



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 660**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 38/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99966122 .6**

96 Fecha de presentación : **09.12.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1135504**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2001**

54

Título: **Ubicutina-ligasa E3 humana para la modulación de NK-κB.**

30

Prioridad: **10.12.1998 US 210060**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2011

73

Titular/es: **Signal Pharmaceuticals L.L.C.**
4550 Towne Centre Court
San Diego, California 92121, US
Yissum Research Development Company of the
Hebrew University of Jerusalem

72

Inventor/es: **Manning, Anthony M.;**
Mercurio, Frank;
Amit, Sharon;
Ben-Neriah, Yinon;
Davis, Matti;
Hatzubai, Ada;
Lavon, Iris y
Yaron, Avraham

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 660 T3

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

Ubiquitina-ligasas E3 humana para la modulación de NK-Kappa b

Campo técnico

5 La presente invención se refiere generalmente a composiciones y a procedimientos para modular la activación del factor nuclear κB (NF-κB). La invención se refiere más particularmente a agentes que modulan la ubiquitinación de IκBα y/o IκBβ fosforilados y a procedimientos para tratar enfermedades asociadas a la activación de NF-κB. Los agentes de modulación englobados por la presente invención incluyen ubiquitina-ligasas E3, y porciones y variantes de las mismas.

Antecedentes de la invención

10 El NF-κB es un factor de transcripción que desempeña una función fundamental en el patrón altamente específico de expresión génica observada para genes de respuesta de fase inmunitaria, inflamatoria y aguda que incluyen interleucina 1, interleucina 8, factor de necrosis tumoral y ciertas moléculas de adhesión a células. Al igual que otros miembros de la familia Rel de activadores de la transcripción, NF-κB es secuestrado en una forma inactiva en el citoplasma de la mayoría de los tipos de células. Una variedad de estímulos extracelulares que incluyen mitógenos,
15 citocinas, antígenos, agentes inductores de estrés, luz UV y proteínas víricas inician una vía de transducción de señales que conduce en última instancia a la liberación y activación de NF-κB.

Importantes moduladores de la activación de NF-κB son las proteínas inhibitoras IκBα y IκBβ (denominadas en este documento IκB) que se asocian a (y así inactivan) NF-κB en el citoplasma de células no estimuladas. La activación y la translocalización nuclear de NF-κB se producen tras la fosforilación inducida por señales de IκB, que conduce a la proteólisis mediante la vía de la ubiquitina. Para IκBα, la fosforilación inducida por estímulos en las serinas 32 y 36
20 convierte el inhibidor en una diana para la ubiquitinación en las lisinas 21 y 22, produciendo la degradación. Similarmente, la fosforilación de IκBβ en las serinas 19 y 23 convierte el inhibidor en una diana para la ubiquitinación en la lisina 9. Sin embargo, no se ha(n) identificado el (los) componente(s) del sistema de ubiquitina que median en el reconocimiento de IκB.

25 La degradación de una proteína mediante la vía de la ubiquitina avanza por dos etapas discretas y sucesivas: (a) unión covalente de múltiples moléculas de ubiquitina al sustrato de proteína, y (b) degradación de la proteína elegida como diana por el complejo del proteasoma 26S. La vía de la ubiquitina consiste en varios componentes que actúan conjuntamente y de una manera jerárquica (para las revisiones véase Ciechanover, Cell 79:13, 1994; Hochstrasser, Curr. Op. Cell. Biol. 7:215, 1995; Jentsch y Schlenker, Cell 82:881, 1995; Deshaies, Trends Cell Biol. 5:428, 1995). Un componente tal, una enzima E1 individual, lleva a cabo la activación de la ubiquitina. Se han
30 caracterizado varias especies principales de enzimas E2 en células de mamífero, plantas y levadura. Las enzimas E2 probablemente se unen a la ligasa E3 (Reiss y Hersko, J. Biol. Chem. 265:3685, 1990; Dohmen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7351, 1991) y parece que cada enzima E2 puede actuar con una o más proteínas E3 (Nuber y col., J. Biol. Chem. 271:2795, 1996; Orian y col., J. Biol. Chem. 270:21707, 1995; Stancovski y col., Mol. Cell. Biol. 15:7106, 1995; Gonen y col., J. Biol. Chem. 271:302, 1996).

Sólo se han descrito unas pocas enzimas E3 (ubiquitina-ligasas). E3α (UBR1 en levadura) y E3β de mamífero reconocen sustratos de proteína mediante sus residuos de aminoácidos del extremo N libres ("N-end rule"; Varshavsky, Cell 69:725, 1992; Hershko y Ciechanover, Ann. Rev. Biochem. 61:761, 1992). Cdc53 es probablemente una E3 que participa en la elección como diana de ciclinas G1 fosforiladas (Willems y col., Cell 86:453, 1996). E6-AP participa en el reconocimiento de p53 (Scheffner y col., Cell 75:495, 1993) y se ha identificado una serie de proteínas homólogas a E6-AP únicas (Huibregtse y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:2563, 1995): Nedd4 participa en la degradación del canal de Na⁺ epitelial (Staub y col., Embo J. 15:2371, 1996) y RSP5 (NIP1) participa en la elección como diana de las permeasas Gap1 y Furl (Hein y col., Mol. Microbiol. 18:77, 1995), mientras que Pub1 elige como diana Cdc25 (Nefsky y Beach, EMBO J. 15:1301, 1996). Varios otras enzimas E3 que se han
45 aislado recientemente parecen estar implicadas en la degradación de c-Fos, un subconjunto de proteínas del músculo, y en el procesamiento de p105, el precursor de NF-κB (Orian y col., J. Biol. Chem. 270:21707, 1995; Stancovski y col., Mol. Cell. Biol. 15:7106, 1995; Gonen y col., J. Biol. Chem. 271:302, 1996). Por tanto, parece que las ligasas representan una gran familia de enzimas la mayoría sin desenmarañar y, excepto por el modo de reconocimiento de las ligasas "de la regla del extremo N" (E3α y E3β), no se han identificado los motivos de
50 reconocimiento de todos los otros sustratos conocidos del sistema de ubiquitina.

Por consiguiente, existe la necesidad en la materia de un entendimiento mejorado de la degradación de IκB mediante la vía de la ubiquitina y de la identificación de moduladores de este procedimiento de degradación para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a la activación de NF-κB. La presente invención satisface estas necesidades y proporciona además otras ventajas relacionadas.

Resumen de la invención

Expuesto brevemente, la presente invención proporciona composiciones para modular la activación del factor nuclear κB (NF-κB) modulando la ubiquitinación de IκBα y/o IκBβ fosforiladas. Dentro de un aspecto, la presente

invención proporciona polipéptidos de ubiquitina-ligasa E3 humana aislada que consisten en la secuencia enumerada en SEC ID N°: 16 o una variante de la misma que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en no más del 15 % de los residuos de aminoácidos en SEC ID N°: 16, de forma que el polipéptido potencie la ubiquitinación de IκB fosforilada.

5 También se proporciona un polipéptido aislado según la reivindicación 2.

La presente invención proporciona además, dentro de otros aspectos, polinucleótidos aislados según las reivindicaciones 3 y 4. Dentro de ciertas realizaciones, tales polinucleótidos pueden codificar una parte de una ubiquitina-ligasa E3 humana, o variante de una parte tal, como se ha descrito anteriormente. También se describen polinucleótidos antisentido que comprenden al menos 10 nucleótidos consecutivos complementarios a tales polinucleótidos. Adicionalmente se proporcionan vectores de expresión que comprenden un polinucleótido tal, y células huésped transformadas o transfectadas con un vector de expresión tal.

Dentro de otros aspectos, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido o polinucleótido como se ha descrito anteriormente en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable.

15 Dentro de otros aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a una ubiquitina-ligasa E3 humana que tiene una secuencia enumerada en SEC ID N°: 16. Tales anticuerpos pueden ser monoclonales.

Dentro de otros aspectos se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable.

20 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente para modular la actividad de NF-κB en un paciente

Dentro de otros aspectos, la presente invención proporciona una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para tratar un paciente aquejado de un trastorno asociado a activación de NF-κB. Tales trastornos incluyen enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, cáncer e infección vírica.

25 Dentro de otros aspectos, la presente invención proporciona procedimientos para cribar un agente que modula la actividad de NF-κB que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un agente candidato con un polipéptido de ubiquitina-ligasa E3 humana, comprendiendo el polipéptido una secuencia enumerada en SEC ID N°: 16 o una parte o variante de la misma que se diferencia en una o más sustituciones, inserciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, de forma que el polipéptido potencia la ubiquitinación de IκB fosforilada, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción entre el polipéptido y el agente candidato; y (b) posteriormente evaluar la capacidad del polipéptido para potenciar la ubiquitinación de IκB fosforilada, con respecto a una capacidad predeterminada del polipéptido para potenciar la ubiquitinación de IκB fosforilada en ausencia de agente candidato; e identificar a partir del mismo un agente que modula la actividad de NF-κB. Agentes candidatos para uso dentro de tales cribados incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas presentes dentro de una biblioteca combinatoria.

35 Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos. Todas las referencias desveladas en este documento se incorporan por este documento por referencia en su totalidad como si cada una se incorporara individualmente.

Breve descripción de los dibujos

40 Las Figuras 1A-1D son autorradiogramas que representan los resultados del análisis de SDS-PAGE de ensayos de ubiquitinación realizados en presencia y ausencia de diversos motivos de reconocimiento de la E3 IκB. A menos que se indique de otro modo, el sustrato fue un polipéptido de IκB marcado con HA marcado con ³⁵S que estaba fosforilada y asociada al complejo de NF-κB.

45 En la Figura 1A, el carril 1 muestra la ubiquitinación de un polipéptido de IκBα que contiene residuos de alanina en las posiciones 32 y 36 (S32/36A; SEC ID N°: 13) y el carril 2 muestra la ubiquitinación de un polipéptido de IκBα natural no fosforilada (SEC ID N°: 12). En los carriles 3-14, el sustrato de ubiquitinación fue IκBα natural (SEC ID N°: 12). En el carril 3, la ubiquitinación se realizó en ausencia de ATP; y en los carriles 4-14 la reacción se realizó en presencia de ATPγS con (carriles 5-14) o sin (carril 4) un motivo de reconocimiento de la E3 IκB u otro péptido. Los péptidos mostrados son:

50 fosfopéptido c-Fos 400 μM (ppFos (SEC ID N°: 10), carril 5); péptido de IκBα sustituida en serina 32, 36 por alanina 400 μM (pp21S/A (SEC ID N°: 11), carril 6); péptido de IκBα doblemente fosforilada 40 μM (pp21 (SEC ID N°: 9), carril 7); péptido de IκBα fosforilada 400 μM (p21 (SEC ID N°: 9), carril 8); péptidos de IκBα fosforilada una vez 100 μM (ppS32 (SEC ID N°: 9), carril 9; ppS36 (SEC ID N°: 9), carril 10); y péptidos de IκBα doblemente fosforilada más cortos 40 μM (pp19 (SEC ID N°: 8), carril 11); pp15 (SEC ID N°: 7), carril 12; pp11 (SEC ID N°: 6), carril 13; pp7 (SEC ID N°: 5), carril 14).

En la Figura 1B, el sustrato de ubiquitinación era IκBα natural libre (SEC ID N°: 12, carriles 1-3) o IκBα

sustituida en S32/36A libre (SEC ID N°: 13, carriles 4-6). La reacción se realizó en ausencia (carriles 1 y 4) o presencia (carriles 2, 3, 5 y 6) de ATPγS. Se añadió péptido de IκBα doblemente fosforilada 40 μM (pp21 (SEC ID N°: 9) a la mezcla de reacción de conjugación en las muestras mostradas en los carriles 3 y 6.

En la Figura 1C se muestra la ubiquitinación de proteínas celulares en masa en extracto de HeLa. El carril 1 muestra la ubiquitinación en ausencia de ATP y el carril 5 muestra la ubiquitinación en presencia de ATP. En los carriles 3-5 se añadió un motivo de reconocimiento de la E3 IκB u otro péptido: péptido de IκBα doblemente fosforilada 40 μM (pp21 (SEC ID N°: 9), carril 2); fosfopéptido c-Fos 400 μM (ppFos (SEC ID N°: 10), carril 3); y péptido de IκBα no fosforilada 400 μM (p21 (SEC ID N°: 9), carril 4).

En la Figura 1D, el sustrato de ubiquitinación era IκBβ natural fosforilada (carriles 2-7) o no fosforilada (carril 1) (SEC ID N°: 14). Las reacciones se realizaron en ausencia (carril 2) o presencia (carriles 1, 3-7) de ATPγS, y con (carriles 4-7) o sin (carriles 1-3) un motivo de reconocimiento de la E3 IκB u otro péptido. Los péptidos mostrados son: péptido de IκBα doblemente fosforilada 40 μM (pp21 (SEC ID N°: 9), carril 4); fosfopéptido c-Fos 400 μM (ppFos (SEC ID N°: 10), carril 5); péptido de IκBα doblemente fosforilada 40 μM (pp19 (SEC ID N°: 8), carril 6); y péptido de IκBα no fosforilada 400 μM (p21 (SEC ID N°: 9), carril 7).

La Figura 2 es un autorradiograma que representa los resultados de un ensayo de degradación *in vitro* dependiente de ubiquitina realizado usando extractos de células HeLa estimuladas. En cada carril de SDS-PAGE se muestra el nivel de polipéptido de IκBα marcada con HA fosforilada (banda superior) y no fosforilada (banda inferior) (SEC ID N°: 12) tras el ensayo de degradación. El carril 1 muestra el nivel de estos polipéptidos tras un ensayo de degradación realizado sin ATP. En los carriles 2-6 se incluyó ATP en la mezcla de reacción. Se añadieron agentes de modulación candidatos 40 μM a las reacciones mostradas en los carriles 3-6: péptido de IκBα doblemente fosforilada (pp21 (SEC ID N°: 9), carril 3); péptido de IκBα doblemente fosforilada (pp19 (SEC ID N°: 8), carril 4); fosfopéptido c-Fos (ppFos (SEC ID N°: 10), carril 5); y péptido de IκBα no fosforilada (p21 (SEC ID N°: 9), carril 6).

La Figura 3A es un autorradiograma que representa los resultados de análisis de SDS-PAGE de ensayos de ubiquitinación realizados usando fracciones de flujo continuo de lisado de células HeLa fraccionado sobre columnas de agente de modulación. En cada caso, el sustrato fue un polipéptido de IκBα marcada con HA marcada con ³⁵S (SEC ID N°: 12) que se fosforiló y se asoció al complejo de NF-κB. El carril 1 muestra el nivel de ubiquitinación usando un extracto no fraccionado. En los carriles 2-9 el extracto se fraccionó sobre una columna de péptido-Sepharose®. Los péptidos usados fueron: fosfopéptido c-Fos (ppFos (SEC ID N°: 10), carril 2); péptido de IκBα sustituida en serina 32, 36 por alanina (pp21S/A (SEC ID N°: 11), carril 3); péptido de IκBα doblemente fosforilada (pp21 (SEC ID N°: 9), carriles 4-6); y péptido de IκBα doblemente fosforilada (pp19 (SEC ID N°: 8), carriles 7-9). Además, se añadió la fracción II de reticulocitos (160 μg) a las reacciones de ubiquitinación mostradas en los carriles 5 y 8, y la fracción I (160 μg) se añadió a las reacciones en los carriles 6 y 9.

La Figura 3B es un autorradiograma que muestra la ubiquitinación de proteínas celulares en masa en extracto de HeLa. El carril 1 muestra la ubiquitinación en ausencia de ATP y el carril 2 muestra la ubiquitinación en presencia de ATP, pero sin agente de modulación candidato. En los carriles 3-6 se añadieron los agentes de modulación candidatos:

péptido de IκBα doblemente fosforilada 40 μM (pp19 (SEC ID N°: 8), carril 3); fosfopéptido c-Fos 400 μM (ppFos (SEC ID N°: 10), carril 4); péptido de IκBα sustituida en serina 32, 36 por alanina 400 μM (pp21S/A (SEC ID N°: 11), carril 5); y péptido de IκBα doblemente fosforilada 40 μM (pp21 (SEC ID N°: 9), carril 6).

Las Figuras 4A-4F son micrografías que muestran el efecto de agentes de modulación candidatos sobre la translocalización nuclear de NF-κB. En las Figuras 4A-C, pp21 (Figuras 4A y 4B) o ppFos (Figura 4C) se microinyectaron en el citoplasma de células HeLa. Entonces, las células se activaron inmediatamente con TNFα y se inmunotñeron con anticuerpos anti-p65. En las Figuras 4D-F, pp21 (Figura 4D) o ppFos (Figura 4F) se inyectaron en el citoplasma de células endoteliales vasculares humanas (HUVEC). Entonces, las células se activaron inmediatamente con TNFα y se inmunotñeron con anticuerpos anti-E-selectina. La Figura 4E es una fotografía de contraste de fases de la Figura 4D. En cada micrografía, las células inyectadas están marcadas por flechas largas. Una célula negativa para E-selectina no inyectada está marcada por una flecha pequeña en las Figuras 4D y 4E.

Las Figuras 4G y 4H son gráficas que presentan un resumen de los experimentos de microinyección mostrados en las Figuras 4A - 4F. En la Figura 4G se muestra el porcentaje de células HeLa que muestra tinción con p65 nuclear. Se microinyectaron 90 y 42 células con pp21 y ppFos, respectivamente. La Figura 4H muestra el porcentaje de HUVEC que muestra tinción con E-selectina. Se microinyectaron 160 y 36 células con pp21 y ppFos, respectivamente. Para cada gráfica, la columna 1 muestra el nivel en ausencia de un motivo de reconocimiento de la E3 IκB u otro péptido y la activación con TNFα. Las columnas 2-4 muestran el nivel tras la activación con TNFα en ausencia de péptido (columna 2) o en presencia de pp21 (columna 3) o ppFos (columna 4).

La Figura 5 es un autorradiograma que representa los resultados de un análisis de transferencia Western que muestra la inmunoprecipitación de la actividad de ubiquitina-ligasa asociada a pIκBα de las células activadas con TNFα. El complejo de pIκB/NF-κB se inmunoprecipitó a partir de células inhibidas por proteasoma, estimuladas por TNFα o no estimuladas y se sometió a ubiquitinación *in vitro* tras la adición de ubiquitina, ATPγS y los siguientes componentes: carril 1, UBC5C; carril 2, UBC5C y E1; carril 3, nada; carriles 4-6, UBC5C y

E1 como se indica; carril 7, UBC5C, E1 y péptido de I κ B α ; carril 8, UBC5C, E1 y péptido de I κ B α sustituida con serina; carril 9, una muestra de lisado de HeLa estimulado por TNF α . La estimulación de células se indica en la fila de TNF α . La I κ B α monomérica y conjugada con ubiquitina están marcadas en la parte izquierda, inferior y superior de la figura.

La Figura 6 es un autorradiograma que ilustra la asociación de la ubiquitina-ligasa al complejo de I κ B α /NF- κ B tras la fosforilación de I κ B α por IKK en el sitio DSGLDS (SEC ID N $^{\circ}$: 8 y 19). El complejo de I κ B α marcado con 35 S/NF- κ B inmunopurificado a partir de células no activadas se fosforiló por IKK-2EE (donde está marcado por + en la parte superior), se incubó con lisado de HeLa no activadas como fuente de E3, se lavó y se sometió a ubiquitinación *in vitro* en presencia de ATP γ S, ubiquitina, E1, UBC5C (excepto cuando un componente excluido se indica por Ausencia de Ub-Enz). Los carriles 2-7 muestran la fosforilación por IKK; los carriles 1 y 3-7 muestran el efecto de la incubación con lisado de HeLa; en el carril 4 se añadió un péptido de pl κ B α durante la incubación con lisado de HeLa; en el carril 5 se añadió péptido de I κ B α sustituida con serina durante la incubación de HeLa; en el carril 6 E1 se omitió de la etapa de la ubiquitinación; y en el carril 7 UBC5C se omitió durante la ubiquitinación.

Las Figuras 7A y 7B ilustran la identificación de proteínas de unión a I κ B α asociadas a actividad de ubiquitina-ligasa. La Figura 7A es una fotografía que muestra tinción con azul coloidal de muestras de gel de SDS-poliacrilamida de fracciones inmunopurificadas que contienen I κ B α /NF- κ B y proteínas asociadas. El complejo de I κ B α /NF- κ B se fosforiló por IKK-2EE (carriles 2, 3) o se fosforiló para control y se usó para adsorber la ubiquitina-ligasa del lisado de HeLa (carriles 1, 2). Los marcadores de tamaño molecular (κ D) se indican a la derecha. Las proteínas identificadas en el análisis por espectrometría de masas se indican a la izquierda. Los sitios de gel correspondientes a las bandas asociadas a la actividad de ubiquitina-ligasa (p54 y p58) están marcados la izquierda por corchetes. La Figura 7B es un autorradiograma de proteínas adsorbidas sobre pl κ B α /NF- κ B de células HeLa marcadas con 35 S. El lisado de HeLa radiomarcado se incubó con el complejo de I κ B α /NF- κ B inmovilizado con anticuerpo fosforilado por IKK. Entonces, los complejos inmunitarios se lavaron, se eluyeron y se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. El carril 1 muestra el complejo de I κ B α no fosforilada/NF- κ B incubado con lisado de HeLa; los carriles 2-4 muestran el complejo de I κ B α fosforilada/NF- κ B incubado con lisado de HeLa en ausencia (carril 2) o presencia de péptido de pl κ B α (carril 3) o péptido de I κ B α sustituida con serina (carril 4). A la izquierda se indican los marcadores de tamaño molecular (κ D), las bandas de Rel A y I κ B α ; a la derecha se indican cuatro bandas asociadas a pl κ B α , tres de las cuales están desplazadas por el péptido de pl κ B α (flechas).

Las Figuras 8A-8D muestran los resultados de un análisis de espectro de masas de p54 asociada a ubiquitina-ligasa. La Figura 8A muestra un espectro de masas por nanoelectropulverización de la mezcla de péptidos tríptica sin separar de la banda de gel de 54 κ D escindida de un carril positivo para ligasa (equivalente al carril 2 en la Figura 7B). Los picos marcados por flechas se fragmentaron y se identificaron como péptidos derivados de β -TrCP. La barra indica la región a escala ampliada en C. Las Figuras 8B y 8C presentan una comparación de los espectros por nanoelectropulverización de la banda de 54 κ D asociada a (C) y sin (B) actividad de ubiquitina-ligasa. El péptido a m/z 714,38 se seleccionó para la secuenciación. La Figura 8D es un espectro de fragmentación del péptido identificado en la Figura 8C. Una marca de secuencia se ensambló a partir de una serie de iones de fragmentos doblemente cargados y se buscó en la base de datos *nrdB* para un patrón de apareamiento. Las masas de los fragmentos calculadas para la secuencia de β -TrCP recuperada AAVNVDFDDKYIVSASGDR (SEC ID N $^{\circ}$: 20) se compararon con el espectro de fragmentación completo para confirmar el apareamiento. Los picos de iones de fragmentos de apareamiento esperados están marcados por círculos.

Las Figuras 9A y 9B presentan la secuencia de un polinucleótido que codifica una ubiquitina-ligasa E3 humana (SEC ID N $^{\circ}$: 15).

La Figura 10 presenta una secuencia de proteínas de ubiquitina-ligasa E3 humana (SEC ID N $^{\circ}$: 16).

Las Figuras 11A-11C son transferencias Western que ilustran la especificidad de unión y de ubiquitinación de los miembros de la familia de ubiquitina-ligasa E3. Dentro de estas figuras, m β -TrCP indica β -TrCP de ratón, h β -TrCP indica β -TrCP humana, $\Delta\beta$ -TrCP indica β -TrCP humana con una delección de la región de caja F y Slimb indica la proteína Slimb de *Drosophila*. La Figura 11A ilustra la unión selectiva a pl κ B α . Las proteínas se inmunoprecipitaron a través de un epítipo FLAG de células 293T transfectadas, se incubaron con el complejo de I κ B α /NF- κ B inmunopurificado que había sido tratado (-/+ IKK) como se indica y el material unido se analizó por transferencia Western con los anticuerpos indicados. El panel superior muestra la unión de pl κ B α específica; el panel central muestra el 10 % del flujo continuo de sustrato; el panel inferior es una transferencia de las proteínas inmunoprecipitadas; y los marcadores de tamaño molecular (κ D) se indican a la izquierda. La Figura 11B muestra que la unión de β -TrCP-pl κ B α está suprimida por un fosfopéptido que representa el motivo de degradación de pl κ B α ¹ (pp10), pero no por un péptido no fosforilado relacionado (pS/A). La Figura 11C ilustra la ubiquitinación *in vitro* de pl κ B α por proteínas de miembros de la familia de E3. Las proteínas marcadas con FLAG inmunopurificadas se incubaron con complejos de I κ B α marcada con 35 S/NF- κ B, se trataron (-/+ IKK) como se indica y se sometieron a ubiquitinación en presencia de ATP γ S, ubiquitina, E1 y UBC5C. El sustrato de I κ B α (compuesto por productos de longitud completa y dos degradaciones), los conjugados de pl κ B α -poliubiquitina y los marcadores de tamaño molecular se indican a la izquierda.

Las Figuras 12A y 12B ilustran la inhibición de la degradación de I κ B α y la activación de NF- κ B por la expresión en exceso de $\Delta\beta$ -TrCP, una molécula negativa dominante. La Figura 12A es una gráfica que representa los resultados de un ensayo de luciferasa dependiente de κ B en células Jurkat estimuladas por P/I transfectadas con plásmido indicador de κ B-Luc y los vectores de expresión indicados (es decir, de la izquierda a la derecha,

vector solo, vector que codifica β -TrCP humana, vector que codifica β -TrCP humana con una delección de la región de caja F y vector que codifica la proteína Slimb de *Drosophila*). La actividad de NF- κ B se muestra como actividad de luciferasa relativa (en veces), siendo el vector FLAG vacío no estimulado la referencia (familia individual). La Figura 12B representa los resultados de análisis de transferencia Western de I κ B α de células Jurkat estimuladas por éster de forbol e ionóforo de Ca⁺⁺ [P/I] y no estimuladas transfectadas con un vector FLAG vacío o $\Delta\beta$ -TrCP. Se indica el intervalo de post-estimulación (min).

Descripción detallada de la invención

Como se ha observado anteriormente, la presente invención se refiere generalmente a composiciones útiles para modular la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y para tratar enfermedades asociadas a tal activación. En particular, la invención se refiere a agentes que modulan la ubiquitinación de I κ B fosforilada (es decir, I κ B α y/o I κ B β). Tal ubiquitinación produce la liberación y la activación de NF- κ B.

La presente invención se basa, en parte, en la identificación y la caracterización de una ubiquitina-ligasa E3 humana que reconoce I κ B fosforilada y asociada a NF- κ B. Los polipéptidos que comprenden esta ubiquitina-ligasa E3, además de porciones y otras variantes de la misma, pueden usarse para modular la actividad de NF- κ B *in vitro* o en un paciente. Tales polipéptidos también pueden usarse, por ejemplo, para identificar agentes (tales como moléculas pequeñas) que pueden usarse para modular la actividad de NF- κ B, y para tratar trastornos asociados a activación de NF- κ B anormal.

Polipéptidos y polinucleótidos de ubiquitina-ligasa E3 humana

Se ha encontrado, dentro del contexto de la presente invención, que una ubiquitina-ligasa E3 humana que migra como una proteína de 54 kD se une a, y potencia la ubiquitinación de, I κ B α fosforilada (I κ B α fosforilada también se designa en este documento pl κ B α). La secuencia de un polinucleótido que codifica una ubiquitina-ligasa E3 humana se proporciona en la Figura 9 y SEC ID N^o: 15; y una secuencia de proteínas de ubiquitina-ligasa E3 humana de longitud completa se proporciona en la Figura 10 y SEC ID N^o: 16. También se ha encontrado que la ubiquitina-ligasa E3 humana, dentro del contexto de la presente invención, es un miembro de una familia de proteínas de la caja F/WD que incluye β -TrCP (Margottin y col., Mol. Cell 1:565-574, 1998) y la proteína Slimb de *Drosophila* (véase Jiang y Struhl, Nature 391:493-496, 1998). Como se describe en mayor detalle más adelante, otros miembros de esta familia comparten ciertas propiedades de E3, y tales proteínas y variantes de la misma pueden usarse dentro de ciertos procedimientos proporcionados en este documento para E3.

Los polipéptidos de ubiquitina-ligasa E3 humana englobados por la presente invención incluyen ubiquitina-ligasa E3 humana nativa (también denominada en este documento "E3"), además de porciones y otras variantes de la misma. Las variantes de E3 pueden diferenciarse en la secuencia de la E3 nativa debido a una o más sustituciones, delecciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos como se describe en este documento, siempre que la variante se una a y potencie la ubiquitinación de un polipéptido de I κ B como se describe en este documento. Preferentemente, una variante de E3 contiene sustituciones de aminoácidos en no más del 10 % de los residuos enumerados en SEC ID N^o: 16. Si una variante de E3 se usa en un procedimiento para cribar un agente que modula la actividad de NF- κ B, preferentemente, la variante de E3 contiene sustituciones de aminoácidos en no más del 20 %, preferentemente en no más del 15 %, y más preferentemente en no más del 10 %, de los residuos enumerados en SEC ID N^o: 16. Variantes incluyen además polipéptidos y polipéptidos truncados que contienen secuencias de aminoácidos adicionales que tienen una mínima influencia sobre la actividad del polipéptido. Un polipéptido de ubiquitina-ligasa E3 humana puede ser de cualquier longitud, siempre que retenga las propiedades enumeradas. En otras palabras, un polipéptido tal puede ser un oligopéptido (es decir, que consiste en un número relativamente pequeño de residuos de aminoácidos tal como 8-10 residuos, unidos por enlaces peptídicos), una proteína de longitud completa (o variante de la misma) o un polipéptido de tamaño intermedio (por ejemplo, 20, 50, 200 ó 400 residuos de aminoácidos).

Ciertas variantes contienen sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es una en la que un aminoácido está sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de forma que un experto en la materia de la química de los péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática fueran sustancialmente invariables. Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse generalmente basándose en la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante también puede contener, o alternativamente contiene, cambios no conservativos. Las variantes también pueden (o alternativamente) modificarse por, por ejemplo, la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima sobre la inmunogenicidad, estructura secundaria y naturaleza hidropática del polipéptido.

Como se ha observado anteriormente, ciertos polipéptidos de E3 pueden contener secuencias de aminoácidos

adicionales en los extremos amino y/o carboxi. Por ejemplo, una secuencia de E3 puede conjugarse con una secuencia señal (o conductora) en el extremo N de la proteína que dirige cotraduccionalmente o post-traduccionalmente la transferencia de la proteína. Un polipéptido también puede, o alternativamente, conjugarse con un ligador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse con una región Fc de inmunoglobulina.

La capacidad de un polipéptido de E3 para unirse a una IκB fosforilada puede determinarse fácilmente usando cualquier ensayo de unión conocido para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, los complejos de pIκBα/NF-κB pueden incubarse con polipéptido de E3 inmovilizado, y el nivel de unión de IκBα evaluarse usando anticuerpos anti-IκBα (en, por ejemplo, una transferencia Western). Dentro de tales ensayos, un polipéptido de E3 debería unirse de forma detectable con IκBα; preferentemente el polipéptido de E3 se une a un nivel que no es sustancialmente reducido con respecto a E3 humana nativa. En otras palabras, la capacidad de una variante para unirse de forma detectable a IκBα fosforilada y complejada puede potenciarse o permanecer invariable, con respecto al polipéptido nativo, o puede reducirse menos del 50 %, y preferentemente menos del 20 %, con respecto al polipéptido nativo. Será evidente que otros sustratos adecuados pueden estar sustituidos por complejos de pIκBα/NF-κB dentro de tales ensayos.

La capacidad de un polipéptido de E3 para potenciar la ubiquitinación de IκB fosforilada puede evaluarse incubando el polipéptido con complejo de IκBα/NF-κB, junto con ATPγS, ubiquitina E1 y ubiquitina E2, y detectando los conjugados de IκBα-ubiquitina de lento movimiento por transferencia Western usando anticuerpos específicos para IκBα como se describe en este documento. En general, un polipéptido de E3 debería producir un nivel detectable de ubiquitinación dentro de un ensayo tal; preferentemente el nivel de ubiquitinación no está sustancialmente reducido con respecto al nivel de ubiquitinación generado por una cantidad similar de E3 humana nativa.

También están englobados por la presente invención polipéptidos que comprenden una parte u otra variante de E3 que retiene la capacidad de unión a IκB fosforilada, pero que no retiene la capacidad de potenciar la ubiquitinación de IκB. Tales polipéptidos pueden identificarse fácilmente usando los ensayos de unión y los ensayos de ubiquitinación proporcionados en este documento, y generalmente pueden usarse para inhibir la ubiquitinación de IκB. Tales polipéptidos incluyen aquellos de los que ha sido delecionada la región de caja F (es decir, una región de la proteína que interactúa con uno o más componentes de la cascada de ubiquitina). Las regiones de caja F pueden identificarse generalmente funcionalmente (es decir, la deleción de una región de caja F produce una proteína que deja de reclutar componentes apropiadas de la maquinaria de ubiquitina) y se basaron en la presencia de una secuencia consenso de la región de caja F (véase Patton y col., Trends in Genet. 14:236-243, 1998). Ciertos polipéptidos tales contienen una deleción de los aminoácidos 122-168 de SEC ID N°: 16. Dentro de ciertas realizaciones, las porciones de E3 puede comprender 10 a 374 residuos de aminoácidos consecutivos, preferentemente 50 a 250, residuos de aminoácidos consecutivos de la secuencia enumerada en SEC ID N°: 16.

La presente invención proporciona además polinucleótidos según la reivindicación 3 o la reivindicación 4 que codifican un polipéptido de E3 como se proporciona en este documento. Cualquier polinucleótido que codifique un polipéptido tal, o una parte o variante del mismo como se describe en este documento, está englobado por la presente invención. Tales polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden, pero no necesitan, estar presentes dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede, pero no necesita, ligarse a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Las secuencias de ADN nativo que codifican una E3 humana, o porción de la misma, pueden aislarse usando cualquiera de una variedad de técnicas de hibridación o amplificación que son muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Dentro de tales técnicas pueden diseñarse sondas o cebadores basándose en la secuencia de E3 proporcionada en este documento, y pueden comprarse o sintetizarse. Pueden cribarse bibliotecas de cualquier tejido adecuado. Entonces puede usarse una porción amplificada o molécula de ADNc parcial para aislar un gen de longitud completa de una biblioteca de ADN genómico o de una biblioteca de ADNc usando técnicas muy conocidas. Alternativamente, un gen de longitud completa puede construirse a partir de múltiples fragmentos de PCR. Los polinucleótidos parciales y de longitud completa que comprenden tales secuencias, otras porciones de polinucleótidos de longitud completa y secuencias complementarias a toda o una parte de tales moléculas de longitud completa, están englobados específicamente por la presente invención. Además, se contemplan específicamente homólogos de otras especies, y generalmente pueden prepararse como se describe en este documento.

Las variantes de polinucleótidos de las secuencias enumeradas pueden diferenciarse de un polinucleótido de E3 nativo en una o más sustituciones, deleciones, inserciones y/o adiciones. Las variantes preferidas contienen sustituciones, deleciones, inserciones y/o adiciones de nucleótidos en no más del 20 %, preferentemente en no más del 10 %, de las posiciones del nucleótido. Ciertas variantes son sustancialmente homólogas a un gen nativo, o una parte o complemento del mismo. Tales variantes de polinucleótido pueden hibridarse bajo condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia de ADN que se produce naturalmente que codifica una proteína E3 (o una secuencia complementaria). Condiciones moderadamente rigurosas adecuadas incluyen lavar previamente en una disolución de 5 X SSC, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridar a 50 °C-65 °C, 5 X SSC, durante la

noche; seguido de lavar dos veces a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de 2 X, 0,5 X y 0,2 X SSC que contiene SDS al 0,1 %). Tales secuencias de hibridación de ADN también están dentro del alcance de la presente invención.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

Apreciarán aquellos expertos en la materia que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en este documento. Algunos de estos polinucleótidos poseen homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones son específicamente contemplados por la presente invención.

Como se ha observado anteriormente, la presente invención proporciona además polinucleótidos antisentido y porciones de cualquiera de las secuencias anteriores. Tales polinucleótidos pueden prepararse generalmente mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica que incluye, por ejemplo, síntesis química con fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas pueden generarse mediante transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que se incorporan en un vector en la dirección 3' de un promotor de ARN polimerasa adecuado (tal como T3, T7 o SP6). Ciertas porciones de un polinucleótido pueden usarse para preparar un polipéptido codificado, como se describe en este documento. Además, o alternativamente, una parte puede hacer de sonda (por ejemplo, para detectar la expresión de E3 en una muestra), y puede marcarse mediante una variedad de grupos indicadores tales como radionúclidos, colorantes fluorescentes y enzimas. Tales porciones tienen preferentemente al menos 10 nucleótidos de longitud, y más preferentemente al menos 20 nucleótidos de longitud. Dentro de ciertas realizaciones preferidas, una parte para uso como sonda comprende una secuencia que es única para un gen E3. Una parte de una secuencia complementaria a una secuencia codificante (es decir, un polinucleótido antisentido) también puede usarse como sonda o para modular la expresión génica. Los constructos de ADN que pueden transcribirse en ARN antisentido también pueden introducirse en células o tejidos para facilitar la producción de ARN antisentido.

Cualquier polinucleótido puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad *in vivo*. Posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3'; el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en vez de enlaces fosfodiesterasa en el esqueleto; y/o la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wybutosina, además de acetil- metil-, tio- y otras formas modificadas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina.

Los polinucleótidos como se describen en este documento puede unirse a una variedad de otras secuencias de nucleótidos usando técnicas de ADN recombinante establecidas. Por ejemplo, un polinucleótido puede clonarse en cualquiera de una variedad de vectores de clonación que incluyen plásmidos, fagémidos, derivados del fago lambda y cósmidos. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación. En general, un vector contendrá un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores de selección. También pueden estar presentes secuencias de ADN iniciales, terminales y/o intervinientes adicionales que, por ejemplo, facilitan la construcción de vectores fácilmente expresados. Vectores adecuados pueden obtenerse comercialmente o ensamblarse a partir de las secuencias descritas por procedimientos muy conocidos en la técnica. Otros elementos que pueden estar presentes en un vector dependerán del uso deseado, y serán evidentes para aquellos expertos en la materia.

Vectores como se describen en este documento pueden transfectarse generalmente en una célula huésped adecuada tal como una célula de mamífero mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen precipitación con fosfato de calcio, electroporación y microinyección.

Los polipéptidos de E3 pueden prepararse generalmente usando técnicas de síntesis automatizadas estándar o mediante expresión de ADN recombinante que codifica el polipéptido deseado. En general, los péptidos pueden prepararse sintéticamente usando técnicas convencionales, incorporando aminoácidos y/o análogos de aminoácidos. Durante la síntesis, los grupos activos de aminoácidos y/o análogos de aminoácidos pueden protegerse según sea necesario usando, por ejemplo, un grupo dicarbonato de t-butilo (t-BOC) o un grupo fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Los aminoácidos y análogos de aminoácidos pueden comprarse comercialmente (por ejemplo, Sigma Chemical Co.; Advanced Chemtec) o sintetizarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Los péptidos pueden sintetizarse usando un procedimiento en fase sólida en el que los péptidos están unidos a una resina tal como 4-metilbenzohidrolamina (MBHA), 4-(oximetil)-fenilacetamidometil- y 4-(hidroximetil)fenoximetilcopoli(estireno-1 % de divinilbenceno) (resina de Wang), estando todas comercialmente disponibles, o un polímero de p-nitrobenzofenona-oxima (resina de oxima) que puede sintetizarse como se describe por De Grado y Kaiser, J. Org. Chem. 47:3258, 1982. Aquellos expertos en la materia comprenderán que la elección de aminoácidos y/o análogos de aminoácidos dependerá, en parte, de las características físicas, químicas o biológicas específicas deseadas. Tales características se determinan, en parte, mediante el procedimiento de administración y la localización diana dentro de un paciente.

La modificación selectiva de los grupos reactivos en un péptido también puede conferir características deseables. Los péptidos pueden manipularse mientras que todavía están unidos a la resina para obtener compuestos modificados en el extremo N tales como un péptido acetilado o pueden eliminarse de la resina usando fluoruro de hidrógeno o un agente de escisión equivalente y luego modificarse. Los compuestos sintetizados que contienen el

grupo carboxi en el extremo C (resina de Wang) pueden modificarse después de la escisión de la resina o, en algunos casos, antes de la síntesis en fase de disolución. Los procedimientos para modificar el extremo N o el extremo C de un péptido son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, procedimientos para la acetilación del extremo N o la amidación del extremo C. Similarmente, los procedimientos para modificar cadenas laterales de los aminoácidos o análogos de aminoácidos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia de la síntesis de péptidos. La elección de modificaciones hechas a grupos reactivos presentes en el péptido se determinará por las características deseadas.

Un polipéptido de E3 también puede ser un péptido cíclico. Un péptido cíclico puede obtenerse induciendo la formación de un enlace covalente entre, por ejemplo, el grupo amino en el extremo N del péptido y el grupo carboxilo en el extremo C. Alternativamente, un péptido cíclico puede obtenerse formando un enlace covalente entre un grupo reactivo terminal y una cadena lateral de aminoácido reactivo o entre dos cadenas laterales reactivas. Será evidente para aquellos expertos en la materia que un péptido cíclico se selecciona basándose en las propiedades deseadas. Por ejemplo, un péptido cíclico puede proporcionar un aumento de la estabilidad, un aumento de la solubilidad, una disminución de la inmunogenicidad o una disminución de la eliminación *in vivo*.

Un péptido recientemente sintetizado puede purificarse usando un procedimiento tal como cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) u otros procedimientos de separación basados en el tamaño o la carga. Además, un péptido purificado puede caracterizarse usando éstos y otros procedimientos muy conocidos tales como análisis de aminoácidos y espectrometría de masas.

Alternativamente, los polipéptidos pueden prepararse generalmente a partir del ácido nucleico que codifica el polipéptido deseado usando técnicas muy conocidas. Para preparar una proteína endógena puede usarse un ADNc aislado. Para preparar un polipéptido variante pueden usarse técnicas de mutagénesis estándar tales como mutagénesis específica para sitio dirigida a oligonucleótidos y pueden eliminarse secciones de la secuencia de ADN para permitir la preparación de polipéptidos truncados.

En general puede usarse cualquiera de una variedad de vectores de expresión conocidos para aquellos expertos en la materia para expresar polipéptidos recombinantes de la presente invención. La expresión puede lograrse en cualquier célula huésped apropiada que haya sido transformada o transfectada con un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica un polipéptido recombinante. Células huésped adecuadas incluyen procariotas, levadura, células de insecto infectadas por baculovirus y células animales. Tras la expresión, los sobrenadantes de sistemas de huésped/vector que secretan proteína recombinante o polipéptido en medios de cultivo pueden concentrarse primero usando un filtro comercialmente disponible. Tras la concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada tal como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Pueden usarse una o más etapas de HPLC de fase inversa para purificar adicionalmente un polipéptido recombinante.

En general, los polipéptidos y los polinucleótidos como se describen en este documento están aislados. Un polipéptido o polinucleótido "aislado" es uno que se saca de su entorno original. Por ejemplo, una proteína que se produce naturalmente se aísla si se separa de alguno o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferentemente, los polipéptidos proporcionados en este documento se aíslan a una pureza de al menos el 80 % en peso, más preferentemente a una pureza de al menos el 95 % en peso, y lo más preferentemente a una pureza de al menos el 99 % en peso. En general, tal purificación puede lograrse usando, por ejemplo, técnicas convencionales de fraccionamiento con sulfato de amonio, electroforesis en SDS-PAGE y cromatografía de afinidad. Un polinucleótido se considera que está aislado si, por ejemplo, se clona en un vector que no es parte del entorno natural.

Anticuerpos

La presente invención proporciona además anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a un polipéptido de E3 enumerado en SEC ID N°: 16. Como se usa en este documento, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, se dice que "se une específicamente" a un polipéptido si reacciona a un nivel detectable (dentro de, por ejemplo, un ELISA) con el polipéptido, y no reacciona de forma detectable con proteínas sin relacionar. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Anticuerpos preferidos son aquellos anticuerpos que inhiben o bloquean la actividad de E3 y dentro de un ensayo de ubicuitinación como se describe en este documento. Otros anticuerpos preferidos (que pueden usarse, por ejemplo, en ensayos de inmunocinasa) son aquellos que inmunoprecipitan E3 activa como se determina usando cualquier ensayo estándar tal como un ensayo proporcionado en este documento.

Los anticuerpos pueden prepararse por cualquiera de una variedad de técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). En una técnica tal, un inmunógeno que comprende el polipéptido se inyecta inicialmente en un animal adecuado (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas y cabras), preferentemente según un programa predeterminado incorporando una o más inmunizaciones de refuerzo, y los animales se sangran periódicamente. Los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido pueden entonces purificarse a partir de tales antiseros por, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976, y mejoras a la misma. Brevemente, estos procedimientos implican la preparación de líneas de células inmortales que pueden producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido de interés). Tales líneas celulares pueden producirse, por ejemplo, a partir de células del bazo obtenidas de un animal inmunizado como se ha descrito anteriormente. Entonces, las células del bazo se immortalizan, por ejemplo, por fusión con un componente de fusión de células del mieloma, preferentemente uno que es singénico con el animal inmunizado. Por ejemplo, las células del bazo y las células de mieloma pueden combinarse con un detergente no iónico durante unos pocos minutos y luego sembrarse a baja densidad en un medio selectivo que ayuda al crecimiento de células híbridas, pero no de células de mieloma. Una técnica de selección preferida usa selección con HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, normalmente aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias individuales y se prueban para la actividad de unión contra el polipéptido. Se prefieren hibridomas que tienen alta reactividad y especificidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de los sobrenadantes de colonias de hibridomas en crecimiento. Además, pueden usarse diversas técnicas para potenciar el rendimiento tales como inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado tal como un ratón. Entonces, los anticuerpos monoclonales pueden recogerse del fluido ascítico o la sangre. Los contaminantes pueden eliminarse de los anticuerpos por técnicas convencionales tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción.

Dentro de ciertas realizaciones puede preferirse el uso de fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fab, que pueden prepararse usando técnicas convencionales. Brevemente, las inmunoglobulinas pueden purificarse a partir de suero de conejo por cromatografía de afinidad en columnas de perlas de proteína A (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) y ser digeridas por papaína para dar fragmentos Fab y Fc. Los fragmentos Fab y Fc pueden separarse, por ejemplo, por cromatografía de afinidad en columnas de perlas de proteína A.

25 Ensayos de ubiquitinación

Como se ha observado anteriormente, la capacidad de un polipéptido de E3 para modular la ubiquitinación de IκB fosforilada puede evaluarse incubando el polipéptido con el complejo de IκBα/NF-κB (o cualquier otro sustrato adecuado), junto con ATPγS, ubiquitina E1 y ubiquitina E2, y detectar conjugados de IκBα-ubiquitina mediante, por ejemplo, transferencia Western usando anticuerpos específicos para IκBα. Los polipéptidos de IκB para uso en un ensayo de ubiquitinación como se describe en este documento pueden ser IκBα (SEC ID N°: 1) o IκBβ (SEC ID N°: 3) humanas nativas, o pueden ser una variante de una proteína nativa. Las variantes de polipéptido de IκB están generalmente modificadas de forma que la capacidad de la variante para fosforilarse y ubiquitinarse dentro de un ensayo de ubiquitinación como se describe en este documento no se reduzca sustancialmente. Un polipéptido de IκB puede marcarse. Por ejemplo, ³⁵S puede incorporarse en un polipéptido de IκB mediante traducción *in vitro* del polipéptido en presencia de ³⁵S-metionina usando técnicas convencionales.

Un polipéptido de IκB puede prepararse generalmente a partir de ADN que codifica el polipéptido mediante expresión del ADN en células huésped cultivadas o mediante traducción usando un sistema *in vitro* tal como extracto de germen de trigo. Si se usan células huésped, tales células son preferentemente bacterias, levadura, células de insecto infectadas por baculovirus o células de mamífero. El ADN recombinante puede clonarse en cualquier vector de expresión adecuado para uso dentro de la célula huésped usando técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia. La traducción *in vitro* del polipéptido puede realizarse generalmente según las instrucciones del fabricante.

Los polipéptidos de IκB expresados pueden usarse sin purificación tras la traducción *in vitro*. Alternativamente, un polipéptido de IκB puede aislarse en forma sustancialmente pura. Un polipéptido de IκB puede aislarse a una pureza de al menos el 80 % en peso, preferentemente a una pureza de al menos el 95 % en peso, y más preferentemente a una pureza de al menos el 99 % en peso. En general, tal purificación puede lograrse usando, por ejemplo, el procedimiento de purificación representativo descrito en este documento o las técnicas convencionales de fraccionamiento con sulfato de amonio, electroforesis en SDS-PAGE y cromatografía de afinidad.

Ciertos ensayos de ubiquitinación pueden usar una E3 celular para caracterizar moduladores de actividad de E3. Dentro de tales ensayos, extractos celulares de células Jurkat, HeLa, THP-1 o endoteliales estimuladas o no estimuladas pueden incubarse *in vitro* con un polipéptido de IκB en presencia de ATP y el inhibidor de fosfatasa ácido okadaico. Los extractos celulares pueden prepararse generalmente según el procedimiento de Alkalay y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10599, 1995. La incubación se realiza en condiciones suficientes para producir la fosforilación del polipéptido de IκB (en las serinas 32 y 36 para IκBα y variantes de la misma) y la asociación del polipéptido fosforilado (pIκB) con el complejo de NF-κB derivado de células. Por ejemplo, el polipéptido de IκB puede incubarse con extracto de células HeLa o Jurkat, ATP y ácido okadaico. La incubación durante 90 minutos a 30 °C es generalmente suficiente para permitir la fosforilación del polipéptido de IκB. Tras esta incubación, el complejo de pIκB/NF-κB puede inmunopurificarse con, por ejemplo, anticuerpos anti-p65 y someterse a ubiquitinación *in vitro* en un sistema libre de células como se describe por Alkalay y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10599, 1995. El nivel de ubiquitinación puede entonces evaluarse usando las técnicas muy conocidas de SDS-PAGE, seguida de

autorradiografía.

Bajo estas condiciones, un polipéptido de ^{35}S -I κ B α natural genera especies múltiplemente ubiquitinadas en presencia de ATP γ S (véase la Figura 1A, carril 4). Ni el mutante de S32/36A marcado con ^{35}S de I κ B α (carril 1) ni la ^{35}S -I κ B α natural no fosforilada (carril 2) están ubiquitinados. Sin embargo, las formas libres de tanto I κ B α mutante como natural se conjugan fácilmente (Figura 1B). Similarmente, un mutante de lisina 21, 22 libre (pero no asociado a un complejo) de I κ B α puede ubiquitinarse *in vitro*. Por tanto, a diferencia de los ensayos de ubiquitinación realizados usando polipéptidos de I κ B libres, el ensayo de ubiquitinación proporcionado en este documento sólo elige como diana polipéptidos de I κ B que están asociados a un complejo y apropiadamente fosforilados.

Un ensayo de ubiquitinación como se ha descrito anteriormente puede usarse para identificar agentes que modulan la ubiquitinación de I κ B. Los agentes de modulación pueden incluir anticuerpos (por ejemplo, monoclonales), péptidos, moléculas pequeñas (por ejemplo, de una biblioteca combinatoria) y otros fármacos que estimulan o, preferentemente, inhiben la ubiquitinación de un polipéptido de I κ B α y/o I κ B β . En general, tales agentes pueden identificarse por incluir un agente de modulación candidato en la reacción de ubiquitinación, que de otro modo puede realizarse como se ha descrito anteriormente, y evaluar el efecto del agente sobre el nivel de ubiquitinación. Una concentración adecuada de agente candidato para uso en un ensayo tal generalmente oscila de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 1 mM. Para agentes candidatos a péptido también puede añadirse un inhibidor de peptidasa tal como bestatina (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y la cantidad de péptido oscila preferentemente de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 1 mM. Un agente candidato que produce un efecto estadísticamente significativo sobre el nivel de ubiquitinación es un agente de modulación englobado por la presente invención.

Los agentes pueden evaluarse adicionalmente por microinyección del agente (por ejemplo, aproximadamente 5 mg/ml de un agente de péptido) en una célula adecuada (por ejemplo, célula HeLa o célula endotelial vascular humana primaria). Tras la microinyección, las células pueden estimularse (por ejemplo, con TNF α) e incubarse para permitir la activación de NF- κ B. En células HeLa, TNF α induce una rápida translocalización nuclear de NF- κ B en el núcleo, que puede detectarse tiñendo con anticuerpos específicos para p65. Los agentes de modulación inducen una disminución estadísticamente significativa en la translocalización de NF- κ B, y pueden reducir tal translocalización a niveles indetectables.

Las células endoteliales vasculares humanas primarias (HUVEC) responden a la estimulación por TNF α mediante la expresión superficial de proteínas de adhesión regulada por NF- κ B tales como ICAM-1, V-CAM-1 y E-selectina (Read y col., Immunity 2:493, 1995; Chen y col., J. Immunol 155:3538, 1995). La expresión de E-selectina es particularmente dependiente de NF- κ B y es la principal molécula de adhesión endotelial inducible para la unión de neutrófilos inicial y que pasa al endotelio activado. Las células estimuladas pueden fijarse y teñirse para detectar la expresión de una o más proteínas de adhesión reguladas por NF- κ B. La microinyección de un polipéptido u otro agente de modulación produce una inhibición estadísticamente significativa de tal expresión, pero no afecta la expresión de proteínas de adhesión independientes de NF- κ B tales como ICAM2.

35 Aplicaciones Terapéuticas

Como se ha observado anteriormente, ciertos polipéptidos de E3, polinucleótidos, anticuerpos y otros agentes como se describen en este documento pueden usarse generalmente como agentes de modulación para inhibir específicamente o potenciar las funciones celulares de NF- κ B. Los agentes de modulación también pueden usarse para modular la ubiquitinación de I κ B α y/o I κ B β en un paciente, modulando así la función celular de NF- κ B *in vivo*. Como se usa en este documento, un "paciente" puede ser cualquier mamífero, que incluye un ser humano, y puede estar aquejado de una enfermedad asociada a activación de NF- κ B, o puede estar libre de enfermedad detectable. Por consiguiente, el tratamiento puede ser de una enfermedad existente o puede ser profiláctico. Enfermedades asociadas a activación de NF- κ B incluyen, pero no se limitan a, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, cáncer e infección vírica.

Tratamiento se refiere a la administración de un agente de modulación como se describe en este documento. Para la administración a un paciente, uno o más compuestos tales se formulan generalmente como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica puede ser una disolución, suspensión o emulsión acuosa o no acuosa estéril que comprende adicionalmente un vehículo fisiológicamente aceptable (es decir, un material no tóxico que no interfiere con la actividad del principio activo). Cualquier vehículo adecuado conocido para aquellos expertos en la materia puede usarse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Vehículos representativos incluyen soluciones salinas fisiológicas, gelatina, agua, alcoholes, aceites naturales o sintéticos, disoluciones de sacáridos, glicoles, ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo o una combinación de tales materiales. Opcionalmente, una composición farmacéutica puede contener adicionalmente conservantes y/u otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y/o gases inertes, y/u otros principios activos.

Alternativamente, una composición farmacéutica puede comprender un polinucleótido que codifica un agente de modulación (de forma que el agente de modulación se genere *in situ*) en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable. En tales composiciones farmacéuticas, el polinucleótido puede estar presente dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de administración conocidos para aquellos expertos en la materia que

incluyen sistemas de expresión en ácido nucleicos, bacterianos y víricos, además de sistemas de dispersión coloidal que incluyen liposomas. Los sistemas de expresión en ácidos nucleicos apropiados contienen las secuencias de polinucleótidos necesarias para la expresión en el paciente (tales como una señal promotora y de terminación adecuada). El ADN también puede ser "desnudo" como se describe, por ejemplo, en Ulmer y col., Science 259:1745-1749, 1993.

Diversos vectores víricos que pueden usarse para introducir una secuencia de ácidos nucleicos en las células del paciente elegidas como diana incluyen, pero no se limitan a, virus de la variolovacuna u otros pox virus, virus del herpes, retrovirus o adenovirus. Las técnicas para incorporar ADN en tales vectores son muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Preferentemente, el vector retrovívico es un derivado de un retrovirus murino o aviar que incluye, pero no se limita a, virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Un vector retrovívico puede transferir o incorporar adicionalmente un gen para un marcador de selección (para ayudar en la identificación o selección de células transducidas) y/o un gen que codifica el ligando para un receptor sobre una célula diana específica (para convertir el vector en específico para diana). Por ejemplo, los vectores retrovívicos pueden hacerse específicos para diana insertando una secuencia de nucleótidos que codifica un azúcar, un glicolípido o una proteína. La elección de la diana también puede llevarse a cabo usando un anticuerpo mediante procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia.

Los vectores víricos son normalmente virus competentes para la replicación no patógenos (defectuosos) que requieren ayuda con el fin de producir partículas de vector infecciosas. Esta ayuda puede proporcionarse, por ejemplo, usando líneas de células colaboradoras que contienen plásmidos que codifican todos los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras dentro de la LTR, pero a las que les falta una secuencia de nucleótidos que permite que el mecanismo de encapsidación reconozca un transcrito de ARN para la encapsulación. Tales líneas de células colaboradoras incluyen (pero no se limitan a) Ψ 2, PA317 y PA12. Un vector retrovívico introducido en tales células puede encapsidarse y producir viriones de vector. Los virios de vector producidos por este procedimiento pueden entonces usarse para infectar una línea celular de tejido tal como células NIH 3T3 para producir grandes cantidades de viriones retrovívicos quiméricos.

Otro sistema de administración elegido como diana para polinucleótidos es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido para uso como vehículo de administración *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (es decir, una vesícula de membrana artificial). Se ha mostrado que grandes vesículas unilaminares (LUV), que oscilan en tamaño de 0,2-4,0 μ m, pueden encapsular un porcentaje sustancial de un tampón acuoso que contiene macromoléculas grandes. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y administrarse a células en una forma biológicamente activa (Fraleigh, y col., Trends Biochem. Sci. 6:77, 1981). Además de a células de mamífero, los liposomas se han usado para la administración de polinucleótidos en células de plantas, levadura y bacterianas. Con el fin de que un liposoma sea un vehículo de transferencia de genes, las siguientes características deben estar presentes: (1) encapsulación de los genes de interés a alta eficiencia mientras que no se comprometa su actividad biológica; (2) unión preferencial y sustancial a una célula diana en comparación con células no diana; (3) administración de los contenidos acuosos de la vesícula al citoplasma de la célula diana a alta eficiencia; y (4) expresión precisa y eficaz de la información genética (Mannino, y col., Biotechniques 6:882, 1988).

La elección de dianas de los liposomas puede clasificarse basándose en factores anatómicos y mecánicos. La clasificación anatómica se basa en el nivel de selectividad y puede ser, por ejemplo, específica para órgano, específica para célula y/o específica para orgánulo. La elección de dianas mecánica puede distinguirse basándose en si es pasiva o activa. La elección de dianas pasiva usa la tendencia natural de los liposomas a distribuirse en células del sistema reticuloendotelial (SRE) en órganos que contienen capilares sinusoidales. La elección de dianas activa, por otra parte, implica la alteración del liposoma acoplado el liposoma a un ligando específico tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glicolípido o proteína, o cambiando la composición o tamaño del liposoma con el fin de lograr la elección como diana de órganos y tipos de células distintos de los sitios de localización que se producen naturalmente.

Las vías y la frecuencia de administración, además de las dosis, variarán de paciente a paciente. En general, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente, intracavitariamente o transdérmicamente. Diariamente pueden administrarse entre 1 y 6 dosis. Una dosis adecuada es una cantidad que es suficiente para mostrar mejoría en los síntomas de un paciente aquejado de una enfermedad asociada a activación de NF- κ B. Tal mejoría puede detectarse monitorizando respuestas inflamatorias (por ejemplo, edema, rechazo de trasplante, hipersensibilidad) o mediante una mejoría en síntomas clínicos asociados a la enfermedad. En general, la cantidad de agente de modulación presente en una dosis, o producido *in situ* por el ADN presente en una dosis, oscila de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 100 mg por kg de huésped. Tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del paciente, pero oscilarán normalmente de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 500 ml para 10-60 kg de animal.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EjemplosEjemplo 1Identificación de un motivo de reconocimiento de la E3 IκB usando ensayo de ubiquitinación

5 Este ejemplo ilustra un ensayo de ubiquitinación representativo y el uso de un ensayo tal para evaluar la capacidad de péptidos para inhibir la ubiquitinación de IκB.

A. Ensayo de ubiquitinación *in vitro*

ADNc de IκBα marcada con HA o IκBβ marcada con HA (Haskill y col., Cell 65:1281-1289, 1991) se tradujeron *in vitro* en extracto de germen de trigo en presencia de ³⁵S-metionina según las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI). Para fosforilar IκBα o IκBβ, 1 μl del extracto que contenía la proteína marcada se incubó durante 90 minutos a 30 °C en una mezcla de reacción que tenía un volumen final de 30 μl: 100 μg de extracto de células HeLa o Jurkat (preparado como se describe por Alkalay y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10599, 1995), ATP 2 mM y ácido okadaico 1 μM. Durante esta incubación, el polipéptido de IκB marcado se fosforiló en las serinas 32 y 36, y se asoció al complejo de NF-κB endógeno (datos no mostrados).

15 Tras la incubación se añadió 1 μl de suero anti-p65 y el complejo inmunitario de NF-κB se inmovilizó a proteína A-Sepharose® y se sometió a ubiquitinación *in vitro* en extracto de células HeLa como se describe por Alkalay y col. Las proteínas ubiquitinadas se separaron por SDS-PAGE y se visualizaron por autorradiografía.

Como se muestra en la Figura 1A, sólo ³⁵S-plkBα natural generó especies múltiplemente ubiquitinadas (carril 4). No se ubiquitaron ni el mutante de S32/36A marcado con ³⁵S de IκBα (carril 1) ni ³⁵S-IκBα natural no fosforilada (carril 2), y no se observó ubiquitinación de plkBα en ausencia de ATP (carril 3).

20 La relevancia fisiológica de este ensayo se documentó adicionalmente mediante la comparación de la ubiquitinación *in vitro* de ³⁵S-IκB libre con la de un sustrato fosforilado asociado al complejo. Mientras que un mutante de S32/36A asociado al complejo no se sometió a conjugación con ubiquitina según su destino *in vivo*, formas libre de tanto IκBα mutante como natural se conjugaron fácilmente (Figura 1B). Similarmente, sólo el mutante de lisina 21, 22 libre, pero no asociado al complejo, de IκBα pudo ubiquitinarse *in vitro* (datos no mostrados). Por tanto, mientras que la IκBα libre es reconocida por el sistema de ubiquitina de un modo no discriminatorio, el inhibidor asociado al complejo está enmascarado a menos que esté apropiadamente fosforilado.

B. Identificación del motivo de reconocimiento de ubiquitina-ligasa para IκBα

30 Para identificar el motivo de reconocimiento de ubiquitina-ligasa para IκBα, diversos péptidos se añadieron a concentraciones variables a las mezclas de reacción en presencia del inhibidor de la peptidasa bestatina (40 μg/ml). Los péptidos atravesaron el dominio de señalización del extremo N de la proteína y se fosforilaron en uno o ambos residuos de serina (32 y 36), o no se modificaron o se sustituyeron con serina. Estos péptidos se incluyeron en la reacción de ubiquitinación a concentraciones diferentes y se probaron para la inhibición de ubiquitinación específica para plkBα. Cuando se monitorizó la conjugación de IκBα libre, la proteína traducida se añadió directamente a la mezcla de reacción de conjugación.

35 Sólo los péptidos que se fosforilaron tanto en serina 32 como 36 (péptidos plkBα) inhibieron eficazmente la ubiquitinación de plkBα (Figura 1A, carriles 7, 11-14). Un fosfopéptido c-Fos (ppFos, carril 5), un péptido de IκBα sustituida en serina 32, 36 por alanina (p21 S/A, carril 6) y un péptido no fosforilado (p21, carril 8) no tuvieron efecto detectable sobre la ubiquitinación de plkB a una concentración de 400 μM. Las CI₅₀ de los péptidos de IκBα fosforiladas se calcularon y concentraciones inhibitorias representativas se muestran en la Figura 1A. Los péptidos de IκBα doblemente fosforiladas inhibieron la reacción de conjugación de plkB (carriles 7, 11-14) a una CI₅₀ de 5 μM. Las secuencias de estos péptidos se proporcionan en la Tabla I, antes, y en las SEC ID N°: 5-9. A diferencia, los péptidos fosforilados una sola vez (carriles 9, 10) inhibieron la conjugación de plkBα a una CI₅₀ de 400 μM. El péptido de tamaño mínimo probado (pp7, carril 14), que solamente atravesaba el sitio de fosforilación de señalización, fue suficiente para inhibir eficazmente la ubiquitinación, aunque a CI₅₀ algo mayor (10 μM). Por tanto, un péptido que comprende los residuos 21 a 41 de SEC ID N°: 1 comprende un dominio de reconocimiento para la ubiquitina-ligasa E3. Interesantemente, los residuos de lisina 21 y 22 no son esenciales para la inhibición, que implica que el sitio de reconocimiento del sistema de ubiquitina es distinto del sitio de conjugación real.

45 La especificidad de los péptidos se probó en otras dos reacciones de conjugación de ubiquitina: la conjugación del mutante de S32/36A natural libre (Figura 1B carriles 1-3) de IκBα (Figura 1B, carriles 4-6) y la conjugación de ubiquitina con la masa de proteínas celulares en extracto de HeLa (detectada por ubiquitina marcada con ¹²⁵I según Alkalay y col., Figura 1C). Ninguna de las dos reacciones estuvo afectada por la adición de un motivo de reconocimiento de ubiquitina-ligasa para IκBα o un péptido de control.

55 Se encontró que los péptidos que comprenden un motivo de reconocimiento de ubiquitina-ligasa para IκBα suprimieron la ubiquitinación del sustrato relacionado con plkBα plkBβ (Figura 1D). Similar a la conjugación de plkBα, la conjugación específica de IκB también requirió un complejo de NF-κB asociado (no mostrado) y la

fosforilación previa en los residuos homólogos de IκBα Ser 19 y 23. Un sustrato de IκBβ preparado en ausencia de inhibidores de fosfatasa no se sometió a ubiquitinación (Figura 1D, carril 1). Los péptidos afectaron la ubiquitinación de IκBβ a una CI₅₀ que era similar a la observada para IκBα (Figura 1D, carriles 4-7). Por tanto, parece que la(s) misma(s) enzima(s) elige(n) como diana ambas IκB para la degradación dependiente de ubiquitina.

5 Los péptidos de IκBα inhibitorios se probaron en un ensayo de degradación *in vitro* dependiente de ubiquitina complementario (Orion y col., J. Biol. Chem. 270:21707, 1995; Stancovski y col., Mol. Cell. Biol. 15:7106, 1995). Usando este ensayo, solo la IκBα derivada de células estimuladas se degrada *in vitro* en un modo dependiente de ubiquitina, mientras que la IκBα no fosforilada del mismo extracto de células no se somete a degradación. La
10 incorporación de los fosfopéptidos inhibitorios de la conjugación en el ensayo de degradación produjo una estabilización del sustrato de IκBα (Figura 2, carriles 3, 4), mientras que el agente de péptido no fosforilado o un péptido fosfo-Fos de control no tuvo efecto sobre la degradación de IκBα específica (carriles 5, 6). El recortar los péptidos en Lys 21/22 no redujo el efecto inhibitorio de la degradación (carril 4), que indica que los péptidos no suprimen la degradación de IκBα mediante agotamiento del sistema de ubiquitina-proteasoma como sustratos conjugables.

15 Ejemplo 2

Identificación del componente del sistema de ubiquitina que participa en el reconocimiento del sustrato

Este ejemplo ilustra la identificación de una E3 específica que es responsable del reconocimiento de polipéptidos de IκB.

20 La conjugación y la degradación de IκBα-ubiquitina requiere un complemento completo de las enzimas del sistema de ubiquitina: E1, una E2 específica derivada de la fracción I del sistema de ubiquitina, E2F1 (Alkalay y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10599, 1995; Chen y col., Cell 84:853, 1996) y un componente E3 de la fracción II. Para identificar el componente del sistema de ubiquitina que participa en el reconocimiento del sustrato, el lisado de HeLa se fraccionó sobre columnas de fosfopéptido de IκBα, y las fracciones de flujo continuo se ensayaron para la
25 conjugación de IκBα. Los péptidos se acoplaron a NHS-Sepharose® (Farmacia) según las instrucciones del fabricante a una concentración de 2 mg/ml. Se incubaron 100 µg de extracto de HeLa con 2,5 µl de resina acoplada en presencia de NP40 al 0,1 % y ovoalbúmina al 3 % durante 1 hora a 4 °C. La resina se desechó y el material sin unir se probó en el ensayo de ubiquitinación descrito anteriormente.

Mientras que una fracción de flujo continuo de una columna de fosfopéptido de control y una columna de S32/36A
30 retuvieron la capacidad de conjugación completa a IκBα (Figura 3A, carriles 2, 3), las fracciones de flujo continuo de dos péptidos de IκBα diferentes perdieron su capacidad de conjugación específica para IκBα (carriles 4, 7). La actividad de conjugación agotada pudo complementarse por la fracción II de reticulocitos (carriles 5, 8) que contenía todas las especies conocidas de enzimas E3 (Ciechanover, Cell 79:13, 1994). La complementación no pudo obtenerse mediante la adición de la fracción I o la fracción I y E1 (carriles 6 y 9, respectivamente), que indica que las
35 columna de péptido se agotaron en E3 en vez de E2 o E1. De nuevo, los residuos 21 y 22 de lisina de IκBα fueron prescindibles para retener E3 (compárese la Figura 3A, carril 7 a carril 4), enfatizándose la distinción entre el reconocimiento de sustrato y el sitio de conjugación. Se encontró que el agotamiento de la columna de péptido era específico para la E3 IκB ya que las fracciones de flujo continuo mantuvieron la actividad completa en la conjugación de proteínas de HeLa al azar (como se detectó midiendo la conjugación de ¹²⁵I-ubiquitina, Figura 3B). Esto indica que una E3 específica es responsable del reconocimiento de las IκB en el motivo identificado.

40 Ejemplo 3

Efecto de péptidos representativos sobre la activación de NF-κB celular

Este ejemplo ilustra la inhibición de la activación de NF-κB celular por microinyección de péptidos que comprende un motivo de reconocimiento de ubiquitina-ligasa para IκBα.

45 Se sembraron células HeLa sobre cubreobjetos de rejilla (Celloclate, Eppendorf) 18 horas antes de la microinyección. La microinyección se realizó con un péptido de IκBα de 22 aminoácidos (pp21; Tabla I y SEC ID N°: 9) o un péptido fosfo-Fos de control (SEC ID N°: 10) usando un aparato semiautomatizado (Eppendorf). Los péptidos se inyectaron en el citoplasma celular a una concentración de 5 mg/ml en KCl 100 mM, Na₂HPO₄ 5mM (pH 7,2) y se activaron inmediatamente con TNFα (200 unidades/ml) bien durante 20 minutos (para la translocalización de NF-κB) o bien durante 3 horas (para la expresión de E-selectina). Tras la activación, las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos
50 anticuerpos específicos para p65 (Mercurio y col., Genes & Dev. 7:705, 1993; Santa Cruz) o anticuerpos monoclonales anti-E-selectina (R&D Systems).

En ausencia de péptido, TNFα induce una rápida translocalización nuclear de NF-κB en el núcleo como se muestra por la tinción nuclear con p65 del 90 % de las células (véase la Figura 4G, columna 2). El péptido pp21 suprimió la activación estimulada por TNFα de NF-κB en el 50 %-70 % de las células microinyectadas en varios experimentos
55 (véanse campos representativos en las Figuras 4A y 4B; y Figura 4G, columna 3). A diferencia, el péptido pp-Fos de control no tuvo efecto sobre la tasa de translocalización nuclear inducida de NF-κB con respecto a células no microinyectadas (Figuras 4C y 4G, columna 4).

Para evaluar adicionalmente las consecuencias funcionales de la inhibición de NF- κ B, el péptido inhibitorio de I κ B-E3 se microinyectó en células endoteliales vasculares humanas primarias (HUVEC; Chen y col., J. Immunol 155:3538, 1995). Estas células responden a estimulación por TNF α mediante la expresión superficial de proteínas de adhesión reguladas por NF- κ B tales como E-selectina. Las células HUVEC se sembraron, se microinyectaron y se estimularon como se ha descrito anteriormente. Tres horas después de la estimulación, las células se fijaron y se tiñeron para la expresión de la E-selectina dependiente de NF- κ B. El 75 %-85 % de las células HUVEC se tiñeron intensamente para E-selectina tras la estimulación por TNF α en varios experimentos. La microinyección del péptido pp21 produjo la inhibición de la expresión de E-selectina en el 70 %-80 % de las células microinyectadas (Figura 4D; y Figura 4H, columna 3). A diferencia, el péptido pp-Fos de control no tuvo efecto sobre la expresión de E-selectina, con respecto a células no microinyectadas (Figuras 4F y 4H, columna 4). La microinyección de un control, péptido de I κ B α sustituida en S32/36A, no tuvo efecto sobre la tasa de expresión de E-selectina.

Estos resultados demuestran que la degradación específica para subunidad de I κ B α y I κ B β fosforiladas inducidas por señal está mediada por una E3 específica. El dominio de reconocimiento para la ubiquitina-ligasa E3 es una secuencia corta, centrada alrededor de las dos fosfoserinas adquiridas por la señal, conservada en ambas I κ B, representando la primera el motivo de reconocimiento de E3 biológicamente relevante. La especificidad en el reconocimiento de I κ B está soportada por el contexto del sustrato fosforilado: un complejo celular asociado enmascara el sustrato de las E3 no específicas. Esta característica restringe la degradación inhibitoria de NF- κ B en la fase de post-estimulación en la que mediante acontecimiento(s) de fosforilación específico(s) de sitio se expone a la ligasa específica. La activación de NF- κ B y su función resultante puede suprimirse específicamente por inhibición *in vivo* de la ligasa I κ B usando un agente de modulación como se proporciona en este documento.

Ejemplo 4

Caracterización adicional de la ubiquitinación de I κ B α

Este ejemplo ilustra adicionalmente la caracterización de la ubiquitina-ligasa asociada a la ubiquitinación de I κ B α .

A. La estimulación de citocina promueve la asociación entre pl κ B α y una ubiquitina-ligasa específica

Para estudiar adicionalmente el reclutamiento de componentes de la maquinaria de la ubiquitina por complejos de I κ B α fosforilada, los complejos de pl κ B α /NF- κ B se purificaron a partir de células HeLa estimuladas por TNF- α inhibidas por proteasoma y se evaluó su potencial de ubiquitinación. Las células HeLa se preincubaron con el inhibidor de proteasomas ALLN (150 μ M) durante 1 hora y se estimularon durante 10 minutos con TNF α . Los complejos de I κ B α /NF- κ B se purificaron por inmunofluorescencia con anticuerpos de cabra anti-Rel A (p65) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) y el péptido p65 relacionado (ELFPLIFPAEPAQASGP (SEC ID N $^{\circ}$: 21), que era sintético y se compró de Alfa-Diagnostic, Inc., y luego se purificó por HPLC, se analizó por espectrometría de masas, se verificó para la estructura predicha y se demostró que tenían más del 85 % de pureza).

La fracción inmunopurificada se complementó con diversos componentes del sistema de ubiquitina y se sometió a ubiquitinación *in vitro*. En particular, la fracción se complementó con 0,2 μ g de E1 purificada y 1 μ g de UBC5C recombinante purificado (Jensen y col., J. Biol. Chem. 270:30408-30414, 1995) y se incubó durante 90 minutos a 37 $^{\circ}$ C en tampón de reacción que contenía: Tris 50 mM (pH 7,6), MgCl $_2$ 2 mM, DTT 1 mM, ácido okadaico 20 nM, 1 mg/ml de ubiquitina bovina (Sigma) y ATP γ S 5 mM (Sigma). Entonces, la mezcla de reacción se hirvió en SDS-tampón y la muestra se analizó por SDS-PAGE (8,5 %) y detección y cuantificación de la radiactividad.

Se encontró que la adición de ubiquitina, E1 purificada y una E2 específica, UBC5C, era suficiente para generar la actividad de conjugación de I κ B α -ubiquitina de capacidad completa (Figura 5, carril 2), evidente en la acumulación de especies de alta masa molecular que reaccionaron con antisueros específicos para I κ B α . Esta actividad fue dependiente de E1 (compárense los carriles 1 y 2), y no se proporcionó por la fracción inmunopurificada correspondiente de células HeLa no estimuladas (compárense los carriles 4, 5, 6). Como la fracción de HeLa estimulada contuvo tanto I κ B α fosforilada como no fosforilada, los conjugados observados pudieron derivarse de ambas especies de I κ B.

Para determinar la fuente de los conjugados de I κ B α , las reacciones de ubiquitinación se realizaron en presencia de un péptido de pl κ B α (pp12; CDRHDS[PO3]GLDS[PO3]; SEC ID N $^{\circ}$: 22) (carril 7) o un péptido de I κ B α sustituida con serina/ácido glutámico (p12S/E) (carril 8). Ambos péptidos fueron sintéticos, se compraron de Alfa-Diagnostic, Inc., y luego se purificaron por HPLC, se analizaron por espectrometría de masas, se verificaron para la estructura predicha y se probó que tenían más del 85 % de pureza. Los péptidos de I κ B α se añadieron a las concentraciones indicadas a las mezclas de reacción en presencia del inhibidor de peptidasa bestatina (40 μ g/ml). Sólo pp12 suprimió la formación de conjugados de poliubiquitina-I κ B α , que indica que la ubiquitinación fue específica para pl κ B α (Yaron y col., EMBO J. 16:6486-6494, 1997).

B. La fosforilación es necesaria y suficiente para reclutar actividad de ubiquitina-ligasa específica

El hallazgo de que E1 y E2 complementaron específicamente la conjugación de pl κ B α de la fracción de HeLa estimulada, pero fracasó en complementar una fracción no estimulada, podría explicarse de varias formas: a) la estimulación de HeLa activa una ubiquitina-ligasa para pl κ B específica, b) la estimulación de HeLa modifica el

sustrato, haciendo que sea responsable de la ubiquitinación, o c) la estimulación de HeLa es necesaria para modificar tanto el sustrato como la ligasa. Para distinguir entre estas posibilidades se usó una proteína IKK2 recombinante constitutivamente activa (IKK2-EE) (Mercurio y col., Science 278:860-66, 1997). Esta proteína fosforila IκBα en la serina 32/36 similarmente a un complejo de IKK activado con TNFα.

5 Tras la inmunoprecipitación de complejos de IκBα marcada con ³⁵S /NF-κB de un lisado de HeLa no estimulado previamente incubado con IκBα marcada con ³⁵S recombinante, los complejos se fosforilaron por la IKK2-EE recombinante, se eluyeron con el péptido p65 relacionado y se sometieron a ubiquitinación *in vitro*. Después de la incubación con IKK2-EE, casi todo la ³⁵S-IκB estaba fosforilada. Sin embargo, la adición de ubiquitina, E1 y UBC5C no produjo la fosforilación de plκBα (Figura 6, carril 2). Por tanto, la fosforilación de IκB por IKK no fue suficiente para
10 promover su ubiquitinación en presencia de E1 y E2. Cabe la posibilidad de que la ubiquitinación de plκBα requiera un componente adicional del lisado de HeLa que no se co-inmopurificó a partir de las células no estimuladas.

Para confirmar esta hipótesis, los complejos de IκBα/NF-κB inmunounidos se incubaron con un lisado de HeLa no estimulado, tanto directamente como tras la fosforilación por IKK2-EE, se lavaron exhaustivamente con tampón con alto contenido de sales y se eluyeron con el péptido p65. De hecho, la incubación de los complejos de IκB fosforilada (Figura 6 carril 3), pero no de la no fosforilada (carril 1), con el lisado de HeLa proporcionó el (los) componente(s) de plκB-ligasa necesario(s) para la conjugación de plκBα. No se obtuvo señal cuando E1 o E2 se omitieron de la reacción, confirmando que la señal en la parte superior del gel representa conjugados de poliubiquitina-IκBα (carriles 5, 6). Los lisados de HeLa estimulados por TNFα no fueron superiores con respecto a los lisados no estimulados en proporcionar el componente de ligasa necesario.

20 El efecto inhibitorio de pp12 sobre la ubiquitinación de plκBα (Figura 5) sugirió que el componente de HeLa esencial se asocia específicamente y de manera estable con el motivo de reconocimiento de plκBα durante el periodo de incubación y posteriormente actúa en la conjugación de plκB-ubiquitina. Para probar esta suposición, los inventores incluyeron en la etapa de incubación pp12 o el péptido de control p12S/E, que se eliminó junto con el lisado de HeLa, antes de eluir las fracciones. La adición de pp12 (Figura 6, carril 4), pero no de p12S/E (carril 5), suprimió la actividad de ubiquitina-ligasa asociada al complejo de plκB, a la vez que conservó la integridad del sustrato. Esto fue evidente en la capacidad de las fracciones tratadas con péptido para someterse a ubiquitinación en presencia de la fracción II de reticulocitos como fuente de E3 (Alkalay y col., Mol. Cell Biol. 15:1294-301,1995). Pueden extraerse varias conclusiones de este experimento.

30 1) Un componente de ubiquitina-ligasa esencial para la ubiquitinación de plκBα es reclutado por el complejo de IκBα/NF-κB del lisado de HeLa tras la fosforilación por IKK.
2) Este componente promotor de la conjugación está contenido en un lisado de HeLa no estimulado, indicando que no es necesario activar la ubiquitina-ligasa por la estimulación por TNF.
3) El componente de ligasa esencial es evidentemente específico y se asocia con IκB mediante una interacción directa con el motivo de reconocimiento de plκB (probado por inhibición por ppl2 de la conjugación de plκBα).
35

C. Aislamiento del componente de ubiquitina-ligasa específico que reconoce plκBα

Se incubó extracto de HeLa (250 mg) con 250 μl de inmunoperlas anti-p65. Tras cuatro lavados en tampón A (KCl 1 M, NP40 al 0,5 %, tampón Tris 50 mM a pH 7,6, DTT 1 mM) y un lavado en tampón B (tampón Tris 50 mM, pH 7,6, DTT 1 mM), la mitad de las perlas se sometió a fosforilación *in vitro* con IKK y la mitad se sometió a fosforilación de control. Las perlas se lavaron dos veces en tampón A y una vez en tampón B, se agitaron con 100 mg de extracto de HeLa en presencia de 1 μm de ácido okadaico durante 30 min a 25 °C, se lavaron cuatro veces con tampón A, una vez en tampón A y se eluyeron con 1 mg/ml de péptido p65. Se realizó un experimento similar con 10 mg de lisado de células HeLa marcado metabólicamente con ³⁵S (100 μCi/ml de Met/Cys durante 8 horas) y 25 μl de inmunoperlas de p65. Las fracciones eluidas derivadas de tanto los lisados calientes como fríos se mezclaron, se hirvieron en SDS-tampón de muestra y se analizaron por SDS al 7,5 %-PAGE y autorradiografía. Las rebanadas de gel correspondientes a las señales del autorradiograma se escindieron y sus bandas de proteínas se secuenciaron en espectrometría de masas como se describe más adelante.

Se compararon tres fracciones purificadas por inmuoafinidad por análisis de SDS-PAGE (Figura 7A): 1) una fracción que contenía complejos de IκBα/NF-κB que no se fosforiló por IKK2-EE, pero se incubó con lisado de HeLa; 2) una fracción sometida a fosforilación por IKK2-EE y posterior incubación con lisado de HeLa; 3) una fracción fosforilada por IKK2-EE, pero que no se incubó con lisado de HeLa. Todas las incubaciones se realizaron en complejos inmovilizados sobre inmunoperlas, que luego se lavaron exhaustivamente y se eluyeron con el péptido p65.

55 Análisis de SDS-PAGE de las tres fracciones revelaron cambios de patrones debidos a la fosforilación por IKK o a inmuoadsorción adicional de proteínas IκBα/NF-κB, pero no distinguió ninguna proteína reclutada por el complejo de IκB tras la fosforilación por IKK. La complejidad de la tinción de proteínas podría ocultar la presencia de cualquier proteína reclutada que migraba junto con una proteína inmunopurificada. Para identificar la proteína reclutada, el análisis de espectrometría de masas se realizó en una docena de bandas teñidas con azul coloidal derivadas de las fracciones 1 y 2. Este análisis reveló la presencia de casi el espectro completo de las proteínas de la familia Rel y

I κ B α : NF- κ B1 (p105), NF- κ B2 (p100), RelA (p65), p50, p49, C-Rel, I κ B α y I κ B ϵ . Sólo unas pocas otras proteínas se coimmunoprecipitaron con el complejo de I κ B/NF- κ , particularmente GRP78/Bip, Hsp 70 y Hsc 70.

Para sortear el posible enmascaramiento de la ubiquitina-ligasa para pl κ B putativa, los inventores sustituyeron la fuente de ligasa por lisado de HeLa biosintéticamente marcado con 35 S y las proteínas asociadas a I κ B α se rastrearon por análisis de SDS-PAGE y autorradiografía (Figura 7B). En paralelo, las diversas fracciones se probaron para su capacidad de ubiquitina-ligasa. El patrón de bandas de la fracción activa (carril 2) se comparó con el de una no activa (carril 1). Se distinguieron cuatro bandas de 35 S-proteína con una masa molecular de 54, 58, 61 y 64 kD en el carril 2. Algunas de estas bandas de proteínas podrían representar componentes de la ubiquitina-ligasa que reconocen la pl κ B α directamente, mientras que otros podrían haberse asociado a pl κ B α indirectamente o a otro componente del complejo fosforilado por IKK. Para separar el componente de ligasa que reconoce pl κ B α directamente, pp12 o el péptido de control p12S/E se añadió al lisado de HeLa radiomarcado, que luego se incubó con el complejo de I κ B α /NF- κ B inmunounido. Una comparación de las fracciones eluidas mostró que de las cuatro bandas distintivas presentes sólo en la fracción 2, tres bandas fueron eliminadas por el péptido pp12 específico (p54, p58 y p61), mientras que sólo la banda de 64 kD persistió en presencia de pp12 (Figura 7B, compárense los carriles 2 y 3). El péptido de control no afectó la asociación de ninguna de las proteínas distintivas a pl κ B α (carril 4). Se presentaron coherentemente dos de las proteínas que interactúan con pl κ B α , p58 y p54, y siempre se asociaron a la actividad de ubiquitina-ligasa específica.

Ejemplo 5

Identificación de ubiquitina-ligasa E3 humana

Este ejemplo ilustra el aislamiento y la caracterización de ubiquitina-ligasa E3 humana.

Las bandas de 54 y 58 kD descritas en el ejemplo previo se escindieron de un carril positivo para ligasa y uno negativo para ligasa (lisado de HeLa incubado con un complejo de I κ B α no fosforilada), las proteínas se digirieron *in situ* (Shevchenko y col., Anal. Chem. 68:850-858, 1996) y los péptidos trípticos así obtenidos se secuenciaron por espectrometría de masas por nanoelectropulverización (Wilm y col., Nature 379:466-469, 1996). Las bandas de proteínas se redujeron en gel, se alquilaron con S y se digirieron en gel con un exceso de tripsina (durante la noche a temperatura ambiente) como se describe (Shevchenko y col., Anal. Chem. 68:850-858, 1996; Wilm y col., Nature 379:466-469, 1996). Se extrajeron trozos de gel y las mezclas de péptidos resultantes se concentraron y se desalaron usando una microcolumna que contenía 50 nl del material Poros R2 (Perceptive Biosystems, Framingham, MA). Los péptidos se eluyeron con 1 μ l de metanol al 60 %, ácido fórmico al 5 % directamente en una aguja de nanoelectropulverización. Los espectros de nanoelectropulverización se registraron en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (QqTOF, Perkin-Elmer Sciex, Toronto, Canadá). Las marcas de las secuencias de péptidos (Mann y Wilm, Anal. Chem. 66:4390-4399, 1994) se ensamblaron a partir de los espectros de fragmentación y se buscaron por comparación con una base de datos de secuencias de proteínas no redundantes (nrdb) mantenida en el European Bioinformatics Institute (EBI, Hinxton Park, Inglaterra) usando el programa PeptideSearch (Mann y Wilm, Anal. Chem. 66:4390-4399, 1994).

Los espectros de masas de la banda de gel de 54 kD revelaron una mezcla de péptidos complejos (Figura 8A) de la que se seleccionaron varios péptidos para la fragmentación. Las proteínas identificadas por la búsqueda de marcas de secuencia de péptidos (Mann y Wilm, Anal. Chem. 66:4390-4399, 1994) incluyeron NF- κ B1 (p50), cinasa I κ B α , I κ B ϵ , RelB, cadena de tubulina beta-1 y proteína de unión al iniciador del receptor tiroideo. Para identificar la proteína asociada a la actividad de E3, péptidos adicionales presentes en pequeñas cantidades se seleccionaron para la secuenciación comparando el espectro de las bandas de 54 kD de la fracción activa con el de una banda similar de una no activa (Figura 8B). La marca de secuencias de péptidos (1587,81) VVNV (SEC ID N $^{\circ}$: 23) (1999,09) se derivó del espectro de fragmentación mostrado en la Figura 8C y se identificó inequívocamente como AAVNVVDFDDKYIVSAS (SEC ID N $^{\circ}$: 24). Espectros adicionales identificaron los péptidos LEGHEELVR (SEC ID N $^{\circ}$: 25), LVVSGSSDNTIR (SEC ID N $^{\circ}$: 26), IQDIETIESNWR (SEC ID N $^{\circ}$: 27) y VISEGMLWK (SEC ID N $^{\circ}$: 28). Los cuatro primeros fragmentos tienen secuencias presentes dentro de la caja F humana/proteína WD β -TrCP (Margottin y col., Mol. Cell 1:565-574, 1998). Sin embargo, el quinto péptido (VISEGMLWK (SEC ID N $^{\circ}$: 28)) se aparea con uno de un péptido de la proteína Slimb de *Drosophila* (véase Jiang y Struhl, Nature 391:493-496, 1998), que es altamente homólogo a β -TrCP humana. La secuenciación adicional identificó la secuencia de nucleótidos de ubiquitina-ligasa E3 humana proporcionada en la Figura 9 (SEC ID N $^{\circ}$: 15), y la secuencia de proteínas predicha proporcionada en la Figura 10 (SEC ID N $^{\circ}$: 16). Por tanto, parece que la ubiquitina-ligasa E3 humana es un miembro novedoso de la familia de β -TrCP/Slimb de proteínas homólogas.

Ejemplo 6

Caracterización adicional de la actividad de ubiquitina-ligasa E3

Este ejemplo ilustra adicionalmente la actividad de ubiquitina-ligasa de los miembros de la familia de la ubiquitina-ligasa E3 humana β -TrCP y Slimb.

La capacidad de estas proteínas para unirse a pl κ B α específicamente y ayudar en su ubiquitinación se examinó en un sistema libre de células. El complejo de I κ B α /NF- κ B se inmunopurificó a partir de células HeLa y el complejo

inmunitario tanto se fosforiló por IKK2-EE como se fosforiló para control como se ha descrito anteriormente. Entonces se incubó con los siguientes miembros de la familia de E3 marcados con FLAG inmovilizados inmunoprecipitados a partir de células 293 transfectadas: β -TrCP de ratón (β -TrCP), β -TrCP humana ($h\beta$ -TrCP), β -TrCP humana con una deleción de los residuos 122-168 de la región de caja F ($\Delta\beta$ -TrCP) y la proteína Slimb de *Drosophila*. El material unido se analizó por transferencia Western con anti-I κ B α y anticuerpos anti-FLAG. Todas estas proteínas se unieron exclusivamente a I κ B α fosforilada por IKK, pero no a la fosforilada de control (véase la Figura 11A). Sin embargo, β -TrCP humana y de ratón se unió mucho a mejor a I κ B α que la proteína de *Drosophila* altamente homóloga (véanse los carriles 2, 4, 6 y 8). $\Delta\beta$ -TrCP se unió a pl κ B α incluso mejor que la proteína nativa, que indica que la región de la caja F era prescindible para la unión. Además, la unión de β -TrCP se suprimió por un péptido que representaba el motivo de reconocimiento de pl κ B α (pp10; DRHDS(PO₃)GLDS(PO₃)M (SEC ID N^o: 29); véase la Figura 11B, carril 3), pero no por el péptido de control (carril 4), especificando el sitio de reconocimiento de pl κ B α de la secuencia conservada DS(PO₃)GLDS(PO₃) (SEC ID N^o: 30).

Para evaluar el efecto de la unión sobre la ubiquitinación, los miembros de la familia E3 y el mutante de deleción se usaron como fuente de actividad de E3 en la ubiquitinación de pl κ B α . En presencia de E1 y E2 (UBC5C), las proteínas β -TrCP naturales facilitaron la ubiquitinación de pl κ B α , pero no la de la I κ B α no fosforilada (véase la Figura 11C, carriles 1-4). $\Delta\beta$ -TrCP, que carecía del módulo de interacción proteína-proteína de la caja F, dejó de promover la ubiquitinación (carriles 7 y 8), a pesar de su capacidad de unión (Figura 11A, carril 6). Aunque Slimb facilitó algo la ubiquitinación de pl κ B α , fue al menos diez veces menos eficiente que la $\Delta\beta$ -TrCP humana y de ratón (basándose en niveles de expresión similares de la marca FLAG), correspondiéndose con su actividad más débil.

El diseño modular de estos miembros de la familia y el análisis *in vitro* descrito en este documento sugirieron que esa deleción de la caja F produciría una proteína que funciona como una molécula negativa dominante *in vivo*. En realidad, la expresión en exceso transitoria de $\Delta\beta$ -TrCP inhibió la degradación de I κ B α endógena en células Jurkat estimuladas produciendo la acumulación de pl κ B α (Figura 12A). Por consiguiente, se inhibió la activación de NF- κ B (Figura 12B). La activación de NF- κ B fue específica, ya que $\Delta\beta$ -TrCP no afectó la activación de un indicador de NF-AT. Es de importancia el hecho de que la inhibición de NF- κ B también se observara con Slimb natural, mientras que la expresión de β -TrCP humana natural no fue inhibitoria (Figura 12B). Por tanto, la expresión en exceso de Slimb natural tiene un efecto negativo dominante sobre la activación de NF- κ B, probablemente ligado a su actividad de ubiquitinación de pl κ B α relativamente escasa (Figura 11B).

De lo anterior se apreciará que, aunque las realizaciones específicas de la invención se han descrito en este documento para fines de ilustración, pueden hacerse diversas modificaciones sin desviarse del alcance de la invención. Por consiguiente, la invención no se limita, excepto por las reivindicaciones adjuntas.

RESUMEN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID N^o: 1 es la secuencia de aminoácidos de I κ B α
 SEC ID N^o: 2 es la secuencia de ADN de I κ B α
 35 SEC ID N^o: 3 es la secuencia de aminoácidos de I κ B β
 SEC ID N^o: 4 es la secuencia de ADN de I κ B β
 SEC ID N^o: 5 es la secuencia de aminoácidos de pp7
 SEC ID N^o: 6 es la secuencia de aminoácidos de pp11
 SEC ID N^o: 7 es la secuencia de aminoácidos de pp15
 40 SEC ID N^o: 8 es la secuencia de aminoácidos de pp19
 SEC ID N^o: 9 es la secuencia de aminoácidos de pp21
 SEC ID N^o: 10 es la secuencia de aminoácidos del péptido fosfo-Fos
 SEC ID N^o: 11 es la secuencia de aminoácidos de pp21 S/A
 SEC ID N^o: 12 es la secuencia de aminoácidos de I κ B α marcada con HA
 45 SEC ID N^o: 13 es la secuencia de aminoácidos de I κ B α de S32 , 36 marcada con HA
 SEC ID N^o: 14 es la secuencia de aminoácidos de I κ B β marcada con HA
 SEC ID N^o: 15 es la secuencia de ADN de ubiquitina-ligasa E3 humana
 SEC ID N^o: 16 es la secuencia de aminoácidos predicha de ubiquitina-ligasa E3 humana
 SEC ID N^o: 17 es la secuencia de ADN de β -TrCP humana
 50 SEC ID N^o: 18 es la secuencia de aminoácidos de β -TrCP E3 humana
 SEC ID N^o: 19 es el sitio fosforilación de I κ B α
 SEC ID N^o: 20 es la secuencia de β -TrCP recuperada
 SEC ID N^o: 21 es la secuencia de aminoácidos del péptido p64 relacionado
 SEC ID N^o: 22 es la secuencia de aminoácidos del péptido de pl κ B α pp12
 55 SEC ID N^o: 23 es la marca de la secuencia de péptidos de ubiquitina-ligasa E3 humana
 SEC ID N^o: 24 es el péptido de ubiquitina-ligasa E3 humana
 SEC ID N^o: 25 es el péptido de ubiquitina-ligasa E3 humana
 SEC ID N^o: 26 es el péptido de ubiquitina-ligasa E3 humana
 SEC ID N^o: 27 es el péptido de ubiquitina-ligasa E3 humana
 60 SEC ID N^o: 28 es el péptido de ubiquitina-ligasa E3 humana
 SEC ID N^o: 29 es la secuencia de aminoácidos del motivo de reconocimiento de pl κ B α
 SEC ID N^o: 30 es la secuencia de pl κ B α conservada

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Signal Pharmaceuticals, Inc.

Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem

<120> COMPUESTOS Y PROCEDIMIENTOS PARA MODULAR LA ACTIVACIÓN DE

5 NF-κB

<130> 860098.427PC

<140> PCT

<141> 09/12/1999

<160> 30

10 <170> PatentIn ver. 2.0

<210> 1

<211> 317

<212> PRI

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

```

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

ES 2 361 660 T3

					165						170						175
Lys	Ala	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	His	Thr	Cys	Leu	His	Leu	Ala	Ser	Ile		
			180					185					190				
His	Gly	Tyr	Leu	Gly	Ile	Val	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Ala	Asp		
		195					200					205					
Val	Asn	Ala	Gln	Glu	Pro	Cys	Asn	Gly	Arg	Thr	Ala	Leu	His	Leu	Ala		
	210					215					220						
Val	Asp	Leu	Gln	Asn	Pro	Asp	Leu	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Lys	Cys	Gly		
225					230					235					240		
Ala	Asp	Val	Asn	Arg	Val	Thr	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Ser	Pro	Tyr	Gln	Leu		
			245						250					255			
Thr	Trp	Gly	Arg	Pro	Ser	Thr	Arg	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln	Leu		
			260					265					270				
Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Met	Leu	Pro	Glu	Ser	Glu	Asp	Glu	Glu	Ser		
		275					280					285					
Tyr	Asp	Thr	Glu	Ser	Glu	Phe	Thr	Glu	Phe	Thr	Glu	Asp	Glu	Leu	Pro		
	290					295					300						
Tyr	Asp	Asp	Cys	Val	Phe	Gly	Gly	Gln	Arg	Leu	Thr	Leu					
305					310					315							

<210> 2

<211> 1550

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

tgccgccgctc ccgccccgcca gcgccccagc gaggaagcag cgcgcagccc gggccccagc 60
gcaccgcgag cagcgccccgc agctcgtccg cgccatgttc cagggcgccg agcgccccca 120
ggagtgggccc atggaggggcc cccgcgacgg gctgaagaag gagcggctac tggacgaccg 180
ccacgacagc ggcctggact ccatgaaaga cgaggagtac gagcagatgg tcaaggagct 240
gcaggagatc cgctcgcagc cgcaggaggt gccgcgcggc tcggagccct ggaagcagca 300
gctcaccgag gacggggact cgttcctgca cttggccatc atccatgaag aaaaggcact 360
gaccatggaa gtgatccgcc aggtgaaggg agacctggct ttcctcaact tccagaacaa 420
cctgcagcag actccactcc acttggctgt gatcaccaac cagccagaaa ttgctgaggc 480
acttctggga gctggctgtg atcctgagct ccgagacttt cgaggaaata cccccctaca 540
ccttgctgtg gagcagggct gcctggccag cgtgggagtc ctgactcagt cctgcaccac 600
cccgcacctc cactccatcc tgaaggctac caactacaat ggccacacgt gtctacactt 660
agcctctatc catggctacc tgggcatcgt ggagcttttg gtgtccttgg gtgctgatgt 720
caatgctcag gagcctgta atggccggac tgcccttcac ctgcgagtgg acctgcaaaa 780
tcctgacctg gtgtcactcc tgttgaagtg tggggctgat gtcaacagag ttacctacca 840
gggctattct ccctaccagc tcacctgggg ccgcccgaag acccggatac agcagcagct 900
gggcccagctg aactagaaa accttcagat gctgccagag agtgaggatg aggagagcta 960
tgacacagag tcagagttca cggagttcac agaggacgag ctgccctatg atgactgtgt 1020
gtttggaggc cagcgtctga cgttatgagt gcaaaggggc tgaaagaaca tggacttgta 1080
tatttgtaca aaaaaaagt tttatttttc taaaaaaga aaaaagaaga aaaaatttaa 1140

```

ES 2 361 660 T3

```

agggtgtact tatatccaca ctgcacactg cctagcccaa aacgtcttat tgtggttagga 1200
tcagccctca ttttgttgc tttgtgaact ttttgtaggg gacgagaaag atcattgaaa 1260
ttctgagaaa acttctttta aacctcacct ttgtgggggtt tttggagaag gttatcaaaa 1320
atctcatgga aggaccacat tttatattta ttgtgcttcg agtgactgac cccagtggta 1380
tcctgtgaca tgtaacagcc aggagtgtta agcgttcagt gatgtggggg gaaaagttac 1440
tacctgtcaa ggtttgtgtt accctcctgt aaatgggtgta cataatgtat tgttggtaat 1500
tatttttgta cttttatgat gtatatttat taaagagatt tttacaaatg 1550

```

<210> 3

<211> 359

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Ala Gly Val Ala Cys Leu Gly Lys Thr Ala Asp Ala Asp Glu Trp
  1          5          10          15

Cys Asp Ser Gly Leu Gly Ser Leu Gly Pro Asp Ala Ala Ala Pro Gly
      20          25          30

Gly Pro Gly Leu Gly Ala Glu Leu Gly Pro Glu Leu Ser Trp Ala Pro
      35          40          45

Leu Val Phe Gly Tyr Val Thr Glu Asp Gly Asp Thr Ala Leu His Leu
  50          55          60

Ala Val Ile His Gln His Glu Pro Phe Leu Asp Phe Leu Leu Gly Phe
  65          70          75          80

Ser Ala Gly His Glu Tyr Leu Asp Leu Gln Asn Asp Leu Gly Gln Thr
      85          90          95

Ala Leu His Leu Ala Ala Ile Leu Gly Glu Ala Ser Thr Val Glu Lys
      100          105          110

Leu Tyr Ala Ala Gly Ala Gly Val Leu Val Ala Glu Arg Gly Gly His
      115          120          125

Thr Ala Leu His Leu Ala Cys Arg Val Arg Ala His Thr Cys Ala Cys
      130          135          140

Val Leu Leu Gln Pro Arg Pro Ser His Pro Arg Asp Ala Ser Asp Thr
      145          150          155          160

Tyr Leu Thr Gln Ser Gln Asp Cys Thr Pro Asp Thr Ser His Ala Pro
      165          170          175

Ala Ala Val Asp Ser Gln Pro Asn Pro Glu Asn Glu Glu Glu Pro Arg
      180          185          190

Asp Glu Asp Trp Arg Leu Gln Leu Glu Ala Glu Asn Tyr Asp Gly His
      195          200          205

Thr Pro Leu His Val Ala Val Ile His Lys Asp Ala Glu Met Val Arg
      210          215          220

```

Leu Leu Arg Asp Ala Gly Ala Asp Leu Asn Lys Pro Glu Pro Thr Cys
 225 230 235 240

Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Val Glu Ala Gln Ala Ala Ser Val
 245 250 255

Leu Glu Leu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Pro Thr Ala Arg Met Tyr
 260 265 270

Gly Gly Arg Thr Pro Leu Gly Ser Ala Leu Leu Arg Pro Asn Pro Ile
 275 280 285

Leu Ala Arg Leu Leu Arg Ala His Gly Ala Pro Glu Pro Glu Asp Glu
 290 295 300

Asp Asp Lys Leu Ser Pro Cys Ser Ser Ser Gly Ser Asp Ser Asp Ser
 305 310 315 320

Asp Asn Arg Asp Glu Gly Asp Glu Tyr Asp Asp Ile Val Val His Ser
 325 330 335

Gly Arg Ser Gln Asn Arg Gln Pro Pro Ser Pro Ala Ser Lys Pro Leu
 340 345 350

Pro Asp Asp Pro Asn Pro Ala
 355

<210> 4

<211> 1212

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

gcgcactgga gctcatcgca gagcccagcg acaggcaggc gaccacaggg ggccacccga 60
 ggtggctggg gccatggccg gggctcgcgtg cttggggaaa actgcggatg ccgatgaatg 120
 gtgcgacagc ggcttgggct ctctaggtcc cgacgcagcg gctcccggag gaccaggtct 180
 gggcgcagag cttggcccag agctgtcgtg ggcgccctta gtctttggct acgtcactga 240
 ggatggggac acagccctgc acttggctgt gattcatcag catgagccct tcctggattt 300
 cctcctgggc ttttccgccg gccacgagta ccttgacctg cagaatgacc taggccaac 360
 agccctgcat ctagcagcca tccttgggga ggcattaca gtagagaagt tgtatgcagc 420
 cggcgcagga gtgttggtgg ctgagagagg gggccacacg gcattgcact tggcctgccg 480
 ggtcagggca cacacgtgcg cgtgcgtact gctccagccc cgteccagcc acccaagaga 540
 tgctcagat acctacctca ctcagagcca ggactgtacc ccagacacca gccatgcccc 600
 tgctgccgtg gattcccaac ccaaccaga gaacgaagag gagccgcgtg atgaagactg 660
 gaggctacaa ctagaagctg aaaactatga tggccatacc ccaactccatg tagctgtcat 720
 ccacaaagat gcagagatgg tccggctgct cagggatgcc ggagccgacc tcaataaacc 780
 ggagcctacg tgtggccgga cccctctgca cctggcagta gaagcccagg cagccagcgt 840
 gctggaactt ctctgaaag ccggtgctga ccccaccgcc cgcatgtatg ggggccgcac 900
 cccgcttggc agtgccctgc tccggcccaa ccccatcctt gcccgctcc tccgtgcaca 960
 tggggcccct gaacctgagg acgaggacga taagcttagc ccttgcagca gcagcggcag 1020
 cgacagtgac agtgacaaca gagatgaggg cgatgaatat gatgacatcg tggttcacag 1080
 tggcaggagc caaaaccgac aaccgccttc cccggcatec aaacctcttc ctgatgaccc 1140
 caaccctgcc tgacttaagt gctaataatta atataatttc caacttaata aaattgcaga 1200

cctgacaacc ag

1212

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

Cys Asp Ser Gly Leu Asp Ser Met
1 5

<210> 6

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Cys Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp Ser Met
1 5 10

<210> 7

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Cys Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp Ser Met Lys Asp Glu Glu
1 5 10 15

20 <210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Cys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp Ser Met
1 5 10 15

25 Lys Asp Glu Glu
20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 9

ES 2 361 660 T3

Cys Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp
1 5 10 15

Ser Met Lys Asp Glu Glu

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Gly Arg Arg Gly Lys Val Glu Gln Leu Ser Pro Glu Glu Glu Glu
1 5 10 15

Lys Arg Arg

<210> 11

<211> 22

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Cys Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ala Gly Leu Asp
1 5 10 15

Ala Met Lys Asp Glu Glu
20

15 <210> 12

<211> 347

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 361 660 T3

Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Tyr Pro Tyr Asp Val
 1 5 10 15

Pro Asp Tyr Ala Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Phe
 20 25 30

Gln Ala Ala Glu Arg Pro Gln Glu Trp Ala Met Glu Gly Pro Arg Asp
 35 40 45

Gly Leu Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu
 50 55 60

Asp Ser Met Lys Asp Glu Glu Tyr Glu Gln Met Val Lys Glu Leu Gln
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Leu Glu Pro Gln Glu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro Trp
 85 90 95

Lys Gln Gln Leu Thr Glu Asp Gly Asp Ser Phe Leu His Leu Ala Ile
 100 105 110

ES 2 361 660 T3

Ile His Glu Glu Lys Ala Leu Thr Met Glu Val Ile Arg Gln Val Lys
 115 120 125

Gly Asp Leu Ala Phe Leu Asn Phe Gln Asn Asn Leu Gln Gln Thr Pro
 130 135 140

Leu His Leu Ala Val Ile Thr Asn Gln Pro Glu Ile Ala Glu Ala Leu
 145 150 155 160

Leu Gly Ala Gly Cys Asp Pro Glu Leu Arg Asp Phe Arg Gly Asn Thr
 165 170 175

Pro Leu His Leu Ala Cys Glu Gln Gly Cys Leu Ala Ser Val Gly Val
 180 185 190

Leu Thr Gln Ser Cys Thr Thr Pro His Leu His Ser Ile Leu Lys Ala
 195 200 205

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

Tyr Leu Gly Ile Val Glu Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Asp Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gln Glu Pro Cys Asn Gly Arg Thr Ala Leu His Leu Ala Val Asp
 245 250 255

Leu Gln Asn Pro Asp Leu Val Ser Leu Leu Leu Lys Cys Gly Ala Asp
 260 265 270

Val Asn Arg Val Thr Tyr Gln Gly Tyr Ser Pro Tyr Gln Leu Thr Trp
 275 280 285

Gly Arg Pro Ser Thr Arg Ile Gln Gln Gln Leu Gly Gln Leu Thr Leu
 290 295 300

Glu Asn Leu Gln Met Leu Pro Glu Ser Glu Asp Glu Glu Ser Tyr Asp
 305 310 315 320

Thr Glu Ser Glu Phe Thr Glu Phe Thr Glu Asp Glu Leu Pro Tyr Asp
 325 330 335

Asp Cys Val Phe Gly Gly Gln Arg Leu Thr Leu
 340 345

<210> 13

<211> 347

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 361 660 T3

Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Tyr Pro Tyr Asp Val
1 5 10 15

Pro Asp Tyr Ala Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Phe
20 25 30

Gln Ala Ala Glu Arg Pro Gln Glu Trp Ala Met Glu Gly Pro Arg Asp
35 40 45

Gly Leu Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ala Gly Leu
50 55 60

Asp Ala Met Lys Asp Glu Glu Tyr Glu Gln Met Val Lys Glu Leu Gln
65 70 75 80

Glu Ile Arg Leu Glu Pro Gln Glu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro Trp
85 90 95

Lys Gln Gln Leu Thr Glu Asp Gly Asp Ser Phe Leu His Leu Ala Ile
100 105 110

Ile His Glu Glu Lys Ala Leu Thr Met Glu Val Ile Arg Gln Val Lys
115 120 125

Gly Asp Leu Ala Phe Leu Asn Phe Gln Asn Asn Leu Gln Gln Thr Pro
130 135 140

Leu His Leu Ala Val Ile Thr Asn Gln Pro Glu Ile Ala Glu Ala Leu
145 150 155 160

Leu Gly Ala Gly Cys Asp Pro Glu Leu Arg Asp Phe Arg Gly Asn Thr
165 170 175

Pro Leu His Leu Ala Cys Glu Gln Gly Cys Leu Ala Ser Val Gly Val
180 185 190

Leu Thr Gln Ser Cys Thr Thr Pro His Leu His Ser Ile Leu Lys Ala
195 200 205

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

Tyr Leu Gly Ile Val Glu Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Asp Val Asn
225 230 235 240

Ala Gln Glu Pro Cys Asn Gly Arg Thr Ala Leu His Leu Ala Val Asp
245 250 255

Leu Gln Asn Pro Asp Leu Val Ser Leu Leu Leu Lys Cys Gly Ala Asp
260 265 270

Val Asn Arg Val Thr Tyr Gln Gly Tyr Ser Pro Tyr Gln Leu Thr Trp
275 280 285

Gly Arg Pro Ser Thr Arg Ile Gln Gln Gln Leu Gly Gln Leu Thr Leu
290 295 300

ES 2 361 660 T3

Glu Asn Leu Gln Met Leu Pro Glu Ser Glu Asp Glu Glu Ser Tyr Asp
 305 310 315 320
 Thr Glu Ser Glu Phe Thr Glu Phe Thr Glu Asp Glu Leu Pro Tyr Asp
 325 330 335
 Asp Cys Val Phe Gly Gly Gln Arg Leu Thr Leu
 340 345

<210> 14

<211> 389

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

Val Asp Ser Gln Pro Asn Pro Glu Asn Glu Glu Glu Pro Arg Asp Glu
 210 215 220

Asp Trp Arg Leu Gln Leu Glu Ala Glu Asn Tyr Asp Gly His Thr Pro
 225 230 235 240

Leu His Val Ala Val Ile His Lys Asp Ala Glu Met Val Arg Leu Leu
 245 250 255

Arg Asp Ala Gly Ala Asp Leu Asn Lys Pro Glu Pro Thr Cys Gly Arg
 260 265 270

Thr Pro Leu His Leu Ala Val Glu Ala Gln Ala Ala Ser Val Leu Glu
 275 280 285

Leu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Pro Thr Ala Arg Met Tyr Gly Gly
 290 295 300

Arg Thr Pro Leu Gly Ser Ala Leu Leu Arg Pro Asn Pro Ile Leu Ala
 305 310 315 320

Arg Leu Leu Arg Ala His Gly Ala Pro Glu Pro Glu Asp Glu Asp Asp
 325 330 335

Lys Leu Ser Pro Cys Ser Ser Ser Gly Ser Asp Ser Asp Ser Asp Asn
 340 345 350

Arg Asp Glu Gly Asp Glu Tyr Asp Asp Ile Val Val His Ser Gly Arg
 355 360 365

Ser Gln Asn Arg Gln Pro Pro Ser Pro Ala Ser Lys Pro Leu Pro Asp
 370 375 380

Asp Pro Asn Pro Ala
 385

<210> 15

<211> 4230

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

gcgaggcggg gccgccgggg ccgccatgga gcccgactcg gtgattgagg acaagaccat 60
cgagctcatg tgttctgtgc caaggtcttt gtggctaggc tgcgccaacc tggtagagag 120
catgtgcgca ctgagttgcc tgcagagcat gccagtgtc agatgtctcc agataagtaa 180
tggaacatca tctgtgatcg tctccagaaa gaggccatca gaaggaaact atcaaaaaga 240
aaaagacttg tgtattaaat attttgacca gtggctctgaa tcagatcaag tggaaattgt 300
ggaacatctt atttcacgaa tgtgtcatta tcagcatgga catattaact cttacctgaa 360
gcccatggtg cagcgggact ttattaccgc tttaccagag caaggcttag atccatagc 420
agaaaacatt ctttcgtacc tggatgccag gtctctgtgt gcagcagagc tggtatgtaa 480
agaatggcag cgagtgatct cagaaggaat gctttggaag aagctgattg aacgaatggt 540
acgcactgat cccctatgga aaggactttc agaaagaaga gggtgggatc agtacctgtt 600
taaaaacaga cccacagatg gccctccaaa ttcattttat aggtcattat acccaaagat 660
tatccaggat atagagacta tagaatctaa ctggcggtgt ggacgacaca acttgcagag 720
    
```

gattcagtgc	cgctctgaaa	atagtaaagg	tgtctactgt	ttacagtacg	atgatgaaaa	780
aattatcagt	ggcctacgag	ataattctat	taagatatgg	gataaaacca	gcctggaatg	840
tttgaaagtg	ttaacaggac	acacaggctc	tgtcctctgt	ctgcagtatg	atgagcgtgt	900
cattgtaact	ggctcttcag	attctacggg	gagagtgtgg	gatgtgaaca	cggggtgaagt	960
tcttaacaca	ttgatccacc	acaatgaggc	tgtattgca	ttacgcttca	gcaatggact	1020
gatggtgacc	tgttccaagg	accgctccat	tgtctgtgtg	gacatggctt	ctgcgaccga	1080
catcacttta	cgccgtgtcc	tgggtggcca	ccgggctgcc	gtcaatgtag	tagactttga	1140
cgacaagtac	atcgtgtctg	cctctgggtg	caggaccatc	aaagtctgga	gcacgagcac	1200
ctgtgaattt	gttcgtactc	tcaatgggca	caagcggggc	attgcctgtc	tccagtacag	1260
ggatcgccctg	gttgttagtg	gatcatcaga	taataccatt	aggctctggg	atattgaatg	1320
tgggtgcctgt	ttaagagtcc	tagagggaca	tgaagaattg	gtccgatgca	tccggtttga	1380
taacaagagg	attgctcagt	gggcctatga	tgggaaaatt	aaagtttggg	acttgcaagc	1440
tgtctttgac	cctcgagccc	cagcaagcac	attgtgtttg	cgcacattgg	tggaacattc	1500
tggacgtgtg	tttcgggtcc	agtttgatga	gtttcagatc	atcagcagct	cccatgatga	1560
cactattttg	atltgggatt	tcttaaattg	gcctcccagt	gcccagaatg	agaccctgtc	1620
tcctccaga	acatacactt	acatctctag	ataacagctc	gcactttcac	ccgtttcagg	1680
gttttctagt	cttgaactac	tggctacgtg	gctaccaaat	gcctaagggg	gttcgttcac	1740
agctgagtta	tgaagctgga	attggttcta	gacgctgggt	agatgcaaag	cagcctaact	1800
cttcaagtac	cgacatttct	cacctctgat	tccggctctc	ctttgagaag	gagaccttag	1860
cttccccggc	ttcaagtaga	acagaagccc	gtttccttcc	ctcatcagtg	aaaaaatcta	1920
atgtttcaaa	tgtaaattgt	tcatagaaaa	ggaacataga	atctgtttta	cagaagtaaa	1980
tcgaccgtca	agagaagact	tggcctctaa	tttatattgc	tttgcacttt	ggtttgatat	2040
taagaaacag	cattcttctt	cagtgaattt	ttgggtgcc	aacacctacc	cagaatgtcc	2100
agggctttca	ttttcaaaag	ttagcattct	ccttttgacc	gtccaagtca	ttatgaattc	2160
tgacttggtg	tattaggaac	atgttggaca	gtggaaaatt	ttctctggat	tgttttagta	2220
atatttttgg	gattatactt	cctttctgta	ccaatttctt	ttaattttaa	gaactataag	2280
tcagttatat	tatctacca	caggtaatat	agctctttct	tttattaact	gttctctgtc	2340
ccccaacat	ctcctgatat	ttggtagagt	aacaccttta	tacgtgtgct	tgcctcctaa	2400
tttaaaatac	tgtattcgca	tgtagatata	atgtacataa	cagtttaacc	tcaaagtgc	2460
tggagtccag	gccccctgtg	cttgagacac	taatacagag	tgtgttcgca	cttagccatg	2520
ggctgggctc	aagaacctga	tacctggggt	gatgtggatt	acctagaacc	cttctgcag	2580
tattcataca	gtgtttttat	tttgttgttg	tcattgcgtg	tgtgtggttt	gtgtgtgttt	2640
ttaatgagaa	tcttgtttta	aaatgtaatt	tctaaggttt	aacaccaaaa	tgttttattt	2700
gttgtggagt	atatattata	caatagagag	gtaccttaaa	cattttttgt	tcttattctt	2760
tttctcataa	gtactcctga	gtacaagtgg	tcacctccca	tagtattcat	ttggcttcgc	2820
tgtcaaaaat	cattattctg	tgcagtcgtg	gccctgggaa	ggggaaataa	gaaggccctg	2880
ttgacgggct	gtcttggctc	tgggaattcat	gcacctggc	cttgccaagg	ttctggcagg	2940
gcctgctggg	gtgttggagc	ctgcagggca	ggtcaggctg	gttcagaggc	ccatgctgag	3000
gggtggggtg	tctgaagtgg	agtgaagcct	caagcccatg	aatgccaccc	cagtcatctc	3060
tgggtgctgac	tgtctgctgtg	gccccagcag	gttctcaaag	ctcccaagtc	ctccctacga	3120
cacagcccaa	atgtgtaaat	ggcactgttg	ccctgacagt	gcatggaaag	gacgttggca	3180
tccaattggc	actccttctc	ccttattcaa	tattaggttt	gatttgccct	tgcctattgt	3240
ttccaaagat	caaggaatgt	caataacatt	ttaaaggacc	aataaacagc	ctcctataaa	3300
gtaaacctct	tcccgtggaa	gcacactcta	ctactaaagg	gaaggcccc	gggctctgat	3360
ttgtcctttg	cattgagaac	gggtgtgggga	tcagtgtgtg	tgtatgtgat	ttgtttattg	3420
agttggcttt	gcttttttag	ttttctttt	aaaaataaaa	tccttccttc	ccatgttact	3480
aaattaattt	atgtttttga	gaggttgagt	ctcaaagtgt	aaacaataaa	cctccattca	3540
taaggtggat	gttghtaagct	tgatgggtgt	tgtgaaagtg	atlttagctt	gaccactttt	3600
catcctacag	cttcaatatc	aaactgggta	ggaaagccca	gggggaagg	agggggcagg	3660
ggaggaggca	attctgaatg	aatgaatgga	ttttttgttg	tttttgcatg	tttaatatag	3720
aagttcccct	cgttccttgg	gagatgatgg	cctttgaata	tgcagacaac	ctttgaattg	3780
tgcctactaa	attatagcag	gggactttgg	caccaagga	gttctgactt	tctgggatta	3840
taatagtaat	tcccagccat	actctggact	ttatlttgct	aaccataact	gagcaaatgt	3900
aaattactgc	tatattaatg	ttttaaagca	ctgggatagt	ctaattctaa	cttghtaatta	3960
attatgtttg	ccaattatct	gtttgaaata	aatttgtgtc	tgaacagcta	ttgaaactgt	4020
taaattgtac	agatattatt	catgacagct	ttgtactgtg	gaatgtgctt	aataaaaaac	4080
aaaaaagttt	gacttttgtc	cagtaaatg	ctaagtaatg	tcaataaatc	gagtatgggt	4140
attatgcagt	gcacctaatc	tggcttcatg	caattgttac	ttcagctact	gattcaaagc	4200
caatactctt	aataaagtgt	tgcaatactc				4230

ES 2 361 660 T3

<210> 16

<211> 542

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 16

```

Met Glu Pro Asp Ser Val Ile Glu Asp Lys Thr Ile Glu Leu Met Cys
 1           5           10           15

Ser Val Pro Arg Ser Leu Trp Leu Gly Cys Ala Asn Leu Val Glu Ser
          20           25           30

Met Cys Ala Leu Ser Cys Leu Gln Ser Met Pro Ser Val Arg Cys Leu
          35           40           45

Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Ser Val Ile Val Ser Arg Lys Arg Pro
 50           55           60

Ser Glu Gly Asn Tyr Gln Lys Glu Lys Asp Leu Cys Ile Lys Tyr Phe
 65           70           75           80

Asp Gln Trp Ser Glu Ser Asp Gln Val Glu Phe Val Glu His Leu Ile
          85           90           95

Ser Arg Met Cys His Tyr Gln His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys
          100          105          110

Pro Met Leu Gln Arg Asp Phe Ile Thr Ala Leu Pro Glu Gln Gly Leu
          115          120          125

Asp His Ile Ala Glu Asn Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Arg Ser Leu
          130          135          140

Cys Ala Ala Glu Leu Val Cys Lys Glu Trp Gln Arg Val Ile Ser Glu
          145          150          155          160

Gly Met Leu Trp Lys Lys Leu Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Pro
          165          170          175

Leu Trp Lys Gly Leu Ser Glu Arg Arg Gly Trp Asp Gln Tyr Leu Phe
          180          185          190

Lys Asn Arg Pro Thr Asp Gly Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ser Leu
          195          200          205

Tyr Pro Lys Ile Ile Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg
          210          215          220

Cys Gly Arg His Asn Leu Gln Arg Ile Gln Cys Arg Ser Glu Asn Ser
          225          230          235          240

```

ES 2 361 660 T3

Lys Gly Val Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Glu Lys Ile Ile Ser Gly
245 250 255

Leu Arg Asp Asn Ser Ile Lys Ile Trp Asp Lys Thr Ser Leu Glu Cys
260 265 270

Leu Lys Val Leu Thr Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr
275 280 285

Asp Glu Arg Val Ile Val Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val
290 295 300

Trp Asp Val Asn Thr Gly Glu Val Leu Asn Thr Leu Ile His His Asn
305 310 315 320

Glu Ala Val Leu His Leu Arg Phe Ser Asn Gly Leu Met Val Thr Cys
325 330 335

Ser Lys Asp Arg Ser Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Ala Thr Asp
340 345 350

Ile Thr Leu Arg Arg Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val
355 360 365

Val Asp Phe Asp Asp Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr
370 375 380

Ile Lys Val Trp Ser Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn
385 390 395 400

Gly His Lys Arg Gly Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val
405 410 415

Val Ser Gly Ser Ser Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys
420 425 430

Gly Ala Cys Leu Arg Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys
435 440 445

Ile Arg Phe Asp Asn Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys
450 455 460

Ile Lys Val Trp Asp Leu Gln Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala
465 470 475 480

Ser Thr Leu Cys Leu Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe
485 490 495

Arg Leu Gln Phe Asp Glu Phe Gln Ile Ile Ser Ser Ser His Asp Asp
500 505 510

Thr Ile Leu Ile Trp Asp Phe Leu Asn Val Pro Pro Ser Ala Gln Asn
515 520 525

ES 2 361 660 T3

Glu Thr Arg Ser Pro Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg
 530 535 540

<210> 17

<211> 2151

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

```

tgcgttggct ggggcctggc accaaagggg eggccccggc ggagagcgga cccagtggcc 60
tcggcgatta tggaccceggc cgaggcgggtg ctgcaagaga aggcactcaa gtttatgaat 120
tcctcagaga gagaagactg taataatggc gaacccecta ggaagataat accagagaag 180
aattcactta gacagacata caacagctgt gccagactct gcttaaacca agaaacagta 240
tgtttagcaa gcaactgctat gaagactgag aattgtgtgg ccaaaacaaa acttgccaat 300
ggcacttcca gtatgattgt gcccaagcaa cggaaactct cagcaagcta tgaaaaggaa 360
aaggaactgt gtgtcaaata ctttgagcag tggtcagagt cagatcaagt ggaatttgtg 420
gaacatctta tatcccaaat gtgtcattac caacatgggc acataaactc gtatcttaa 480
cctatgttgc agagagattt cataactgct ctgccagctc ggggattgga tcatatcgct 540
gagaacattc tgtcatacct ggatgccaaa tcaactatgt ctgctgaact tgtgtgcaag 600
gaatggtacc gagtgaacct tgatggcatg ctgtggaaga agcttatcga gagaatggtc 660
aggacagatt ctctgtggag aggctggca gaacgaagag gatggggaca gtatttattc 720
aaaaacaaac ctctgacgg gaatgctcct cccaactctt tttatagagc actttatcct 780
aaaattatac aagacattga gacaatagaa tctaattgga gatgtggaag acatagttta 840
cagagaattc actgccgaag tgaacaagc aaaggagtct actgtttaca gtatgatgat 900
cagaaaatag taagcggcct tcgagacaac acaatcaaga tctgggataa aaacacattg 960
gaatgcaagc gaattctcac aggccataca ggttcagtc tctgtctcca gtatgatgag 1020
agagtgatca taacaggatc atcggattcc acggtcagag tgtgggatgt aaatacaggt 1080
gaaatgctaa acacgttgat tcaccattgt gaagcagttc tgcacttgcg tttcaataat 1140
ggcatgatgg tgacctgctc caaagatcgt tccattgctg tatgggatat ggccctccca 1200
actgacatta cctccggag ggtgctggtc ggacaccgag ctgctgtcaa tgtttagac 1260
tttgatgaca agtacattgt ttctgcatct ggggatagaa ctataaaggt atggaacaca 1320
agtacttgtg aatttgtaag gaccttaaat ggacacaaac gaggcattgc ctgtttgcag 1380
tacagggaca ggctggtagt gagtggctca tctgacaaca ctatcagatt atgggacata 1440
gaatgtgggtg catgtttacg agtgttagaa ggccatgagg aattggtgcg ctgtattcga 1500
tttgataaca agaggatagt cagtggggcc tatgatggaa aaattaaagt gtgggatctt 1560
gtggctgctt tggacccccg tgctcctgca gggacactct gtctacggac ccttgtggag 1620
cattccggaa gagtttttcg actacagttt gatgaattcc agattgtcag tagttcacat 1680
gatgacacaa tcctcatctg ggacttcta aatgatccag ctgcccaagc tgaaccccc 1740
cgttccccct ctcgaacata cacctacatc tccagataaa taaccataca ctgacctcat 1800
acttgcccag gaccattaa agttgcggta tttaacgtat ctgccaatac caggatgagc 1860
aacaacagta acaatcaaac tactgccag tttccctgga ctagccgagg agcagggctt 1920
tgagactcct gttgggacac agttggtctg cagtgggcc aggacggtct actcagcaca 1980
actgactgct tcagtgtctc tatcagaaga tgtctctat caattgtgaa tgattggaac 2040
ttttaaacct cccctcctct cctcctttca cctctgcacc tagttttttc ccattggttc 2100
cagacaaagg tgacttataa atatatttag tgttttgcca gaaaaaaaa a 2151
    
```

<210> 18

<211> 569

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 361 660 T3

Met Asp Pro Ala Glu Ala Val Leu Gln Glu Lys Ala Leu Lys Phe Met
1 5 10 15

Asn Ser Ser Glu Arg Glu Asp Cys Asn Asn Gly Glu Pro Pro Arg Lys
20 25 30

Ile Ile Pro Glu Lys Asn Ser Leu Arg Gln Thr Tyr Asn Ser Cys Ala
35 40 45

Arg Leu Cys Leu Asn Gln Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser Thr Ala Met
50 55 60

Lys Thr Glu Asn Cys Val Ala Lys Thr Lys Leu Ala Asn Gly Thr Ser
65 70 75 80

Ser Met Ile Val Pro Lys Gln Arg Lys Leu Ser Ala Ser Tyr Glu Lys
85 90 95

Glu Lys Glu Leu Cys Val Lys Tyr Phe Glu Gln Trp Ser Glu Ser Asp
100 105 110

Gln Val Glu Phe Val Glu His Leu Ile Ser Gln Met Cys His Tyr Gln
115 120 125

His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln Arg Asp Phe
130 135 140

Ile Thr Ala Leu Pro Ala Arg Gly Leu Asp His Ile Ala Glu Asn Ile
145 150 155 160

Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Lys Ser Leu Cys Ala Ala Glu Leu Val Cys
165 170 175

Lys Glu Trp Tyr Arg Val Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp Lys Lys Leu
180 185 190

Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly Leu Ala Glu
195 200 205

Arg Arg Gly Trp Gly Gln Tyr Leu Phe Lys Asn Lys Pro Pro Asp Gly
210 215 220

Asn Ala Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro Lys Ile Ile
225 230 235 240

Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg Cys Gly Arg His Ser
245 250 255

Leu Gln Arg Ile His Cys Arg Ser Glu Thr Ser Lys Gly Val Tyr Cys
260 265 270

Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg Asp Asn Thr
275 280 285

Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg Ile Leu Thr
290 295 300

ES 2 361 660 T3

Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Arg Val Ile
 305 310 315 320

Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp Val Asn Thr
 325 330 335

Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala Val Leu His
 340 345 350

Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys Asp Arg Ser
 355 360 365

Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr Leu Arg Arg
 370 375 380

Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val Val Asp Phe Asp Asp
 385 390 395 400

Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys Val Trp Asn
 405 410 415

Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His Lys Arg Gly
 420 425 430

Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser Gly Ser Ser
 435 440 445

Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala Cys Leu Arg
 450 455 460

Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg Phe Asp Asn
 465 470 475 480

Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys Val Trp Asp
 485 490 495

Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr Leu Cys Leu
 500 505 510

Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu Gln Phe Asp
 515 520 525

Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser Ser His Asp Asp Thr Ile Leu Ile Trp
 530 535 540

Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro Arg Ser Pro
 545 550 555 560

Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg
 565

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

ES 2 361 660 T3

<213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Ser Gly Leu Asp Ser
1 5

<210> 20

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Ala Val Asn Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Tyr Ile Val Ser Ala
1 5 10 15

Ser Gly Asp Arg
20

10 <210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Glu Leu Phe Pro Leu Ile Phe Pro Ala Glu Pro Ala Gln Ala Ser Gly
1 5 10 15

15 Pro

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> MOD_RES

<222> (6)

<223> FOSFORILACIÓN

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (10)

<223> FOSFORILACIÓN

<400> 22

Cys Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp Ser
1 5 10

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 23

Val Val Asn Val
1

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Ala Val Asn Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Tyr Ile Val Ser Ala
1 5 10 15

Ser

<210> 25

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg
1 5

<210> 26

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Leu Val Val Ser Gly Ser Ser Asp Asn Thr Ile Arg
1 5 10

25 <210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

ES 2 361 660 T3

Ile Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg
 1 5 10

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 28

Val Ile Ser Glu Gly Met Leu Trp Lys
 1 5

<210> 29

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)

15 <223> FOSFORILACIÓN

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)

<223> FOSFORILACIÓN

20 <400> 29

Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp Ser Met
 1 5 10

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)

<223> FOSFORILACIÓN

30 <220>

<221> MOD_RES

<222> (6)

<223> FOSFORILACIÓN

<400> 30

Asp Ser Gly Leu Asp Ser
1 5

5

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que consiste en la secuencia enumerada en SEC ID N°: 16 o una variante de la misma que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en no más del 15 % de los residuos en SEC ID N°: 16, de forma que el polipéptido potencia la ubicuitinación de IκB fosforilada.
- 5 2. Un polipéptido aislado que comprende una porción de 200 aminoácidos de una ubicuitina-ligasa E3 humana enumerada en SEC ID N°: 16 o una variante de la misma que contiene sustituciones de aminoácidos en no más del 15 % de los residuos de dicha porción de SEC ID N°: 16, en el que la porción o variante de la misma se une a IκB fosforilada e inhibe la ubicuitinación de IκB fosforilada.
3. Un polinucleótido aislado que consiste en la región codificante para un polipéptido según la reivindicación 1.
- 10 4. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido según la reivindicación 2.
5. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
6. Una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión según la reivindicación 5.
7. Una composición farmacéutica que comprende:
- 15 (a) un polipéptido de ubicuitina-ligasa E3 humana, en la que el polipéptido consiste en una secuencia enumerada en SEC ID N°: 16, o consiste en una porción de 200 aminoácidos de SEC ID N°: 16, o es una variante de SEC ID N°: 16 que se diferencia en una o más sustituciones de aminoácidos en no más del 15 % de los residuos en SEC ID N°: 16, de forma que el polipéptido potencia la ubicuitinación de IκB fosforilada y
- (b) un vehículo fisiológicamente aceptable.
8. Una composición farmacéutica que comprende:
- 20 (a) un polipéptido, en la que el polipéptido comprende una porción de 200 aminoácidos de una ubicuitina-ligasa E3 humana enumerada en SEC ID N°: 16, o comprende una variante de dicha porción que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en no más del 15 % de los residuos en SEC ID N°: 16, en el que la porción o variante de la misma se une a IκB fosforilada e inhibe la ubicuitinación de IκB fosforilada; y
- (b) un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 25 9. Una composición farmacéutica que comprende:
- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido de ubicuitina-ligasa E3 humana, en la que el polinucleótido consiste en la región codificante para un polipéptido que consiste en una secuencia enumerada en SEC ID N°: 16, o que consiste en una parte de SEC ID N°: 16, o que es una variante de SEC ID N°: 16 que comprende sustituciones en no más del 15 % de los residuos en SEC ID N°: 16, de forma que el polipéptido potencia la
- 30 ubicuitinación de IκB fosforilada y
- (b) un vehículo fisiológicamente aceptable.
10. Una composición farmacéutica que comprende:
- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido, en la que el polipéptido comprende una porción de 200 aminoácidos de una ubicuitina-ligasa E3 humana enumerada en SEC ID N°: 16, o variante de dicha porción
- 35 que comprende sustituciones en no más del 15 % de los residuos en SEC ID N°: 16, de forma que el polipéptido se une a IκB fosforilada e inhibe la ubicuitinación de IκB fosforilada; y
- (b) un vehículo fisiológicamente aceptable.
11. Una composición farmacéutica que comprende:
- (a) un polinucleótido que consiste en un polinucleótido antisentido del polinucleótido según la reivindicación 4 y
- 40 que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos complementarios a un polinucleótido según la reivindicación 4; y
- (b) un vehículo fisiológicamente aceptable.
12. Un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una secuencia de ubicuitina-ligasa E3 humana enumerada en SEC ID N°: 16.
- 45 13. Un anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

14. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 12 en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable.
15. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 14 para uso en la modulación de la actividad de NF-κB en un paciente.
- 5 16. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11 ó 14 para uso en el tratamiento de un paciente aquejado de un trastorno asociado a activación de NF-κB.
17. Una composición según la reivindicación 16, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, cáncer e infección vírica.
18. Un procedimiento para cribar un agente que modula la actividad de NF-κB que comprende las etapas de:
- 10 (a) poner en contacto un agente candidato con un polipéptido aislado de ubiquitina-ligasa E3 humana, en el que el polipéptido comprende una secuencia enumerada en SEC ID N°: 16, una parte de SEC ID N°: 16 o variante de SEC ID N°: 16 que se diferencia en una o más sustituciones, inserciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, de forma que el polipéptido potencia la ubiquitinación de IκB fosforilada, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción entre el polipéptido y el agente candidato; y
- 15 (b) posteriormente evaluar la capacidad del polipéptido para potenciar la ubiquitinación de IκB fosforilada, con respecto a una capacidad predeterminada del polipéptido para potenciar la ubiquitinación de IκB fosforilada en ausencia de agente candidato;
- e identificar a partir del mismo un agente que modula la actividad de NF-κB.
19. Un procedimiento según la reivindicación 18, en el que el agente candidato es una molécula pequeña presente dentro de una biblioteca combinatoria.
- 20 20. Un polipéptido que comprende una proteína β-TrCP que tiene la secuencia enumerada en SEC ID N°: 18, o una porción de SEC ID N°: 18, o variante de SEC ID N°: 18 que se diferencia en una o más inserciones, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos en no más del 20 % de los residuos en SEC ID N°: 18, de forma que el polipéptido potencia la ubiquitinación de IκB fosforilada, para uso en la modulación de la actividad de NF-κB en un paciente.
- 25 21. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una proteína β-TrCP que tiene la secuencia enumerada en SEC ID N°: 18, el polipéptido que potencia la ubiquitinación de IκB fosforilada, para uso en el tratamiento de un paciente aquejado de un trastorno asociado a activación de NF-κB.
22. Un polipéptido según la reivindicación 21, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, cáncer e infección vírica.
- 30 23. Un procedimiento para cribar un agente que modula la actividad de NF-κB que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto un agente candidato con un polipéptido aislado que comprende una proteína β-TrCP que tiene la secuencia enumerada en SEC ID N°: 18, de forma que el polipéptido potencia la ubiquitinación de IκB fosforilada, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción entre el polipéptido y el agente candidato; y
- 35 (b) posteriormente evaluar la capacidad del polipéptido para potenciar la ubiquitinación de IκB fosforilada, con respecto a una capacidad predeterminada del polipéptido para potenciar la ubiquitinación de IκB fosforilada en ausencia de agente candidato;
- e identificar a partir del mismo un agente que modula la actividad de NF-κB.
- 40 24. Un procedimiento según la reivindicación 23, en el que el agente candidato es una molécula pequeña presente dentro de una biblioteca combinatoria.
25. Un polipéptido aislado que consiste en una porción de una ubiquitina-ligasa E3 humana enumerada en SEC ID N°: 16, o variante de la misma que contiene sustituciones de aminoácidos en no más del 15 % de los residuos de dicha porción de SEC ID N°: 16, en el que la porción o variante de la misma se une a IκB fosforilada e inhibe la ubiquitinación de IκB fosforilada.
- 45 26. Una composición farmacéutica que comprende:
- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido en la que el polipéptido consiste en una porción de una ubiquitina-ligasa E3 humana enumerada en SEC ID N°: 16 de forma que el polipéptido se une a IκB fosforilada e inhibe la ubiquitinación de IκB fosforilada; y
- 50 (b) un vehículo fisiológicamente aceptable.

27. Una composición farmacéutica que comprende:

(a) un polinucleótido antisentido que consiste en 10 nucleótidos consecutivos complementarios a un polinucleótido según la reivindicación 3 o la reivindicación 4; y

b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 28. Una porción de un polinucleótido complementario a un polinucleótido según la reivindicación 4 para uso como una sonda, en la que la porción tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos.

29. Una porción de un polinucleótido complementario a un polinucleótido según la reivindicación 4 para uso en la modulación de la expresión génica, en la que la porción tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos.

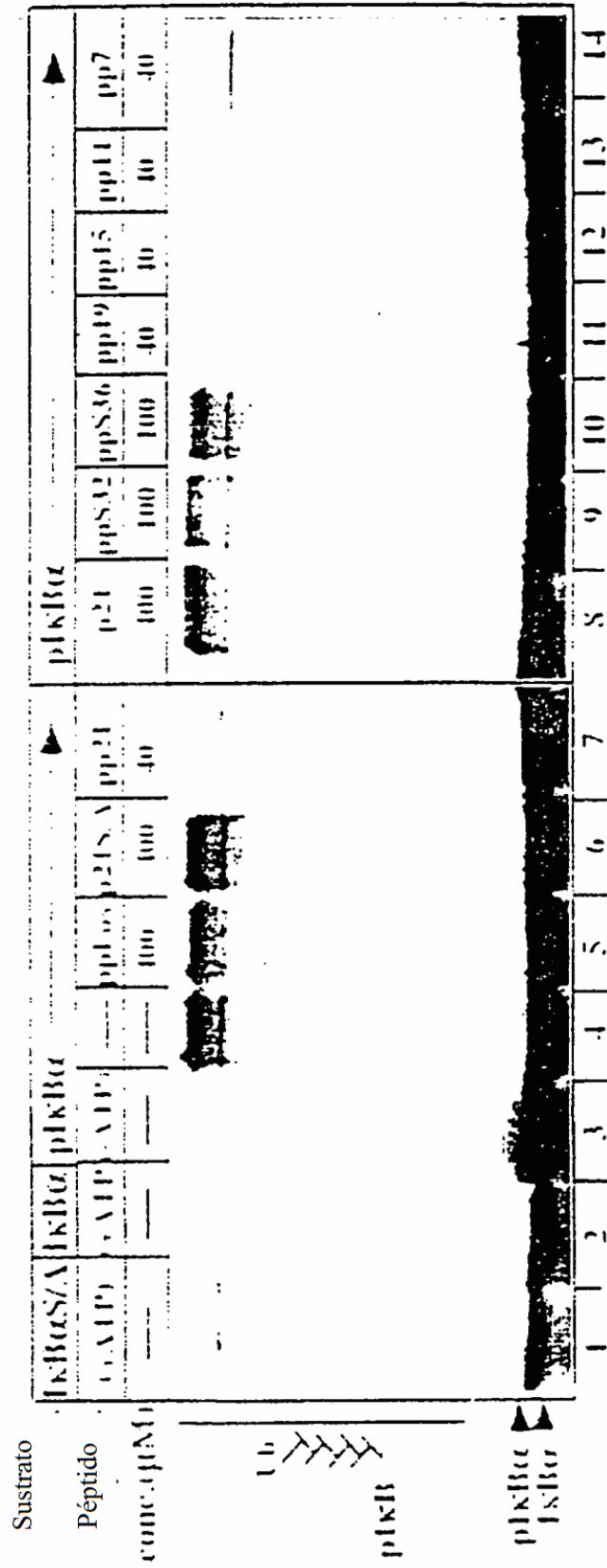


FIG. 1A

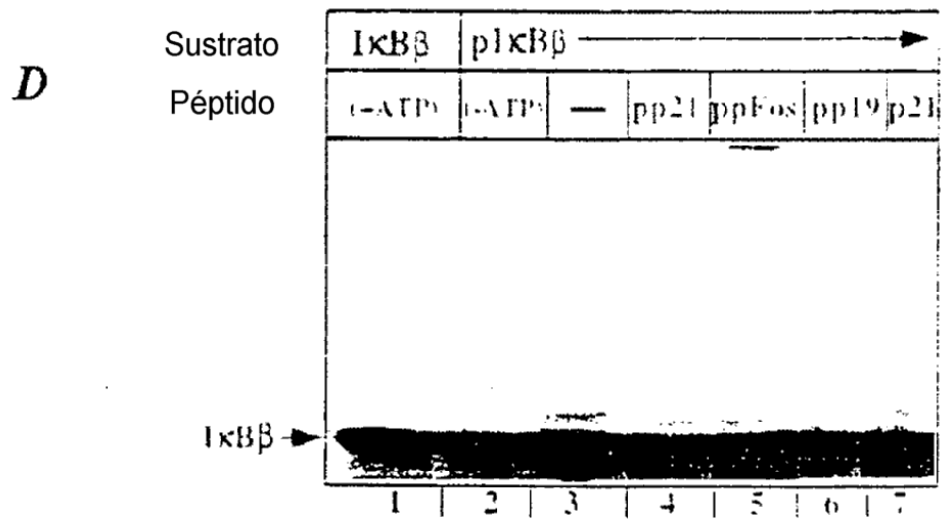
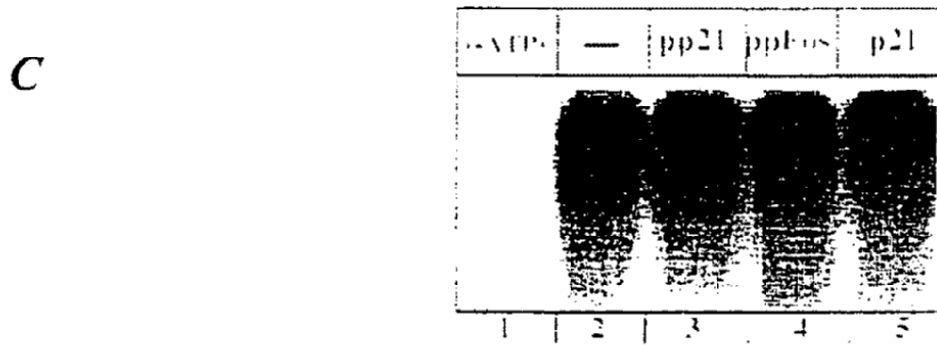
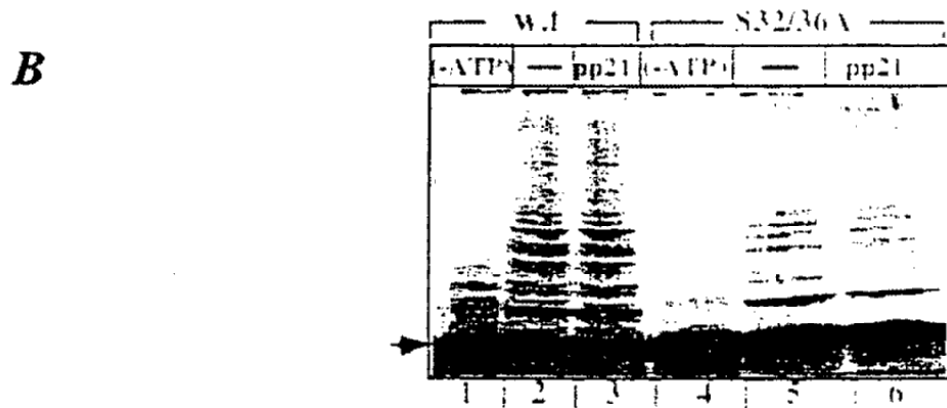


FIG. 1B-1D

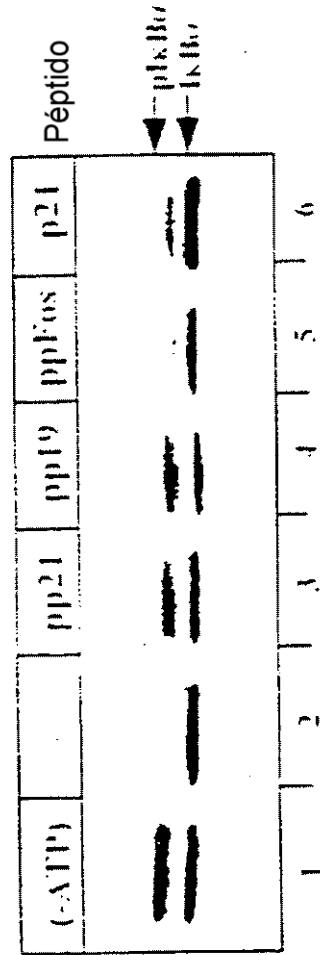


FIG. 2

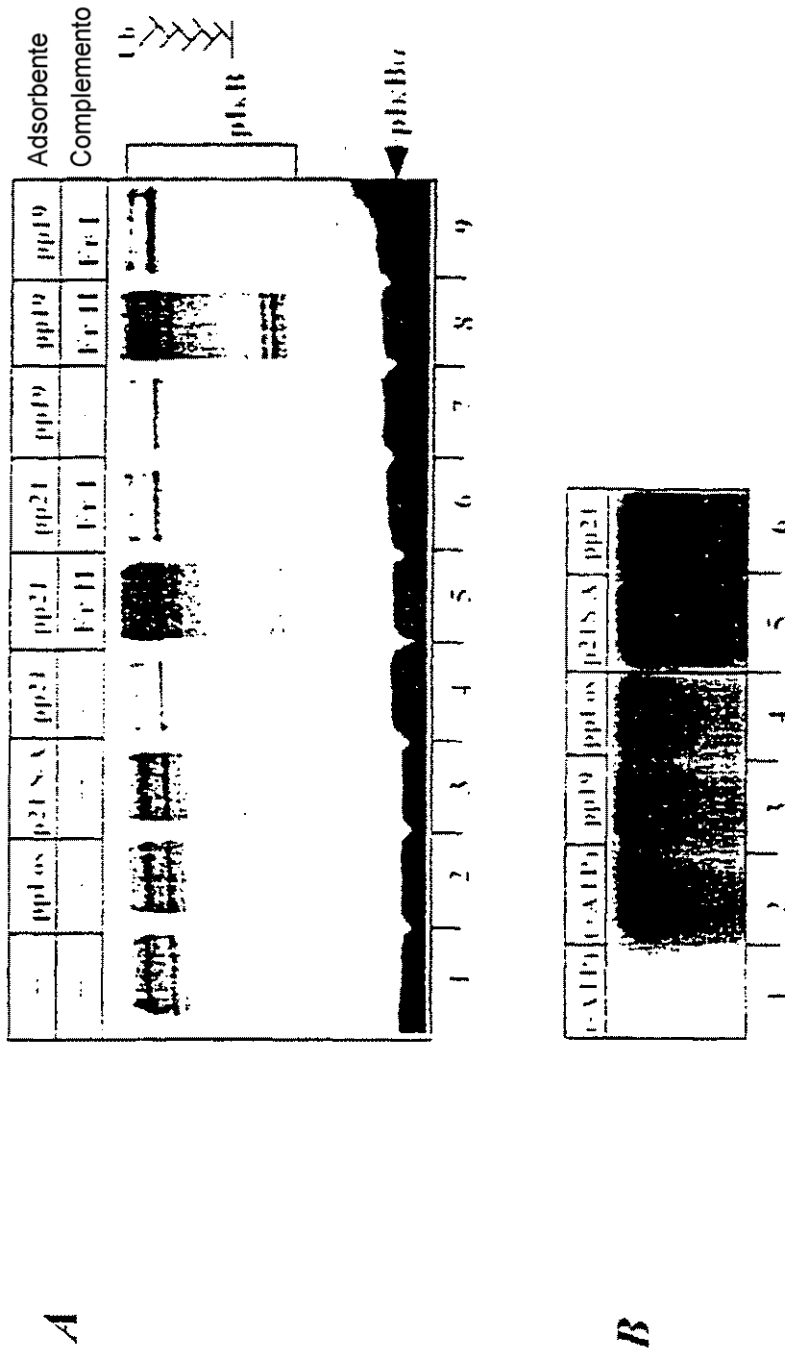


FIG. 3A y 3B

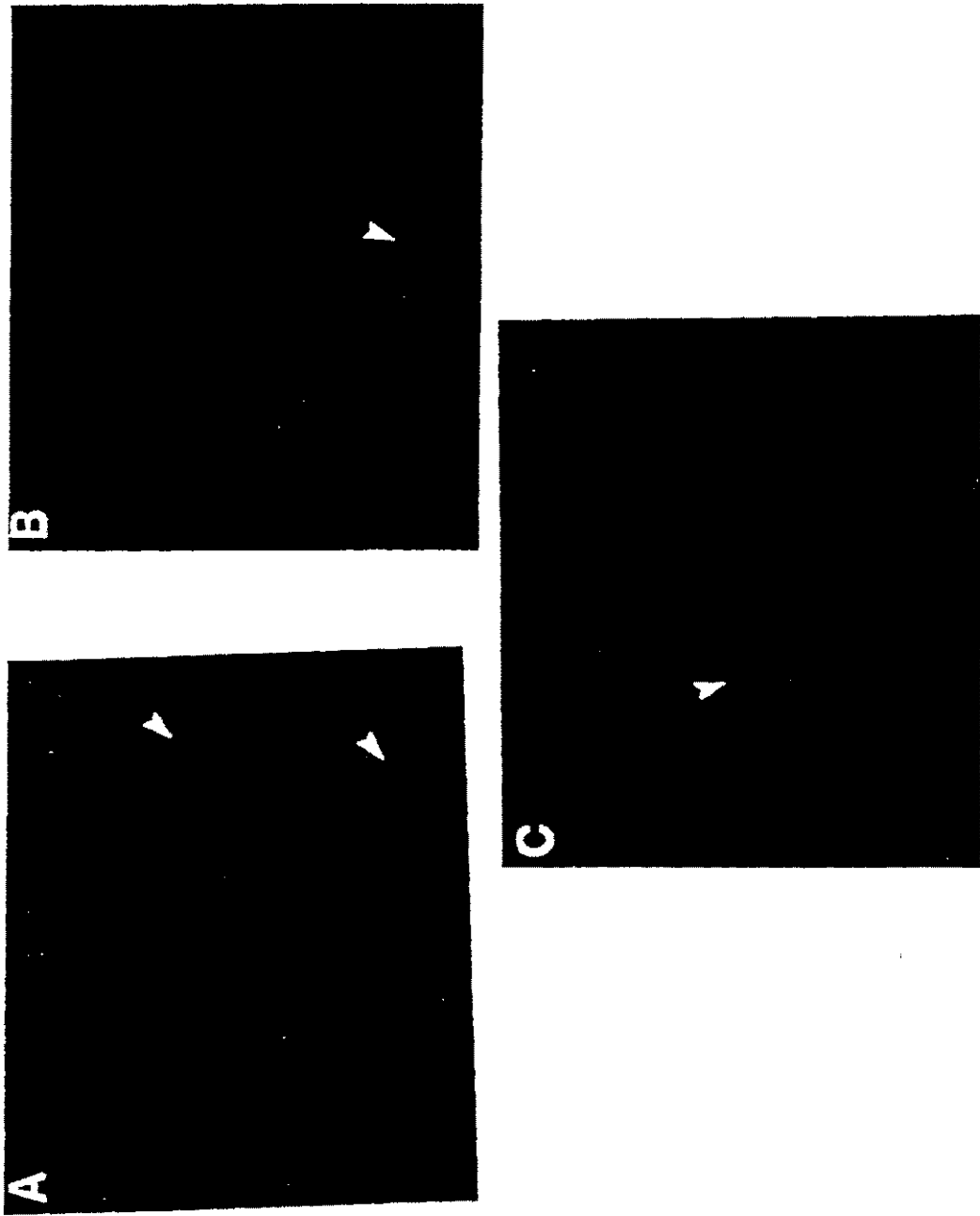


FIG. 4A-4C

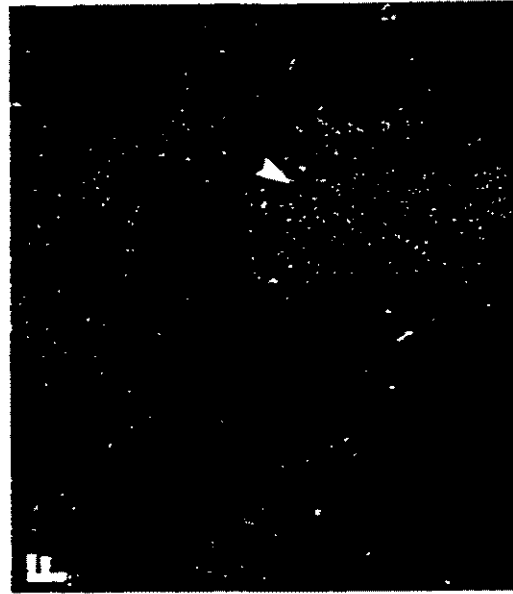
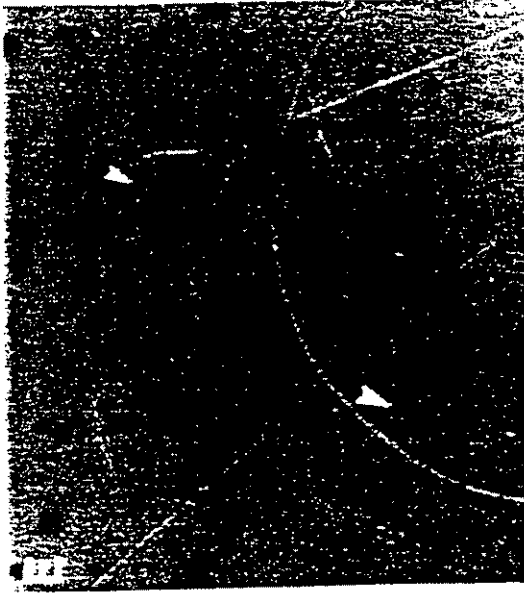


FIG. 4D-4F

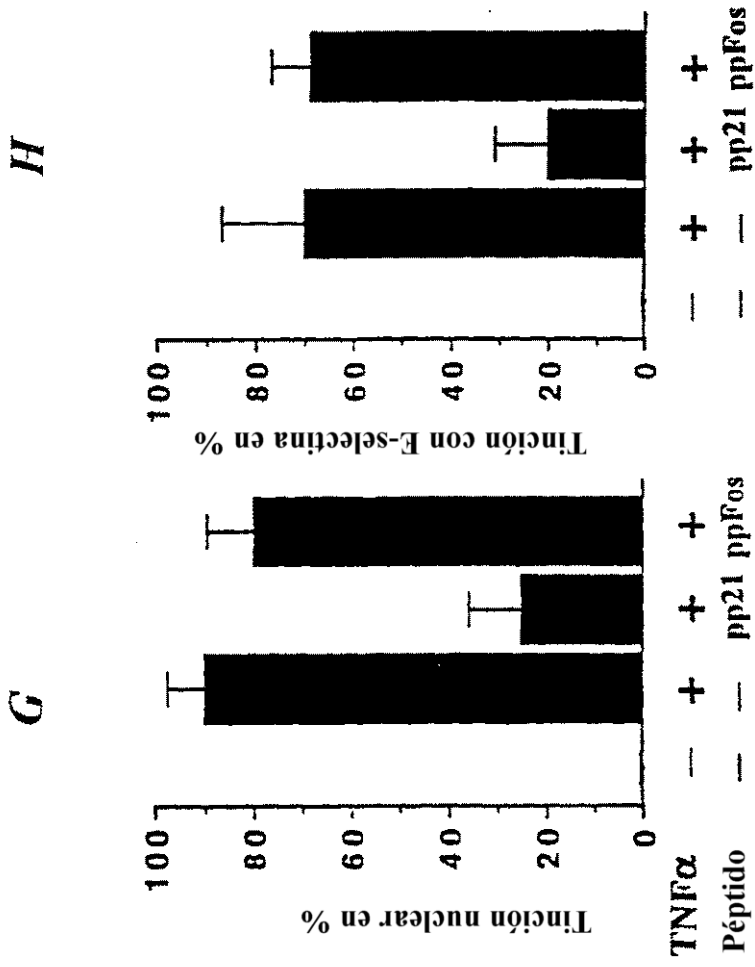


FIG. 4G y 4H

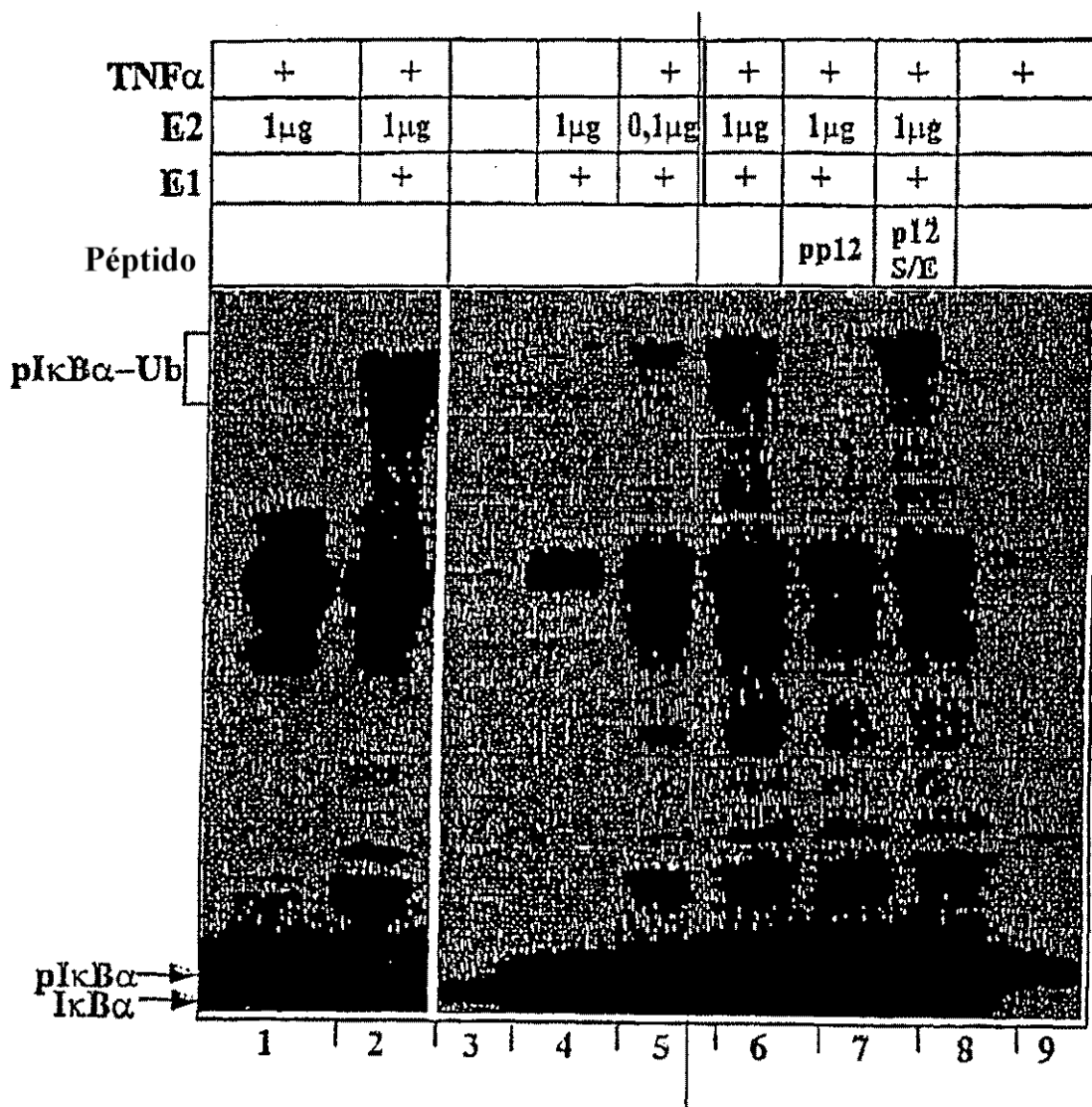


FIG. 5

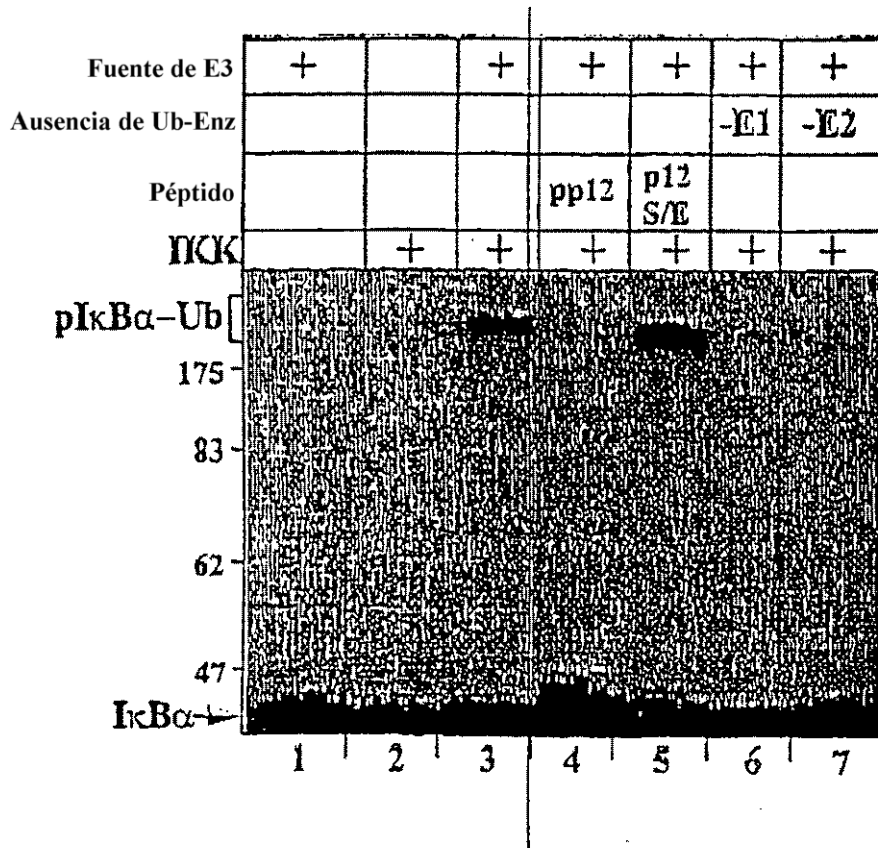


FIG. 6

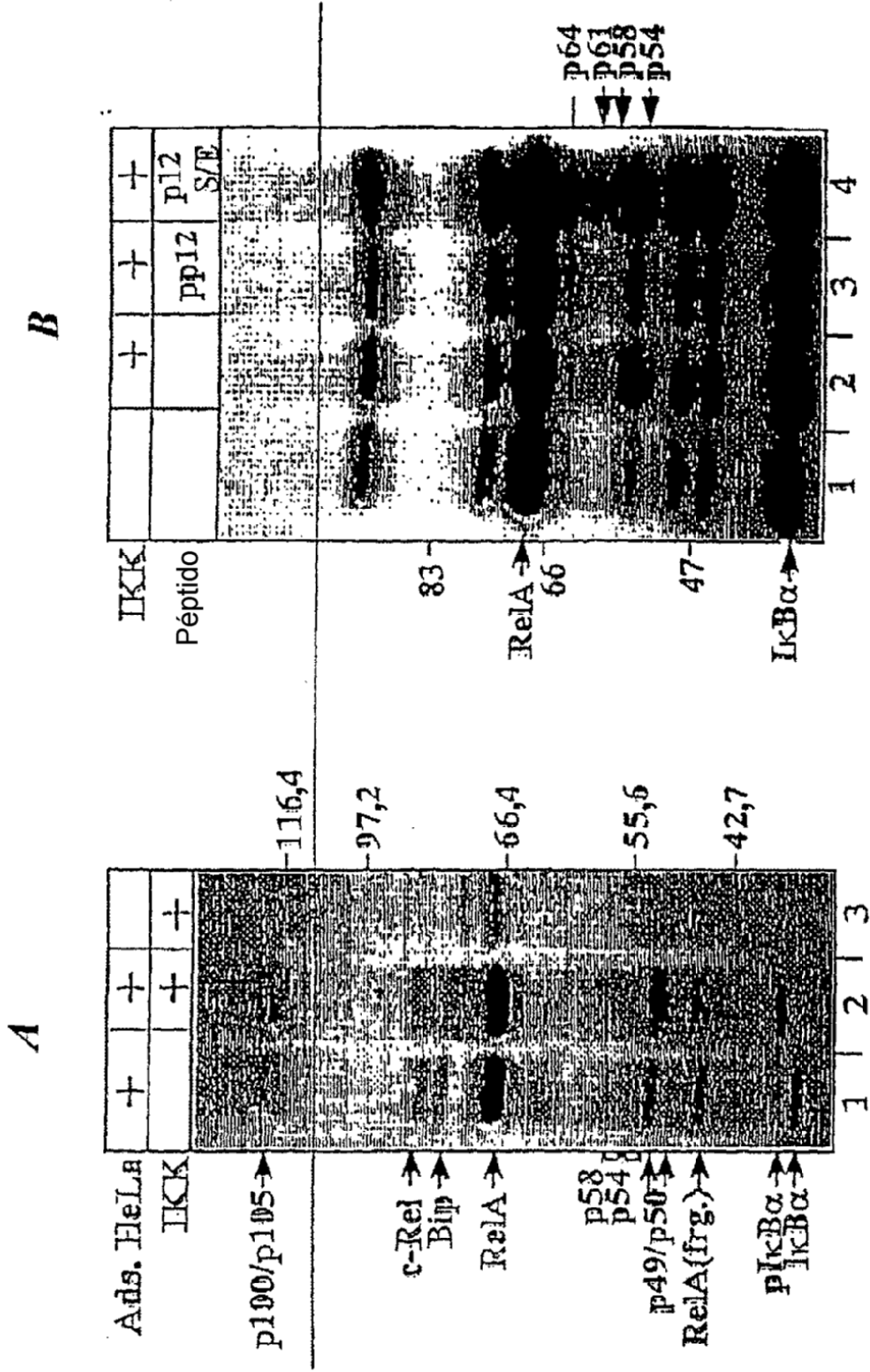


FIG. 7A y 7B

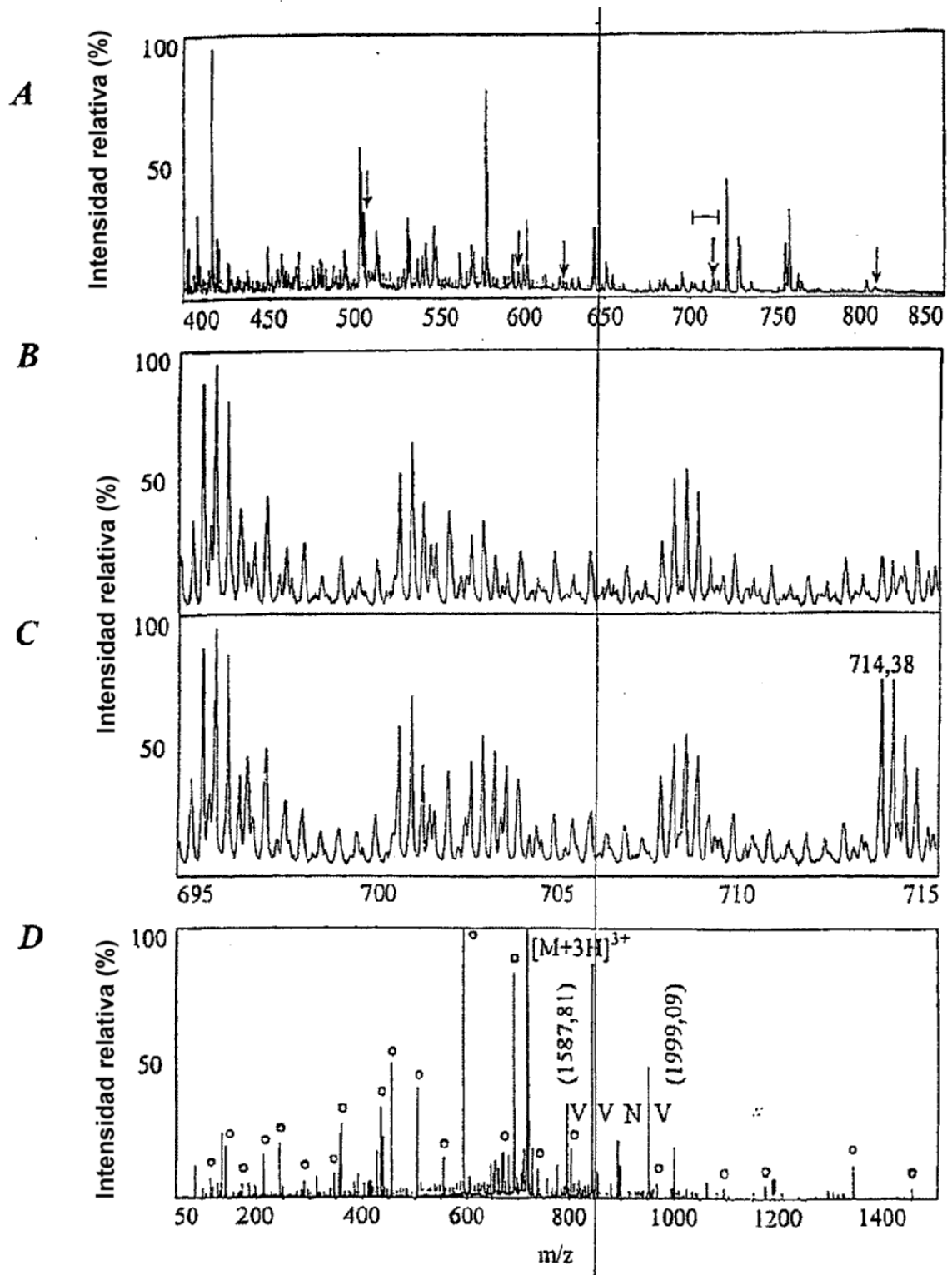


FIG. 8A-8D

GCGAGGCGGGGCGCGGGCCCGCCATGGAGCCCGACTCGGTGATTGAGGACAAGACCATCGAGCTCATGTGTTCTGTGC
 CAAGGTCTTTGTGGCTAGGCTGCGCCAACTGCTAGAGAGCATGTGCGCACTGAGTTGCC
 TGCAGAGCATGCCAGTGTCCAGATGTCTCCAGATAAGTAATGGAACATCATCTGTGATCGTCTCCAGAAA
 GAGGCCATCAGAAAGAACTATCAAAAAGAAAAGACTTGTGTATTAATATTTTGACCAGTGGTCTGAA
 TCAGATCAAGTGAATTTGTGGAACATCTTATTTACGAATGTGTCAATATCAGCATGGACATATTAAT
 CTTACCTGAAGCCCATGTTGCAGCGGACTTTATFACCGCTTACCAGAGCAAGGCTTAGATCACATAGC
 AGAAAACATCTTTGCTACCTGGATGCCAGGTCTCTGTGTGCAGCAGAGCTGGTATGTAAGAATGGCAG
 CGAGTGTCTCAGAAGGAATGCTTTGGAAGAAAGCTGATTGAACGAATGGTACGCACTGATCCCTATGGA
 AAGGACTTTCAGAAAGAAAGGGTGGGATCAGTACCTGTTAAAAACAGACCCACAGATGGCCCTCCAAA
 TTCATTTTATAGGTCATTATACCCAAAGATTATCCAGGATATAGAGACTATAGAATCTAACTGGCGGTGT
 GGACGACACAATTTGCAGAGGATTCAGTGCCGCTCTGAAAATAGTAAAGGTGTCTACTGTTTACAGTACG
 ATGATGAAAAAATFATCAGTGGCTACGAGATAATTTCTATTAAGATATGGGATAAAACCAGCCTGGAATG
 TTTGAAAGTGTAAACAGGACACACAGGCTCTGTCTCTGTCTGCAGTATGATGAGCGTGTCAATTGTAAT
 GGCTCTTCAGATTCTACGGTGAGAGTGTGGGATGTGAACACGGGTGAAGTCTTAAACACATTGATCCACC
 ACAATGAGGCTGTATTGCACCTACGCTTACGAATGGACTGATGGTGCCTGTTCCAAGSACCGCTCCAT
 TGCTGTGTGGGACATGGCTCTGCGACCGACATCACTTACGCGCTGTCTGTTGGCCACCGGGCTGCC
 GTCAATGTAGTAGACTTTGACGACAAGTACATCGTGTCTGCCTCTGGTGACAGGACCATCAAAGTCTGGA
 GCACGAGCACCTGTGAATTTGTTCTACTCTCAATGGGCACAAGCGGGGCATTGCCTGTCTCCAGTACAG
 GGATCGCCTGGTGTAGTGGATCATCAGATAATACCATTAGGCTCTGGGATATTGAATGTGGTGCCTGT
 TTAAGAGCTTAGAGGGACATGAAGAAATGGTCCGATGCATCCGTTTGATAACAAGAGGATTGTCAAGTG
 GGGCCTATGATGGAAAAATTAAGTTTGGGACTTGCAAGCTGTCTTGACCTCAGCCCAAGCAAGCAC
 ATTGTGTTTGCACATTGGTGGAACTTCTGGACGTGTGTTTGGCTCCAGTTTGTAGGTTTCCAGATC
 ATCAGCAGCTCCCATGATGACACTATTTGATTTGGGATTTCTAAATGTCCCTCCAGTCCCAGAAATG
 AGACCGTCTCCCTCCAGAACATACACTTACATCTCTAGATAACAGTCTGCACCTTACCCTGTTTCCAGG
 GTTTTCTAGTCTTGAACACTGCGCTACGTGGCTACCAAAATGCCAAGGGAGTTCTGTTACAGCTGAGTTA
 TGAAGCTGGAATGGTCTAGACGCTGGGTAGATGCAAGCAGCCTAACTCTTCAAGTACCGACATTTCT
 CACCTCTGATCCGGCTCTCCTTTGAGAAGGAGACCTTAGCTTCCCGGCTTCAAGTAGAACAGAAGCCC
 GTTCTCTCCCTCATCAGTGAAAAAATCTAATGTTTCAAATGTAATTTGTCATAGAAAAGGAACATAGA
 ATCTGTTTTACAGAAGTAAATCGACCGTCAAGAGAAGACTTGGCTCTAATTTATATTGCTTGCACCTT
 GGTTTGATATTAAGAAACAGCATTCTTCTTCAAGTGAATTTTGGGTGCCAAACACCTACCCAGAATGTCC
 AGGGCTTTTCAAAAAGTTAGCATTCTCCTTTTACCCTCAAGTCAATTAATGAATTTCTGACTTGTG
 TATTAGGAACATGTTGGACAGTGGAAAAATTTCTCTGGATTGTTTTAGTAATATTTTGGGATTACTTT
 CCTTCTGTACCAATTTCTTTAATTAAGAAGTATAAGTCAAGTATATATCTACCAACAGGTAATAT
 AGCTCTTCTTTTAACTGTTCTCTGTCCCCAACCATCTCCTGATAATTTGGTAGAGTAACACCTTTA
 TACGTGTGCTTGCCCTCAATTTAAAACTACTGATTCGCATGTAGATATAATGTACATAACAGTTTAAAC
 TCAAAGTGTGAGAGTCAAGGGCCCTGTGCTTGAGACACTAATACAGAGTGTGTTGCACTTAGCCATG
 GGCTGGGCTCAAGAACCTGATACCTGGGTTGATGTGGATTACCTAGAACCCTTCTGCAATTCATACA
 GTGTTTTTATTTTGTGTTGTCATTGCGTGTGTGTTTGTGTTGTTTTAATGAGAATCTTGTTTTA
 AAATGTAATTTCTAAGGTTTAAACCCAAAATGTTTTATTGTTGGAGTATATATTATACAATAGAGAG
 GTACCTTAAACATTTTTGTTCTTATTTCTCATAAGTACTCCTGAGTACAAGTGGTCACTCCCA
 TAGTATTCATTTGGCTTCGCTGTCAAAAATCATTATCTGTGCAAGTCTGGCCCTGGGAAGGGGAAATAA
 GAAGGCCCTGTGACGGGCTGTCTTGGCTCTGGAATTCATGCATCCTGGCCTTGCCAAGGTTCTGGCAGG
 GCCTGCTGGTGTGTTGGAGCCTGCAGGGCAGGTCAAGGCTGGTTCAGAGGGCCCATGCTGAGGGGTGGGTGC
 TCTGAAGTGGAGTGAAGCCTCAAGCCCATGAATGCCACCCAGTCACTCTGGTGTGAGCTGCTGCTGTG
 GCCCCAGCAGGTTCTCAAAGCTCCCAAGTCTCCCTAGGACACAGCCAAATGTAAATGGCACTGTTG
 CCTTGACAGTGCATGGAAGGACGTTGGCATCCAATGGCACTCCTTCTCCCTTATTCAATATTAGGTTT
 GATTTGCCCTTCCGCTTGTTCCAAAGATCAAGGAATGTCAATAACATTTTAAAGGACCAATAAACAGC
 CTCCTATAAAGTAAACCTCTTCCCGTGGAAAGCACACTCTACTACTAAAGGGAAGGCCCTGGGCTCTGAT
 TTGTCTTTGCAATTGAGAACGGTGTGGGGATCAGTGTGTGTATGTGATTTGTTTATTGAGTTGGCTTT
 GCTTTTTTAGTTTTCTTTAAAAAATAAATCCTTCTCCCATGTTACTAAATTAATTTATGTTTTGA
 GAGGTTGAGTCTCAAAGTGAACAATAAACCTCCATTCATAAGGTGGATGTTGTAAGCTTGTAGGTGGT
 TGTGAAAGTGAATTTAGCTTTGACCACTTTTCACTACAGCTTCAATATCAAACCTGGTTAGGAAAGCCCA
 GGGGGAAGGGAGGGGGCAGGGGAGGAGGCAATTCGAATGAATGAATGGATTTTTGTGTTTTGTCATG
 TTTAATATAGAAGTCCCTCGTTCCTTGGGAGATGATGGCCTTGAATATGCAGACAACCTTTGAATTG

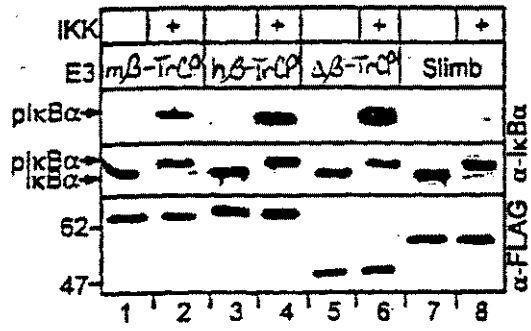
FIG. 9A

TGCCTACTAAATTATAGCAGGGGACTTTGGCACCCAAGGAGTTCTGACTTTCTGGGATTATAATAGTAAT
TCCCAGCCATACTCTGGACTTTATTTTGCTAACCATAACTGAGCAAATGTAAATFACTGTATATTAATG
TTTTAAAGCACTGGGATAGTCTAATTCTAACTTGTAATTAATTATGTTTGCCAATTATCTGTTTGAAATA
AATTTGTGTCTGAACAGCTATTGAAACTGTTAAATTGTACAGATATTATTCATGACAGCTTTGACTGTG
GAATGTGCTTAATAAAAAACAAAAAGTTTGACTTTTGTCCAGTAAATTGCTAAGTAATGTCAATAAATC
GAGTATGGGTATTATGCAGTGCACCTAATCTGGCTTCATGCAATTGTTACTTCAGCTACTGATTCAAAGC
CAATACTCTTAATAAAGTGTGCAATACTC

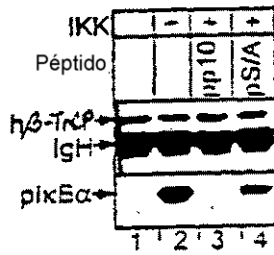
FIG. 9B

MEPDSVIEDKTIELMCSVPRSLWLGCANLVESMCALSCLQSMPSVRCLQISNGTSSVIVSRK
RPSEGNVQKEKDLCKYFDQWSESDQVEFVEHLISRMCHYQHGHSYLPMLQRDFITALPEQGLDHA
ENILSYLDARSLCAAELVCKEWQRVISEGMLWKKLIERMVRTDPLWKGLSERRGWDQYLFKNRPTDGPPI
SFYRSLYPKIIDIETIESNWRRCGRHNLQRIQCRSENSKGVYCLQYDDEKIIISGLRDNSIKIWDKTSLEC
LKVLGTGHTGSVLCLOQYDERVIVTGSSDSTVRVWDVNTGEVLNLIHHNEAVLHLRFSNGLMVTCSKDRSI
AVWDMASATDITLRRVLVGHRAAVNVVDFDDKYIVSASGDRTIKVVSTSTCEFVRTLNHGKRGIAQLQYR
DRLVVGSSDNTIRLWDIECGACLRLVLEGHEELVRCIRFDNKRIVSGAYDGGKIKVWDLQAALDPRAPAST
LCLRTLVEHSGRVFRLQFDEFQIISSSHDDTILIWDFLNVPPSAQNETRSPSRITYTISR

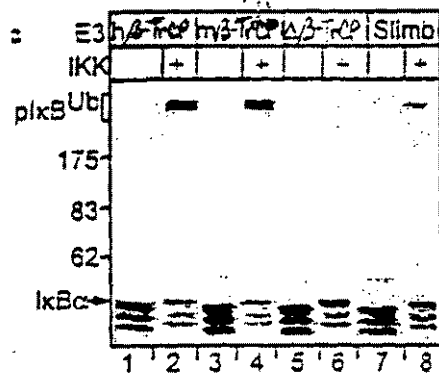
FIG. 10



A



B



C

FIG. 11A-11C

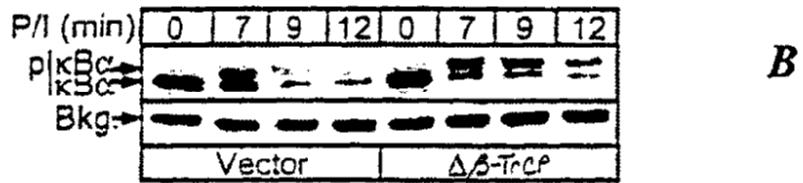
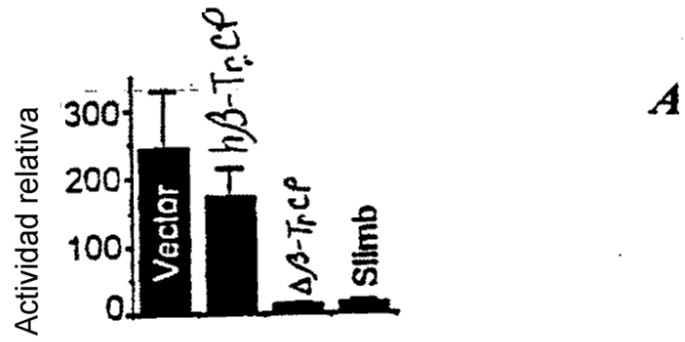


FIG. 12A y 12B