	Pep(+)	Pep(-)	
RNF43-331	SYQEPGRRL	360,0	2%	1%	0%	0%	1
RNF43-350	HYHLPAAAYL	200,0	26%	17%	5%	4%	
RNF43-639	LFNLQKSSL	30,0	42%	33%	7%	5%	
RNF43-24	GFGRTGLVL	20,0	8%	9%	1%	2%	
RNF43-247	RYQASCRQA	15,0	71%	82%	28%	16%	
RNF43-397	RAPGEQQRL	14,4	41%	32%	15%	15%	13
RNF43-114	RAPRPCLSL	12,0	23%	26%	6%	9%	
RNF43-368	RPPRPGPFL	12,0	1%	0%	0%	0%	
RNF43-45	KAVIRVIPL	12,0	NE				
RNF43-721	NSQPVWLCL	10,0	68%	0%	26%	0%	

NE: Ningún establecimiento de líneas de CTL

- 10 Las líneas de CTL estimuladas con RNF43-350 (HYHLPAAAYL) (SEQ ID NO: 72), RNF43-639 (LFNLQKSSL) (SEQ ID NO: 73), y RNF43-721 (NSQPVWLCL) (SEQ ID NO: 80) mostraron actividades citotóxicas superiores sobre dianas tratadas con pulsos de péptidos en comparación con aquella sobre dianas que no se trataron con pulsos de ninguno de los péptidos. A partir de estos CTL, se estableció un clon de CTL con RNF43-639 y se establecieron 13 clones de CTL con RNF43-721.
- 15 La línea de CTL estimulada con RNF43-721 mostró una potente actividad citotóxica sobre las dianas tratadas con pulsos de péptidos sin mostrar ninguna actividad citotóxica significativa sobre dianas que no se trataron con pulsos de ninguno de los péptidos (figura 33).

Los resultados obtenidos examinando la actividad citotóxica de líneas de CTL estimuladas con los péptidos de 10 meros (SEQ ID NO: 81-90) se muestran en la tabla 5.

Tabla 5 Citotoxicidad de líneas CTL (10 meros)

Posición de inicio	Secuencias de AA	Afinidad de unión	Citotoxicidad				Clones de CTL establecidos
			X20		X2		
			Pep(+)	Pep(-)	Pep(+)	Pep(-)	
RNF43-449	SYCTERSGYL	200,0	1%	1%	0%	0%	
RNF43-350	HYHLPAAYLL	200,0			NE		
RNF43-718	CYSNSQPVWL	200,0			NE		
RNF43-209	IFVLILASVL	36,0			Sin síntesis		
RNF43-313	VFNLTEGDSF	15,0			Sin síntesis		
RNF43-496	TFCSSLSSDF	12,0	8%	9%	0%	0%	
RNF43-81	KLMQSHPLYL	12,0	10%	5%	2%	-3%	
RNF43-54	KMDPTGKLNL	9,6	5%	2%	0%	-1%	
RNF43-683	HYTPSVAYPW	8,4	0%	0%	0%	-1%	
RNF43-282	GQELRVISCL	8,4			NE		

NE: Ningún establecimiento de líneas de CTL

Las líneas de CTL estimuladas con RNF43-81 (KLMQSHPLYL) (SEQ ID NO: 87) o RNF43-54 (KMDPTGKLNL) (SEQ ID NO: 88) mostraron una actividad citotóxica modesta sobre dianas tratadas con pulsos de péptidos en comparación con aquella sobre dianas que no se trataron con pulsos de ninguno de los péptidos.

(33) Establecimiento de clones de CTL

Se propagaron clones de CTL a partir de las líneas de CTL descritas anteriormente usando el método de dilución limitante. Se establecieron 13 clones de CTL frente a RNF43-721 y 1 clon de CTL frente a RNF43-639 (véase la tabla 4 anterior). La actividad citotóxica de clones de CTL RNF43-721 se muestra en la figura 34. Cada clon de CTL tuvo una actividad citotóxica muy potente sobre dianas tratadas con pulsos de péptido sin mostrar ninguna actividad citotóxica sobre dianas que no se trataron con pulsos de ninguno de los péptidos.

(34) Actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer colorrectal que expresan de manera endógena RNF43 como diana

Se examinaron los clones de CTL preparados frente a péptidos predichos para determinar su capacidad para reconocer y destruir células tumorales que expresan de manera endógena RNF43. La figura 35 muestra los resultados del clon de CTL 45 preparado frente a RNF43-721. El clon de CTL 45 mostró una potente actividad citotóxica sobre HT29 y WiDR que expresan tanto RNF43 como HLA-A24. Por otro lado, el clon de CTL 45 no mostró ninguna actividad citotóxica ni sobre HCT116 (que expresa RNF43 pero no HLA-A24) ni sobre TISI (que expresa HLA-A24 pero no RNF43). Además, el clon de CTL 45 no mostró ninguna actividad citotóxica sobre TISI y SNU-C4 tratadas con pulsos de péptido irrelevante que expresan RNF43 pero poco HLA-A24 (datos no mostrados).

(35) Caracterización de CTL establecidos

Se realizó un ensayo de inhibición de diana fría para confirmar la especificidad del con de CTL frente a RNF43-721. Se usaron células HT29 marcadas mediante ⁵¹Cr como diana caliente, mientras que se usaron células TISI tratadas con pulsos de RNF43-721 sin marcaje con ⁵¹Cr como diana fría. Cuando se añadieron TISI tratadas con pulsos de RNF43-721 en el ensayo a diversas razones, se inhibió significativamente la lisis celular específica frente a las células diana HT29 (figura 36). Este resultado se indica como un porcentaje de lisis específica a la razón de E/T de 20. Para examinar las características del clon de CTL preparado frente al péptido RNF43, se sometieron a prueba anticuerpos frente a HLA clase I, HLA clase II, CD3, CD4 y CD8 para determinar su capacidad para inhibir la actividad citotóxica del clon de CTL. La citotoxicidad del clon de CTL sobre las células diana WiDR se inhibió significativamente cuando se usaron anticuerpos anti-HLA clase I, CD3 y CD8 (figura 37). El resultado indica que el clon de CTL reconoce el péptido derivado de RNF43 mediante HLA clase I, CD3 y CD8.

(36) Análisis de homología del péptido RNF43-721

- Los clones de CTL establecidos frente a RNF43-721 mostraron una actividad citotóxica muy potente. Este resultado puede indicar que la secuencia de RNF43-721 es homóloga a los péptidos derivados de otras moléculas que se sabe que sensibilizan el sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se realizó un análisis de homología de RNF43-721 usando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). No se encontró ninguna secuencia que correspondiera completamente o fuera sumamente homóloga a RNF43-721 entre las moléculas indicadas en BLAST (tabla 6).

Tabla 6

Análisis de homología de RNF43-721

- 10 (BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)

Identificación (9/9) 0

Identificación (8/9) 0

Identificación (7/9) 0

Identificación (6/9) 2

- 15 Estos resultados indican que la secuencia de RNF43-721 es única y hay poca posibilidad de que los clones de CTL establecidos con RNF43-721 provoquen una respuesta inmunológica frente a otras moléculas.

(37) Modificación de RNF43-721 para mejorar la eficacia de presentación de epítomos

- 20 Para mejorar la eficacia de presentación de péptidos, se modificó el péptido RNF43-721 en alternaciones de aminoácidos en el sitio de anclaje. Se esperaba que la modificación mejorara la afinidad de unión del péptido a la molécula de HLA clase I. La tabla 7 demuestra una mejor afinidad de unión a la molécula HLA-A24 de RNF43-721 con alternaciones de aminoácidos en la posición 2 (SEQ ID NO: 91 y 92).

Tabla 7 Capacidades de unión predichas de los péptidos modificados a partir del péptido nativo RNF43-721

Secuencia	Puntuación	Rango*
NSQPVWLCL	10,08	10
NEQPVWLCL	50,40	3
NYQPVWLCL	504,00	1

* En péptidos de 9 meros restringidos por HLA-A24

(38) Predicción de péptidos candidatos derivados de RNF43

- 25 La tabla 8 muestra péptidos candidatos (SEQ ID NO: 87, y 93-111) en orden de alta afinidad de unión.

Tabla 8

RNF43: Predicción de péptidos epítomos (HLA-A*0201)

9 meros					10 meros			
N.º	Posición de inicio	Secuencias	Puntuación		N.º	Posición de inicio	Secuencias	Puntuación
1	60	KLNLTLGV	274,3		11	81	KLMQSHPLYL	1521,5
2	8	QLAALWPWL	199,7		12	357	YLLGPSRSASV	1183,7
3	82	LMQSHPLYL	144,2		13	202	LMTVVGTIFV	469,6
4	358	LLGPSRSASV	118,2		14	290	CLHEFHRNCV	285,1
5	11	ALWPWLLMA	94,8		15	500	SLSSDFDPLV	264,2
6	15	WLLMATLQA	84,5		16	8	QLAAIWPWLL	160,2
7	200	WILMTVVGT	40,1		17	11	ALWPWLLMAT	142,2
8	171	KLMEFVYKN	34,5		18	7	LQLAALWPWL	127,3
9	62	NLTLEGVFA	27,3		19	726	WLCLTPRQPL	98,2
10	156	GLTWPVLI	23,9		20	302	WLHQHRTCPL	98,2

En total se seleccionaron veinte péptidos y se examinaron tal como se describió anteriormente.

5 (39) Estimulación de células T usando péptidos candidatos

Se cultivaron células linfoides usando los péptidos candidatos derivados de RNF43 según el método descrito en "Materiales y métodos". Se expandieron las células linfoides resultantes que mostraron actividad citotóxica detectable, y se establecieron líneas de CTL. Las actividades citotóxicas de las líneas de CTL inducidas mediante la estimulación usando péptidos de 9 meros (SEQ ID NO: 93-102) se muestran en la tabla 9.

Tabla 9

Citotoxicidad de líneas de CTL (HLA-A*0201 9 meros)						
Posición de inicio	Secuencias de AA	Afinidad de unión	Citotoxicidad (%)			
			X20		X2	
			Pep(+)	Pep(-)	Pep(+)	Pep(-)
RNF43-60	KLNLTLGV	274,3	-2,1	0,2	-1,6	0,0
RNF43-8	QLAALWPWL	199,7	3,5	0,0	0,0	1,0
RNF43-82	LMQSHPLYL	144,2	1,7	1,2	0,0	-0,4
RNF43-358	LLGPSRSAV	118,2	-0,4	-0,7	0,0	-0,8
RNF43-11	ALWPWLLMA	94,8	90,2	1,5	45,4	1,3
RNF43-15	WLLMATLQA	84,5	-0,2	0,0	-0,4	-0,9
RNF43-200	WILMTVVGT	40,1	Sin síntesis			
RNF43-171	KLMEFVYKN	34,5	2,6	0,0	1,1	-0,5
RNF43-62	NLTLEGVFA	27,3	Sin síntesis			
RNF43-156	GLTWPVCLI	23,9	-0,4	0,7	-0,5	-0,3
NE: Ningún establecimiento de líneas de CTL						

Las líneas de CTL inducidas con RNF43-11-9 (ALWPWLLMA) (SEQ ID NO: 97) mostraron actividades citotóxicas superiores sobre la diana tratada con pulsos de péptidos en comparación con aquellas sobre la diana que no se trató con pulsos de ninguno de los péptidos. A partir de estos CTL, se establecieron cuatro clones de CTL con RNF43-11-9. La línea de CTL estimulada con RNF43-11-9 mostró una potente actividad citotóxica sobre la diana tratada con pulsos de péptido son mostrar ninguna actividad citotóxica significativa sobre la diana que no se trató con pulsos de ninguno de los péptidos (figura 38A).

Los resultados del examen sobre la actividad citotóxica de líneas de CTL inducidas con los péptidos de 10 meros (SEQ ID NO: 87, y 103-111) se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

Citotoxicidad de líneas de CTL (HLA-A*0201 10 meros)						
Posición de inicio	Secuencias de AA	Afinidad de unión	Citotoxicidad (%)			
			X20		X2	
			Pep(+)	Pep(-)	Pep(+)	Pep(-)
RNF43-81	KLMQSHPLYL	1521,5	18,0	27,6	6,3	8,3
RNF43-357	YLLGPSRSAV	1183,7	18,2	15,4	3,7	3,0
RNF43-202	LMTVVGTTFV	469,6	Sin síntesis			
RNF43-290	CLHEFHRNCV	285,1	9,6	9,7	2,7	3,7
RNF43-500	SLSSDFDPLV	264,2	NE			
RNF43-8	QLAAIWPLL	160,2	6,7	9,0	1,1	1,3
RNF43-11	ALWPWLLMAT	142,2	91,5	27,1	40,5	4,3
RNF43-7	LQLAALWPWL	127,3	NE			
RNF43-726	WLCLTPRQPL	98,2	NE			
RNF43-302	WLHQHRTCPL	98,2	7,4	6,1	1,5	2,2
NE: Ningún establecimiento de líneas de CTL						

Las líneas de CTL inducidas con RNF43-11-10 (ALWPWLLMAT) (SEQ ID NO: 108) mostraron una actividad citotóxica superior sobre la diana tratada con pulsos de péptidos en comparación con aquella sobre la diana que no se trató con pulsos de ninguno de los péptidos (figura 38B).

5 (40) Establecimiento de clones de CTL

Se propagaron clones de CTL a partir de las líneas de CTL descritas anteriormente usando el método de dilución limitante. Se establecieron cuatro clones de CTL frente a RNF43-11-9 (véase la tabla 9 anterior). La actividad citotóxica de clones de CTL derivados de péptidos de RNF43 se muestra en las figuras 39A y 39B. Cada clon de CTL tenía una actividad citotóxica muy potente sobre la diana tratada con pulsos de péptidos sin mostrar ninguna actividad citotóxica sobre la diana que no se trató con pulsos de ninguno de los péptidos.

(41) Actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer colorrectal que expresan de manera endógena RNF43 como dianas

Se examinaron los clones de CTL generados frente a los péptidos predichos para determinar su capacidad para reconocer y destruir células tumorales que expresan de manera endógena RNF43. Las figuras 40A y 40B muestran los resultados obtenidos para los clones de CTL preparados frente a péptidos derivados de RNF43. Los clones de CTL mostraron una potente actividad citotóxica sobre DLD-1 que expresa RNF43 y HLA-A*0201, pero ninguna sobre HT29 que expresa RNF43 pero no HLA-A*0201.

(42) Especificidad de clones de CTL

Se realizó un ensayo de inhibición de diana fría para confirmar la especificidad del clon de CTL frente a RNF43-5-11 (9 meros). Se usaron células HCT116 marcadas con ⁵¹Cr como diana caliente, mientras que se usaron células T2 tratadas con pulsos de RNF43-5 sin marcaje con ⁵¹Cr como diana fría. Se inhibió significativamente la lisis celular específica de las células diana HCT-116 cuando se añadieron células T2 tratadas con pulsos de RNF43-5 en el ensayo a diversas razones (figura 41).

Aplicabilidad industrial

La expresión de los genes humanos novedosos *CXADRL1* y *GCUD1* está notablemente elevada en el cáncer gástrico en comparación con tejidos estomacales no cancerosos. Por otro lado, la expresión del gen humano novedoso RNF43 está notablemente elevada en cánceres colorrectales en comparación con tejidos mucosos no cancerosos. Por consiguiente, estos genes pueden servir como marcador de diagnóstico del cáncer y las proteínas codificadas por los mismos pueden usarse en ensayos de diagnóstico del cáncer.

Los presentes inventores también han mostrado que la expresión de la proteína novedosa CXADRL1, GCUD1 o RNF43 promueve el crecimiento celular mientras que se suprime el crecimiento celular mediante oligonucleótidos antisentido o ARN de interferencia pequeños correspondientes al gen *CXADRL1*, *GCUD1*, o *RNF43*. Estos hallazgos sugieren que cada una de las proteínas CXADRL1, GCUD1 y RNF43 estimulan la actividad oncogénica. Por tanto, cada una de esas oncoproteínas novedosas es una diana útil para el desarrollo de productos farmacéuticos anticancerígenos. Por ejemplo, agentes que bloquean la expresión de CXADRL1, GCUD1 o RNF43, o previenen su actividad pueden encontrar utilidad terapéutica como agentes anticancerígenos, particularmente agentes anticancerígenos para el tratamiento de cánceres gástricos y colorrectales. Los ejemplos de tales agentes incluyen oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia pequeños y anticuerpos que reconocen CXADRL1, GCUD1 o RNF43.

Además, los presentes inventores han mostrado que CXADRL1 interacciona con AIP1. Se espera que la actividad de proliferación celular de CXADRL1 se regule mediante su unión a AIP1. Por tanto, agentes que inhiben la actividad de la formación de un complejo compuesto por CXADRL1 y AIP1 también pueden encontrar utilidad en el tratamiento y la prevención del cáncer, específicamente cánceres colorrectal, de pulmón, gástrico y de hígado. Alternativamente, los presentes inventores han mostrado que RNF43 interacciona con NOTCH2 o STRIN. Se espera que la actividad de proliferación celular de RNF43 se regule mediante su unión a NOTCH2 o STRIN. Por tanto, agentes que inhiben la actividad de la formación de un complejo compuesto por RNF43 y NOTCH2 o STRIN también pueden encontrar utilidad en el tratamiento y la prevención del cáncer, específicamente cánceres colorrectal, de pulmón, gástrico y de hígado.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. JAPÓN REPRESENTADO POR EL PRESIDENTE DE LA UNIVERSIDAD DE TOKIO

<120> GENES Y POLIPÉPTIDOS RELACIONADOS CON CÁNCERES DE COLON HUMANOS

<130> ONC-A0203Y2P

<150> Documento US 60/386.985

<151> 06-06-2002

<150> Documento US 60/415.209

<151> 30-09-2002

<150> Documento US 60/451.013

<151> 28-02-2003

<160> 194

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 3423

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (238).. (1533)

<223>

<400> 1

gctggcgagc ccggaacgcc tctgggcaca gctcagcgtc cgcggagccg ggcggcgctg	60
gagctgcact tggctcgtct gtgggtctga cagtcccagc tctgcgcggg gaacagcggc	120
ccggagctgg gtgtgggagg accaggctgc cccaagagcg cggagactca cgcccgcctcc	180
tctcctgttg cgaccgggag ccgggtagga ggcaggcgcg ctccctgcgg ccccggg	237
atg act tct cag cgt tcc cct ctg gcg cct ttg ctg ctc ctc tct ctg	285
Met Thr Ser Gln Arg Ser Pro Leu Ala Pro Leu Leu Leu Leu Ser Leu	
1 5 10 15	
cac ggt gtt gca gca tcc ctg gaa gtg tca gag agc cct ggg agt atc	333
His Gly Val Ala Ala Ser Leu Glu Val Ser Glu Ser Pro Gly Ser Ile	
20 25 30	

cag gtc gcc cgg ggt cag cca gca gtc ctg ccc tgc act ttc act acc	381
Gln Val Ala Arg Gly Gln Pro Ala Val Leu Pro Cys Thr Phe Thr Thr	
35 40 45	
ago gct gcc ctc att aac ctc aat gtc att tgg atg gtc act cct ctc	429
Ser Ala Ala Leu Ile Asn Leu Asn Val Ile Trp Met Val Thr Pro Leu	
50 55 60	
tcc aat gcc aac caa cct gaa cag gtc atc ctg tat cag ggt gga cag	477
Ser Asn Ala Asn Gln Pro Glu Gln Val Ile Leu Tyr Gln Gly Gly Gln	
65 70 75 80	
atg ttt gat ggt gcc ccc cgg ttc cac ggt agg gta gga ttt aca ggc	525
Met Phe Asp Gly Ala Pro Arg Phe His Gly Arg Val Gly Phe Thr Gly	
85 90 95	
acc atg cca gct acc aat gtc tct atc ttc att aat aac act cag tta	573
Thr Met Pro Ala Thr Asn Val Ser Ile Phe Ile Asn Asn Thr Gln Leu	
100 105 110	
tca gac act ggc acc tac cag tgc ctg gtc aac aac ctt cca gac ata	621
Ser Asp Thr Gly Thr Tyr Gln Cys Leu Val Asn Asn Leu Pro Asp Ile	
115 120 125	
ggg ggc agg aac att ggg gtc acc ggt ctc aca gtg tta gtt ccc cct	669
Gly Gly Arg Asn Ile Gly Val Thr Gly Leu Thr Val Leu Val Pro Pro	
130 135 140	
tct gcc cca cac tgc caa atc caa gga tcc cag gat att ggc agc gat	717
Ser Ala Pro His Cys Gln Ile Gln Gly Ser Gln Asp Ile Gly Ser Asp	
145 150 155 160	
gtc atc cta ctc tgt agc tca gag gaa ggc att cct cga cca act tac	765
Val Ile Leu Leu Cys Ser Ser Glu Glu Gly Ile Pro Arg Pro Thr Tyr	
165 170 175	
ctt tgg gag aag tta gac aat acc ctc aaa cta cct cca aca gct act	813
Leu Trp Glu Lys Leu Asp Asn Thr Leu Lys Leu Pro Pro Thr Ala Thr	
180 185 190	
cag gac cag gtc cag gga aca gtc acc atc cgg aac atc agt gcc ctg	861
Gln Asp Gln Val Gln Gly Thr Val Thr Ile Arg Asn Ile Ser Ala Leu	
195 200 205	
tct tca ggt ttg tac cag tgc gtg gct tct aat gct att gga acc agc	909
Ser Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Val Ala Ser Asn Ala Ile Gly Thr Ser	
210 215 220	

acc tgt ctt ctg gat ctc cag gtt att tca ccc cag ccc agg aac att Thr Cys Leu Leu Asp Leu Gln Val Ile Ser Pro Gln Pro Arg Asn Ile 225 230 235 240	957
gga cta ata gct gga gcc att ggc act ggt gca gtt att atc att ttt Gly Leu Ile Ala Gly Ala Ile Gly Thr Gly Ala Val Ile Ile Ile Phe 245 250 255	1005
tgc att gca cta att tta ggg gca ttc ttt tac tgg aga agc aaa aat Cys Ile Ala Leu Ile Leu Gly Ala Phe Phe Tyr Trp Arg Ser Lys Asn 260 265 270	1053
aaa gag gag gaa gaa gaa gaa att cct aat gaa ata aga gag gat gat Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ile Pro Asn Glu Ile Arg Glu Asp Asp 275 280 285	1101
ctt cca ccc aag tgt tct tct gcc aaa gca ttt cac act gag att tcc Leu Pro Pro Lys Cys Ser Ser Ala Lys Ala Phe His Thr Glu Ile Ser 290 295 300	1149
tcc tcg gac aac aac aca cta acc tct tcc aat gcc tac aac agt cga Ser Ser Asp Asn Asn Thr Leu Thr Ser Ser Asn Ala Tyr Asn Ser Arg 305 310 315 320	1197
tac tgg agc aac aat cca aaa gtt cat aga aac aca gat tca gtc agc Tyr Trp Ser Asn Asn Pro Lys Val His Arg Asn Thr Asp Ser Val Ser 325 330 335	1245
cac ttc agt gac ttg ggc caa tct ttc tct ttc cac tca ggc aat gcc His Phe Ser Asp Leu Gly Gln Ser Phe Ser Phe His Ser Gly Asn Ala 340 345 350	1293
aac ata cca tcc att tat gct aat ggg acc cat ctg gtc ccg ggt caa Asn Ile Pro Ser Ile Tyr Ala Asn Gly Thr His Leu Val Pro Gly Gln 355 360 365	1341
cat aag act ctg gta gtg aca gcc aac aga ggg tca tca cca cag gtg His Lys Thr Leu Val Val Thr Ala Asn Arg Gly Ser Ser Pro Gln Val 370 375 380	1389
atg tcc agg agc aat ggc tca gtc agt agg gag cct cgg cct cca cac Met Ser Arg Ser Asn Gly Ser Val Ser Arg Glu Pro Arg Pro Pro His 385 390 395 400	1437
act cat tcc tac acc atc agc cac gca aca ctg gaa cga att ggt gca Thr His Ser Tyr Thr Ile Ser His Ala Thr Leu Glu Arg Ile Gly Ala 405 410 415	1485

gta cct gtc atg gta cca gcc cag agt cgg gcc ggg tcc ttg gta tag	1533
Val Pro Val Met Val Pro Ala Gln Ser Arg Ala Gly Ser Leu Val	
420 425 430	
gacatgagga aatgtttgtgt tcagaaatga ataaatggaa tgccctcata caagggggag	1593
ggtgggggtgg ggagtgtctgg gaaagaaaca cticcattata attatattag taaaatgcac	1653
aaagaagaag gcagtgtctgt taotttggcca ctaagatgtg taaaatggac tgaaatgcto	1713
catcatgaag acttgcttcc ccaccaaaga tgtcctggga ttctgttga totcaaagat	1773
gtgccaagcc aaggaaaaag atacaagagc agaatagtag ttaaaatcca aactgocgcc	1833
cagatgggct tgttcttcat gcctaactta ataattttta agagattaaa gtgccagatg	1893
gagtttaaat attgaaatta ttttaaaagg taggtgtctt taagaaaata acaagcaacc	1953
ctgtgatatg ttccgtctct cccaattccc tcgttatata gagggcttaa tgggtataaat	2013
ggttaatat ggtcccaaca gggctgactc ttctatcata taatcaaac tttttacatg	2073
agcaaaattc agtaagaaat gggggaagac aaaggaaacg tctttgagaa gccccttcat	2133
atttatattat ttatctcttc ctgaaccatg aatttcatat gtggaatatt gctatattga	2193
cagattcttg cctgtctgtg ttattctagg atctgttaca ggtccatggc aattactgtt	2253
tatTTTTTcc tggaaaaata tttttttata aaaggctttt tttttttttt aaatacatga	2313
gaggcattgg gctaagaaag aaaagactgt tgtataatac cttgttcaat ggttgtattt	2373
agtgagctca tagaggcca tcatatcatg accgagctag gttgtgtggg caggaaggta	2433
gggctaaggg gttgtagcct tgctgggcag cctctcagag caaggttgtt cagatctccc	2493
ttgctattac agtaggttac tattaatgag ggcagcacct gatgcctttt gtactgaggt	2553
atgtaacttt ctcttattt gacaagtaga agttaactta cttgtcaggg agggcagacg	2613
tttttttggt ctgtttcgtt tttcaaaata atgctttttg caaaagaggt aagactgaga	2673
ctaaagggtg tatctttctgg tgtgtctctg gaagtgtcta ccctacattt gtgtcagctc	2733
agggttgcag tgttggccag atgcatttta catcactgta aagagattac ttttgtgggt	2793
actacctggc ttggctggcc ttgcgggtta ccagattaat ttacaaactc ccccacttta	2853

ttttgtgcta tgtagatctg gccatacttg cattagtgac tgtcttgcct taaccacact	2913
taagcaaccc acaaatttct tctcagattt gtttcctaga ttacttatga tactcatccc	2973
atgtctcaat aagagtgtct tttctttctg gatgtgttct cttactccct cttaccacca	3033
tactttttgc tctcttctcc tgcaagcgta gtcttcacag ggagtggctt cctgacattt	3093
ttttcagtta tgtgaatgaa tggaaaccaa cagctgctgc aaacactgtt tttccaagaa	3153
ggctacactc agaacctaac cattgccaac catttcagta ttgataaaaa gctgaattta	3213
cttttagcatt acttattttt ttttccattt gatggttctt actttgtaaa aatttaaata	3273
aatgaatgtc tatacttttt ataaagaaaa gtgaaaatac catgacactg aaaagatgat	3333
gctatcagat gctgtttaga aagcatttat cttgcatttc tttattcttt ctaattatct	3393
aaaattcaat aaaattttat tcatataaaa	3423

<210> 2

<211> 431

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

Ser Asp Thr Gly Thr Tyr Gln Cys Leu Val Asn Asn Leu Pro Asp Ile
 115 120 125

Gly Gly Arg Asn Ile Gly Val Thr Gly Leu Thr Val Leu Val Pro Pro
 130 135 140

Ser Ala Pro His Cys Gln Ile Gln Gly Ser Gln Asp Ile Gly Ser Asp
 145 150 155 160

Val Ile Leu Leu Cys Ser Ser Glu Glu Gly Ile Pro Arg Pro Thr Tyr
 165 170 175

Leu Trp Glu Lys Leu Asp Asn Thr Leu Lys Leu Pro Pro Thr Ala Thr
 180 185 190

Gln Asp Gln Val Gln Gly Thr Val Thr Ile Arg Asn Ile Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Val Ala Ser Asn Ala Ile Gly Thr Ser
 210 215 220

Thr Cys Leu Leu Asp Leu Gln Val Ile Ser Pro Gln Pro Arg Asn Ile
 225 230 235 240

Gly Leu Ile Ala Gly Ala Ile Gly Thr Gly Ala Val Ile Ile Ile Phe
 245 250 255

Cys Ile Ala Leu Ile Leu Gly Ala Phe Phe Tyr Trp Arg Ser Lys Asn
 260 265 270

Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ile Pro Asn Glu Ile Arg Glu Asp Asp
 275 280 285

Leu Pro Pro Lys Cys Ser Ser Ala Lys Ala Phe His Thr Glu Ile Ser
 290 295 300

Ser Ser Asp Asn Asn Thr Leu Thr Ser Ser Asn Ala Tyr Asn Ser Arg
 305 310 315 320

Tyr Trp Ser Asn Asn Pro Lys Val His Arg Asn Thr Asp Ser Val Ser
 325 330 335

His Phe Ser Asp Leu Gly Gln Ser Phe Ser Phe His Ser Gly Asn Ala
 340 345 350

Asn Ile Pro Ser Ile Tyr Ala Asn Gly Thr His Leu Val Pro Gly Gln
 355 360 365

His Lys Thr Leu Val Val Thr Ala Asn Arg Gly Ser Ser Pro Gln Val
370 375 380

Met Ser Arg Ser Asn Gly Ser Val Ser Arg Glu Pro Arg Pro Pro His
385 390 395 400

Thr His Ser Tyr Thr Ile Ser His Ala Thr Leu Glu Arg Ile Gly Ala
405 410 415

Val Pro Val Met Val Pro Ala Gln Ser Arg Ala Gly Ser Leu Val
420 425 430

<210> 3

<211> 4987

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (60).. (1304)

<223>

10 <400> 3

gcggccgcag cctcagcacc gcagagcgga gagcggagcc cggagcccgcc cgccccagg	59
atg gct gca gct cct cca agt tac tgt ttt gtt gcc ttc cct cca cgt Met Ala Ala Ala Pro Pro Ser Tyr Cys Phe Val Ala Phe Pro Pro Arg 1 5 10 15	107
gct aag gat ggt ctg gtg gta ttt ggg aaa aat tca gcc cgg ccc aga Ala Lys Asp Gly Leu Val Val Phe Gly Lys Asn Ser Ala Arg Pro Arg 20 25 30	155
gat gaa gtg caa gag gtt gtg tat ttc tcg gct gct gat cac gaa ccg Asp Glu Val Gln Glu Val Val Tyr Phe Ser Ala Ala Asp His Glu Pro 35 40 45	203
gag agc aag gtt gag tgc act tac att tca atc gac caa gtt cca agg Glu Ser Lys Val Glu Cys Thr Tyr Ile Ser Ile Asp Gln Val Pro Arg 50 55 60	251
acc tat gcc ata atg ata agc aga ccc gcc tgg ctc tgg gga gca gaa Thr Tyr Ala Ile Met Ile Ser Arg Pro Ala Trp Leu Trp Gly Ala Glu 65 70 75 80	299
atg gga gcc aat gaa cat gga gtg tgc ata gcc aat gaa gcc atc aac	347

Met Gly Ala Asn Glu His Gly Val Cys Ile Ala Asn Glu Ala Ile Asn	
85 90 95	
acc aga gag cca gct gcc gag ata gaa gcc ttg ctg ggg atg gat ctg	395
Thr Arg Glu Pro Ala Ala Glu Ile Glu Ala Leu Leu Gly Met Asp Leu	
100 105 110	
gtc agg ctt ggt tta gaa aga ggg gaa aca gct aaa gaa gcc tta gat	443
Val Arg Leu Gly Leu Glu Arg Gly Glu Thr Ala Lys Glu Ala Leu Asp	
115 120 125	
gtc att gtc tcc ttg ttg gaa gaa cat gga caa ggt ggg aat tac ttt	491
Val Ile Val Ser Leu Leu Glu Glu His Gly Gln Gly Gly Asn Tyr Phe	
130 135 140	
gaa gat gca aac tcc tgc cac agc ttc caa agt gca tat ctg att gtg	539
Glu Asp Ala Asn Ser Cys His Ser Phe Gln Ser Ala Tyr Leu Ile Val	
145 150 155 160	
gat cgt gat gaa gcc tgg gtg ctc gag acc ata ggg aag tac tgg gct	587
Asp Arg Asp Glu Ala Trp Val Leu Glu Thr Ile Gly Lys Tyr Trp Ala	
165 170 175	
gcc gag aaa gtc aca gag gga gtg agg tgc att tgc agt cag ctt tcg	635
Ala Glu Lys Val Thr Glu Gly Val Arg Cys Ile Cys Ser Gln Leu Ser	
180 185 190	
ctc acc act aag atg gat gca gag cat ccg gaa ctc agg agt tac gct	683
Leu Thr Thr Lys Met Asp Ala Glu His Pro Glu Leu Arg Ser Tyr Ala	
195 200 205	
cag agc caa ggt tgg tgg acg gga gag ggc gag ttc aat ttt tcc gaa	731
Gln Ser Gln Gly Trp Trp Thr Gly Glu Gly Glu Phe Asn Phe Ser Glu	
210 215 220	
gtc ttt tct cca gtt gag gat cat cta gac tgc ggt gct ggc aaa gac	779
Val Phe Ser Pro Val Glu Asp His Leu Asp Cys Gly Ala Gly Lys Asp	
225 230 235 240	
agc tta gaa aaa caa gaa gaa agc atc aca gtg cag act atg atg aac	827
Ser Leu Glu Lys Gln Glu Glu Ser Ile Thr Val Gln Thr Met Met Asn	
245 250 255	
acc tta cgg gac aaa gcc agc gga gtg tgc ata gac tct gag ttt ttc	875
Thr Leu Arg Asp Lys Ala Ser Gly Val Cys Ile Asp Ser Glu Phe Phe	
260 265 270	
ctc acc aca gcc agt gga gtg tct gtc ctg ccg cag aat aga agc tct	923

Leu Thr Thr Ala Ser Gly Val Ser Val Leu Pro Gln Asn Arg Ser Ser			
275	280	285	
cgc tgc att cac tac ttc act gga acc cct gat cct tcc agg tcc ata	971		
Pro Cys Ile His Tyr Phe Thr Gly Thr Pro Asp Pro Ser Arg Ser Ile			
290	295	300	
ttc aag cct ttc atc ttt gtt gat gac gta aaa ctt gtc ccc aaa aca	1019		
Phe Lys Pro Phe Ile Phe Val Asp Asp Val Lys Leu Val Pro Lys Thr			
305	310	315	320
cag tct ccc tgt ttt ggg gat gac gac cct gcc aaa aag gag cct cgg	1067		
Gln Ser Pro Cys Phe Gly Asp Asp Asp Pro Ala Lys Lys Glu Pro Arg			
	325	330	335
ttc cag gag aaa cca gac cgc cgg cat gag ctg tac aaa gcc cac gag	1115		
Phe Gln Glu Lys Pro Asp Arg Arg His Glu Leu Tyr Lys Ala His Glu			
	340	345	350
tgg gca cgt gcc atc atc gaa agt gac cag gag caa ggt cgc aag ctg	1163		
Trp Ala Arg Ala Ile Ile Glu Ser Asp Gln Glu Gln Gly Arg Lys Leu			
	355	360	365
agg agc acc atg ctg gag ctg gag aag caa ggc ctg gaa gcc atg gaa	1211		
Arg Ser Thr Met Leu Glu Leu Glu Lys Gln Gly Leu Glu Ala Met Glu			
	370	375	380
gaa atc ctg acc agc tcc gag cca ctg gac cct gcg gaa gtg ggg gac	1259		
Glu Ile Leu Thr Ser Ser Glu Pro Leu Asp Pro Ala Glu Val Gly Asp			
385	390	395	400
ctt ttc tat gac tgt gtt gac acg gag att aag ttc ttt aag tga	1304		
Leu Phe Tyr Asp Cys Val Asp Thr Glu Ile Lys Phe Phe Lys			
	405	410	
agtaagcgtt ccctttcccc ttcttattta agacttccca ccttactaaa ttaccagcaa	1364		
aacaaaccac tctcctgttt gagtaaaatg agaaagttaa tatgtggcct ccttttctga	1424		
agccagatca aactgttacc ttgtgttcca ccttgaatct cacagcgtcc ccttctgcaa	1484		
tgtagggtctc cttcctgtgc agtgtaacat gtatcccggtt gcctgttggt cggttgtgtg	1544		
actaattgtg gattttaagc tgctattatt gtatttcagt ggcaatggac acattagcct	1604		
tttacaagag gactagagtt catcaagcct tgaaaggcag gcttcacagt gccgagttgg	1664		
cgggaaaagc aaattctttt gaagtcttag tctttccctc agtagcgggt tctttcaggt	1724		

taacaagagg catttgtgca cacacacagg gctcttgtgt gtgttgtaa ggggaccctc	1784
cgtggcctcc cgtgagtga tgctgtagt gcacagtgtc tctacagggtg tcttctgggg	1844
ggcagaacca attggaagga agaaaggac cctctccag tcctggctcc ttcctacatc	1904
ctgggctcct gaagaagctg tcttcccatt ttccatgcgc tgtgcttatg tgtggtggac	1964
tgcagagctg cttccactta caggagagct gataatttgt tagctggaac ctattcactt	2024
ccgagattca gacatagcca tgctgggtggc cttctgaatc actgcatgga tgtcccagga	2084
ggcagctctc cccacacagc agcacagcca tcacaggatt ccttgtgtag aaatgattcc	2144
cagtctagtt accaacagct agtctaggag taattgaatg gccctatggc acagttccac	2204
ccacagagta gtgaatctct cagccaagga gggaaagaaa aggaagaact cttgactatt	2264
tagattctag ttaaatactt ggaatcctag cagtcactac attatctcag cagagagact	2324
ttaattaaac tgatttggtt ccaatgtcgg gttcacttaa aggatttgac ttaccaccag	2384
agcatagaaa agcatgcaag gaagaccaga tgggcttagc attgggaaga cagagggcaa	2444
ggaggtgata gatggatata gaagcatttc tctgcaggat accagttcag gccccaccat	2504
tcctgccaag gccattacat cccacaaacc caaatacaaa gcagctgact tccctggatc	2564
ttccccccac tctcacacc tcacatgtcc caggagctgc cttcattcag gcgggtagct	2624
gcactgggca tgggggtggtg gtgggagctt accgccacct attcaagctc tcagctactc	2684
ctgaaacggg cagagatgat gaacagaagt gtatgtaaat acagcagcta gtgggagagc	2744
accagttggg cctaatacctg cctcatcatt cttggcagga atctgcaaatt ggaaacattg	2804
tgagtatcag caatctggga agtgacaggg ttaataactc cttcccagaa gctgtatcat	2864
gagattttga ggggaccgag ccctgttaca tggatgtgaa cagtgaggat cagaggtttt	2924
atcagaacac attctttttt tctaccaact ctccagagcg tgagtatagg agtgccatga	2984
gcttttttagt cagcagtttt gtaaactctg tatataaaat cattaaccac acattgtggg	3044
tgatgggaag acgatttcag ctgacagagt taatggcaac caataatggt ggcctgtagc	3104
tgctaagagc ttcacgcagg tttggcctgg gctttcactg ttggtgaatt tagagtgtcc	3164

ttttaggtgg ggcggctatt ctaaaagtgt ctttctatca ctgttaaggg ggggggaaag 3224
 tgaggttoga ggatgacgta ggtaactctc ccctccaag tccatgttcc aagtggctat 3284
 gtaaagcaag atgatacaga aagctgctct aaaatctcac tgagtgattt caccttcgcc 3344
 tactatgaaa tgtctcatca gacctgacat gtctgagata accaaggtga ttcaggattt 3404
 gatcaaaaga agtctagtaa gaattaatta cacagaagcc tcctttcatt tctatgggcc 3464
 aaacaaaggc catggataac cctacccgct ttatgtcatt acccattggg aaacacaatg 3524
 gctacttctg ttagggtaaca ttgacctgg tcaagcatct taaagaaggc aaccctaatt 3584
 gagagctgtc ttggctaata ctctgcacca caattgtgat gtccatagtc taccactaga 3644
 gggcatggta cagcctggca aaagttaaaa ggggtgtggc agctcccatc aggtctggag 3704
 gtggctctata agcacagtig acagtgtgac attgggatgg gtggagaaag acgacaagag 3764
 agcagagaat ctgctgatgt ggctgcgctt acttttagtg actttatgta cttatattaa 3824
 cagctggaaa taggttggtg ggttttgagc aggcgtttat agtgaggaat gttcattttt 3884
 aaatgttcct aacagatttt gcttttgaaa aatgcttggt acatgaataa tttgtggacc 3944
 agggattgct tttctgaagg cagtataggg aacatgaata ttcaagatga aatacaaaaa 4004
 ttatgtttta gggctcatagt gtataagtag ctccctagga aaccctttgt gtatcttttc 4064
 agactggggt gggggctgag catgcttggt cagaaagaag ccatagccag aaaggacaga 4124
 atctctcccc cactcccttg ccccataacc aaacataagc tagctagtct tgtctaatag 4184
 atgggattta ctataggtga agatagccct catattcaag gacagaagct ctggcaggag 4244
 taaattagca aagcagaaat agtacccttt cattcttgga ggtgctttga aattttaggt 4304
 agaataaat cgaaattatg gaggttcctt agtgotcaat aatataagac ctggtgttat 4364
 tagaacgagt ctttcttata aactaacaga gcaggatatat gcctgttaga ccttagctgt 4424
 ggggttcctt tactattggg tgaatcatta ggtataaaaa ataatcatca accaggcaaa 4484
 ttactttgct tcctagotga tgtcatccca cattgggtaca ggtgttattc agtactgggt 4544
 ggttcagcag ggaagccggg tgggaccagt gtgtctgtca tgaaaccact aactgcattc 4604

ctgactgaag agccatctgt catttattgg ggaaggtctt cagttgagct ctcagcctta	4664
ggaaggaagc acgtggagga gggacggagg aggttccctt gctgggcatg cttcgtagag	4724
ggccaggagc agcaggatcat gtgcacatgc cgttgcagca caagcttatg cttcccgtag	4784
ccgtggcttt tcattctgca cagtcccagg tcccagctcc cctcttatgg tttctgtcat	4844
aatgtgcttt atctgattga ctccaaacat cccgaaatgt cacctgcaga tttctcgtgg	4904
gaaccaatat gtacatgttt gcaattatgc tgtgagaatt taaatgtgtt agatggaaaa	4964
tgctattggc agggaataat aat	4987

<210> 4

<211> 414

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

Glu Asp Ala Asn Ser Cys His Ser Phe Gln Ser Ala Tyr Leu Ile Val
 145 150 155 160
 Asp Arg Asp Glu Ala Trp Val Leu Glu Thr Ile Gly Lys Tyr Trp Ala
 165 170 175
 Ala Glu Lys Val Thr Glu Gly Val Arg Cys Ile Cys Ser Gln Leu Ser
 180 185 190
 Leu Thr Thr Lys Met Asp Ala Glu His Pro Glu Leu Arg Ser Tyr Ala
 195 200 205
 Gln Ser Gln Gly Trp Trp Thr Gly Glu Gly Glu Phe Asn Phe Ser Glu
 210 215 220
 Val Phe Ser Pro Val Glu Asp His Leu Asp Cys Gly Ala Gly Lys Asp
 225 230 235 240
 Ser Leu Glu Lys Gln Glu Glu Ser Ile Thr Val Gln Thr Met Met Asn
 245 250 255
 Thr Leu Arg Asp Lys Ala Ser Gly Val Cys Ile Asp Ser Glu Phe Phe
 260 265 270
 Leu Thr Thr Ala Ser Gly Val Ser Val Leu Pro Gln Asn Arg Ser Ser
 275 280 285
 Pro Cys Ile His Tyr Phe Thr Gly Thr Pro Asp Pro Ser Arg Ser Ile
 290 295 300
 Phe Lys Pro Phe Ile Phe Val Asp Asp Val Lys Leu Val Pro Lys Thr
 305 310 315 320
 Gln Ser Pro Cys Phe Gly Asp Asp Asp Pro Ala Lys Lys Glu Pro Arg
 325 330 335
 Phe Gln Glu Lys Pro Asp Arg Arg His Glu Leu Tyr Lys Ala His Glu
 340 345 350
 Trp Ala Arg Ala Ile Ile Glu Ser Asp Gln Glu Gln Gly Arg Lys Leu
 355 360 365
 Arg Ser Thr Met Leu Glu Leu Glu Lys Gln Gly Leu Glu Ala Met Glu
 370 375 380
 Glu Ile Leu Thr Ser Ser Glu Pro Leu Asp Pro Ala Glu Val Gly Asp
 385 390 395 400

Leu Phe Tyr Asp Cys Val Asp Thr Glu Ile Lys Phe Phe Lys
405 410

<210> 5

<211> 5345

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (489) .. (2840)

<223>

10 <400> 5

gtacttgggtt aagcagttga aacotttttt gagcaggatc tgtaaaagca taattgaatt	60
tgtttcacccc ccgtggattc cagtgggccc gacagcgcaa cagtgcctgg caacttgatg	120
catatggaag agcaatgcca agtgatctga cataatacaa attcacgaag tgacatttta	180
tcacaagcaa agttggaaat tccaaagaga agtgggtgaga tctttactag tcacagtga	240
gatggggagaa aatgacatac ctgcagcaga tgtgggctga aaatatcctc ttctctgccc	300
aatcaggaat gotacotggt tttgggaata aactttagag aaaggaaggg ccaaaactac	360
gacttggctt tctgaaacgg aagcataaat gttcttttcc tccatttgtc tggatctgag	420
aacctgcatt tgggtattagc tagtggaagc agtatgtatg gttgaagtgc attgctgcag	480
ctggtagc atg agt ggt ggc cac cag ctg cag ctg gct gcc ctc tgg ccc	530
Met Ser Gly Gly His Gln Leu Gln Leu Ala Ala Leu Trp Pro	
1 5 10	
tgg ctg ctg atg gct acc ctg cag gca ggc ttt gga cgc aca gga ctg	578
Trp Leu Leu Met Ala Thr Leu Gln Ala Gly Phe Gly Arg Thr Gly Leu	
15 20 25 30	
gta ctg gca gca gcg gtg gag tct gaa aga tca gca gaa cag aaa gct	626
Val Leu Ala Ala Ala Val Glu Ser Glu Arg Ser Ala Glu Gln Lys Ala	
35 40 45	
att atc aga gtg atc ccc ttg aaa atg gac ccc aca gga aaa ctg aat	674
Ile Ile Arg Val Ile Pro Leu Lys Met Asp Pro Thr Gly Lys Leu Asn	
50 55 60	

ctc act ttg gaa ggt gtg ttt gct ggt gtt gct gaa ata act cca gca Leu Thr Leu Glu Gly Val Phe Ala Gly Val Ala Glu Ile Thr Pro Ala 65 70 75	722
gaa gga aaa tta atg cag tcc cac ccg ctg tac ctg tgc aat gcc agt Glu Gly Lys Leu Met Gln Ser His Pro Leu Tyr Leu Cys Asn Ala Ser 80 85 90	770
gat gac gac aat ctg gag cct gga ttc atc agc atc gtc aag ctg gag Asp Asp Asp Asn Leu Glu Pro Gly Phe Ile Ser Ile Val Lys Leu Glu 95 100 105 110	818
agt cct cga cgg gcc ccc cgc ccc tgc ctg tca ctg gct agc aag gct Ser Pro Arg Arg Ala Pro Arg Pro Cys Leu Ser Leu Ala Ser Lys Ala 115 120 125	866
cgg atg gcg ggt gag cga gga gcc agt gct gtc ctc ttt gac atc act Arg Met Ala Gly Glu Arg Gly Ala Ser Ala Val Leu Phe Asp Ile Thr 130 135 140	914
gag gat cga gct gct gct gag cag ctg cag cag ccg ctg ggg ctg acc Glu Asp Arg Ala Ala Ala Glu Gln Leu Gln Gln Pro Leu Gly Leu Thr 145 150 155	962
tgg cca gtg gtg ttg atc tgg ggt aat gac gct gag aag ctg atg gag Trp Pro Val Val Leu Ile Trp Gly Asn Asp Ala Glu Lys Leu Met Glu 160 165 170	1010
ttt gtg tac aag aac caa aag gcc cat gtg agg att gag ctg aag gag Phe Val Tyr Lys Asn Gln Lys Ala His Val Arg Ile Glu Leu Lys Glu 175 180 185 190	1058
ccc ccg gcc tgg cca gat tat gat gtg tgg atc cta atg aca gtg gtg Pro Pro Ala Trp Pro Asp Tyr Asp Val Trp Ile Leu Met Thr Val Val 195 200 205	1106
ggc acc atc ttt gtg atc atc ctg gct tgc gtg ctg cgc atc cgg tgc Gly Thr Ile Phe Val Ile Ile Leu Ala Ser Val Leu Arg Ile Arg Cys 210 215 220	1154
cgc ccc cgc cac agc agg ccg gat ccg ctt cag cag aga aca gcc tgg Arg Pro Arg His Ser Arg Pro Asp Pro Leu Gln Gln Arg Thr Ala Trp 225 230 235	1202
gcc atc agc cag ctg gcc acc agg agg tac cag gcc agc tgc agg cag Ala Ile Ser Gln Leu Ala Thr Arg Arg Tyr Gln Ala Ser Cys Arg Gln 240 245 250	1250

goc cgg ggt gag tgg cca gac tca ggg agc agc tgc agc tca gcc cct Ala Arg Gly Glu Trp Pro Asp Ser Gly Ser Ser Cys Ser Ser Ala Pro 255 260 265 270	1298
gtg tgt gcc atc tgt ctg gag gag ttc tct gag ggg cag gag cta cgg Val Cys Ala Ile Cys Leu Glu Glu Phe Ser Glu Gly Gln Glu Leu Arg 275 280 285	1346
gtc att tcc tgc ctc cat gag ttc cat cgt aac tgt gtg gac ccc tgg Val Ile Ser Cys Leu His Glu Phe His Arg Asn Cys Val Asp Pro Trp 290 295 300	1394
tta cat cag cat cgg act tgc ccc ctc tgc gtg ttc aac atc aca gag Leu His Gln His Arg Thr Cys Pro Leu Cys Val Phe Asn Ile Thr Glu 305 310 315	1442
gga gat tca ttt tcc cag tcc ctg gga ccc tot cga tot tac caa gaa Gly Asp Ser Phe Ser Gln Ser Leu Gly Pro Ser Arg Ser Tyr Gln Glu 320 325 330	1490
cca ggt cga aga ctc cac ctc att cgc cag cat ccc ggc cat gcc cac Pro Gly Arg Arg Leu His Leu Ile Arg Gln His Pro Gly His Ala His 335 340 345 350	1538
tac cac ctc cct gct gcc tac ctg ttg ggc cct tcc cgg agt gca gtg Tyr His Leu Pro Ala Ala Tyr Leu Leu Gly Pro Ser Arg Ser Ala Val 355 360 365	1586
gct cgg ccc cca cgg cct ggt ccc ttc ctg cca tcc cag gag cca ggc Ala Arg Pro Pro Arg Pro Gly Pro Phe Leu Pro Ser Gln Glu Pro Gly 370 375 380	1634
atg ggc cct cgg cat cac cgc ttc ccc aga gct gca cat ccc cgg gct Met Gly Pro Arg His His Arg Phe Pro Arg Ala Ala His Pro Arg Ala 385 390 395	1682
cca gga gag cag cag cgc ctg gca gga gcc cag cac ccc tat gca caa Pro Gly Glu Gln Gln Arg Leu Ala Gly Ala Gln His Pro Tyr Ala Gln 400 405 410	1730
ggc tgg gga atg agc cac ctc caa tcc acc tca cag cac cct gct gct Gly Trp Gly Met Ser His Leu Gln Ser Thr Ser Gln His Pro Ala Ala 415 420 425 430	1778
tgc cca gtg ccc cta cgc cgg gcc agg ccc cct gac agc agt gga tct Cys Pro Val Pro Leu Arg Arg Ala Arg Pro Pro Asp Ser Ser Gly Ser 435 440 445	1826

gga gaa agc tat tgc aca gaa cgc agt ggg tac ctg gca gat ggg cca Gly Glu Ser Tyr Cys Thr Glu Arg Ser Gly Tyr Leu Ala Asp Gly Pro 450 455 460	1874
gcc agt gac tcc agc tca ggg ccc tgt cat ggc tct tcc agt gac tct Ala Ser Asp Ser Ser Ser Gly Pro Cys His Gly Ser Ser Ser Asp Ser 465 470 475	1922
gtg gtc aac tgc acg gac atc agc cta cag ggg gtc cat ggc agc agt Val Val Asn Cys Thr Asp Ile Ser Leu Gln Gly Val His Gly Ser Ser 480 485 490	1970
tct act ttc tgc agc tcc cta agc agt gac ttt gac ccc cta gtg tac Ser Thr Phe Cys Ser Ser Leu Ser Ser Asp Phe Asp Pro Leu Val Tyr 495 500 505 510	2018
tgc agc cct aaa ggg gat ccc cag cga gtg gac atg cag cct agt gtg Cys Ser Pro Lys Gly Asp Pro Gln Arg Val Asp Met Gln Pro Ser Val 515 520 525	2066
acc tct cgg cct cgt tcc ttg gac tgc gtg gtg ccc aca ggg gaa acc Thr Ser Arg Pro Arg Ser Leu Asp Ser Val Val Pro Thr Gly Glu Thr 530 535 540	2114
cag gtt tcc agc cat gtc cac tac cac cgc cac cgg cac cac cac tac Gln Val Ser Ser His Val His Tyr His Arg His Arg His His His Tyr 545 550 555	2162
aaa aag cgg ttc cag tgg cat ggc agg aag cct ggc cca gaa acc gga Lys Lys Arg Phe Gln Trp His Gly Arg Lys Pro Gly Pro Glu Thr Gly 560 565 570	2210
gtc ccc cag tcc agg cct cct att cct cgg aca cag ccc cag cca gag Val Pro Gln Ser Arg Pro Pro Ile Pro Arg Thr Gln Pro Gln Pro Glu 575 580 585 590	2258
cca cct tct cct gat cag caa gtc acc gga tcc aac tca gca gcc cct Pro Pro Ser Pro Asp Gln Gln Val Thr Gly Ser Asn Ser Ala Ala Pro 595 600 605	2306
tgc ggg cgg ctg tct aac cca cag tgc ccc agg gcc ctg cct gag cca Ser Gly Arg Leu Ser Asn Pro Gln Cys Pro Arg Ala Leu Pro Glu Pro 610 615 620	2354
gcc cct ggc cca gtt gac gcc tcc agc atc tgc ccc agt acc agc agt Ala Pro Gly Pro Val Asp Ala Ser Ser Ile Cys Pro Ser Thr Ser Ser 625 630 635	2402

ctg ttc aac ttg caa aaa tcc agc ctc tct gcc cga cac cca cag agg Leu Phe Asn Leu Gln Lys Ser Ser Leu Ser Ala Arg His Pro Gln Arg 640 645 650	2450
aaa agg cgg ggg ggt ccc tcc gag ccc acc cct ggc tct cgg ccc cag Lys Arg Arg Gly Gly Pro Ser Glu Pro Thr Pro Gly Ser Arg Pro Gln 655 660 665 670	2498
gat gca act gtg cac cca gct tgc cag att ttt ccc cat tac acc ccc Asp Ala Thr Val His Pro Ala Cys Gln Ile Phe Pro His Tyr Thr Pro 675 680 685	2546
agt gtg gca tat cct tgg tcc cca gag gca cac ccc ttg atc tgt gga Ser Val Ala Tyr Pro Trp Ser Pro Glu Ala His Pro Leu Ile Cys Gly 690 695 700	2594
cct cca ggc ctg gac aag agg ctg cta cca gaa acc cca ggc ccc tgt Pro Pro Gly Leu Asp Lys Arg Leu Leu Pro Glu Thr Pro Gly Pro Cys 705 710 715	2642
tac tca aat tca cag cca gtg tgg ttg tgc ctg act cct cgc cag ccc Tyr Ser Asn Ser Gln Pro Val Trp Leu Cys Leu Thr Pro Arg Gln Pro 720 725 730	2690
ctg gaa cca cat cca cct ggg gag ggg cct tct gaa tgg agt tct gac Leu Glu Pro His Pro Pro Gly Glu Gly Pro Ser Glu Trp Ser Ser Asp 735 740 745 750	2738
acc gca gag ggc agg cca tgc cct tat ccg cac tgc cag gtg ctg tcg Thr Ala Glu Gly Arg Pro Cys Pro Tyr Pro His Cys Gln Val Leu Ser 755 760 765	2786
gcc cag cct ggc tca gag gag gaa ctc gag gag ctg tgt gaa cag gct Ala Gln Pro Gly Ser Glu Glu Glu Leu Glu Glu Leu Cys Glu Gln Ala 770 775 780	2834
gtg tga gatgttcagg cctagctcca accaagagtg tgctccagat gtgtttgggc Val	2890
cctacctggc acagagtct gctcctggga aaggaaagga ccacagcaaa caccattctt	2950
tttgccgtac ttctagaag cactggaaga ggactggtga tgggtggagg tgagagggtg	3010
ccgtttcctg ctccagctcc agaccttgtc tgcagaaaac atctgcagt cagcaaatcc	3070
atgtccagcc aggcaaccag ctgctgcctg tggcgtgtgt gggctggatc ccttgaaggc	3130

tgagtttttg agggcagaaa gctagctatg ggtagccagg tgttacaag gtgctgctcc 3190
 ttctccaacc cctacttggg ttccctcacc ccaagcctca tgttcatacc agccagtggg 3250
 ttcagcagaa cgcatgacac cttatcacct ccctccttgg gtgagctctg aacaccagct 3310
 ttggcccctc cacagtaagg ctgctacatc aggggcaacc ctggctctat cattttcctt 3370
 ttttgccaaa aggaccagta gcataggtga gccctgagca ctaaaaggag gggctccctga 3430
 agctttccca ctatagtgtg gagttctgtc cctgaggtgg gtacagcagc cttgggttct 3490
 ctgggggttg agaataagaa tagtggggag ggaaaaactc ctccctgaag atttcctgtc 3550
 tcagagtccc agagaggtag aaaggaggaa tttctgctgg actttatctg ggcagaggaa 3610
 ggatggaatg aaggtagaaa aggcagaatt acagctgagc ggggacaaca aagagttctt 3670
 ctctgggaaa agttttgtct tagagcaagg atggaaaatg gggacaacaa aggaaaagca 3730
 aagtgtgacc cttgggtttg gacagcccag agggccagct cccagttata agccatacag 3790
 gccagggacc cacaggagag tggattagag cacaagtctg gcctcactga gtggacaaga 3850
 gctgatgggc ctcatcaggg tgacattcac ccagggcag cctgaccact cttggcccct 3910
 caggcattat ccattttgga atgtgaatgt ggtggcaaag tgggcagagg accccacctg 3970
 ggaacctttt tccctcagtt agtggggaga ctagcaccta ggtaccaca tgggtattta 4030
 tatctgaacc agacagacgc ttgaatcagg cactatgtta agaaatatat ttatttgcta 4090
 atatatttat ccacaaacag gcactatgtt aagaaatata tttatttgct aatatattta 4150
 tccacaaatg tggctctggc ttgtggtttt gttctgtcgt gactgtcact cagggttaaca 4210
 acgtcatctc tttctacatc aagagaagta aattatttat gttatcagag gctaggctcc 4270
 gattcatgaa aggatagggg agagtagagg gcttggcaat aagaactggg ttgtaagccc 4330
 ctaaaagtgt ggcttagtga gatcagggaa ggagaaaagca tgactggatt cttactgtgc 4390
 ttcagtcatt attattatac tgttcacttc acacattatc atacttcagt gactcagacc 4450
 ttgggcaaat actctgtgcc tcgctttttc agtcataaaa atgggcctac ttaatagttg 4510
 ttgcaggact tacatgagat aatagagtgt agaaaatatg ttccaaagtg gaaagtttta 4570

```

ttcatgtgat agaaaacatc caaacctgtc acagagccca tctgaacaca gcatgggacc 4630
gccacaaga agaaagcccg ccggaagca gctcaatcag gaggtgggc tggaatgaca 4690
gcgagcggg gcctgaaact atttatatcc caaagctcct ctgagataaa cacaaatgac 4750
tgcgttctgc ctgcactcgg gctattgcga ggacagagag ctggtgctcc attggcgtga 4810
agtctccagg gccagaaggg gcctttgtcg ctctctcaca aggcacaagt tccccttctg 4870
cttccccgag aaagggttgg taggggtggg ggtttagtgc ctatagaaca aggcatttcg 4930
cttctagac ggtgaaatga aagggaaaaa aaggacacct aatctctac aaatggtctt 4990
tagtaaagga accgtgtcta agcgctaaga actgcgcaaa gtataaatta tcagccggaa 5050
cgagcaaaca gacggagttt taaaagataa atacgcattt ttttcgccg tagctcccag 5110
gccagcattc ctgtgggaag caagtggaaa ccctatagcg ctctcgcagt taggaaggag 5170
gggtggggct gtcgtggat ttottotogg totctgcaga gacaatccag agggagacag 5230
tggattcact gccccaatg cttctaaaaa gggzagacaa aacaaaaaaaa aacaaacttc 5290
cgggttacca tcggggaaca ggaccgacgc ccagggccac cagccccctc gtgcc 5345

```

<210> 6

<211> 783

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

Lys Leu Met Gln Ser His Pro Leu Tyr Leu Cys Asn Ala Ser Asp Asp
 85 90 95

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

Arg Arg Ala Pro Arg Pro Cys Leu Ser Leu Ala Ser Lys Ala Arg Met
 115 120 125

Ala Gly Glu Arg Gly Ala Ser Ala Val Leu Phe Asp Ile Thr Glu Asp
 130 135 140

Arg Ala Ala Ala Glu Gln Leu Gln Gln Pro Leu Gly Leu Thr Trp Pro
 145 150 155 160

Val Val Leu Ile Trp Gly Asn Asp Ala Glu Lys Leu Met Glu Phe Val
 165 170 175

Tyr Lys Asn Gln Lys Ala His Val Arg Ile Glu Leu Lys Glu Pro Pro
 180 185 190

Ala Trp Pro Asp Tyr Asp Val Trp Ile Leu Met Thr Val Val Gly Thr
 195 200 205

Ile Phe Val Ile Ile Leu Ala Ser Val Leu Arg Ile Arg Cys Arg Pro
 210 215 220

Arg His Ser Arg Pro Asp Pro Leu Gln Gln Arg Thr Ala Trp Ala Ile
 225 230 235 240

Ser Gln Leu Ala Thr Arg Arg Tyr Gln Ala Ser Cys Arg Gln Ala Arg
 245 250 255

Gly Glu Trp Pro Asp Ser Gly Ser Ser Cys Ser Ser Ala Pro Val Cys
 260 265 270

Ala Ile Cys Leu Glu Glu Phe Ser Glu Gly Gln Glu Leu Arg Val Ile
 275 280 285

Ser Cys Leu His Glu Phe His Arg Asn Cys Val Asp Pro Trp Leu His
 290 295 300

Gln His Arg Thr Cys Pro Leu Cys Val Phe Asn Ile Thr Glu Gly Asp
 305 310 315 320

Ser Phe Ser Gln Ser Leu Gly Pro Ser Arg Ser Tyr Gln Glu Pro Gly
 325 330 335

Arg Arg Leu His Leu Ile Arg Gln His Pro Gly His Ala His Tyr His
 340 345 350
 Leu Pro Ala Ala Tyr Leu Leu Gly Pro Ser Arg Ser Ala Val Ala Arg
 355 360 365
 Pro Pro Arg Pro Gly Pro Phe Leu Pro Ser Gln Glu Pro Gly Met Gly
 370 375 380
 Pro Arg His His Arg Phe Pro Arg Ala Ala His Pro Arg Ala Pro Gly
 385 390 395 400
 Glu Gln Gln Arg Leu Ala Gly Ala Gln His Pro Tyr Ala Gln Gly Trp
 405 410 415
 Gly Met Ser His Leu Gln Ser Thr Ser Gln His Pro Ala Ala Cys Pro
 420 425 430
 Val Pro Leu Arg Arg Ala Arg Pro Pro Asp Ser Ser Gly Ser Gly Glu
 435 440 445
 Ser Tyr Cys Thr Glu Arg Ser Gly Tyr Leu Ala Asp Gly Pro Ala Ser
 450 455 460
 Asp Ser Ser Ser Gly Pro Cys His Gly Ser Ser Ser Asp Ser Val Val
 465 470 475 480
 Asn Cys Thr Asp Ile Ser Leu Gln Gly Val His Gly Ser Ser Ser Thr
 485 490 495
 Phe Cys Ser Ser Leu Ser Ser Asp Phe Asp Pro Leu Val Tyr Cys Ser
 500 505 510
 Pro Lys Gly Asp Pro Gln Arg Val Asp Met Gln Pro Ser Val Thr Ser
 515 520 525
 Arg Pro Arg Ser Leu Asp Ser Val Val Pro Thr Gly Glu Thr Gln Val
 530 535 540
 Ser Ser His Val His Tyr His Arg His Arg His His His Tyr Lys Lys
 545 550 555 560
 Arg Phe Gln Trp His Gly Arg Lys Pro Gly Pro Glu Thr Gly Val Pro
 565 570 575
 Gln Ser Arg Pro Pro Ile Pro Arg Thr Gln Pro Gln Pro Glu Pro Pro
 580 585 590

Ser Pro Asp Gln Gln Val Thr Gly Ser Asn Ser Ala Ala Pro Ser Gly
595 600 605

Arg Leu Ser Asn Pro Gln Cys Pro Arg Ala Leu Pro Glu Pro Ala Pro
610 615 620

Gly Pro Val Asp Ala Ser Ser Ile Cys Pro Ser Thr Ser Ser Leu Phe
625 630 635 640

Asn Leu Gln Lys Ser Ser Leu Ser Ala Arg His Pro Gln Arg Lys Arg
645 650 655

Arg Gly Gly Pro Ser Glu Pro Thr Pro Gly Ser Arg Pro Gln Asp Ala
660 665 670

Thr Val His Pro Ala Cys Gln Ile Phe Pro His Tyr Thr Pro Ser Val
675 680 685

Ala Tyr Pro Trp Ser Pro Glu Ala His Pro Leu Ile Cys Gly Pro Pro
690 695 700

Gly Leu Asp Lys Arg Leu Leu Pro Glu Thr Pro Gly Pro Cys Tyr Ser
705 710 715 720

Asn Ser Gln Pro Val Trp Leu Cys Leu Thr Pro Arg Gln Pro Leu Glu
725 730 735

Pro His Pro Pro Gly Glu Gly Pro Ser Glu Trp Ser Ser Asp Thr Ala
740 745 750

Glu Gly Arg Pro Cys Pro Tyr Pro His Cys Gln Val Leu Ser Ala Gln
755 760 765

Pro Gly Ser Glu Glu Glu Leu Glu Glu Leu Cys Glu Gln Ala Val
770 775 780

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 7

acaacagcct caagatcatc ag

22

10 <210> 8

<211> 20

<212> ADN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 8	
5	ggtccaccac tgacacgttg	20
	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 9	
	agctgagaca ttgttctct tg	22
	<210> 10	
15	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
20	<400> 10	
	tataaaccag ctgagtcag ag	22
	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 11	
	ttccgatat caacatctac cag	23
30	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 12	
	agtgtgtgac ctcaataagg cat	23

	<210> 13	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 13	
	caggctttgg acgcacagga ctggtac	27
	<210> 14	
10	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
15	<400> 14	
	ctttgtgatc atcctggctt cggtgct	27
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 15	
	ggttgagatt taagttctca aa	22
25	<210> 16	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 16	
	agttaagctt gccgggatga ctctcagcg ttcccctctg g	41
	<210> 17	
	<211> 32	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	

	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 17	
	atctcgagta ccaaggaccc ggcccgactc tg	32
	<210> 18	
5	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
10	<400> 18	
	gcggatccag gatggctgct gcagctcctc caag	34
	<210> 19	
	<211> 36	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 19	
	tagaattctt aaagaactta atctccgtgt caacac	36
20	<210> 20	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 20	
	tgcatgatctg cagctggttag catgagtggg g	31
	<210> 21	
	<211> 32	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 21	
35	gaggagctgt gtgaacaggc tgtgtgagat gt	32
	<210> 22	
	<211> 16	

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un S-oligonucleótido sintetizado artificialmente	
5	<400> 22	
	tctgcacggt gagtag	16
	<210> 23	
	<211> 16	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un S-oligonucleótido sintetizado artificialmente	
	<400> 23	
	ctactcaccg tgcaga	16
15	<210> 24	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> un S-oligonucleótido sintetizado artificialmente	
	<400> 24	
	ttctgtaggt gttgca	16
	<210> 25	
	<211> 16	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un S-oligonucleótido sintetizado artificialmente	
	<400> 25	
30	tgcaacacct acagaa	16
	<210> 26	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> un S-oligonucleótido sintetizado artificialmente	
	<400> 26	

	cttttcagga tggctg	16
	<210> 27	
	<211> 16	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un S-oligonucleótido sintetizado artificialmente	
	<400> 27	
	cagccatcct gaaaag	16
10	<210> 28	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> un S-oligonucleótido sintetizado artificialmente	
	<400> 28	
	aggttgaggt aagccg	16
	<210> 29	
	<211> 16	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un S-oligonucleótido sintetizado artificialmente	
	<400> 29	
25	cggcttacct caacct	16
	<210> 30	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> un S-oligonucleótido sintetizado artificialmente	
	<400> 30	
	tggtagcatg agtggt	16
	<210> 31	
35	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> un S-oligonucleótido sintetizado artificialmente	
	<400> 31	
	accactcatg ctacca	16
5	<210> 32	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 32	
	tggtagccaa gtgcaggtta ta	22
	<210> 33	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 33	
20	ccaaagggtt tctgcagttt ca	22
	<210> 34	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 34	
	tgcggtacca gagcagattg tactgagagt	30
	<210> 35	
30	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
35	<400> 35	
	ctctatctcg agtgaggcgg aaagaacca	29
	<210> 36	

	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 36	
	tttaagcttg aagaccattt ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaac	47
	<210> 37	
	<211> 34	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 37	
15	tttaagcttg aagacatggg aaagagtgtg ctca	34
	<210> 38	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> una secuencia de oligonucleótido sintetizada artificialmente	
	<400> 38	
	caccgaagca gcacgacttc ttctcaaga gagaagaagt cgtgctgctt c	51
	<210> 39	
25	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de oligonucleótido sintetizada artificialmente	
30	<400> 39	
	aaaagaagca gcacgacttc ttctctctg aagaagaagt cgtgctgctt c	51
	<210> 40	
	<211> 51	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	

	<400> 40	
	tcccgtcacc g gatccaact cagttcaaga gactgagttg gatccggtga c	51
	<210> 41	
	<211> 51	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 41	
10	aaaagtcacc g gatccaact cagtctcttg aactgagttg gatccggtga c	51
	<210> 42	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 42	
	tcccgctatt gcacagaacg cagttcaaga gactgcggtc tgtgcaatag c	51
	<210> 43	
20	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
25	<400> 43	
	aaaagctatt gcacagaacg cagtctcttg aactgcggtc tgtgcaatag c	51
	<210> 44	
	<211> 51	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 44	
	tccccagaaa gctgttatca gaggtaaga gactctgata acagctttct g	51
35	<210> 45	
	<211> 51	
	<212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 45	
5	aaaacagaaa gctgttatca gagtctcttg aactctgata acagctttct g	51
	<210> 46	
	<211 > 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 46	
	tccctgagcc acctccaatc cactcaaga gagtggattg gaggtggctc a	51
	<210> 47	
15	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
20	<400> 47	
	aaaatgagcc acctccaatc cactctcttg aagtggattg gaggtggctc a	51
	<210> 48	
	<211> 51	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 48	
	tccctgcac ggacatcagc ctattcaaga gataggctga tgtccgtgca g	51
30	<210> 49	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 49	
	aaaactgcac ggacatcagc ctatctcttg aataggctga tgtccgtgca g	51

	<210> 50	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 50	
	tcccggtgca gagagccctg ggattcaaga gatcccaggg ctctctgaca c	51
	<210> 51	
10	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
15	<400> 51	
	aaaagtgca gagagccctg ggatctcttg aatcccaggg ctctctgaca c	51
	<210> 52	
	<211> 51	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 52	
	tcccctcaa tgtcatttg atgtcaaga gacatccaaa tgcaattgag g	51
25	<210> 53	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 53	
	aaaacctcaa tgtcatttg atgtctcttg aacatccaaa tgcaattgag g	51
	<210> 54	
	<211> 51	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	

	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 54	
	tccctgcat ttggatggc acttcaaga gaagtgacca tccaaatgac a	51
	<210> 55	
5	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
10	<400> 55	
	aaaatgcat ttggatggc acttcttg aaagtgacca tccaaatgac a	51
	<210> 56	
	<211> 51	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 56	
	tccctgcaa ccaacctgaa cagtcaaga gactgtcag gttggtggc a	51
20	<210> 57	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 57	
	aaaatgcaa ccaacctgaa cagtcttg aactgtcag gttggtggc a	51
	<210> 58	
	<211> 51	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 58	
35	tccccaacc tgaacaggc atctcaaga gagatgacct gtcagggtg g	51
	<210> 59	
	<211> 51	

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
5	<400> 59	
	aaaaccaacc tgaacaggtc atctctcttg aagatgacct gttcaggttg g	51
	<210> 60	
	<211> 51	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 60	
	tccccctgaa caggatcatcc tgttcaaga gaacaggatg acctgttcag g	51
15	<210> 61	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 61	
	aaaacctgaa caggatcatcc tgttctcttg aaacaggatg acctgttcag g	51
	<210> 62	
	<211> 51	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 62	
30	tccccaggtc atcctgtatc aggttcaaga gacctgatac aggatgacct g	51
	<210> 63	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para ARNip	
	<400> 63	

	aaaacaggtc atcctgtatc aggtctcttg aacctgatac aggatgacct g	51
	<210> 64	
	<211> 28	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 64	
	gaagatctgc agcggaggag tctgaaag	28
10	<210> 65	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 65	
	ggaattcgga ctgggaaaat gaatctcct c	31
	<210> 66	
	<211> 26	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 66	
25	ggagatctcc tgatcagcaa gtcacc	26
	<210> 67	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 67	
	ggaattccac agcctgttca cacagctcct c	31
	<210> 68	
35	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 68	
	gcggatccag gatggctgca gctcctcaa g	31
5	<210> 69	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 69	
	ctgaattcac ttaaagaact taatctccgt gtcaacac	38
	<210> 70	
	<211> 10	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 70	
	cccgggatga	10
	<210> 71	
20	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente	
25	<400> 71	
	Ser Tyr Gln Glu Pro Gly Arg Arg Leu	
	1 5	
	<210> 72	
	<211> 9	
	<212> PRT	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente	
	<400> 72	

His Tyr His Leu Pro Ala Ala Tyr Leu
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 73

Leu Phe Asn Leu Gln Lys Ser Ser Leu
1 5

10 <210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 74

Gly Phe Gly Arg Thr Gly Leu Val Leu
1 5

<210> 75

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 75

Arg Tyr Gln Ala Ser Cys Arg Gln Ala
1 5

25

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 76

Arg Ala Pro Gly Glu Gln Gln Arg Leu
1 5

5 <210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 77

Arg Ala Pro Arg Pro Cys Leu Ser Leu
1 5

<210> 78

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 78

Arg Pro Pro Arg Pro Gly Pro Phe Leu
1 5

20

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 79

Lys Ala Val Ile Arg Val Ile Pro Leu
1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 80

Asn	Ser	Gln	Pro	Val	Trp	Leu	Cys	Leu
1				5				

<210> 81

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 81

Ser	Tyr	Cys	Thr	Glu	Arg	Ser	Gly	Tyr	Leu
1				5					10

15

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 82

His	Tyr	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu
1				5					10

<210> 83

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

30 <400> 83

Cys Tyr Ser Asn Ser Gln Pro Val Trp Leu
1 5 10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 84

Ile Phe Val Ile Ile Leu Ala Ser Val Leu
1 5 10

10 <210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 85

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

<210> 86

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 86

Thr Phe Cys Ser Ser Leu Ser Ser Asp Phe
1 5 10

25

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 87

Lys Leu Met Gln Ser His Pro Leu Tyr Leu
1 5 10

5 <210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 88

Lys Met Asp Pro Thr Gly Lys Leu Asn Leu
1 5 10

<210> 89

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 89

His Tyr Thr Pro Ser Val Ala Tyr Pro Trp
1 5 10

20

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 90

Gly Gln Glu Leu Arg Val Ile Ser Cys Leu
1 5 10

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 91

Asn Phe Gln Pro Val Trp Leu Cys Leu
1 5

<210> 92

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 92

Asn Tyr Gln Pro Val Trp Leu Cys Leu
1 5

15

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 93

Lys Leu Asn Leu Thr Leu Glu Gly Val
1 5

<210> 94

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

30 <400> 94

Gln Leu Ala Ala Leu Trp Pro Trp Leu
1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 95

Leu Met Gln Ser His Pro Leu Tyr Leu
1 5

10 <210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 96

Leu Leu Gly Pro Ser Arg Ser Ala Val
1 5

<210> 97

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 97

Ala Leu Trp Pro Trp Leu Leu Met Ala
1 5

25

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 98

Trp Leu Leu Met Ala Thr Leu Gln Ala
1 5

5 <210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 99

Trp Ile Leu Met Thr Val Val Gly Thr
1 5

<210> 100

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 100

Lys Leu Met Glu Phe Val Tyr Lys Asn
1 5

20

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 101

Asn Leu Thr Leu Glu Gly Val Phe Ala
1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 102

Gly Leu Thr Trp Pro Val Val Leu Ile
1 5

<210> 103

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

15 <400> 103

Tyr Leu Leu Gly Pro Ser Arg Ser Ala Val
1 5 10

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 104

Leu Met Thr Val Val Gly Thr Ile Phe Val
1 5 10

25 <210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 105

Cys	Leu	His	Glu	Phe	His	Arg	Asn	Cys	Val
1				5					10

<210> 106

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 106

Ser	Leu	Ser	Ser	Asp	Phe	Asp	Pro	Leu	Val
1				5					10

10

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 107

Gln	Leu	Ala	Ala	Ile	Trp	Pro	Trp	Leu	Leu
1				5					10

<210> 108

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

25 <400> 108

Ala	Leu	Trp	Pro	Trp	Leu	Leu	Met	Ala	Thr
1				5					10

<210> 109

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 109

Leu Gln Leu Ala Ala Leu Trp Pro Trp Leu
1 5 10

5

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 110

Trp Leu Cys Leu Thr Pro Arg Gln Pro Leu
1 5 10

<210> 111

15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

20

<400> 111

Trp Leu His Gln His Arg Thr Cys Pro Leu
1 5 10

<210> 112

<211> 20

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia diana sintetizada artificialmente para ARNip

<400> 112

gtcacccggat ccaactcagt

20

30

<210> 113

<211> 20

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> una secuencia diana sintetizada artificialmente para ARNip
 5 <400> 113
 gctattgcac agaacgcagt 20
 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> una secuencia diana sintetizada artificialmente para ARNip
 <400> 114
 caggatcatcc tgtatcaggt 20
 15 <210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente
 <400> 115
 Tyr Leu Trp Glu Lys Leu Asp Asn Thr
 1 5
 <210> 116
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente
 <400> 116
 Leu Leu Leu Leu Ser Leu His Gly Val
 1 5
 30 <210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 117

Ile Asn Leu Asn Val Ile Trp Met Val
1 5

5 <210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 118

Trp Met Val Thr Pro Leu Ser Asn Ala
1 5

<210> 119

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 119

Cys Leu Val Asn Asn Leu Pro Asp Ile
1 5

20

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 120

Ser Leu His Gly Val Ala Ala Ser Leu
1 5

<210> 121

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 121

Val Ile Ile Ile Phe Cys Ile Ala Leu
1 5

5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 122

Leu Ile Asn Leu Asn Val Ile Trp Met
1 5

<210> 123

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

20

<400> 123

Ala Val Leu Pro Cys Thr Phe Thr Thr
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 124

Ala Leu Ser Ser Gly Leu Tyr Gln Cys
1 5

30

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

5 <400> 125

Val Met Ser Arg Ser Asn Gly Ser Val
1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 126

Ser Ile Phe Ile Asn Asn Thr Gln Leu
1 5

15 <210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 127

Lys Val His Arg Asn Thr Asp Ser Val
1 5

<210> 128

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 128

Arg Ile Gly Ala Val Pro Val Met Val
1 5

30

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

5 <400> 129

Asn Ile Gly Val Thr Gly Leu Thr Val
1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 130

Ser Ile Tyr Ala Asn Gly Thr His Leu
1 5

15 <210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 131

Leu Leu Cys Ser Ser Glu Glu Gly Ile
1 5

<210> 132

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 132

Leu Leu Ser Leu His Gly Val Ala Ala
1 5

30

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 133

Ile Ile Phe Cys Ile Ala Leu Ile Leu
1 5

<210> 134

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

15 <400> 134

Thr Met Pro Ala Thr Asn Val Ser Ile
1 5

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 135

Tyr Leu Trp Glu Lys Leu Asp Asn Thr Leu
1 5 10

25 <210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 136

Leu Ile Asn Leu Asn Val Ile Trp Met Val
1 5 10

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 137

Ala Leu Ser Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Val
1 5 10

10 <210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 138

Ala Leu Ile Asn Leu Asn Val Ile Trp Met
1 5 10

<210> 139

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 139

Ile Leu Leu Cys Ser Ser Glu Glu Gly Ile
1 5 10

25

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 140

Val Leu Pro Cys Thr Phe Thr Thr Ser Ala
1 5 10

<210> 141

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 141

Leu Leu Leu Ser Leu His Gly Val Ala Ala
1 5 10

10

<210> 142

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 142

Ser Ile Tyr Ala Asn Gly Thr His Leu Val
1 5 10

<210> 143

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

25 <400> 143

Gln Leu Ser Asp Thr Gly Thr Tyr Gln Cys
1 5 10

<210> 144

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 144

Gly Leu Tyr Gln Cys Val Ala Ser Asn Ala
1 5 10

<210> 145

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

10 <400> 145

Pro Leu Leu Leu Leu Ser Leu His Gly Val
1 5 10

<210> 146

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 146

Ile Gln Val Ala Arg Gly Gln Pro Ala Val
1 5 10

20 <210> 147

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 147

Phe Ile Asn Asn Thr Gln Leu Ser Asp Thr
1 5 10

<210> 148

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 148

Leu Val Pro Gly Gln His Lys Thr Leu Val
1 5 10

5

<210> 149

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 149

Asn Leu Pro Asp Ile Gly Gly Arg Asn Ile
1 5 10

<210> 150

15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

20

<400> 150

Val Leu Val Pro Pro Ser Ala Pro His Cys
1 5 10

<210> 151

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 151

Ala Val Ile Ile Ile Phe Cys Ile Ala Leu
1 5 10

30

<210> 152

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

5 <400> 152

Val	Ile	Ile	Ile	Phe	Cys	Ile	Ala	Leu	Ile
1				5					10

<210> 153

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 153

Ile	Leu	Gly	Ala	Phe	Phe	Tyr	Trp	Arg	Ser
1				5					10

15 <210> 154

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 154

Gly	Leu	Thr	Val	Leu	Val	Pro	Pro	Ser	Ala
1				5					10

<210> 155

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 155

Ser	Ile	Phe	Lys	Pro	Phe	Ile	Phe	Val
1				5				

30

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 156

Trp Leu Trp Gly Ala Glu Met Gly Ala
1 5

<210> 157

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 157

Ile Met Ile Ser Arg Pro Ala Trp Leu

15

1 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 158

Leu Leu Gly Met Asp Leu Val Arg Leu
1 5

25 <210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 159

Phe Ile Phe Val Asp Asp Val Lys Leu
1 5

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 160

Val Cys Ile Asp Ser Glu Phe Phe Leu
1 5

10 <210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 161

Lys Pro Phe Ile Phe Val Asp Asp Val
1 5

<210> 162

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 162

Ile Val Asp Arg Asp Glu Ala Trp Val
1 5

25

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 163

Thr Leu Arg Asp Lys Ala Ser Gly Val
1 5

<210> 164

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 164

Lys Met Asp Ala Glu His Pro Glu Leu
1 5

10

<210> 165

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 165

Ala Leu Asp Val Ile Val Ser Leu Leu
1 5

<210> 166

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

25 <400> 166

Tyr Ala Gln Ser Gln Gly Trp Trp Thr
1 5

<210> 167

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 167

Lys Leu Arg Ser Thr Met Leu Glu Leu
1 5

<210> 168

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

10 <400> 168

Tyr Leu Ile Val Asp Arg Asp Glu Ala
1 5

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 169

Ala Ala Pro Pro Ser Tyr Cys Phe Val
1 5

20 <210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 170

Gly Met Asp Leu Val Arg Leu Gly Leu
1 5

<210> 171

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 171

Lys Val Thr Glu Gly Val Arg Cys Ile
1 5

5 <210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 172

Cys Ile Asp Ser Glu Phe Phe Leu Thr
1 5

<210> 173

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 173

Thr Val Gln Thr Met Met Asn Thr Leu
1 5

20

<210> 174

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 174

Glu Met Gly Ala Asn Glu His Gly Val
1 5

<210> 175

30 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 175

Phe Ile Phe Val Asp Asp Val Lys Leu Val
1 5 10

<210> 176

 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 176

Leu Ile Val Asp Arg Asp Glu Ala Trp Val
1 5 10

<210> 177

15 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

20 <400> 177

Phe Leu Thr Thr Ala Ser Gly Val Ser Val
1 5 10

<210> 178

 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

25 <213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 178

Thr Met Leu Glu Leu Glu Lys Gln Gly Leu
1 5 10

30 <210> 179

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

5 <400> 179

Ala Leu Leu Gly Met Asp Leu Val Arg Leu
1 5 10

<210> 180

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 180

Ala Ile Met Ile Ser Arg Pro Ala Trp Leu
1 5 10

15 <210> 181

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 181

Gly Val Cys Ile Asp Ser Glu Phe Phe Leu
1 5 10

<210> 182

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 182

Lys Leu Val Pro Lys Thr Gln Ser Pro Cys
1 5 10

30

<210> 183

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 183

Phe Asn Phe Ser Glu Val Phe Ser Pro Val
1 5 10

<210> 184

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 184

Tyr Ile Ser Ile Asp Gln Val Pro Arg Thr
1 5 10

15

<210> 185

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 185

Gly Glu Gly Glu Phe Asn Phe Ser Glu Val
1 5 10

<210> 186

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

30 <400> 186

Trp Ala Ala Glu Lys Val Thr Glu Gly Val
1 5 10

<210> 187

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 187

Val	Leu	Pro	Gln	Asn	Arg	Ser	Ser	Pro	Cys
1				5					10

<210> 188

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

15 <400> 188

Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Ser	Tyr	Cys	Phe	Val
1				5					10

<210> 189

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 189

Thr	Met	Met	Asn	Thr	Leu	Arg	Asp	Lys	Ala
1				5					10

25 <210> 190

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 190

Glu Val Gly Asp Leu Phe Tyr Asp Cys Val
1 5 10

<210> 191

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 191

Ala Glu Met Gly Ala Asn Glu His Gly Val
1 5 10

10 <210> 192

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 192

Gly Leu Val Val Phe Gly Lys Asn Ser Ala
1 5 10

<210> 193

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 193

Gln Leu Ser Leu Thr Thr Lys Met Asp Ala
1 5 10

25

<210> 194

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 194

Arg	Ser	Ile	Phe	Lys	Pro	Phe	Ile	Phe	Val
1				5					10

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
2. Polinucleótido que codifica para el polipéptido según la reivindicación 1.
3. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 2.
- 5 4. Célula huésped que alberga el polinucleótido según la reivindicación 2 o el vector según la reivindicación 3.
5. Método para producir el polipéptido según la reivindicación 1, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) cultivar la célula huésped según la reivindicación 4;
 - (b) permitir que la célula huésped exprese el polipéptido; y
 - (c) recoger el polipéptido expresado.
- 10 6. Polinucleótido que es la cadena complementaria del polinucleótido según la reivindicación 2.
7. ARN de interferencia pequeño frente al polinucleótido según la reivindicación 2.
8. ARN de interferencia pequeño según la reivindicación 7, en donde la cadena sentido del mismo consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 112 como secuencia diana.
9. Polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 ó 108.
- 15 10. Método *in vitro* para diagnosticar cáncer de colon, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) detectar el nivel de expresión del gen que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en una muestra biológica de espécimen; y
 - (b) relacionar un aumento del nivel de expresión con cáncer de colon.
- 20 11. Método según la reivindicación 10, en el que el nivel de expresión se detecta mediante uno cualquiera del método seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) detectar el ARNm que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y
 - (b) detectar la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
- 25 12. Composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon, comprendiendo dicha composición una cantidad farmacéuticamente eficaz de un ARN de interferencia pequeño frente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 como principio activo, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 13. Composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon, comprendiendo dicha composición una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 como principio activo, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 14. Método *in vitro* para inducir una inmunidad antitumoral, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto un polipéptido que consiste en el aminoácido de SEQ ID NO: 6 con células presentadoras de antígenos, o introducir un polinucleótido que codifica para el polipéptido o un vector que comprende el polinucleótido en células presentadoras de antígenos.
- 40 15. Método *in vitro* para inducir una inmunidad antitumoral, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto un polipéptido seleccionado del grupo de polipéptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 y 108 con células presentadoras de antígenos, o introducir un polinucleótido que codifica para el polipéptido o un vector que comprende el polinucleótido en células presentadoras de antígenos.
- 45 16. Composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido que consiste en el aminoácido de SEQ ID NO: 6, o un polinucleótido que codifica para el polipéptido como principio activo, y un portador farmacéuticamente aceptable.
17. Composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 80, 97 y 108, o un polinucleótido que codifica para el polipéptido como principio activo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

18. Composición farmacéutica según la reivindicación 16 ó 17, en la que el polinucleótido se incorpora en un vector de expresión.
- 5 19. Uso de un ARN de interferencia pequeño frente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon.
20. Uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer de colon.
- 10 21. Uso de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o un polinucleótido que codifica para el polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer de colon.
22. Uso de un polipéptido seleccionado del grupo de polipéptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 y 108, o un polinucleótido que codifica para el polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer de colon.
- 15 23. Uso de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido o un vector que comprende dicho polinucleótido, para la preparación de una composición farmacéutica para inducir inmunidad antitumoral.
24. Composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de
 - 20 (a) un ARN de interferencia pequeño frente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o
 - (b) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
- 25 25. Uso de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, 97 y 108, un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido, o un vector que comprende dicho polinucleótido para la preparación de una composición farmacéutica para inducir inmunidad antitumoral.
26. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, o uso según la reivindicación 19, en los que una cadena sentido del ARN de interferencia pequeño consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 112 como secuencia diana.
- 30 27. Polinucleótido aislado que codifica para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 80, 97 y 108.

FIG.1

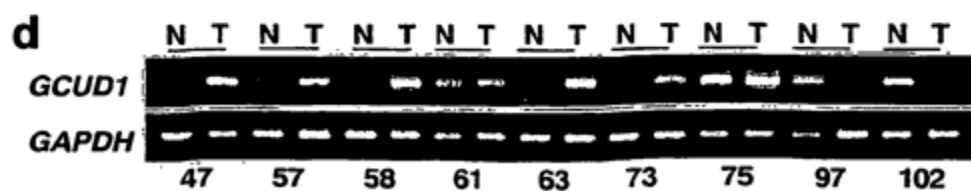
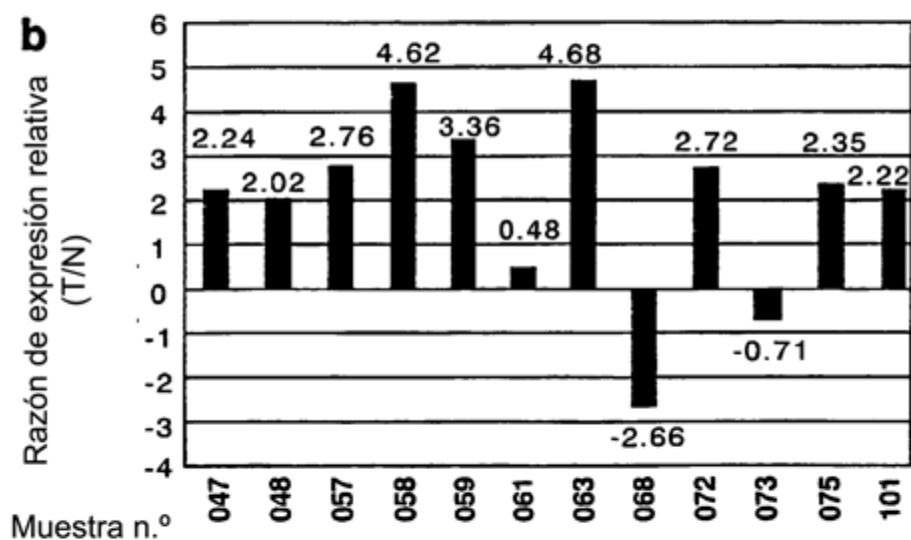
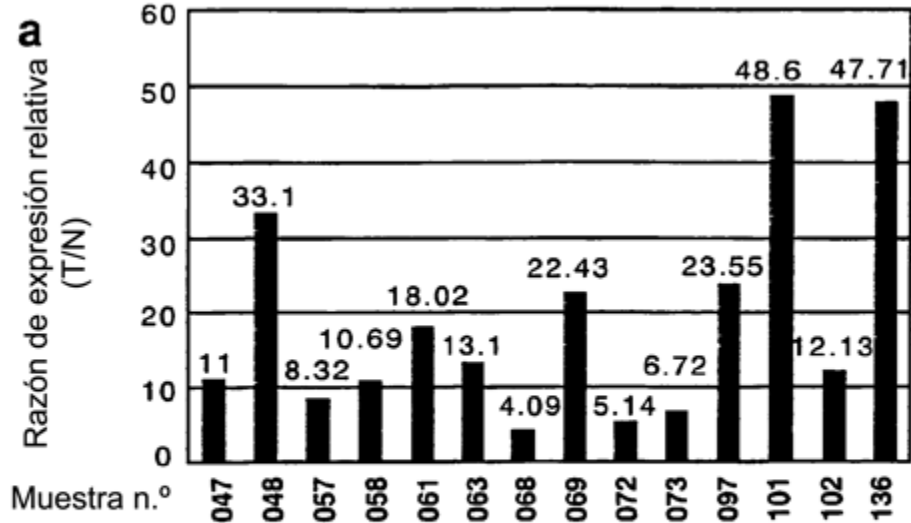
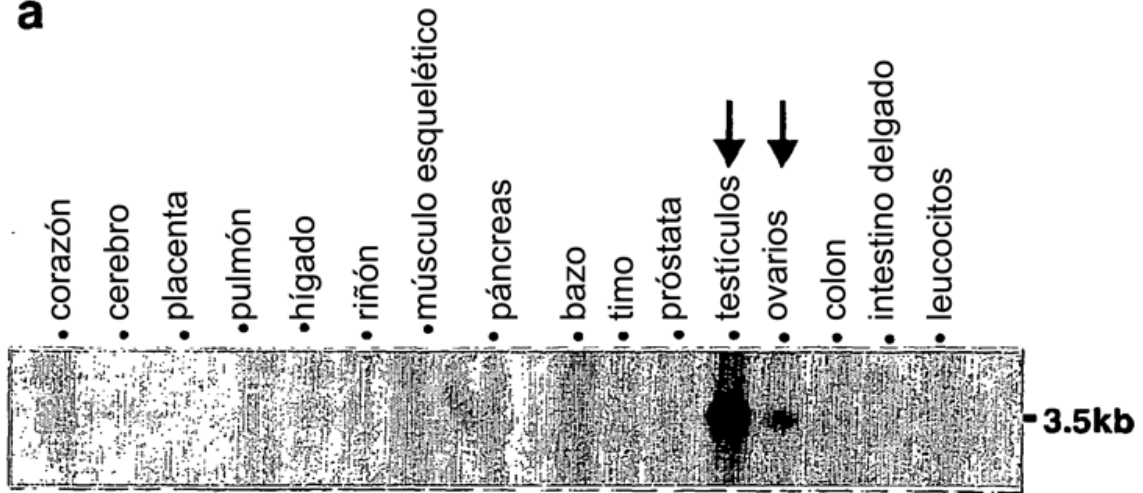


FIG.2

a



b

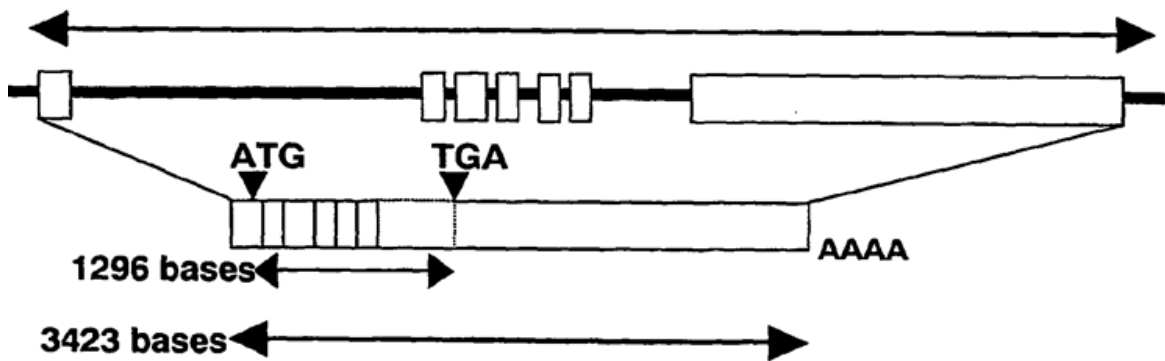


FIG.3

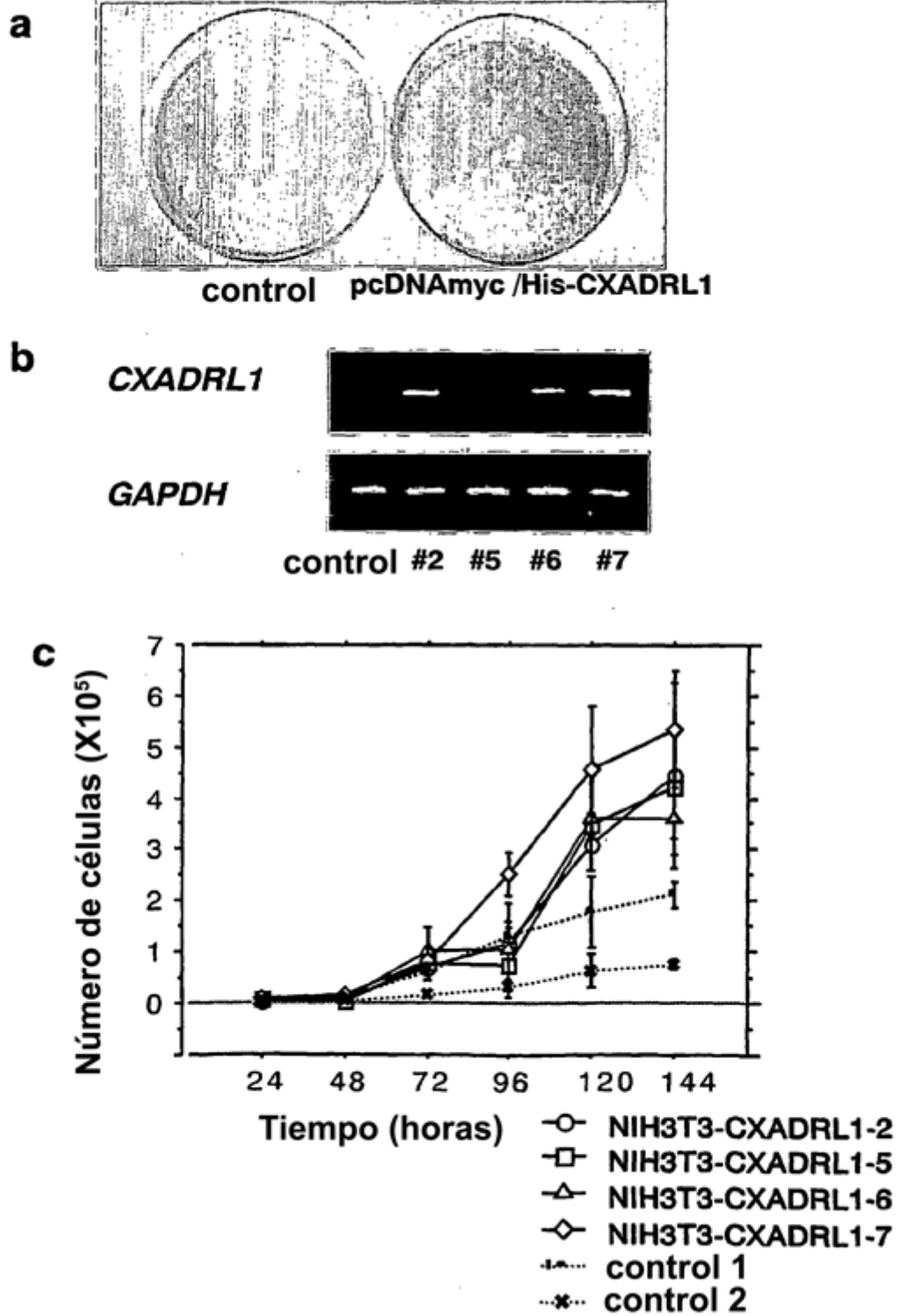


FIG.4

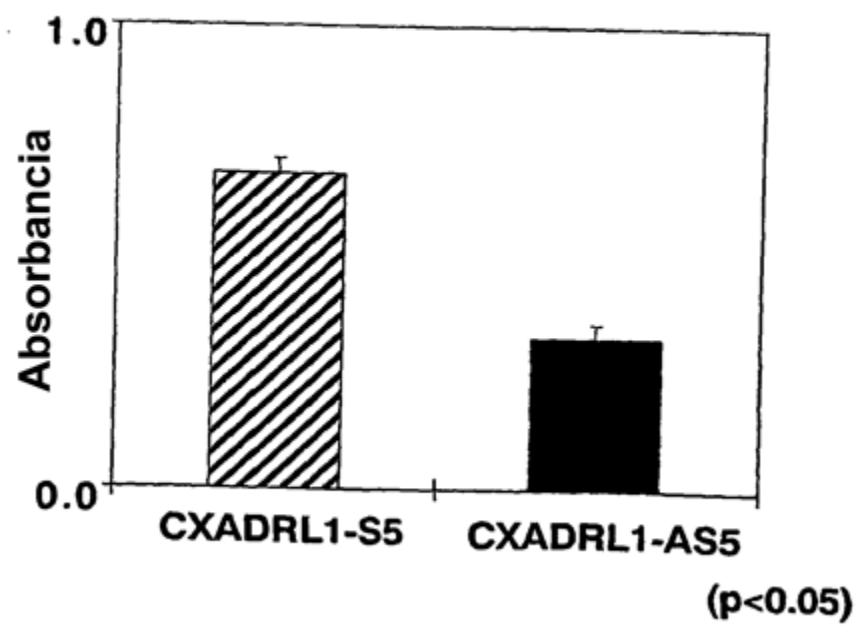
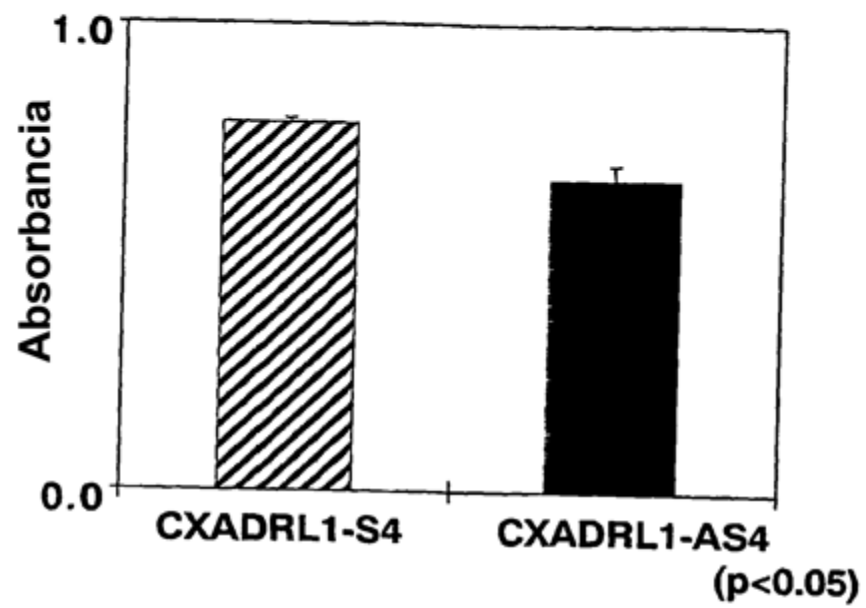


FIG.5

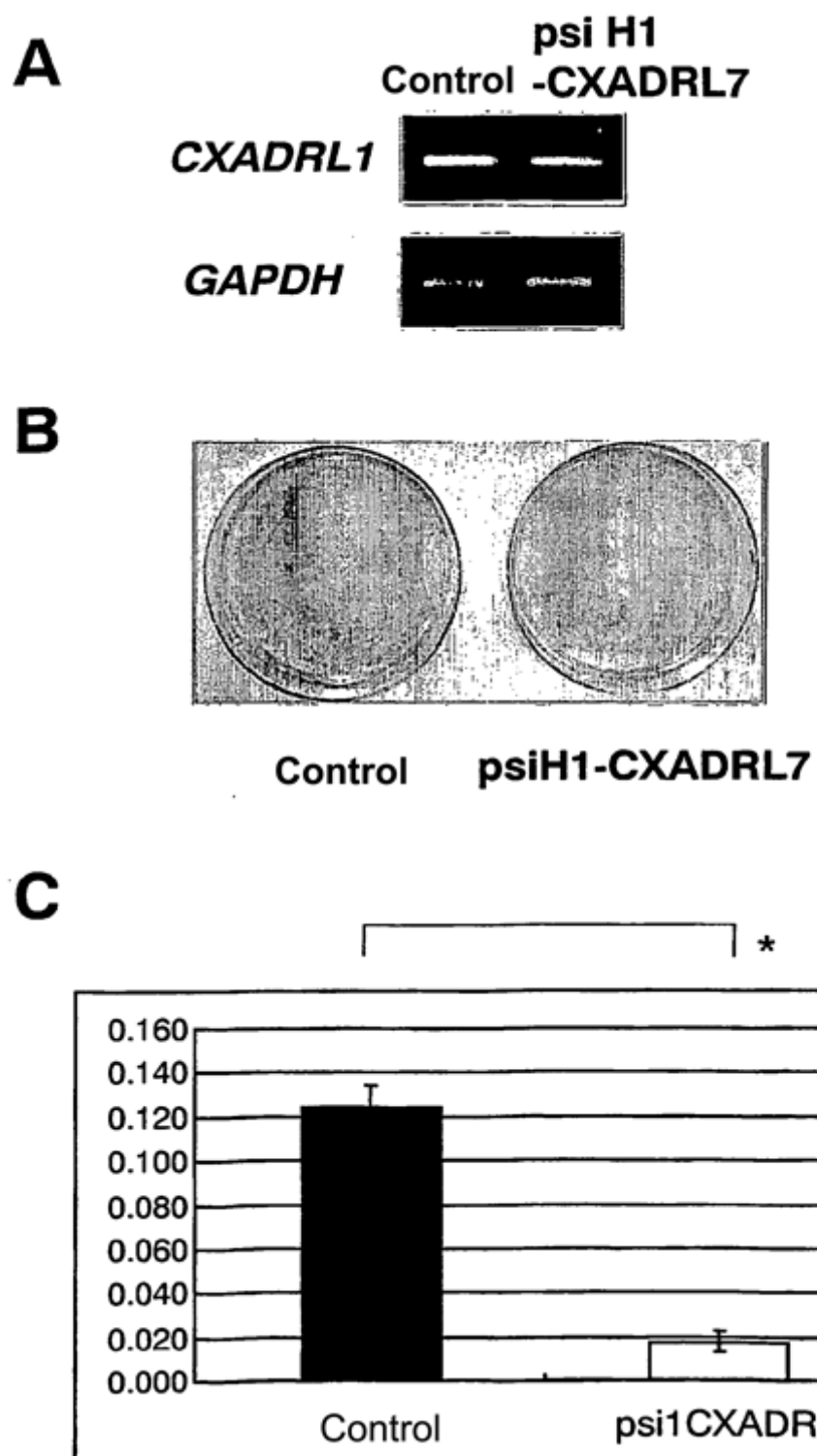


FIG.6

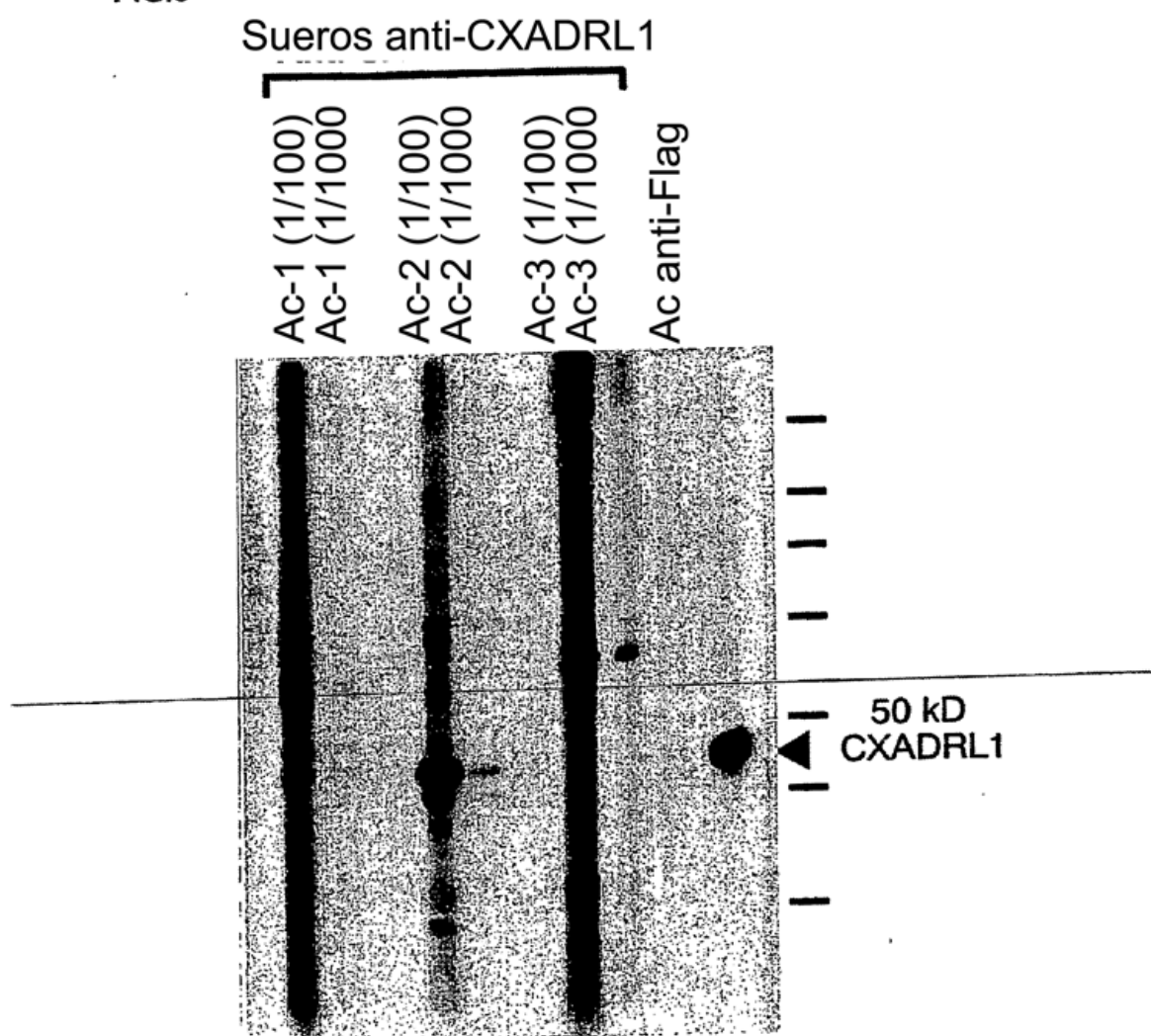
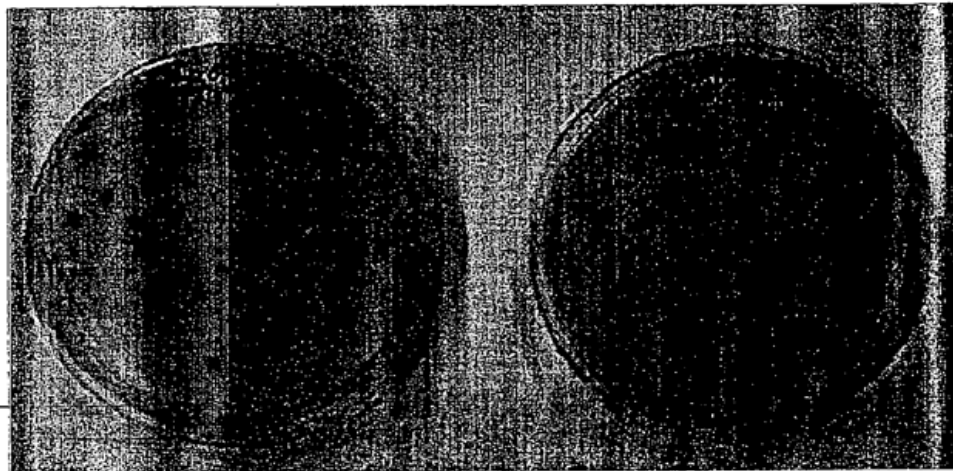


FIG.7



pAS2 -CXADRL1 +pACT2-AIP1

pAS2(control) +pACT2 -AIP1

FIG.8

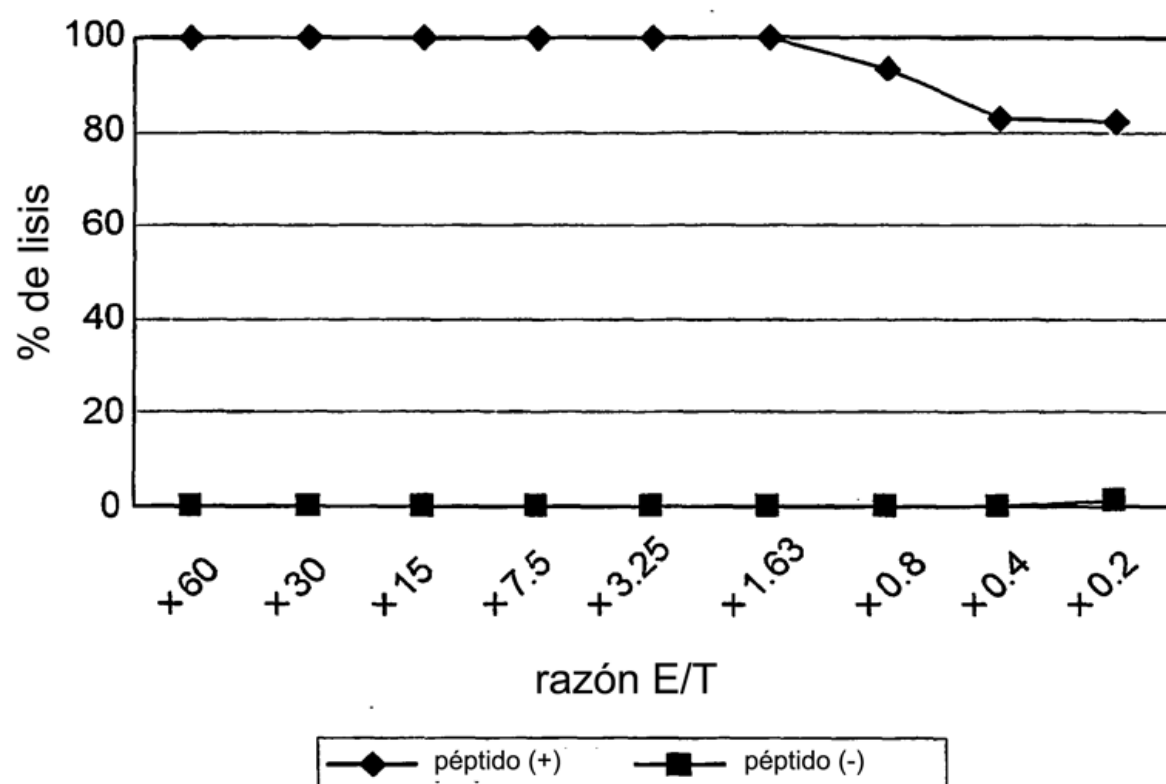


FIG.9

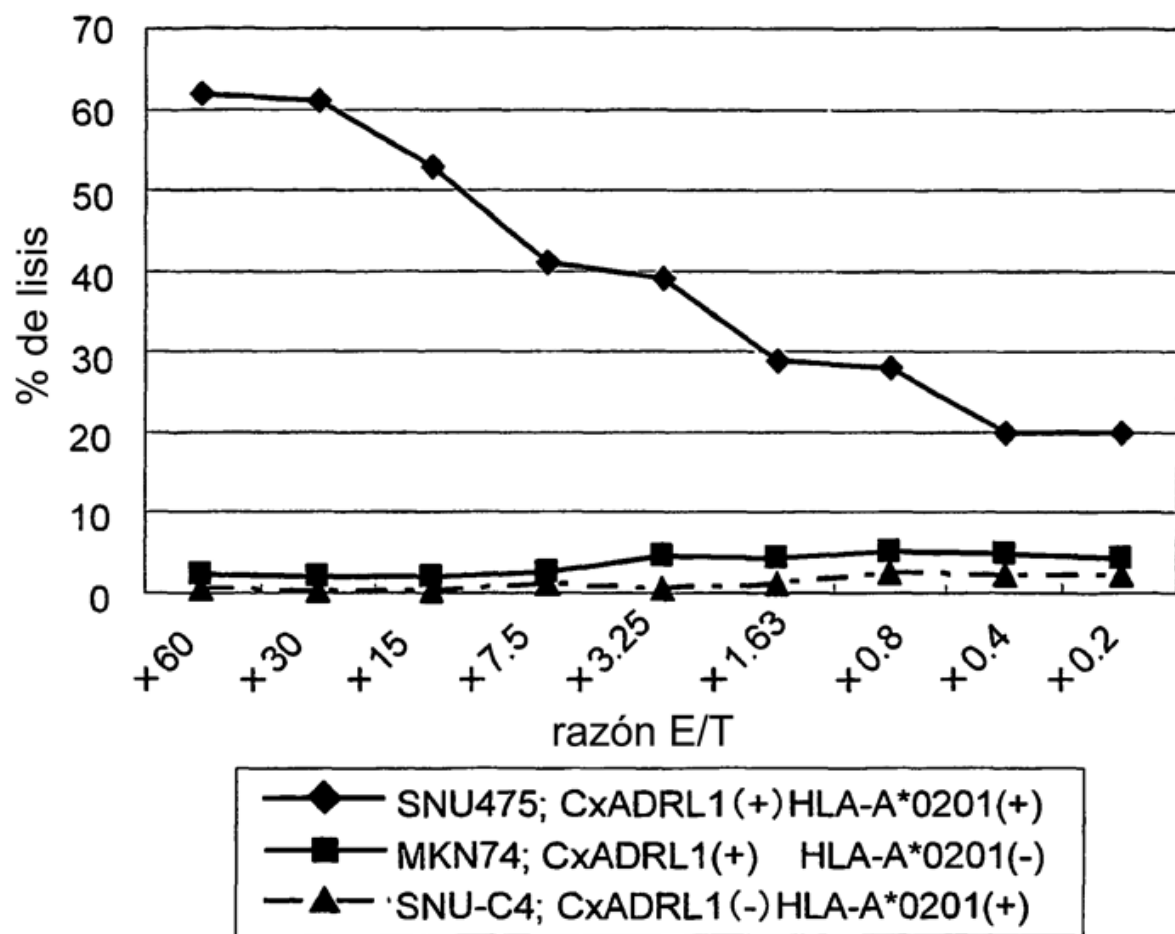


FIG.10

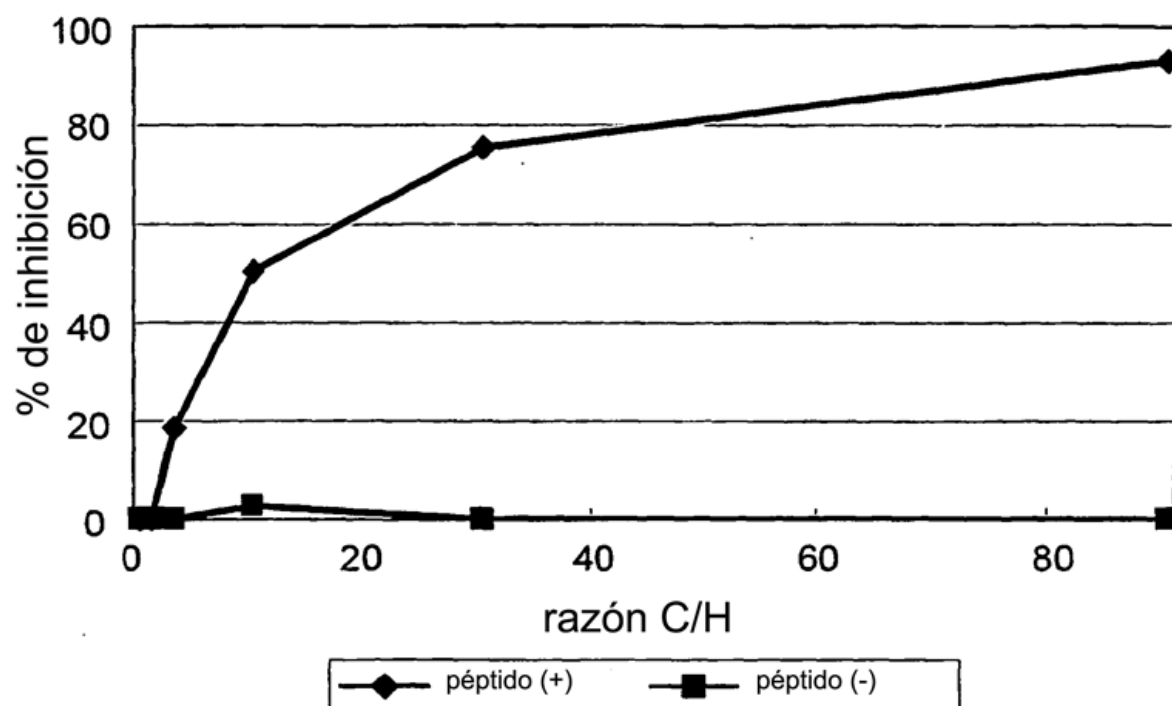


FIG.11

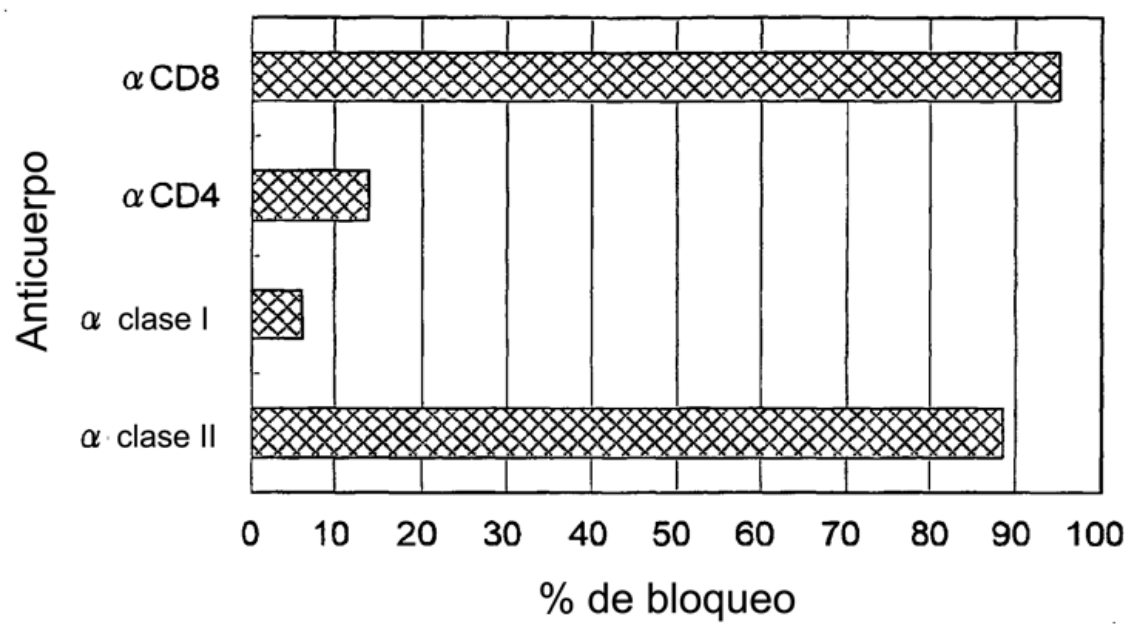


FIG.12

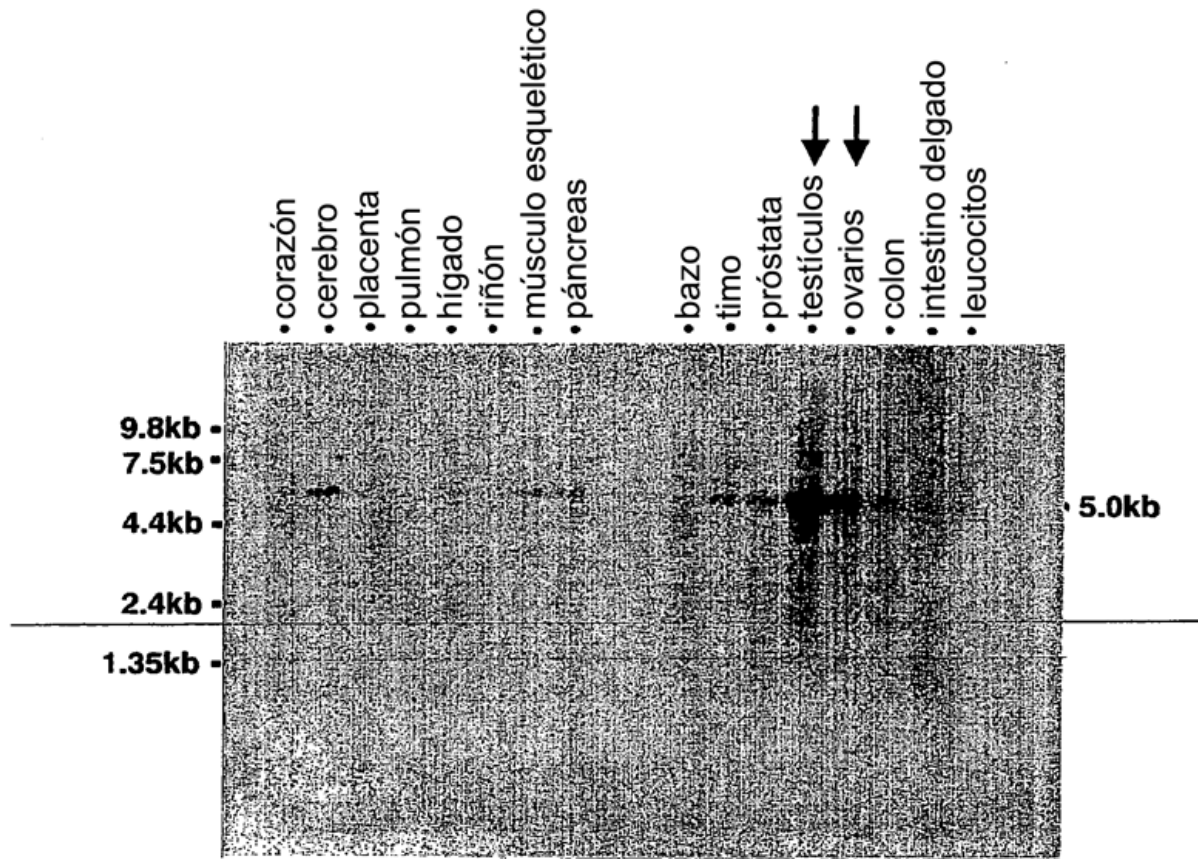


FIG.13

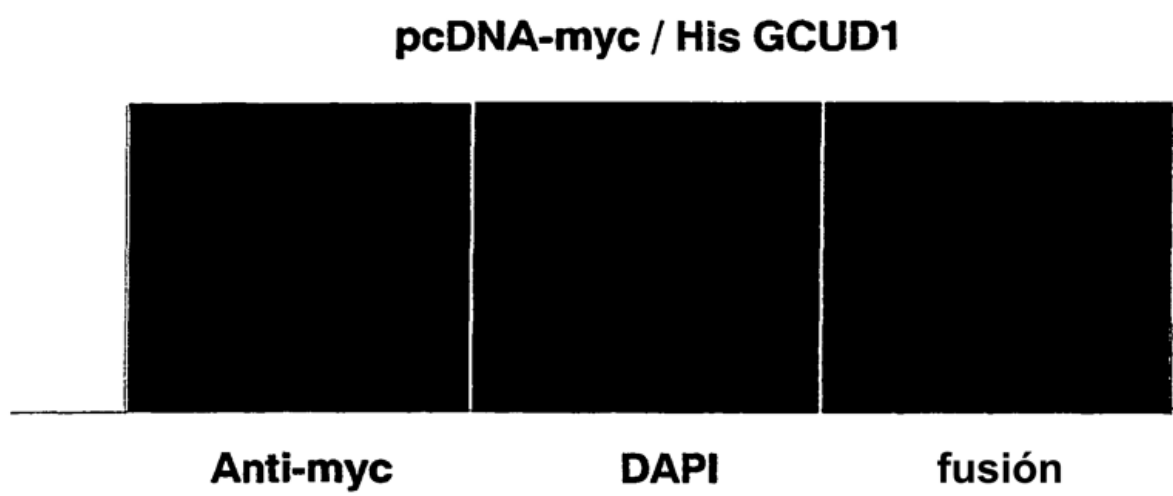


FIG.14

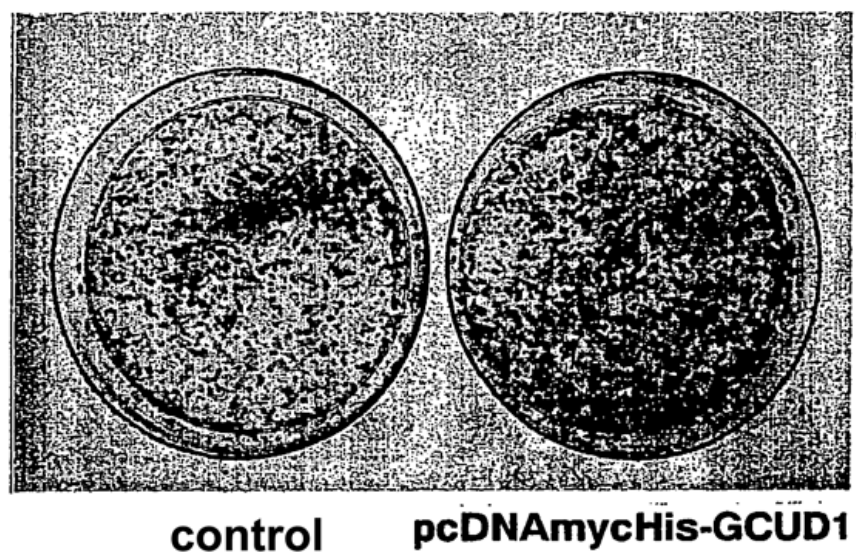


FIG.15

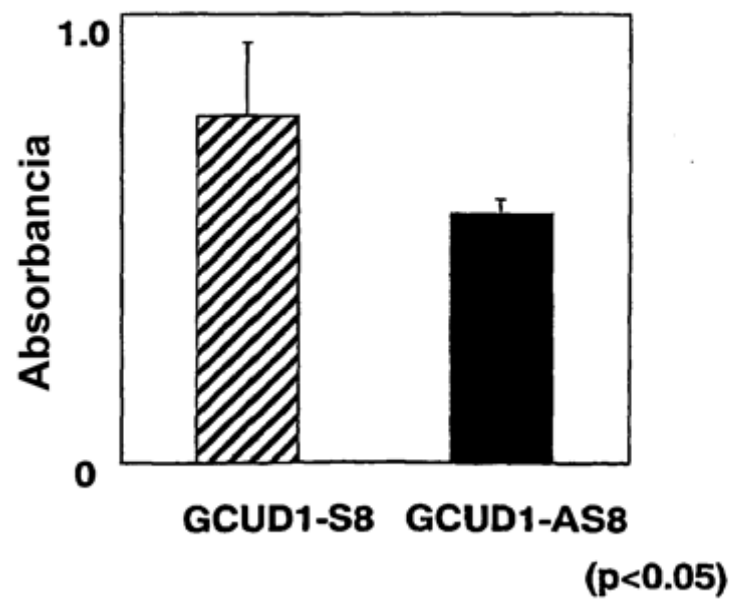
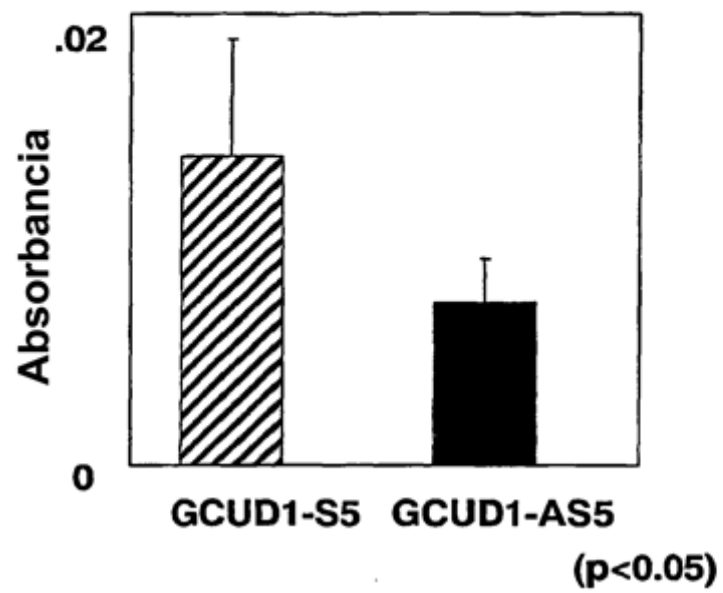


FIG.16

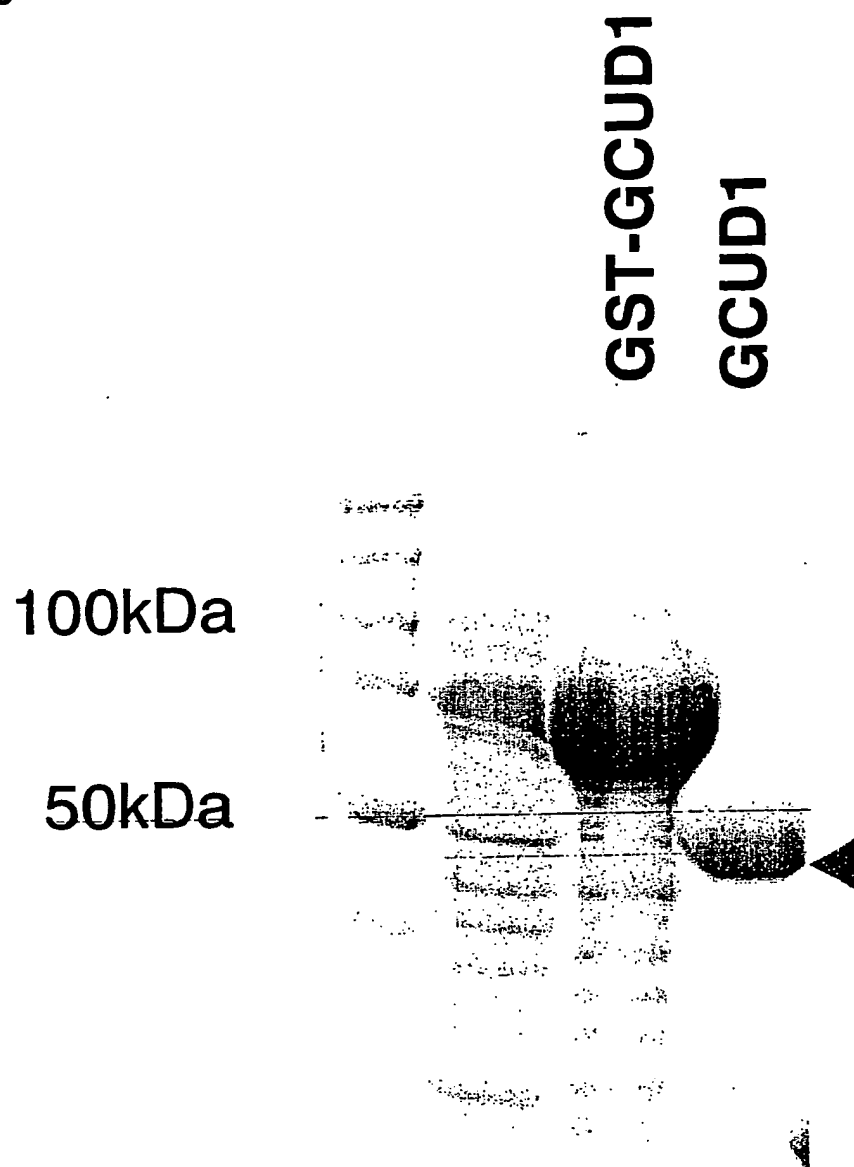


FIG.17

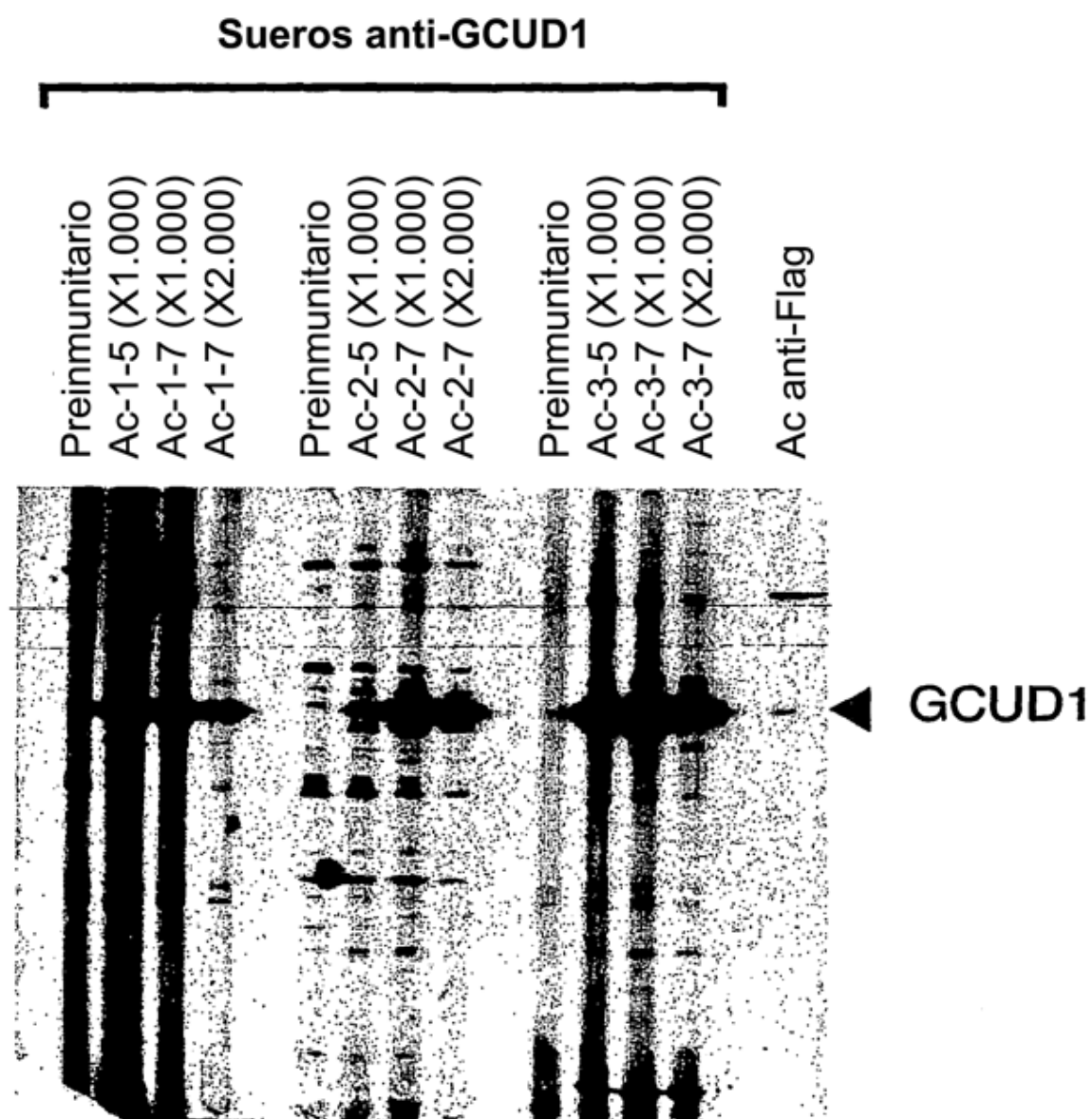


FIG.18

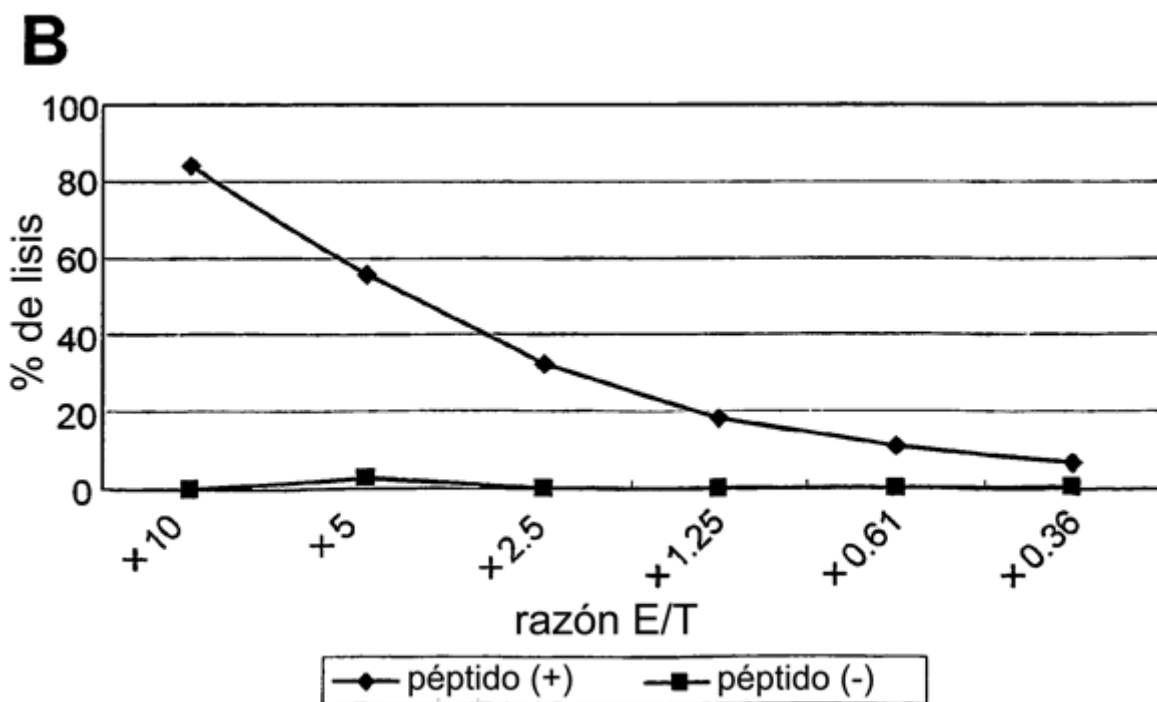
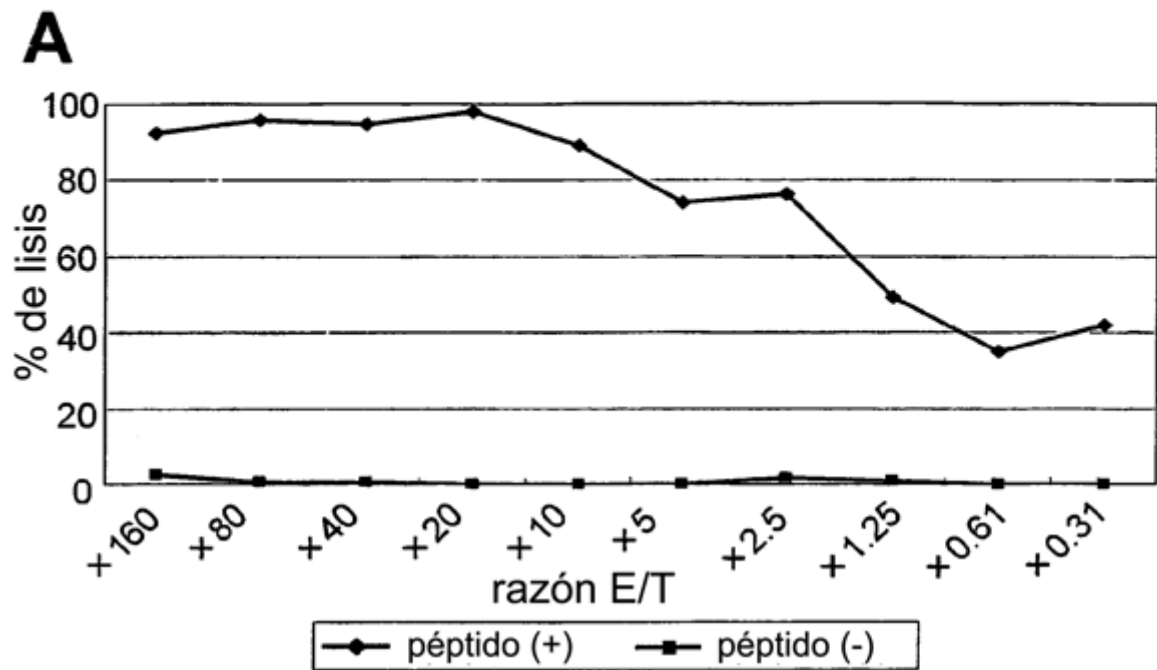


FIG.19

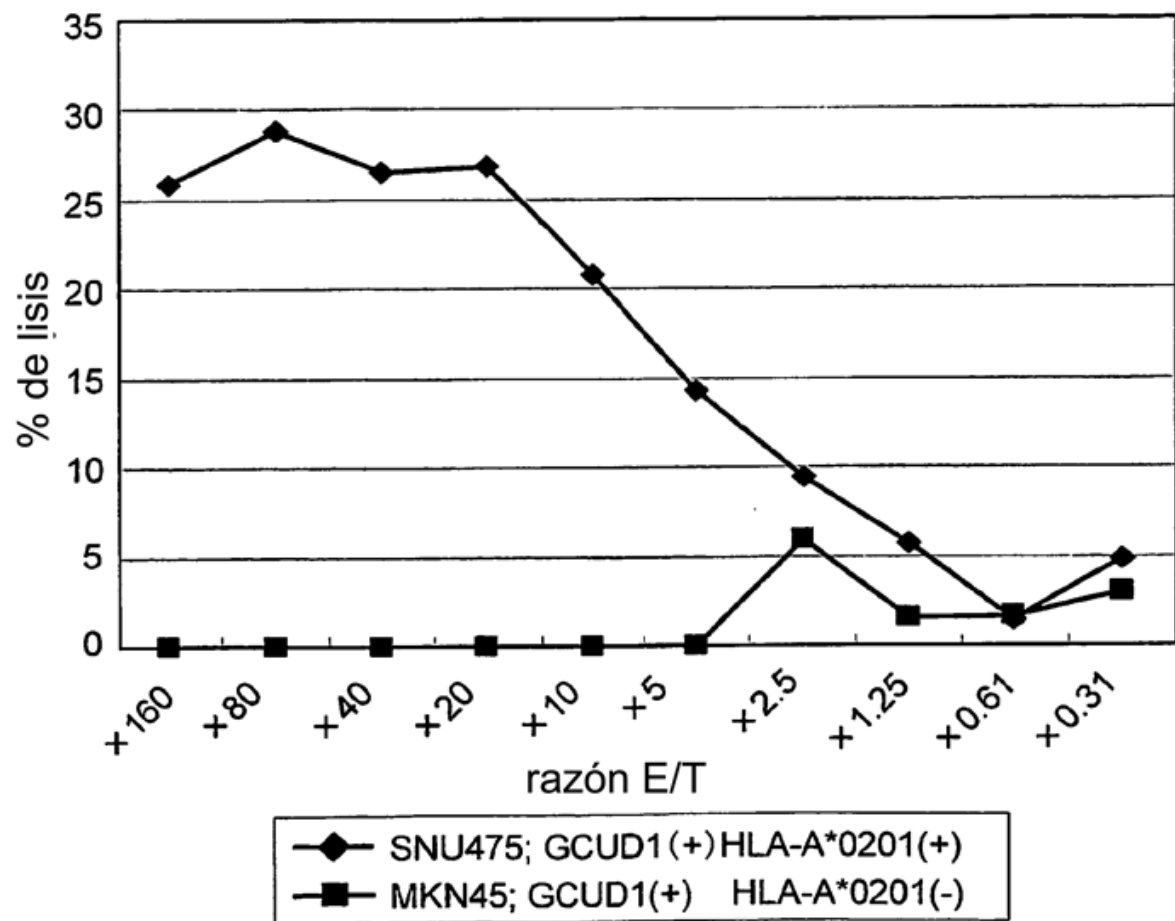


FIG.20

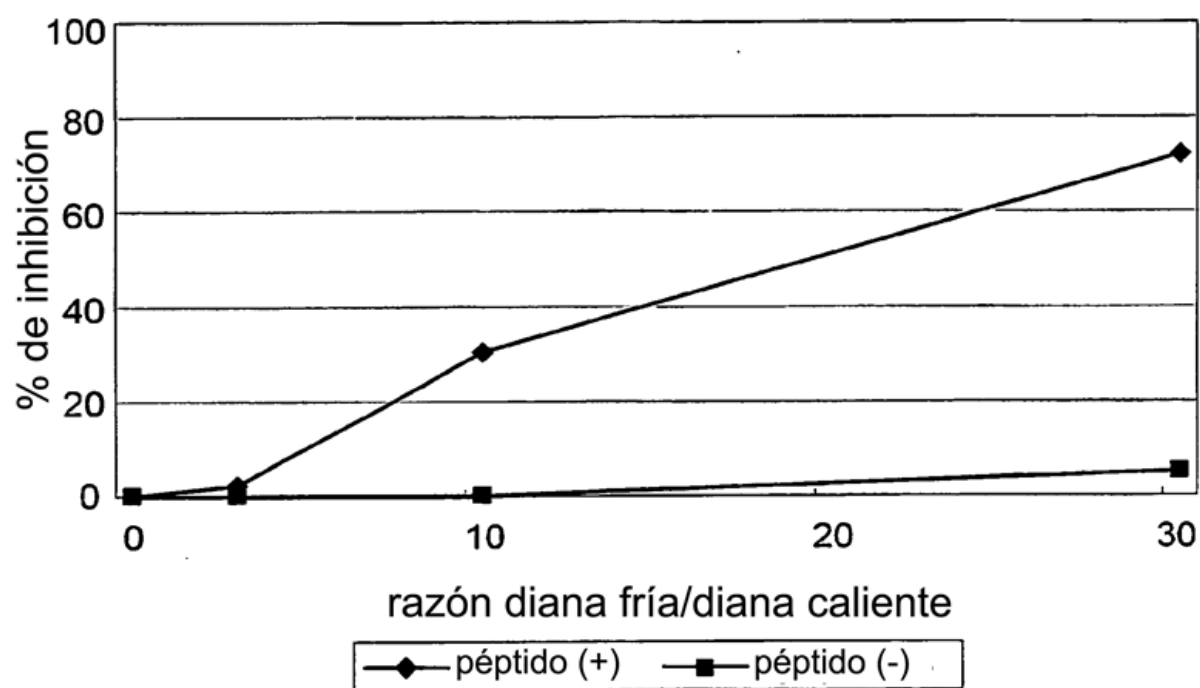


FIG.21

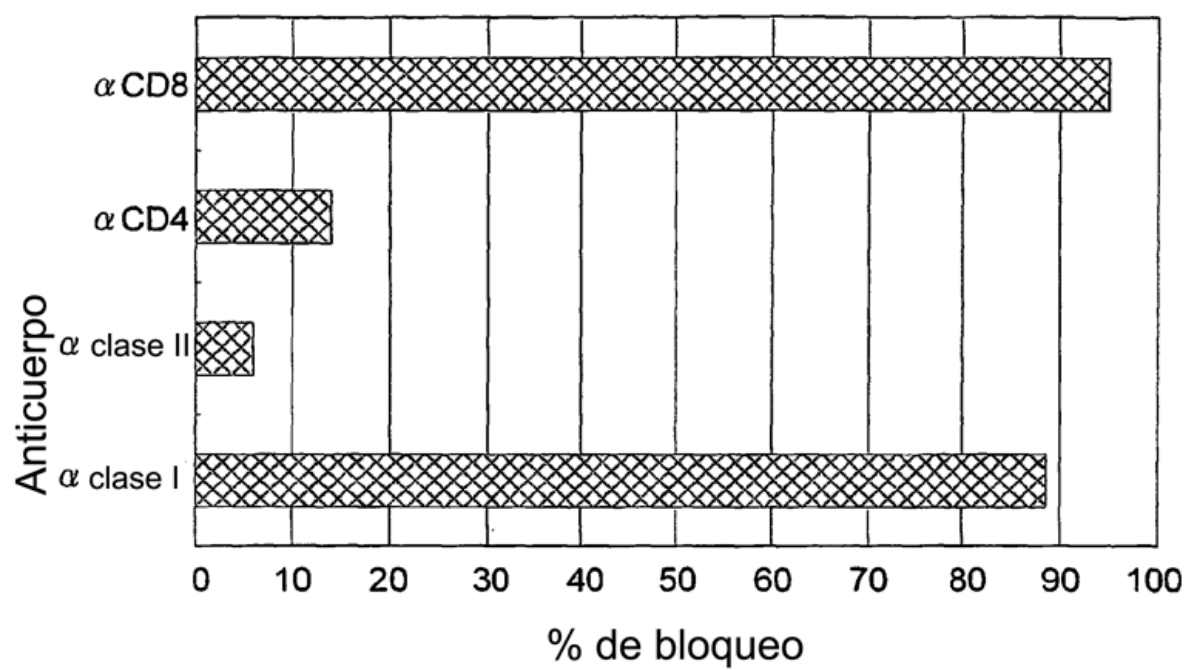


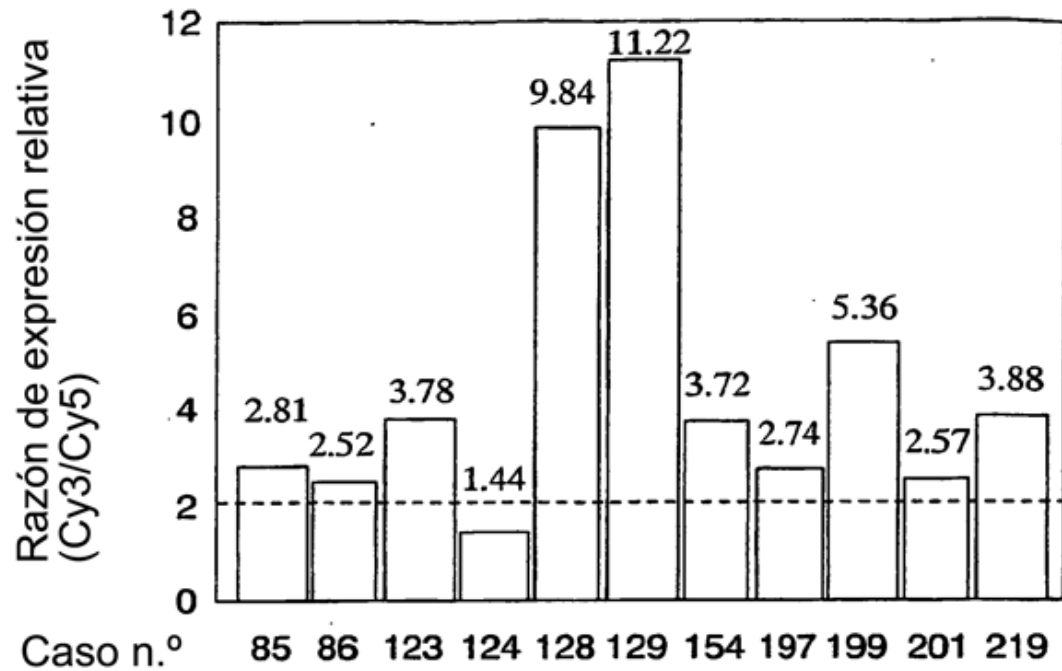
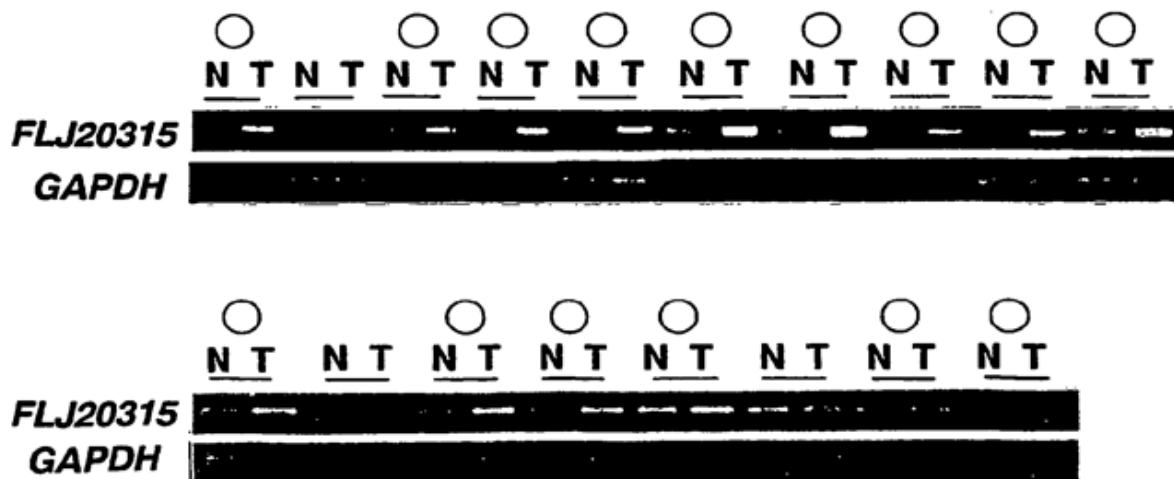
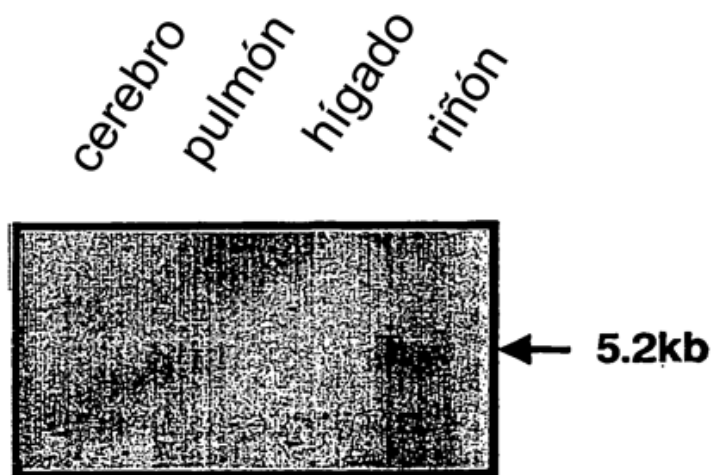
FIG.22**a****b**

FIG.23

a

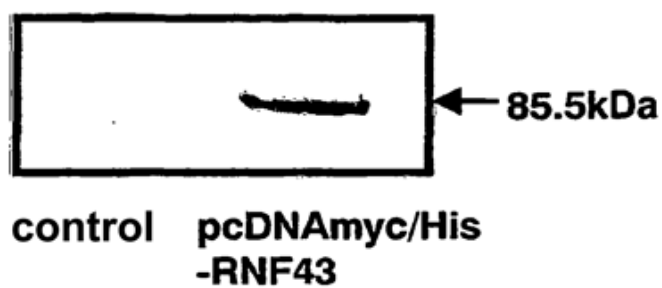


b



FIG.24

a



b

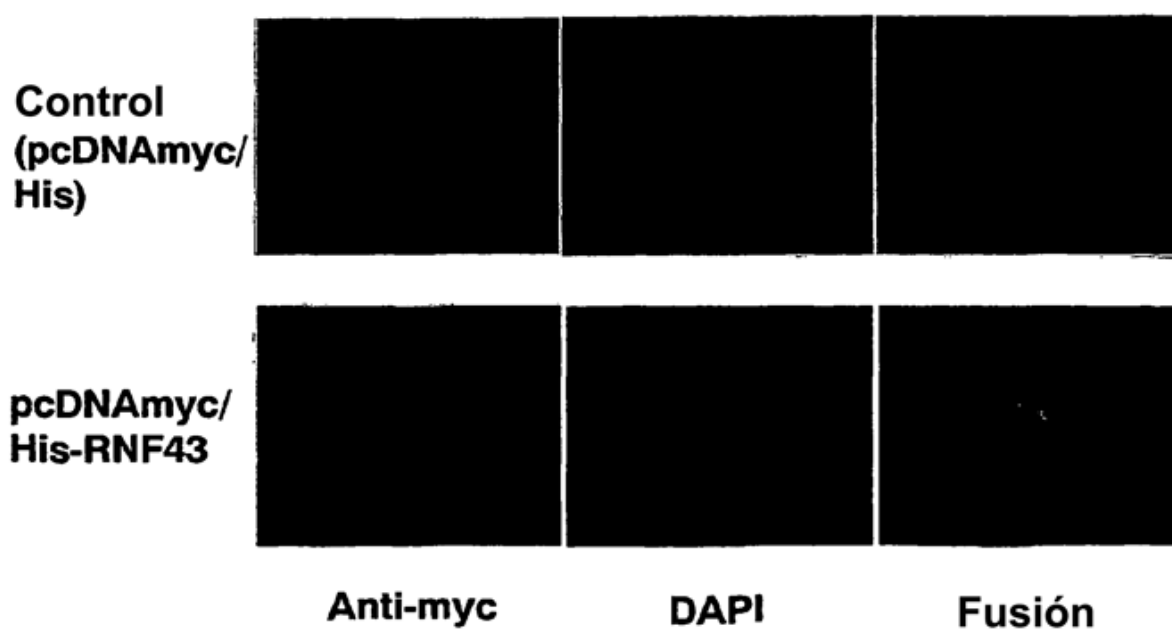
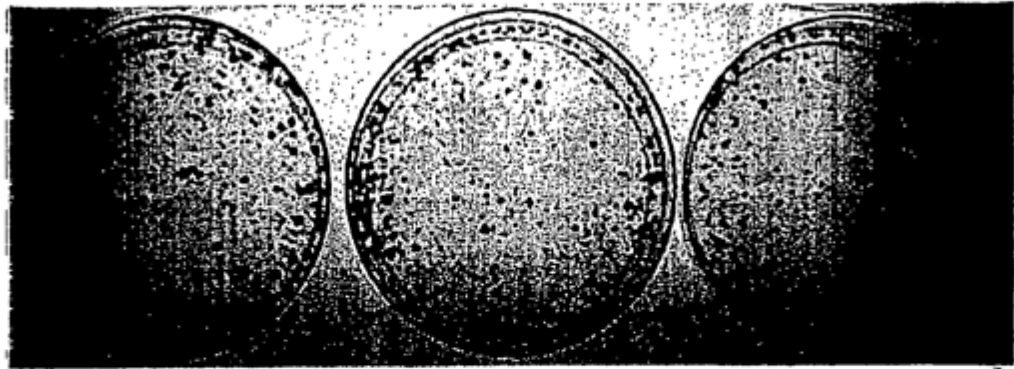


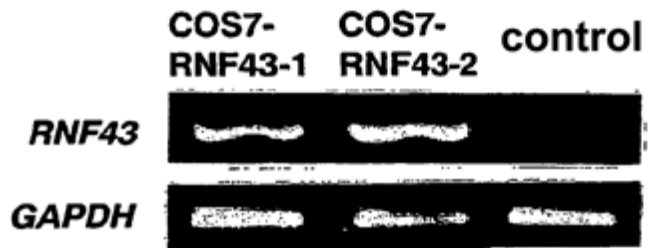
FIG.25

a

pcDNA-RNF43

control

pcDNA-antisentido

bCOS7-
RNF43-1COS7-
RNF43-2

control

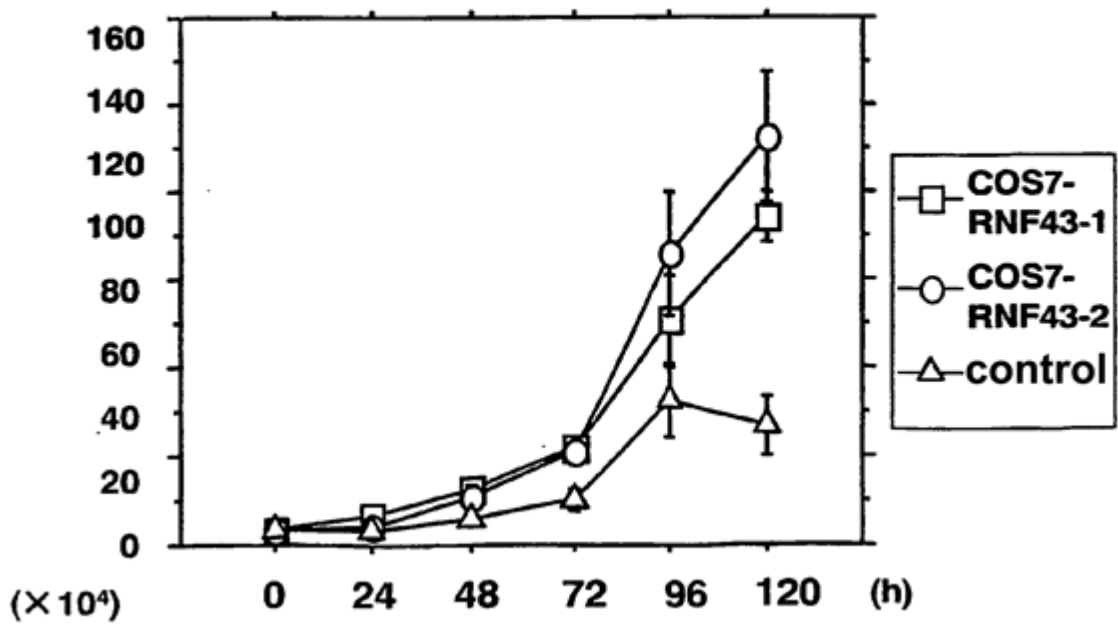
*RNF43**GAPDH***c**

FIG.26

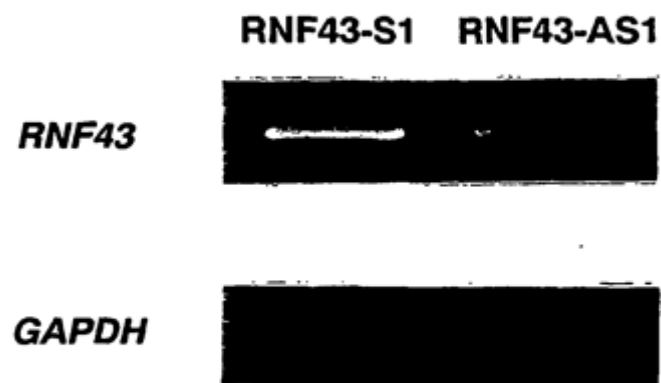
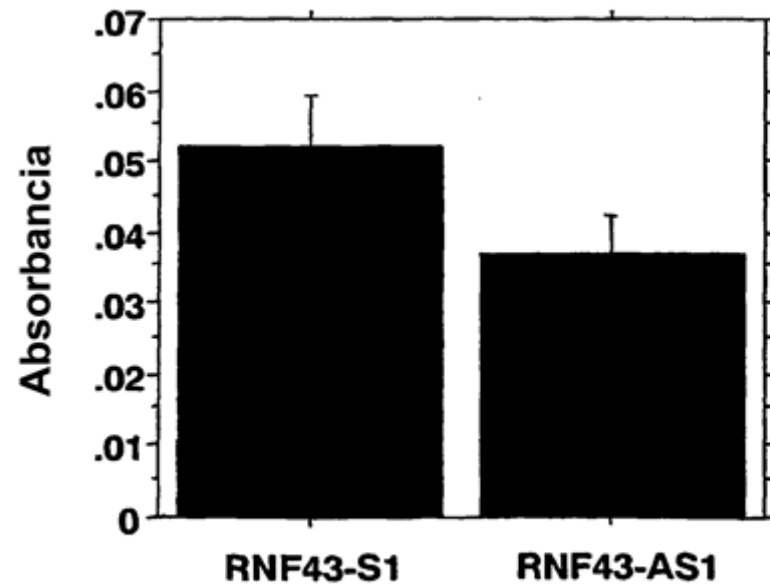
a**b****(p<0.05)**

FIG.27

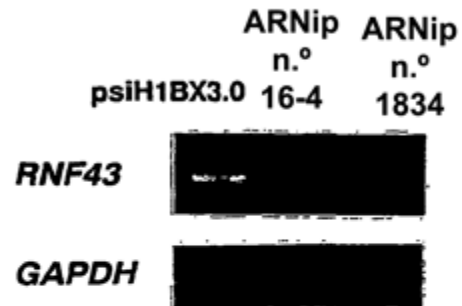
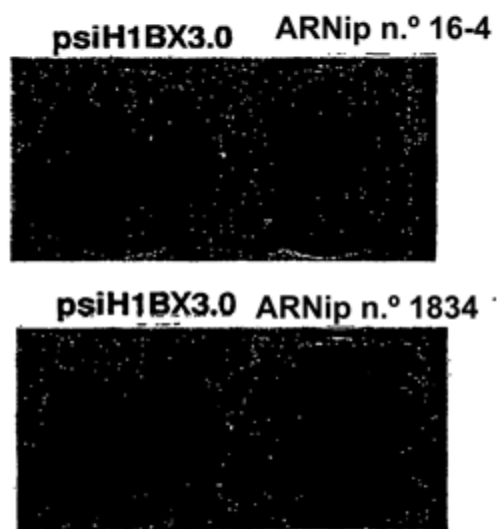
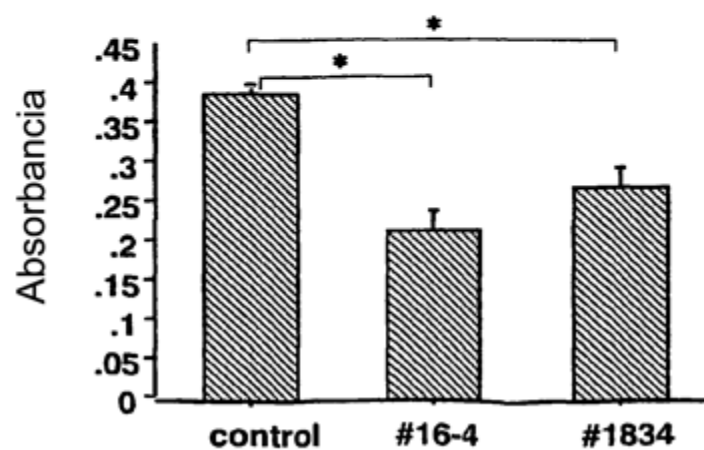
A RT-PCR semicuantitativa**B****C** Ensayo de MTT

FIG.28

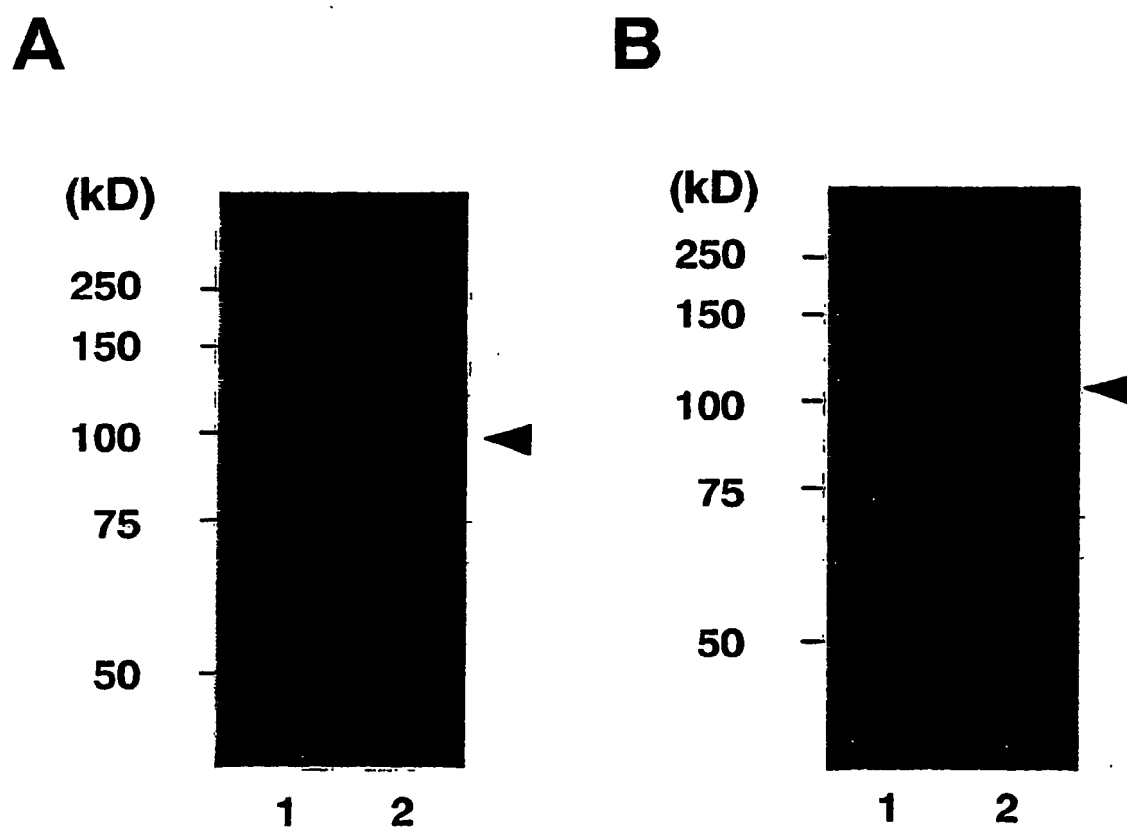


FIG.29

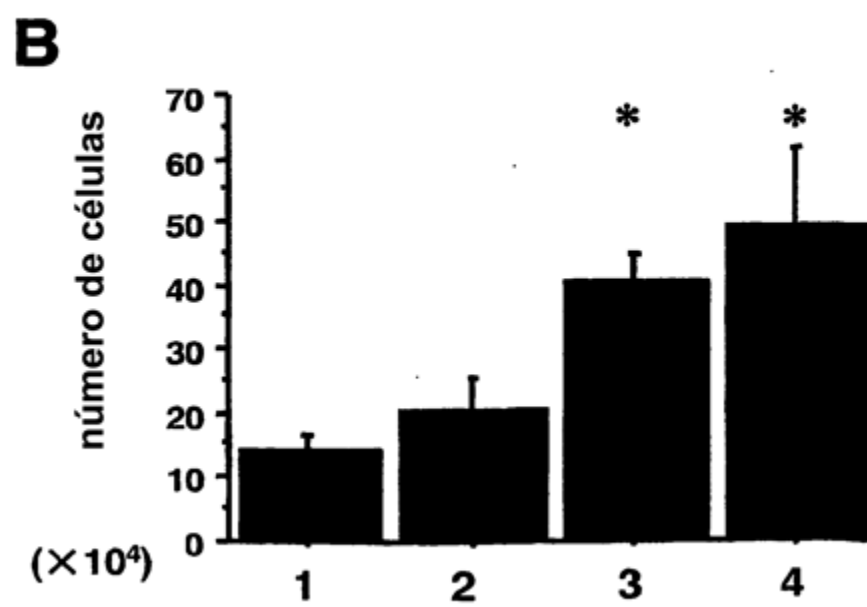
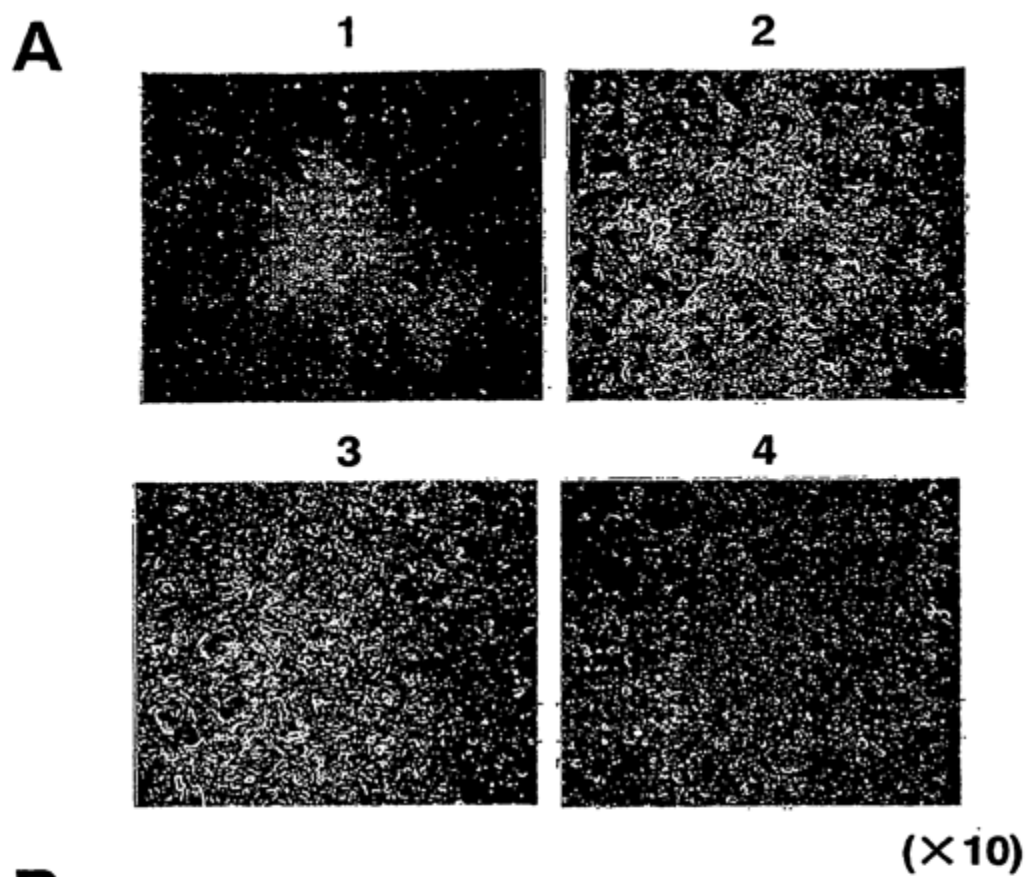
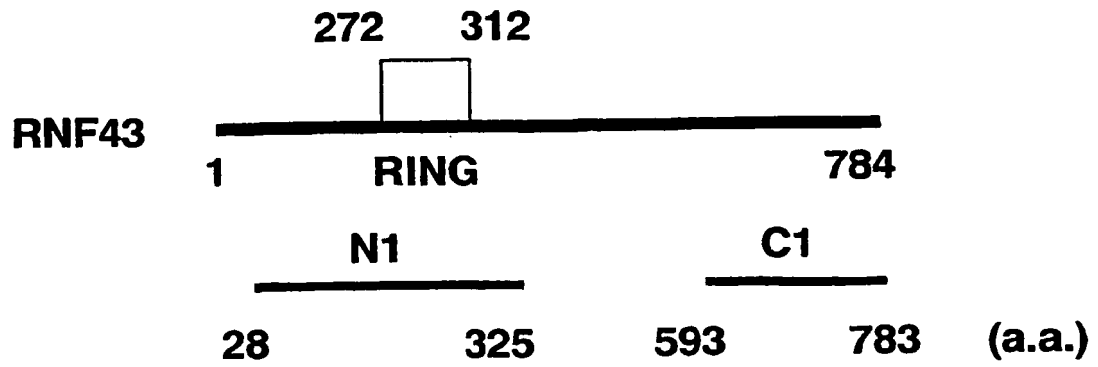
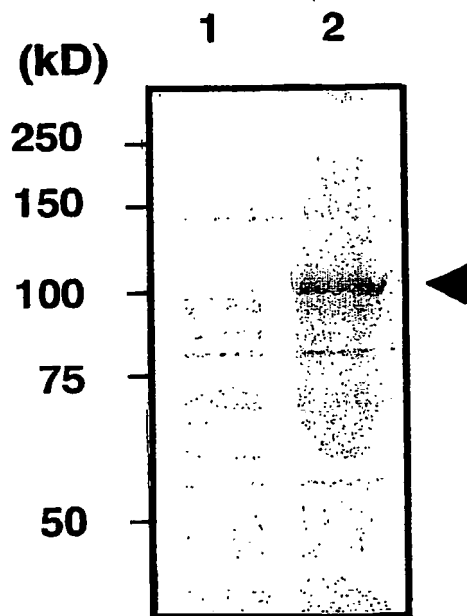


FIG.30

A



B



C

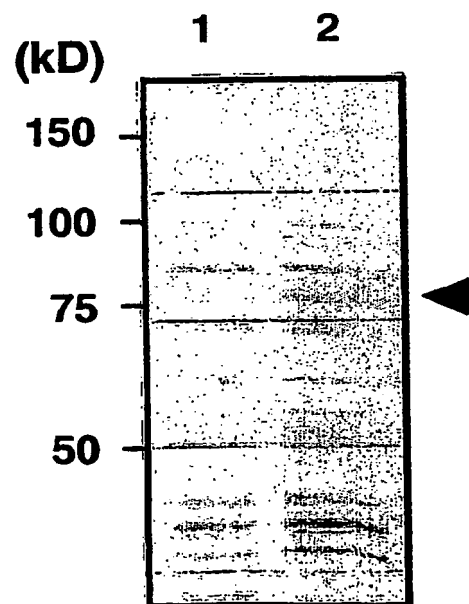
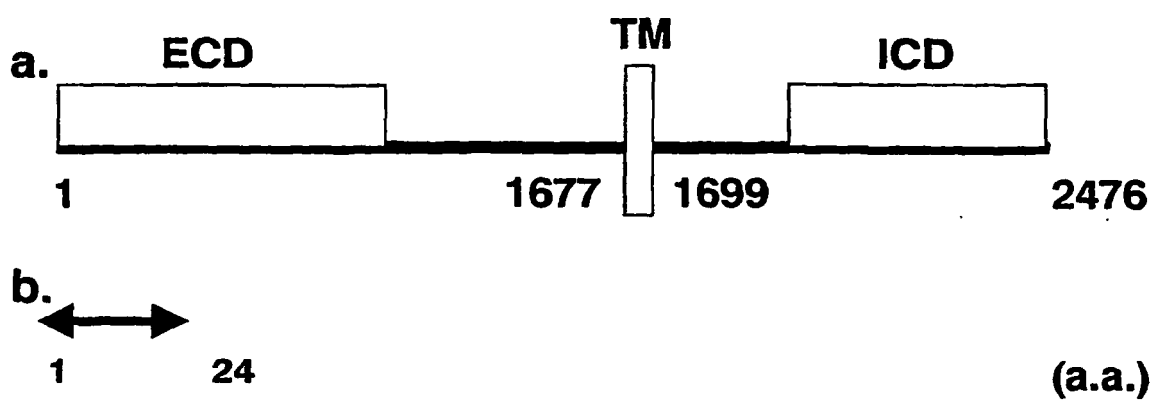
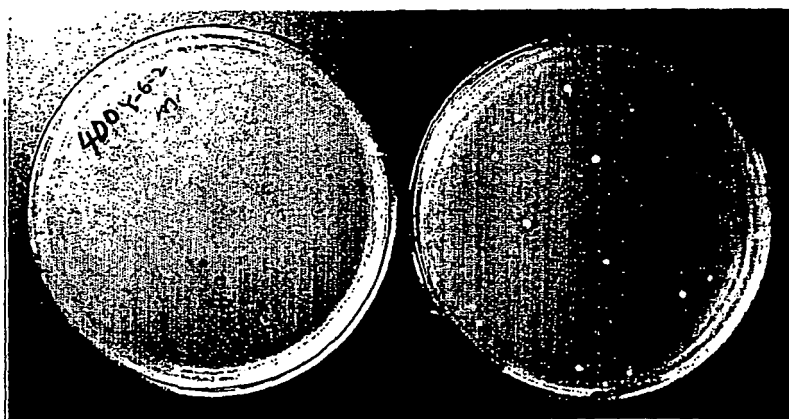


FIG.31

A



B

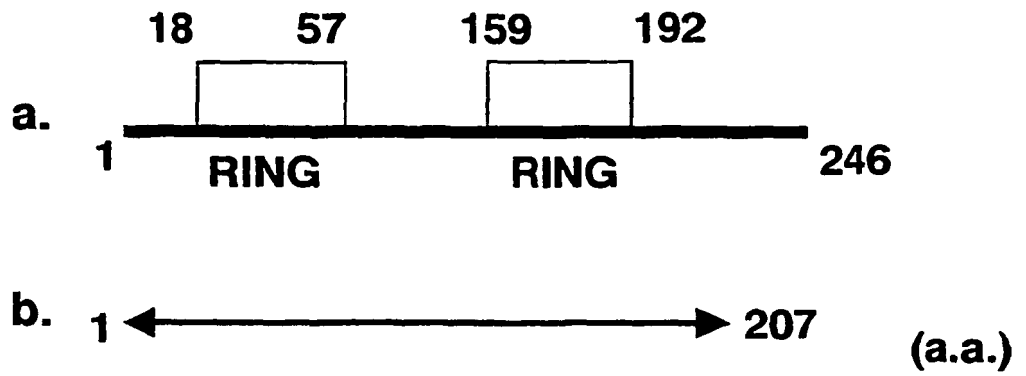


1

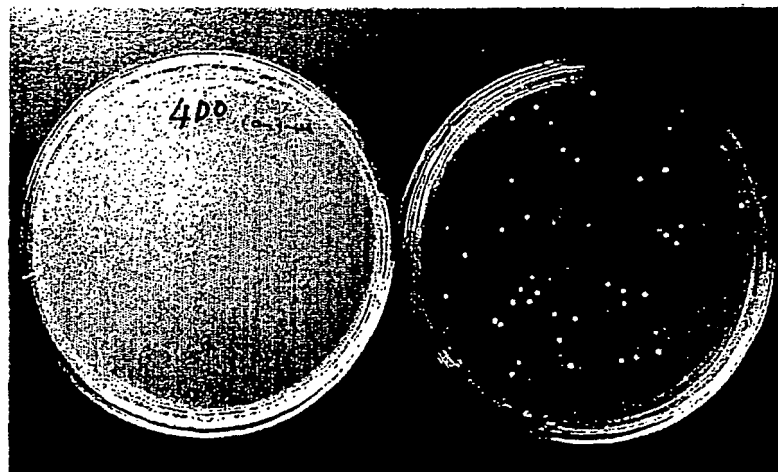
2

FIG.32

A



B



1

2

FIG.33

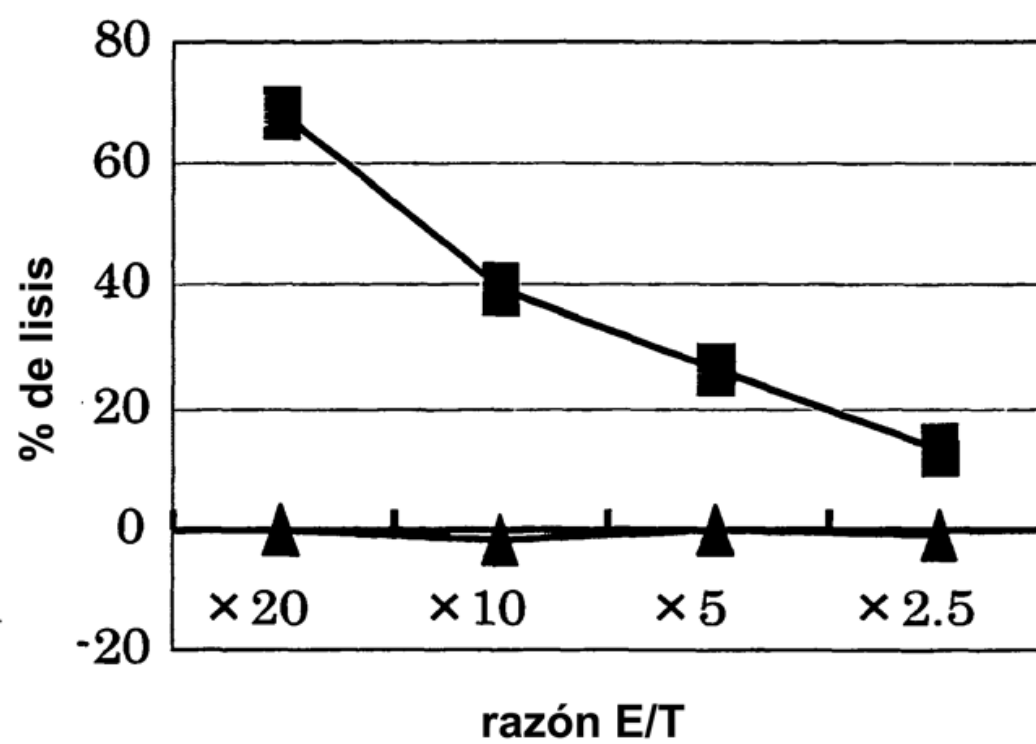


FIG.34

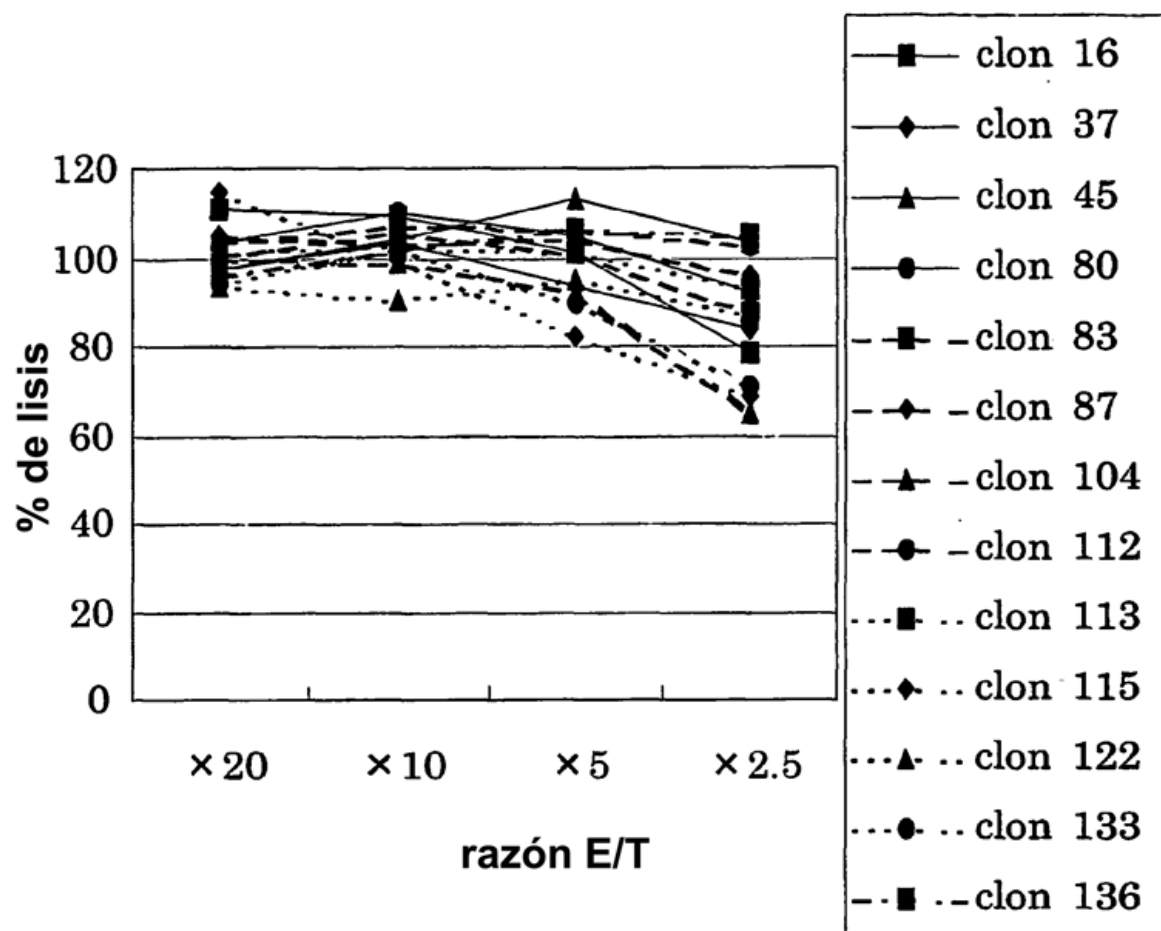


FIG.35

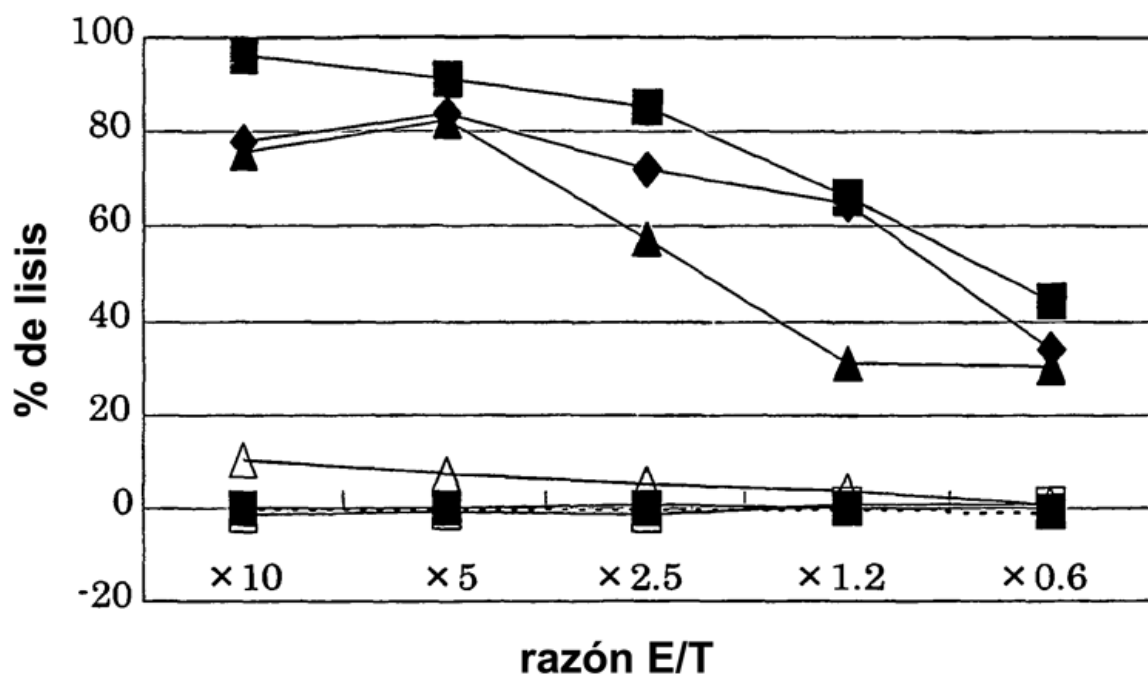


FIG.36

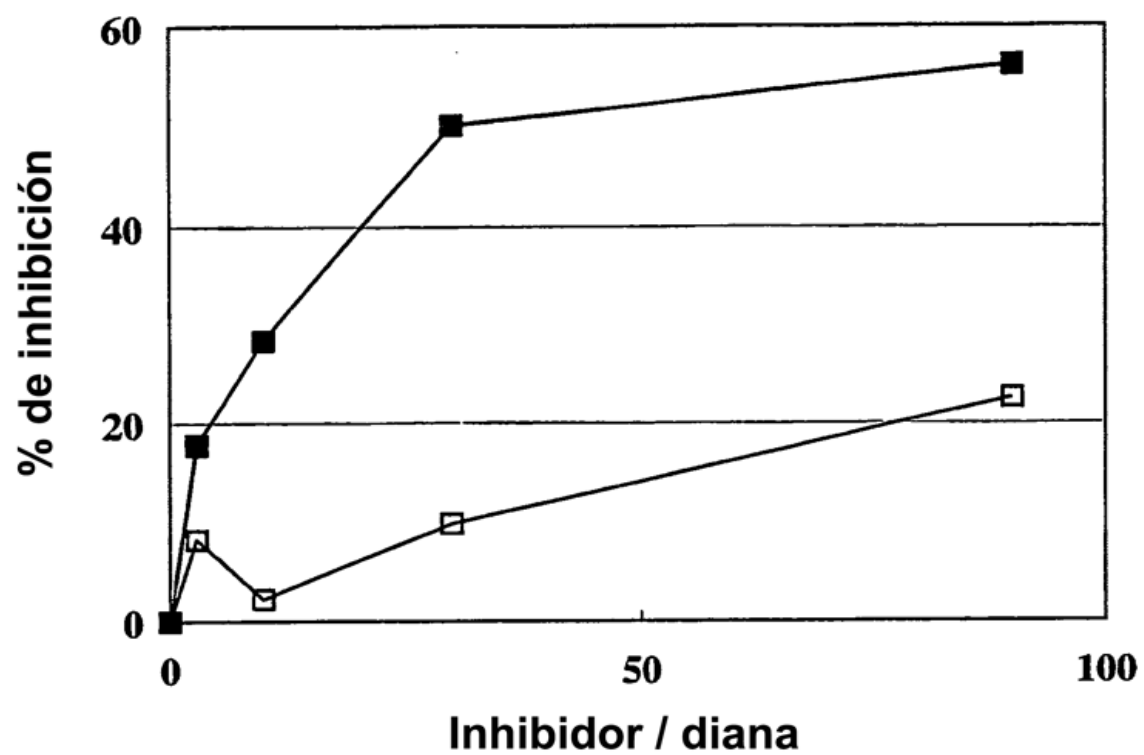


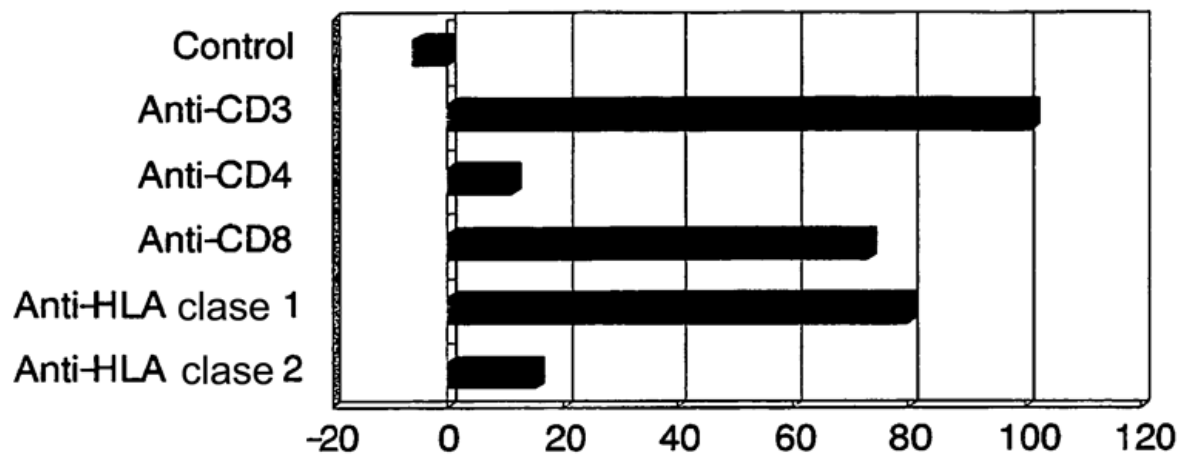
FIG.37

FIG.38A

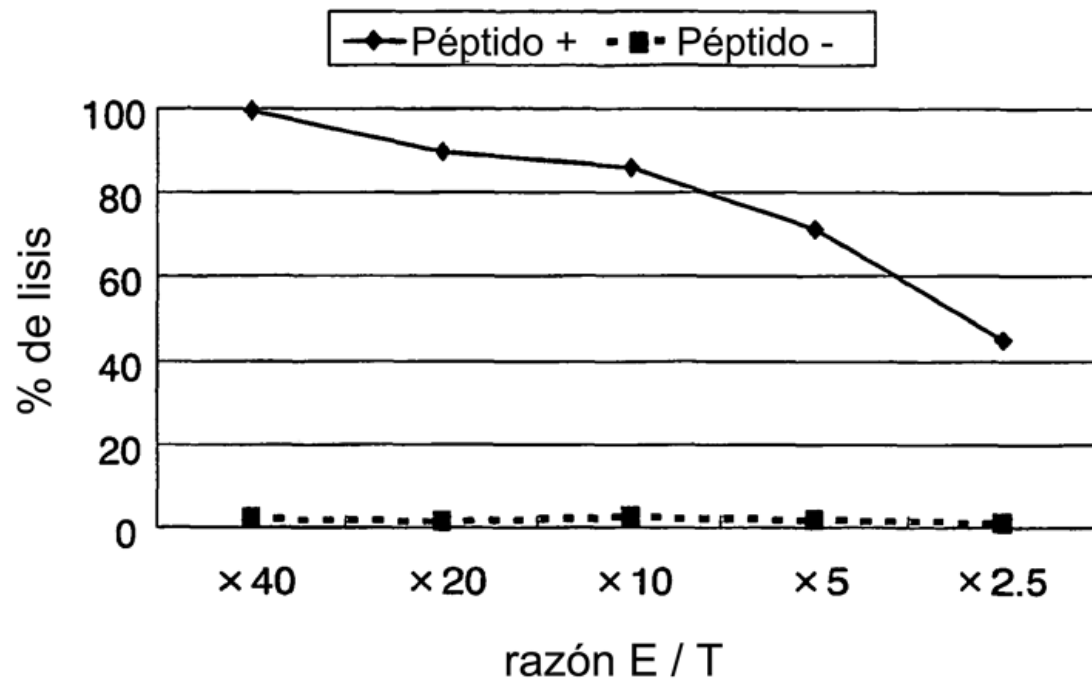


FIG.38B

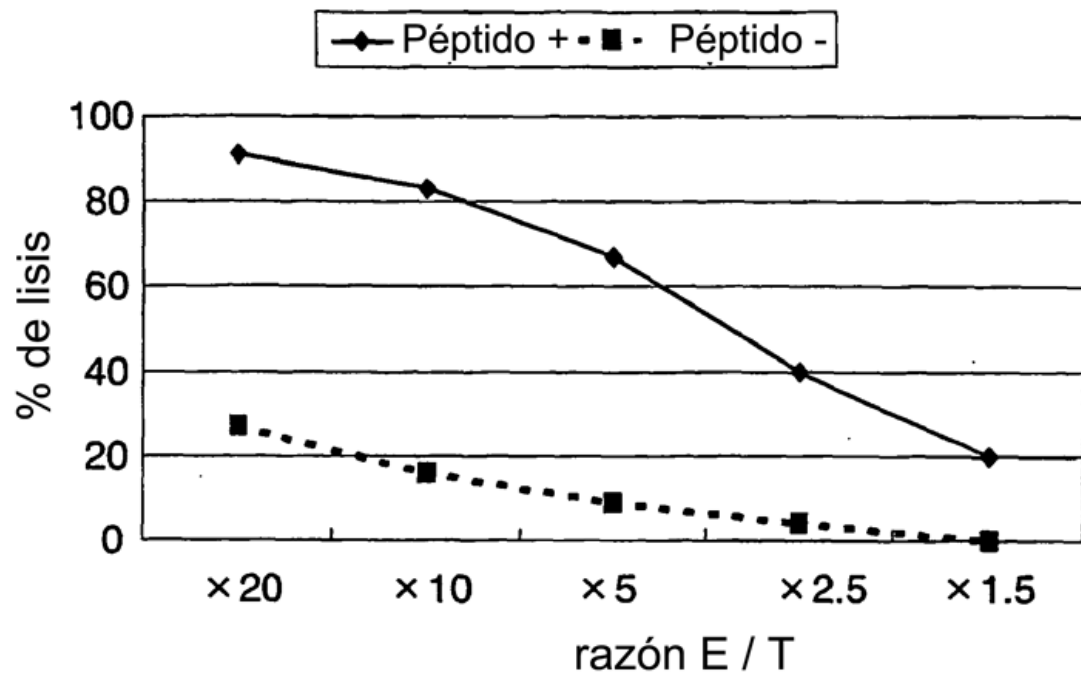


FIG.39A

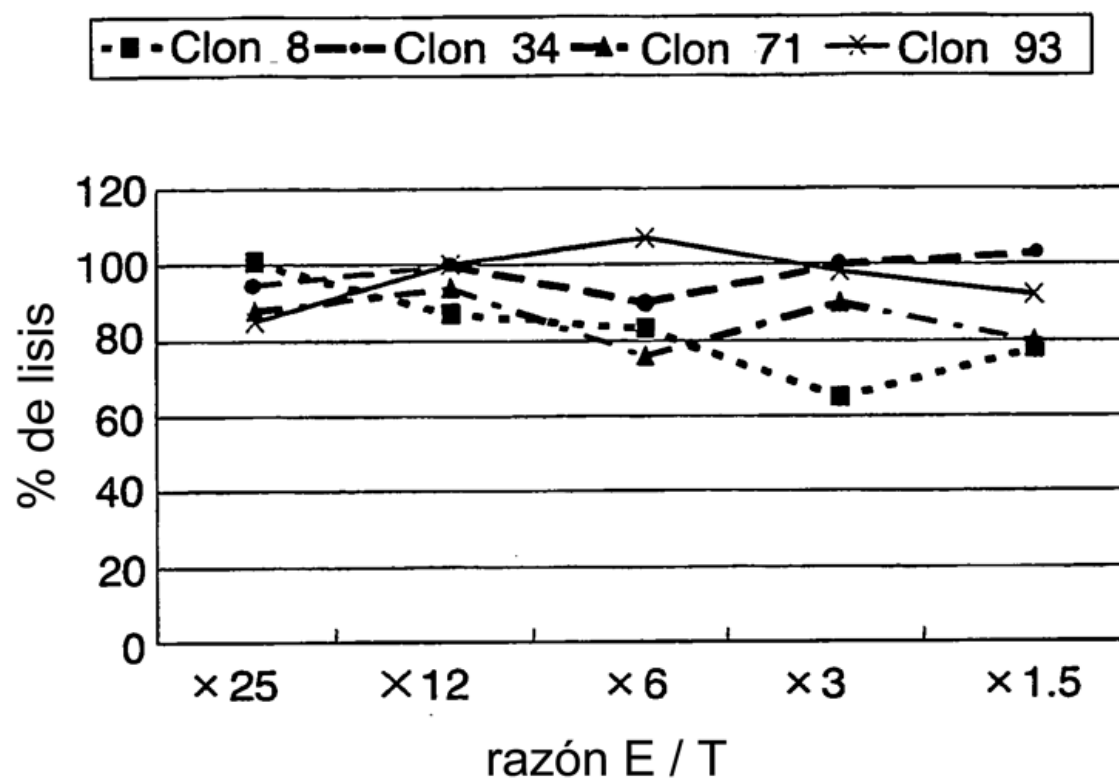


FIG.39B

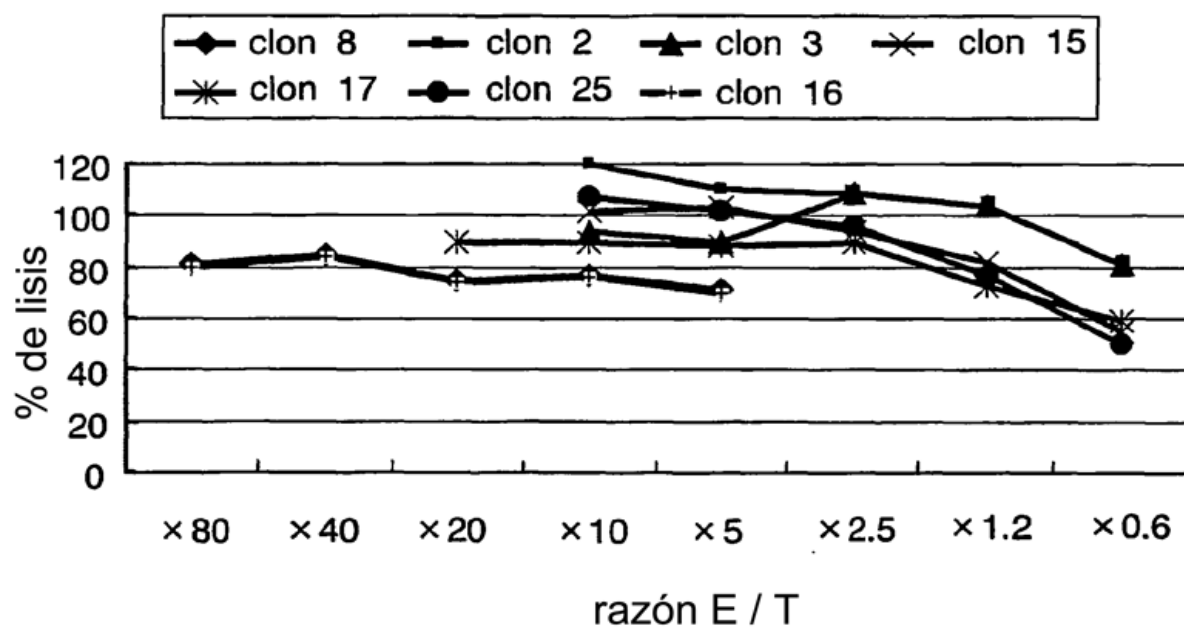


FIG.40A

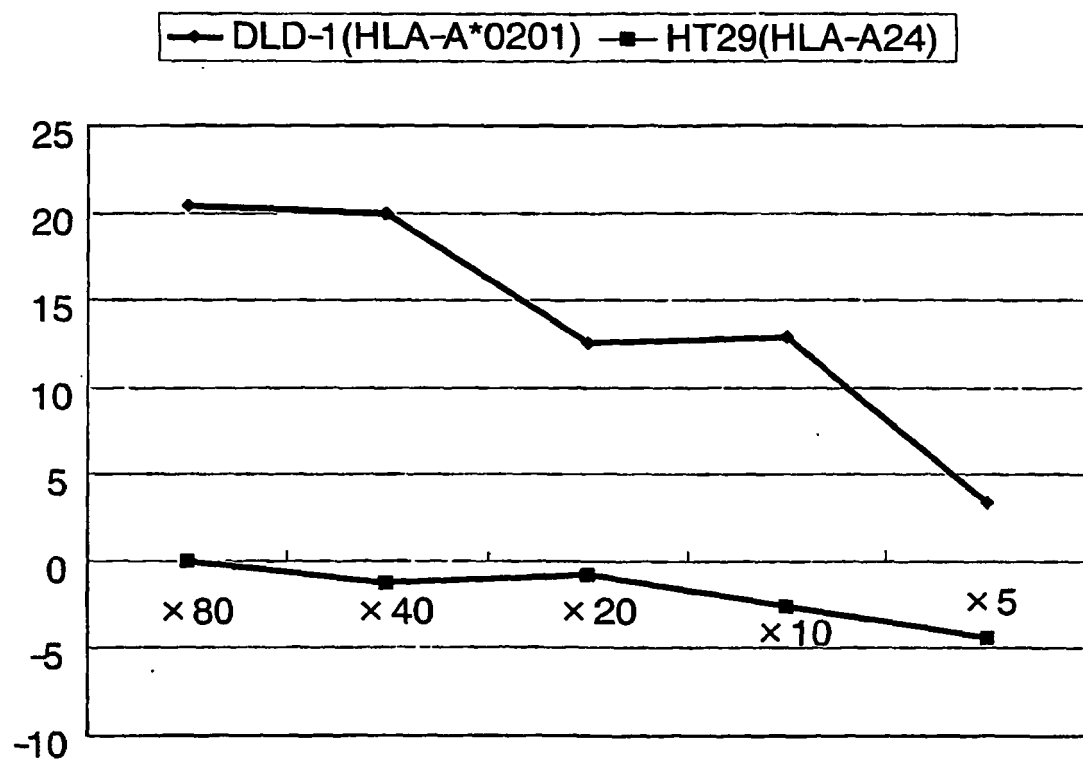


FIG.40B

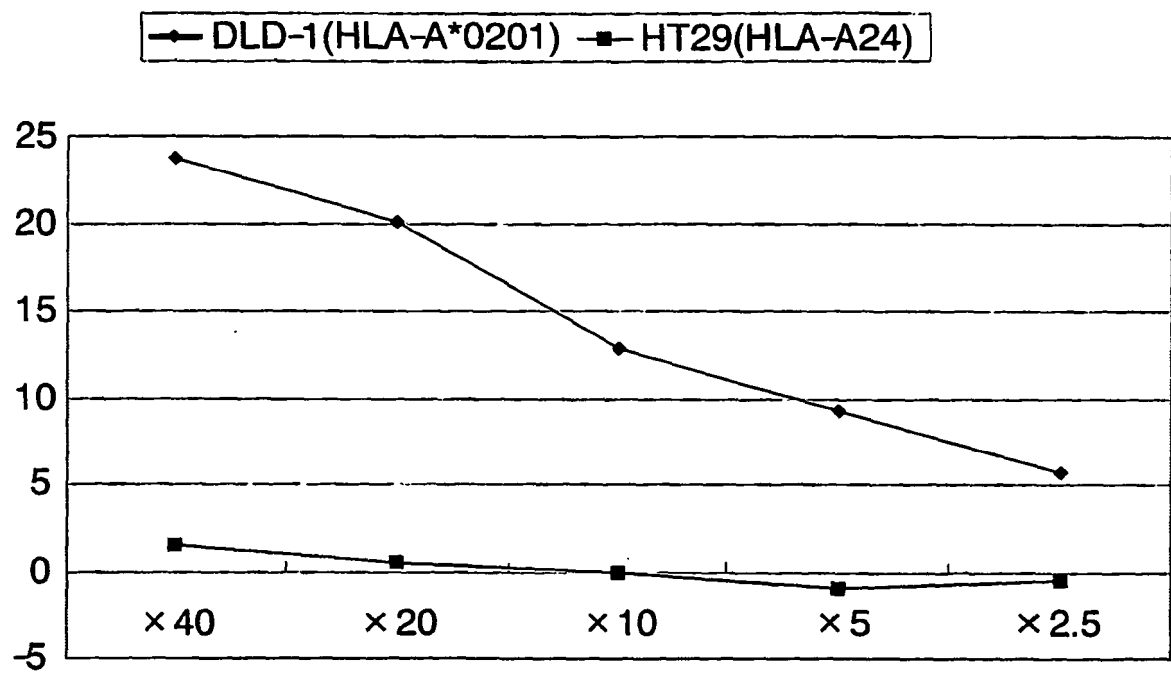


FIG.41

