



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 234**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07013470 .5**

96 Fecha de presentación : **24.03.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1847607**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2007**

54 Título: **Anticuerpos contra la proteína p51.**

30 Prioridad: **27.03.1998 JP 10-100467**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2011

73 Titular/es: **OTSUKA PHARMACEUTICAL Co., Ltd.**
9, Kandatsukasa-cho, 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 101-0048, JP
Yoji Ikawa

72 Inventor/es: **Ikawa, Yoji;**
Ikawa, Shuntaro y
Obinata, Masuo

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

Anticuerpos contra la proteína p51.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere anticuerpos contra la proteína p51.

10 **Antecedentes de la técnica**

La proteína p53 se descubrió como una proteína nuclear que se une al antígeno T grande del virus tumoral de ADN SV40 y su gen (gen p53) se ha clonado. Al principio, se consideró que p53 era un oncogén porque la transferencia de este gen y el gen ras juntos a células daba como resultado la transformación de células embrionarias. Estudios posteriores, sin embargo, revelaron que el gen p53 inicialmente clonado era un tipo mutante y que el tipo natural más bien suprimía la actividad transformante del tipo mutante. En la actualidad, se han detectado delecciones o anomalías en el gen p53 en muchos cánceres humanos y se descubrió también una mutación en los gametos del gen p53 en el síndrome de Li-Fraumeni que se sabe que es una enfermedad hereditaria con un alto riesgo de conversión maligna. Debido a estos y otros hallazgos, se considera actualmente que el gen p53 es un importante oncogén supresor [Baker, S. J., *et al.*, Science, 244, 217-221 (1989); Nigro, J. M., Nature, 342, 705-708 (1989)].

La proteína p53 humana consiste en 393 residuos de aminoácido y puede dividirse aproximadamente en el dominio N-terminal (la región de los aminoácidos 1-101), el dominio núcleo (la región de los aminoácidos 102-292) y el dominio C-terminal (la región de los aminoácidos 293-393). El dominio N-terminal contiene secuencias necesarias para la regulación de la transcripción, tales como aminoácidos ácidos y una región con alto contenido en prolina, y se considera que es un dominio activador de la transcripción. El dominio núcleo central contiene 3 sitios hidrófobos y es un dominio asociado con unión a ADN específica de secuencia de nucleótidos. El dominio C-terminal contiene muchos aminoácidos básicos y una secuencia necesaria para la tetramerización y se considera que es responsable del reconocimiento de la unión a ADN no específica y el daño en el ADN y la inhibición de la transformación.

Muchas de las anomalías del gen p53 detectadas en cánceres humanos son mutaciones de cambio de sentido y la mayoría de ellas se concentran en el dominio núcleo correspondiente a la secuencia de los aminoácidos 100-300 del extremo N-terminal, particularmente en la región denominada "punto caliente" que se ha conservado entre especies. La región de punto caliente en el dominio núcleo es la secuencia asociada con la unión entre la proteína p53 y el ADN y, realmente, la mutación de esta región da como resultado la inhibición de la unión específica al ADN.

Resulta evidente a partir de lo expuesto anteriormente que la proteína p53 desempeña el papel de un factor de control de la transcripción que se une específicamente a otros genes para modular la expresión de los genes.

El gen cuya transcripción se induce por la proteína p53 incluye, entre otros, el gen p21 [conocido como WAF1, CIP1, o SDI1 (El-Dairy, W. S., *et al.*, Cell, 75, 817 (1993)); MDM2 (Wu, X., *et al.*, Genes Dev., 7, 1126 (1993)); MCK (Weintraub, H., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4570 (1991); Zambetti, G. P., *et al.*, Genes Dev., 6, 1143 (1992)), GADD95 [Kastan, M. B., *et al.*, Cell, 71, 587 (1992)], ciclina G [Cyclin G: Okamoto, K., EMBO J., 13, 4816 (1994)], BAX [Miyashita, T., *et al.*, Cell, 80, 293 (1995)], y proteína 3 de unión a factor de crecimiento similar a la insulina [IGF-BP3: Buckbinder, L., *et al.*, Nature, 377, 646 (1995)].

La proteína codificada por el gen p21 es una proteína inhibidora para cinasa dependiente de ciclina (CDK), y se ha encontrado que la proteína p53 de tipo natural regula el ciclo celular de una manera inhibitoria a través de p21 [Harper, J. W., *et al.*, Cell, 75, 805 (1993); Xiong, Y., *et al.*, Nature, 366, 707 (1993); Gu, Y., *et al.*, Nature, 366, 701 (1993)]. Además, el gen p21 se une de manera notificada al antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) para inhibir directamente la replicación del ADN [Waga, S., *et al.*, Nature, 369, 574 (1994)]. Además, el gen p21 se ha encontrado en el mismo gen que el gen SDI1 que induce la senescencia de células para inhibir la síntesis de ADN [Noda, A., *et al.*, Exp. Cell Res., 211, 90 (1994)].

MDM2 se une a la proteína p53 para inactivar la actividad de regulación de la transcripción de la proteína del gen, lo que conduce a la supuesta conclusión de que MDM2 actúa como factor de regulación de retroalimentación negativa.

IGF-BP3 es un factor de regulación negativa en la señalización por IGF. Por tanto, el aumento del gen de IGF-BP3 por la proteína p53 sugiere el posible resultado de que la proteína p53 induce la supresión del crecimiento de células dependientes de IGF.

Mientras tanto, la proteína p53 de tipo natural induce de manera notificada la apoptosis de células de leucemia mielocítica [Yonish-Rouach, E., *et al.*, Nature, 352, 345 (1991)]. La inducción de la apoptosis de timocitos mediante irradiación no tiene lugar en ratones defectuosos en p53 [Lowe, S. W., Nature, 362, 847 (1993); Clarke, A. R., *et al.*, Nature 362, 849 (1993)] y, en la lente del cristalino, la retina y el cerebro, la proteína p53 induce la muerte apoptótica de células privadas de actividad normal del gen de retinoblastoma (gen RB) [Pan, H., y Griep, A. E., Genes Dev., 8, 1285 (1999); Morgenbesser, S. D., *et al.*, Nature 371, 72 (1999); Howes, K. A., Genes Dev., 8, 1300 (1994):

Symonds, H., *et al.*, Cell, 78, 703 (1994)]. E. White propone que la proteína p53 es útil para una vigilancia de la mutación del gen RB y que es probable que la proteína induzca la apoptosis de las células en las que está implicada una mutación del gen RB [White, E., Nature, 371, 21 (1994)].

Además, en la línea celular de leucemia eritroide de ratón en la que sólo se expresa el gen p53 sensible a la temperatura, una disminución en la temperatura da como resultado la reconversión del gen p53 mutante al tipo natural para inducir apoptosis y el gen p53 mutante aislado a partir del mismo confiere la capacidad de crecer en medio de agar blando a una línea de fibroblastos defectuosos en p53 (confiere independencia de anclaje) [Xu *et al.*, Jpn. J. Cancer Res. 86: 284-291 (1995); Kato *et al.*, Int. J. Oncol. 9: 269-277].

BAX puede unirse a bcl-2, que es un inhibidor de la apoptosis, y estimula la muerte de células apoptóticas [Oltvai, Z. M., *et al.*, Cell, 74, 609 (1993)]. El aumento en el gen BAX y la disminución en bcl-2 por la proteína p53 están implicadas en la apoptosis de la línea celular de leucemia de ratón M1 [Miyashita, T., *et al.*, Oncogene, 9, 1799 (1994)] y Fas, que es uno de los transductores de la señal para la apoptosis, está aumentado en cáncer de pulmón de células no pequeñas y eritroleucemia [Owen-Schaub, L. B., *et al.*, Mol. Cell Biol., 15, 3032 (1995)].

Las diversas investigaciones a las cuales se hace referencia anteriormente han revelado que la proteína p53 o bien activa o bien suprime la transcripción de diversos genes sin limitarse al gen p21. Además, incluso la proteína p53 mutante defectuosa en la función de regulación de la transcripción puede interactuar con otras proteínas intracelulares para transmitir señales y desencadenar una función de reparación del daño en el ADN.

Entre las funciones de la proteína p53 que se han identificado hasta la fecha están una función de regulación de la transcripción, una función de transductor de señales a través de la unión a otras proteínas intracelulares, un elemento constituyente de un complejo proteico relacionado con la replicación del ADN, una función de unión a ADN y actividad exonucleasa, y se conjetura que es el resultado de una interacción de compuesto de estas funciones la que provoca la detención del ciclo celular en células, la inducción de la apoptosis, la reparación del ADN, la regulación de la replicación del ADN y la inducción de la diferenciación.

Además, no es cierto que las funciones de la proteína p53 se expresan sólo en el caso de un daño en el gen, sino que se ha constatado que cuando el tejido vivo se somete a diversas tensiones tales como infección viral, estimulación con citocinas, hipoxia, un cambio en la reserva de nucleótidos, anormalidad metabólica inducida por fármacos, etc., los estímulos desencadenan cambios cuantitativos o cualitativos en la proteína p53. La proteína p53 sometida a la regulación cuantitativa o cualitativa expresa sus funciones, tal como la transducción de señales, a través de interacciones con otras proteínas y el control de la transcripción de otros genes, para regular la replicación del ADN en células de los tejidos vivos sometidos a tensiones biológicas, reparar las células suspendiendo el ciclo celular, eliminar células por medio de apoptosis o promover la diferenciación de células, contribuyendo de ese modo a la protección del tejido vivo frente a las tensiones [Ganman, C. E., *et al.*, Genes Dev., 9, 600-611 (1995); Graeber, T. G., *et al.*, Nature, 379, 88-91 (1996); Linke, S.P., *et al.*, Genes Dev., 10, 934-947 (1996); Xiang, H., *et al.*, J. Neurosci., 16, 6753-6765 (1996)].

En vista de la existencia de mutaciones del gen p53 en la mitad de los tumores humanos, la aplicación clínica del gen p53 y su producto proteico para el diagnóstico y la terapia de tumores ha sido objeto de estudio en los últimos años. El procedimiento de detección de células tumorales que invaden ganglios linfáticos o fluidos corporales llevando a cabo una PCR utilizando cebadores que reconocen específicamente el sitio de la mutación del gen p53 puede ser una técnica de diagnóstico eficaz para estimar el alcance de la invasión tumoral o predecir una recidiva del tumor [Hayashi, H., *et al.*, Lancet, 345, 1257-1259 (1995)].

Además, aprovechando la actividad inductora de la apoptosis de la proteína p53, está poniéndose en práctica en los Estados Unidos una terapia génica que comprende la introducción de un gen p53 de tipo natural en la célula tumoral por medio de un vector viral y su eficacia se ha constatado [Roth, J. A., *et al.*, Nature Med., 2, 985-991 (1996)]. Recientemente, en Japón, se ha iniciado también esta terapia génica en varios centros.

Mientras tanto, más de la mayoría de los tumores humanos no están asociados con mutación del gen p53 y, a partir de este hecho, se ha apuntado la posibilidad de existencia de otras proteínas inhibitorias de la tumorigénesis análogas a la proteína p53.

Los inventores de la presente invención encontraron anteriormente que una mutación del p53 no puede ser un indicador premonitorio útil de linfoma de no-Hodgkin (LNH).

Recientemente, se ha identificado un nuevo gen, denominado p73, que presenta alta homología con dicho gen p53 [Kaghad, M., *et al.*, Cell, 90, 809-819 (1997)]. Según la información disponible para los presentes inventores, la proteína p73 muestra una homología del 29% con la proteína p53 humana en el dominio activador de la transcripción (la región de los aminoácidos 1-45). Además, esta proteína p73 presenta una homología del 63% en el dominio de unión a ADN (la región de los aminoácidos 113 ~ 290) presentando 6 secuencias conservadas complementarias denominadas puntos calientes de mutación; y una homología del 38% en el dominio de oligomerización (la región de los aminoácidos 319 ~ 363). Con respecto al dominio C-terminal, sin embargo, no se ha

reconocido homología significativa entre la proteína p73 y la proteína p53.

Se ha constatado que la expresión excesiva de la proteína p73 inhibe el crecimiento de una línea celular de neuroblastoma y células SAOS2 (una línea celular de osteosarcoma) y que una expresión transitoria de la proteína p73 promueve la apoptosis de células SAOS2 y células de riñón de cría de hámster [Bruce Clurman y Mark Groudine, *Nature*, 389, 122-123 (1997); Christine, A., *et al.*, *Nature*, 389, 191-194 (1997)].

Sin embargo, la proteína p73 es algo diferente de la proteína p53 porque la primera se expresa sólo a bajos niveles en tejidos normales. Además, la proteína p73 es diferente de la proteína p53 porque la expresión de la primera proteína en una línea celular de neuroblastoma no se induce por irradiación UV o una dosis baja de actinomicina D.

Por tanto, no es cierto que la proteína p73 presente exactamente las mismas funciones que las de la proteína p53 y, en la actualidad, depende mucho de la investigación adicional. Existe un artículo que argumenta que, basándose en las observaciones realizadas hasta la fecha, esta p73 puede clasificarse como un supuesto factor supresor de tumores en neuroblastoma. Véase también la siguiente descripción intermedia [Osada *et al.*, *Nature Medecine*, 4, 839-843 (julio de 1992) y Yang *et al.*, *Molecular Cell*, 2, 305-316 (septiembre de 1998)].

La presente invención tiene como objetivo proporcionar anticuerpos contra la proteína p51.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que ilustra características de los dominios estructurales de la proteína p51, junto con las de la proteína p53 y la proteína p73 β . En el diagrama, "TA" representa un dominio activador de la transcripción; "unión a ADN" representa un dominio de unión a ADN; y "oligo" representa un dominio de oligomerización.

La figura 2 es un diagrama que muestra la relación de homología de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen p51A humano, la secuencia de aminoácidos de la proteína p53, y la secuencia de aminoácidos de la proteína p73 β . Los aminoácidos que son comunes entre las tres secuencias se indican en bloques.

La figura 3 es un diagrama que muestra la relación de homología de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen p51B humano y la secuencia de aminoácidos de la proteína p73 α . Los aminoácidos que son comunes a ambas secuencias se indican en bloques.

La figura 4 es un diagrama esquemático que compara la estructura de la variante de corte y empalme alternativo (p51A, p51B) de la proteína p51 con la estructura de la variante de corte y empalme alternativo (p73 α , p73 β) de la proteína p73.

La figura 5 es una fotografía, en lugar de un dibujo, que muestra el patrón de expresión de ARNm de p51 en diversos tejidos humanos como un electroforetograma de transferencia de tipo Northern (utilizando un filtro de Clontech). Los carriles representan los resultados para 1: corazón, 2: cerebro, 3: placenta, 4: pulmón, 5: hígado, 6: músculo esquelético, 7: bazo, 8: páncreas, respectivamente.

La figura 6 es una fotografía, en lugar de un dibujo, que muestra el patrón de expresión de ARNm de p51 en diversos tejidos humanos como un electroferograma de transferencia de tipo Northern (utilizando un filtro preparado utilizando el ARN adquirido de Clontech). Los carriles representan los resultados para 1: glándula mamaria, 2: próstata, 3: glándula salival, 4: estómago, 5: timo, 6: tiroides, 7: tráquea y 8: útero, respectivamente.

La figura 7 es una figura, en lugar de un dibujo, que muestra la actividad de formación de colonias del gen p51A. Más específicamente, es una fotografía, en lugar de un dibujo, que muestra en comparación las actividades de formación de colonias de las células transformadas con el plásmido de expresión de p51A (p51A), el plásmido de expresión de p53 (p53), el plásmido de expresión de p51A marcado con HA (HAp51A) y el vector (RcCMV) solo, respectivamente.

La figura 8 es un diagrama esquemático que muestra los constructos indicadores utilizados en el ejemplo experimental 2. En el diagrama, "WAF-1 promotor luc" representa un constructo de promotor p21WAF1 de tipo natural con dos elementos de regulación de p53 retenidos; "del 1" representa un constructo similar el que se ha delecionado un elemento en el sentido de 5'; y "del 2" representa un constructo en el que se han delecionado ambos elementos.

La figura 9 es un diagrama que muestra la actividad de transactivación hallada en la transferencia del plásmido de expresión de p51A (p51A), el plásmido de expresión de p53 (p53) o el vector control (Rc/CMV) que alberga los diversos constructos indicadores mostrados en la figura 8 en células SAOS2 [véase el ejemplo experimental 2].

La figura 10 es un diagrama que muestra la actividad de transactivación hallada en la transferencia del plásmido de expresión de p51A (p51A), el plásmido de expresión de p51A marcado con HA (HAp51A), el plásmido de expresión de p53 (p53) o el vector control (Rc/CMV) que alberga el constructo indicador PGC, cuya respuesta a p53 se ha

demostrado experimentalmente, en células SAOS2 [véase el ejemplo experimental 2].

La figura 11 es una fotografía (un electroforetograma en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio), en lugar de un dibujo, que muestra los resultados de ensayos de fragmentación del ADN realizados con células 1C1 y 4B1 que contiene el gen p51A humanos y células 1-2-3 que no contienen el gen p51A tal como se hacen crecer a diferentes temperaturas de 32°C y 37°C.

En el diagrama, "células 1-2-3" representa células control en las que sólo se ha introducido el vector y que no contienen el gen p51A y "células 1C1" o "células 4B1" representa las células 1-2-3 que contienen p51A transformadas con el vector de expresión que alberga el gen p51A (pRcCMV/p51A). "λ/Hind III" representa productos de digestión digeridos con la enzima de restricción de ADN del fago λ Hind III y son marcadores de tamaño de ADN (producto de New England Biolabs. Ind.). "Marcador de tamaño molecular de 100 pb" representa marcadores de tamaño que comprenden fragmentos de ADN que presentan tamaños que corresponden a múltiplos de 100 pb (producto de GIBCO-BRL).

Las figuras 12 a 14 muestran un diagrama que compara la secuencia de nucleótidos (fila inferior) de la región codificante del gen p51B humano con la secuencia correspondiente (fila superior) del homólogo de ratón (gen p51B de ratón). Los nucleótidos comunes entre las dos secuencias se indican mediante la marca de asterisco en el diagrama.

La figura 15 es un diagrama que compara las secuencias de aminoácidos de la proteína p51B humana y la proteína p51B de ratón codificadas por el gen p51B humano y el gen p51B de ratón, ambas mostradas en las figuras 12-14, respectivamente. Los aminoácidos comunes a ambas secuencias se indican mediante la marca de asterisco en el diagrama.

Descripción de la invención

Puesto que la mayoría de los tejidos tumorales humanos presentan mutantes del gen p53 que es un gen supresor de oncogenes tal como se mencionó anteriormente, se ha sugerido la posibilidad de la existencia de otros productos génicos (proteínas) distintos de la proteína p53 que desencadenan la función de inhibición de la tumorigénesis.

Por tanto, los inventores de la presente invención hicieron investigaciones intensas en la búsqueda de nuevos genes y productos génicos que pudieran estar asociados con dicha función de inhibición de la tumorigénesis. Como resultado, descubrieron un nuevo gen derivado de ser humano que codifica para una proteína que muestra una actividad similar a la de dicha proteína p53 y confirmaron que el gen particular o producto génico está asociado de manera significativa con la apoptosis. La presente invención tiene su base en este nuevo hallazgo.

La presente invención, por tanto, se refiere a lo siguiente.

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína p51 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 1, en el que dicha proteína p51 se produce mediante tecnología recombinante o síntesis química.
2. El anticuerpo aislado según el punto 1, en el que la unión se determina utilizando inmunoprecipitación, inmunotinción, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA o radioinmunoanálisis (RIA).
3. Un kit para detectar la proteína p51 que comprende
 - (i) un anticuerpo aislado según el punto 1, y
 - (ii) un medio para detectar el anticuerpo.
4. El kit según el punto 3, en el que el medio para detectar el anticuerpo es uno o más de una enzima, una coenzima, un sustrato, un polipéptido, un anticuerpo o un marcador detectable.
5. El kit según el punto 4, en el que el medio para detectar el anticuerpo es un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo.
6. El kit según el punto 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
7. El kit según el punto 3, en el que el anticuerpo está en una forma de una preparación purificada de anticuerpo policlonal.

También se describen (como referencia): un vector que alberga dicho gen p51, células huésped transformadas con dicho vector y un procedimiento de producción de la proteína p51 caracterizado por hacer crecer dichas células huésped en un medio y recoger la proteína del cultivo resultante.

Debe entenderse que la designación de p51 se utiliza sólo por motivos de conveniencia en esta referencia de memoria.

Además, el término "gen (ADN)" en el contexto de la presente memoria significa no sólo un ADN bicatenario sino también un ADN monocatenario, incluidos los componentes de cadena sentido y cadena antisentido, y de ningún modo es limitativo de su longitud. Por tanto, a menos que se indique lo contrario, el gen (ADN) incluye el ADN bicatenario incluido ADN genómico humano, un ADN monocatenario que comprende el ADNc (cadena sentido), un ADN monocatenario que presenta una secuencia complementaria a dicha cadena sentido (cadena antisentido) y todos los fragmentos del mismo.

La representación de aminoácidos, péptidos, secuencias de nucleótidos, ácidos nucleicos, etc. mediante abreviaturas en esta memoria confirma las recomendaciones de la IUPAC-IUB, las "Guidelines for Preparation of Specifications Etc. which contain Nucleotide Sequences or Amino Acid Sequences (la triple Oficina de Patentes japonesa, de los Estados Unidos de América y Europea), y las convenciones en el uso de símbolos en el campo de la técnica relacionado.

(1) El gen p51 y su equivalente (sólo para referencia)

La presente memoria se refiere a nuevos genes humanos que codifican para proteínas que presentan acciones o funciones idénticas o equivalentes a las acciones o funciones de la proteína p53.

El gen se ha obtenido llevando a cabo una PCR utilizando cebadores recientemente establecidos tras activas exploraciones utilizando regiones específicas seleccionadas de las secuencias del gen p73 y el gen p53 conocidos hasta la fecha con esfuerzos sensatos.

Más particularmente, llevando a cabo una PCR utilizando los nuevos cebadores descritos en los ejemplos que aparecen más adelante en la presente memoria, se obtuvo un fragmento génico que no es idéntico sino similar al gen p73 y al gen p53. Utilizando este fragmento de ADN como sonda, se aisló satisfactoriamente un clon de ADNc que codifica para una nueva proteína que presenta alta homología con la secuencia de aminoácidos de la proteína p53 entre clones de ADNc seleccionados aleatoriamente de una biblioteca de ADNc de músculo esquelético humano.

La masa molecular calculada de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del ADNc así obtenido era de aproximadamente 50.894 Da y, por tanto, los presentes inventores denominaron a este ADNc (ADN) "gen p51A humano (o resumidamente, gen p51A)" y a la proteína que presenta la secuencia de aminoácidos codificada por este gen "proteína p51A (resumidamente, proteína p51A)" por motivos de conveniencia.

La investigación posterior reveló que el gen codificado por el clon de ADNc de p51 presenta variantes de corte y empalme alternativo. Además, una investigación del patrón de expresión y la producción de los transcritos del gen en diversos tejidos humanos reveló que los productos de expresión (proteínas) existen como cortados y empalmados principalmente en una forma corta y una forma larga.

Basándose en la información de aminoácidos deducida a partir de las variantes de corte y empalme del ADNc de p51, la variante de corte y empalme de forma corta es el gen (gen p51A) que codifica para la proteína que presenta dicha secuencia de 448 aminoácidos (masa molecular de aprox. 50,9 kDa) y la variante de corte y empalme de forma larga es un gen que codifica para una proteína que presenta una secuencia de 641 aminoácidos (masa molecular de aprox. 71,9 kDa). En esta memoria, por motivos de conveniencia, este último gen se denomina "gen p51B humano (o resumidamente, gen p51B)" y la proteína que presenta la secuencia de aminoácidos codificada por dicho gen "proteína p51B humana (o resumidamente, proteína p51B)".

Además, en esta memoria, dicho gen p51A y gen p51B se denominan en conjunto "gen p51" y la proteína p51A y la proteína p51B se denominan en conjunto "proteína p51".

Haciendo referencia a dicha variante de corte y empalme del gen p51, se ha confirmado la existencia de una pluralidad de variantes incluido el gen defectuoso en una parte del dominio TA.

Una investigación de los productos de expresión de estos genes p51 reveló que el producto del gen p51 (proteína p51) de la presente invención muestra actividad de activación de la transcripción, actividad inhibitoria del crecimiento celular y actividad de inducción de la apoptosis que son similares a las actividades de la proteína p53. Además, se encontró que la expresión del gen p51 en tejidos humanos era más específica de tejido que la expresión del gen p53 y, en comparación con la expresión del gen p73 que también es específica de tejido, presentaba una distribución tisular más amplia aunque había un solapamiento del patrón de expresión entre ellos. Además, la mutación del gen p51 se encontró en los tejidos tumorales humanos o líneas celulares tumorales.

Los hallazgos anteriores sugieren con fuerza que el gen p51 humano es un nuevo miembro de la familia del gen

supresor de tumores p53.

Como ejemplo específico del gen p51, puede mencionarse uno que presenta la secuencia de ADN que presentan los clones (p51A, p51B) descritos en el ejemplo 1 que aparece más adelante en la presente memoria.

Como gen que presenta el clon p51A, puede mencionarse el gen (1344 nucleótidos) que codifica para la proteína de 448 residuos de SEC ID nº:1 en el LISTADO DE SECUENCIAS que aparece más adelante en la presente memoria. Específicamente, éste es un gen que presenta la secuencia de nucleótidos que corresponde a los nucleótidos 145 ~ 1488 de SEC ID nº:2, que corresponde a un marco de lectura abierto.

La secuencia de nucleótidos de longitud completa del ADNc de p51A consiste en 2816 nucleótidos tal como se muestra en la SEC ID nº: 2. El gen p51A incluye genes que contienen esta secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº:2. En la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº:2, el codón de iniciación (ATG) está situado en la posición de nucleótido 145~147 y la señal de poliadenilación (AATAA) está situada en la posición 2786~2791.

La secuencia de aminoácidos de la proteína p51A de 448 residuos codificada por el gen p51A se muestra en SEC ID nº:1. Tal como se muestra, esta proteína presenta un dominio de activación de la transcripción que corresponde a los números de aminoácido 1~59, un dominio de unión a ADN que corresponde a los números de aminoácido 142~321, y un dominio de oligomerización que corresponde a los números de aminoácido 353~397.

Se investigó la homología de cada uno de dichos dominios de la proteína p51A con el dominio correspondiente de las proteínas p53 o p73 conocidas con el programa FASTA utilizando el software de GCG (Wisconsin Sequencing Package, Genetics Computer Group) [Person, W. R. y Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 1435-1441 (1988)]. Los resultados se muestran en la tabla 1 (véanse las figuras 1 y 2). Para referencia, las homologías entre la proteína p53 y la proteína p73β tal como se determinan mediante el mismo procedimiento se muestran también en la tabla 1.

Tabla 1

	Secuencia de longitud completa	Dominio de activación de la transcripción	Dominio de unión a ADN	Dominio de oligomerización
p51A↔p53	36%	22%	60%	37%
p51A↔P73β	42%	30%	87%	65%
p53 ↔p73	28%	27%	63%	83%

Por otro lado, como gen que presenta el clon p51B, puede mencionarse un gen (1923 nucleótidos) que codifica para la proteína de 641 residuos mostrada en SEC ID nº:4 en el listado de secuencias facilitado más adelante en la presente memoria. Específicamente, éste es un gen que presenta la secuencia de nucleótidos identificada por los números de nucleótido 145~2067 de SEC ID nº: 5, que corresponde a un marco de lectura abierto.

La secuencia de nucleótidos de longitud completa de este ADNc de p51B consiste en 2270 nucleótidos tal como se muestra en SEC ID nº: 5. El gen p51B incluye genes que contienen la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº:5.

La secuencia de aminoácidos de la proteína p51B de 641 residuos codificada por el gen p51B se muestra en SEC ID nº:4. Esta proteína presenta un dominio de activación de la transcripción que corresponde a los números de aminoácido 1~59, un dominio de unión a ADN que corresponde a los números de aminoácido 142~321 y un dominio de oligomerización que corresponde a los números de aminoácido 353~397. Además, hay una secuencia adicional (dominio SAM) en la región C-terminal, aunque los números de aminoácido correspondientes no pueden identificarse. En esta memoria, la región de números de aminoácido 353~641 incluido este dominio SAM se considera como un dominio de oligomerización en un sentido amplio.

Como en el caso de la proteína p51A, se investigó la homología de la secuencia de aminoácidos de cada uno de dichos dominios de la proteína p51B con la secuencia del dominio correspondiente de la proteína p73α conocida con el programa FASTA utilizando software de GCG. Los resultados se muestran en la figura 3. En la figura 3, las partes en recuadros son secuencias de aminoácidos comunes con la proteína p51B y la proteína p73α. Por tanto, queda claro que la secuencia de aminoácidos de la proteína p51B es homóloga a la secuencia de la proteína p73α a lo largo de un amplio intervalo.

Por tanto, el gen p51 incluye un gen p51A humano que presenta una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº:1 y un gen p51B humano que presenta una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº:4. Sin embargo, el gen p51 no se limita a esos genes sino que incluye todos los homólogos de esos genes p51 humanos.

La expresión “homólogo de gen p51 humano” significa cualquier miembro de un grupo de genes interrelacionados que son análogos a dicho gen p51A o gen p51B en la secuencia de nucleótidos y/o las características estructurales y el patrón de expresión génica o análogos entre sí en las funciones biológicas particulares y productos génicos (proteínas) y, como tales, puede considerarse que constituyen una familia génica. En este sentido, variantes de corte y empalme y alelos del gen p51 humano se incluyen, por supuesto, en el concepto de dicho “homólogo”.

Como ejemplo de dicho homólogo, puede mencionarse un gen que codifica para una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos que resulta de la mutación o modificación de uno o una pluralidad de sitios de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº:1 y que presenta acciones o funciones similares a las de dicha proteína p51A que presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº:1. El preferido es un gen que codifica para una secuencia de aminoácidos que conserva al menos un grado dado de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº:1.

El grado de homología en secuencia de aminoácidos puede ser generalmente no inferior a aproximadamente el 45%, preferentemente no inferior a aproximadamente el 50%, en cuanto a la secuencia de longitud completa tal como se determina con el programa FASTA utilizando dicho software de GCG. Preferentemente, la homología debe ser no inferior a un valor dado en al menos uno del dominio de activación de la transcripción, el dominio de unión a ADN y el dominio de oligomerización. Por ejemplo, la homología en el dominio de activación de la transcripción puede ser de aproximadamente el 35% o superior, preferentemente no inferior al 45%, la homología en el dominio de unión a ADN puede ser del 88% o superior, preferentemente no inferior a aproximadamente el 90%, y la homología en el dominio de oligomerización puede ser de aproximadamente el 70% o superior, preferentemente no inferior a aproximadamente el 80%.

Por tanto, el gen incluye cualquier gen que presente una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de SEC ID nº:1 mediante delección, sustitución o adición de uno, algunos o una pluralidad de aminoácidos con la condición de que se cumplan las calificaciones mencionadas anteriormente.

La magnitud de la “delección, sustitución o adición de aminoácidos” y el sitio o sitios implicados no están particularmente restringidos en la medida en que la proteína así modificada sea funcionalmente equivalente a la proteína (proteína p51A o proteína p51B) que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº:1 ó 4. Por tanto, la expresión “actividad de p51” tal como se utiliza en esta memoria significa las actividades y funciones que presenta la proteína p51, representada por la proteína p51A o la proteína p51B, de la presente invención, incluyendo por tanto actividad inhibitoria del crecimiento de células tumorales, actividad de inducción de la apoptosis y función de regulación de la transcripción en células, entre otras.

La proteína p51 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº:1, y se considera que presenta acciones similares a las de la proteína p53 que se sabe que es un factor inhibitorio de la proliferación celular. Por tanto, la expresión “actividad de p51” tal como se utiliza en esta memoria refiriéndose a las acciones y funciones de la proteína p51 puede replantearse en los mismos términos aplicados a las características funcionales y actividades conocidas de la proteína p53.

Como acciones y funciones de la proteína p53, puede mencionarse una función de regulación de la transcripción, una función de transducción de señales que se expresa a través de su unión a otras proteínas intracelulares, la función como componente del complejo proteico relacionado con la replicación del ADN, una función de unión a ADN, actividad exonucleasa, etc., y como funciones expresadas por la interacción compuesta de dichas diversas funciones, una función de interrupción del ciclo celular, una función de inducción de la apoptosis, una función de reparación del ADN, una función de control de la replicación del ADN y/o una función de inducción de la diferenciación en células. Se considera que la proteína p51 de la presente invención presenta algunas o todas de estas acciones y funciones.

La modificación de una secuencia de aminoácidos puede ser espontánea, por ejemplo mutación espontánea o modificación postraducciona, pero puede inducirse artificialmente sobre la base de un gen nativo.

La presente memoria abarca todos los genes modificados que codifican para proteínas que presentan las características mencionadas anteriormente de la proteína p51 de la invención independientemente de la causa o medios de mutación o modificación.

Los medios para realizar dichas modificaciones artificiales incluyen técnicas de ingeniería genética tales como mutagénesis específica de sitio (dirigida al sitio) [Methods in Enzymology, 154: 350, 367-382 (1987); ditto 100: 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12: 9441 (1984); Zoku Seikagaku Jikken Koza 1 “Idenshi Kenkyuho II” [Experimental Biochemistry Series 1 “Methods for Gene Research II” (editado por la Sociedad Bioquímica Japonesa), p. 105 (1986)], etc. y técnicas sintéticas químicas tales como el procedimiento de fosfotriéster y el procedimiento de fosfoamidato [J. Am. Chem. Soc., 89: 4801 (1967); ditto 91: 3350 (1968); Science, 150: 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22: 1859 (1981); ditto 24: 245 (1983)] así como una combinación adecuada de tales técnicas. Más específicamente, la síntesis de ADN puede llevarse a cabo químicamente mediante el procedimiento de fosforamida

o el procedimiento de triéster, o en un sintetizador de oligonucleótidos automático comercial. El fragmento de cadena bicatenaria puede obtenerse sintetizando cadenas complementarias e hibridándolas entre sí en condiciones adecuadas o puede obtenerse a partir de una cadena monocatenaria sintetizada químicamente añadiendo una cadena complementaria utilizando una ADN polimerasa junto con secuencias de cebador adecuadas.

Como ejemplos específicos del gen, puede mencionarse el gen que presenta una secuencia de nucleótidos que corresponde a los números de nucleótido 145~1488 de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID n°:2 y el gen que presenta una secuencia de nucleótidos que corresponde a los números de nucleótido 145~2067 de la secuencia de SEC ID n°:5. Cada una de estas secuencias de nucleótidos representa un ejemplo de combinación de los codones que codifican para los residuos de aminoácido respectivos de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n°:1 ó 4. Por tanto, el gen no se limita a genes que presentan tales secuencias de nucleótidos específicas sino que pueden presentar secuencias de nucleótidos diseñadas utilizando una combinación de codones opcionales para cada residuo de aminoácido. La selección de codones puede hacerse de manera rutinaria, por ejemplo con referencia a la frecuencia de utilización de cada codón por el huésped que va a utilizarse [Nucleic Acids Res., 9, 43 (1981)].

Además, tal como se mencionó anteriormente, el gen incluye una secuencia de nucleótidos que presenta un grado definido de homología con la secuencia de nucleótidos que corresponde a los números de nucleótido 145~1488 [denominada resumidamente algunas veces a continuación en la presente memoria secuencia de nucleótidos (145-1488)] de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID n°:2.

Como ejemplo de dicho gen, puede mencionarse un gen que presenta una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con un ADN que presenta dicha secuencia de nucleótidos (145-1488) en condiciones rigurosas, por ejemplo en 0,2 X SSC que contiene SDS al 0,1% a 50°C o en 1 X SSC que contiene SDS al 0,1% a 60°C.

El gen puede producirse y obtenerse fácilmente mediante las técnicas de ingeniería genética convencionales [Molecular Cloning 2ª Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); Zoku Seikagaku Jikken Koza 1 "Idenshi Kenkyuho I, II, III" [Supplemental Biochemical Experimental Series 1 "Methods for Gene Research I, II, III" (editado por la Sociedad Bioquímica Japonesa), (1986), etc.] basándose en la información de secuencia en los ejemplos específicos mostrados en SEC ID n°:2.

Más particularmente, el gen objeto puede obtenerse construyendo una biblioteca de ADNc de una fuente adecuada en la que el gen de la invención puede expresarse y seleccionando el clon deseado de esta biblioteca de ADNc utilizando un anticuerpo o sonda adecuada específica para el gen de la invención de la manera conocida *per se* [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78: 6613 (1981); Science, 222: 778 (1983), etc.].

En el procedimiento anterior, la fuente de ADNc incluye pero no se limita a diversas células o tejidos en los que el gen de la invención se expresa y células cultivadas derivadas de los mismos. El aislamiento del ARN completo a partir de una fuente de este tipo, el aislamiento y la purificación de ARNm, la adquisición de ADNc y la clonación del mismo pueden llevarse a cabo todos de manera rutinaria. También están disponibles comercialmente bibliotecas de ADNc. En la práctica de la presente invención, pueden emplearse también tales bibliotecas de ADNc comerciales, por ejemplo las disponibles de Clontech Lab. Inc.

El procedimiento de selección para el gen a partir de la biblioteca de ADNc no está tampoco particularmente restringido, aunque pueden emplearse selectivamente los procedimientos convencionales.

Para ser específico, pueden mencionarse a modo de ejemplo la selección de un clon de ADNc mediante una técnica de inmunoselección utilizando un anticuerpo específico contra la proteína producida por el ADNc, la técnica de hibridación de colonias o de hibridación de placas utilizando una sonda que presenta una afinidad de unión selectiva por la secuencia de ADN objetivo, o una combinación de las mismas.

Como sonda que va a utilizarse en el procedimiento anterior, es ventajoso generalmente utilizar un ADN sintetizado químicamente según la información de secuencia de nucleótidos sobre el gen, aunque puede utilizarse con ventaja como dicha sonda, por supuesto, el propio gen que ya se ha obtenido o un fragmento del mismo. Además, pueden utilizarse como sonda de selección el cebador sentido y el cebador antisentido establecidos basándose en la información de la secuencia de nucleótidos sobre el gen p51 de la presente invención.

Para la obtención del gen, puede utilizarse también con ventaja la amplificación de ADN/ARN mediante el procedimiento de PCR [Science, 230, 1350 (1985)] o una modificación del mismo. Particularmente, en circunstancias en las que casi no puede obtenerse un ADNc de longitud completa de una biblioteca, puede utilizarse con ventaja el procedimiento de RACE [amplificación rápida de extremos de ADNc] [Jikken Igaku (Experimental Medicine), 12(6): 35 (1994)], en particular el procedimiento de 5'-RACE [Frohman, M. A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8: 8998 (1988)].

Los cebadores para su utilización en dichos procedimientos de PCR pueden establecerse de manera sensata según la información de secuencia sobre el gen p51 que se ha descubierto en la presente memoria y pueden sintetizarse

mediante el procedimiento convencional. El aislamiento y la purificación del fragmento de ARN o ADN amplificado puede llevarse a cabo mediante las técnicas convencionales mencionadas anteriormente en la presente memoria, por ejemplo mediante electroforesis en gel o hibridación.

5 La secuencia de nucleótidos del gen p51 o cualquiera de los diversos fragmentos de ADN que pueden obtenerse como anteriormente puede determinarse de manera rutinaria, por ejemplo mediante el procedimiento de didesoxi [Proc. Natl. Acad. Sci.; USA., 74: 5463 (1977)], el procedimiento de Maxam-Gilbert [Methods in Enzymology, 65: 499 (1980)] o, de manera más conveniente, por medio de un kit de secuenciación comercial.

10 Con el gen p51, por ejemplo utilizando una secuencia de nucleótidos de longitud completa o parcial de este gen, puede detectarse específicamente la expresión o no expresión del gen p51 en un ser humano u otro organismo individual o diversos tejidos del mismo.

15 Esta detección puede realizarse de manera rutinaria. Por ejemplo, pueden mencionarse determinación a nivel celular mediante amplificación de ARN mediante RT-PCR [reacción en cadena de al polimerasa con transcripción inversa; E. S. Kawasaki, *et al.*, Amplification of RNA in PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, 21-27 (1991)], análisis de transferencia de tipo Northern [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989)], RT-PCR *in situ* [Nucl. Acids Res., 21, 3159-3166 (1993)] o hibridación *in situ*, el procedimiento de NASBA [amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico, Nature, 350, 91-92 (1991)] y otras técnicas. El
20 procedimiento preferido es el procedimiento de RT-PCR-SSCP.

Los cebadores para su utilización en el procedimiento de PCR no están particularmente restringidos en la medida en que el gen p51 (incluido un ADN parcial) pueda amplificarse específicamente, y pueden establecerse de manera sensata basándose en la información de secuencia sobre el gen p51. Habitualmente, por ejemplo, pueden
25 emplearse cebadores que presentan una secuencia parcial del gen p51 y una longitud que oscila entre aproximadamente 10 y 35 nucleótidos, preferentemente 15-30 nucleótidos.

Por tanto, el gen incluye fragmentos de ADN que pueden utilizarse como cebadores específicos y/o sondas específicas para la detección del gen p51 humano.

30 Puede definirse un fragmento de ADN de este tipo como el ADN caracterizado por su capacidad para hibridar con un ADN que presenta dicha secuencia de nucleótidos (145-1488) en condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas mencionadas anteriormente pueden ser las condiciones convencionales utilizadas para cebadores y sondas y, por ese motivo, no se restringen particularmente sino a las condiciones anteriormente mencionadas, concretamente
35 pueden mencionarse por ejemplo 0,2 X SSC que contiene SDS al 0,1% a 50°C o 1 X SSC que contiene SDS al 0,1% a 60°C.

Con el gen p51 humano, la proteína que comprende el producto génico correspondiente (proteína p51) puede producirse a gran escala y con buena reproducibilidad utilizando la tecnología de ingeniería genética convencional.

40 (2) La proteína p51

La presente invención, por tanto, proporciona la proteína p51 codificada por el gen descrito anteriormente.

45 La proteína de la presente invención es la proteína p51A que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n°:1 Sin embargo, debe entenderse que la proteína de la presente invención no se limita a dicha proteína p51A y proteína p51B sino que también incluye sus homólogos. Más particularmente, pueden mencionarse los productos génicos de dichos homólogos del gen p51 (genes relacionados con p51 incluyendo alelos y variantes de corte y empalme).

50 La proteína de la presente invención puede prepararse mediante la tecnología de ADN recombinante convencional [por ejemplo Science, 224, 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 5990 (1983), etc.] basándose en la información de secuencia del gen p51 humano proporcionada por la presente invención.

55 (3) El polipéptido que contiene uno o más dominios funcionales de la proteína p51

La presente memoria se refiere además a un polipéptido que contiene una región parcial de dicha proteína p51.

60 El polipéptido presenta preferentemente la secuencia de aminoácidos que corresponde a cualquiera de dichas regiones funcionales diversas de la proteína p51 y, específicamente, puede mencionarse un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que corresponde a al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en el dominio de activación de la transcripción, el dominio de unión a ADN y el dominio de oligomerización de la proteína p51.

65 Tal como se mencionó anteriormente, las ubicaciones del dominio de activación de la transcripción, el dominio de

unión a ADN y el dominio de oligomerización de la proteína p51 pueden identificarse mediante los números de aminoácido 1~59, los números de aminoácido 142~321 y los números de aminoácido 353~397, respectivamente, de la secuencia de aminoácidos de la proteína p51A que se muestra en SEC ID nº:1.

5 Por tanto, el polipéptido incluye lo siguiente.

(i) Un polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos que corresponde a los números de aminoácido 1~59 de SEC ID nº: 1 (denominada resumidamente a continuación en la presente memoria secuencia de aminoácidos 1 (1-59)) y su equivalente.

10 El equivalente mencionado justo anteriormente incluye cualquier polipéptido que presente una secuencia de aminoácidos derivada de dicha secuencia de aminoácidos 1 (1-59) mediante delección, sustitución o adición de uno o una pluralidad de aminoácidos y que presenta una función de activación de la transcripción. La magnitud de la modificación o mutación de la secuencia de aminoácidos no está particularmente restringida en la medida en que el polipéptido modificado conserve dicha función de activación de la transcripción. Preferentemente, sin embargo, la homogeneidad de la secuencia así modificada con respecto a la secuencia de aminoácidos 1 (1-59) no es inferior a aproximadamente el 35%, particularmente no inferior al 45%.

15 (ii) Un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos identificada por los números de aminoácido 142~321 de SEC ID nº:1 (denominada resumidamente a continuación en la presente memoria secuencia de aminoácidos 1 (142-321)) y su equivalente.

20 El equivalente mencionado anteriormente incluye cualquier polipéptido que presente una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos 1 (142-321) mediante delección, sustitución o adición de uno o una pluralidad de aminoácidos y que presenta dicha función de unión a ADN. La magnitud de la modificación o mutación de la secuencia de aminoácidos no está particularmente restringida en la medida en que la secuencia modificada conserve la actividad de unión a ADN pero la secuencia presente preferentemente una homología de no menos de aproximadamente el 88%, más preferentemente no menos del 90% con respecto a la secuencia de aminoácidos 1 (142-321).

25 (iii) Un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos identificada mediante los números de aminoácido 353~397 de SEC ID nº:1 (denominada resumidamente a continuación en la presente memoria secuencia de aminoácidos 1 (353-397) y su equivalente.

30 Este equivalente incluye un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos derivada de dicha secuencia de aminoácidos 1 (353-397) mediante delección, sustitución o adición de uno o una pluralidad de aminoácidos y que presenta una función de oligomerización, por ejemplo el dominio de oligomerización en un sentido amplio (es decir, los números de aminoácido 353~641 de SEC ID nº:4) de la proteína p51. La magnitud de la modificación o mutación de la secuencia de aminoácidos no está particularmente restringida en la medida en que la secuencia así modificada conserve la función de oligomerización pero preferentemente conserve una homología de no menos de aproximadamente el 70%, más preferentemente de no menos del 80%, con respecto a la secuencia de aminoácidos 1 (353-397).

35 El polipéptido puede ser un polipéptido que contiene cualquiera de dicha secuencia de aminoácidos 1 (1-59) o un equivalente de la misma, dicha secuencia de aminoácidos 1 (142-321) o un equivalente de la misma y dicha secuencia de aminoácidos 1 (353-397) o un equivalente de la misma en una región o un polipéptido que contiene dos o más de dichas secuencias de aminoácidos en una combinación opcional o bien como una región continua o bien como una región discontinua.

40 La presente memoria incluye además genes (ADN) que presentan secuencias de oligonucleótidos que codifican para tales polipéptidos. Más particularmente, la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha secuencia de aminoácidos 1 (1~59) es la secuencia de nucleótidos que corresponde a los números de nucleótido 145~321 de SEC ID nº:2; la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha secuencia de aminoácidos 1 (142-321) es la secuencia de nucleótidos que corresponde a los números de nucleótido 568~1107 de SEC ID nº:2; y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha secuencia de aminoácidos 1 (353~397) es la secuencia de nucleótidos que corresponde a los números de nucleótido 1201~1335 de SEC ID nº:2.

45 (4) Procedimiento de producción de la proteína p51 y los materiales para su uso en su producción

50 La presente memoria proporciona además un procedimiento de producción de dicha proteína p51 y los materiales que van a utilizarse para su producción, por ejemplo, un vector que alberga dicho gen y células huésped transformadas con dicho vector.

55 Más particularmente, la producción de dicha proteína se lleva a cabo según el procedimiento que comprende construir un vector recombinante (vector de expresión) en el que el gen que codifica para la proteína deseada puede

expresarse, transformar células huésped con el constructo resultante, cultivar los transformantes así obtenidos y recoger la proteína deseada del cultivo obtenido.

Como dichas células huésped, puede emplearse cualquiera de células eucariotas y células procariotas.

Las células eucariotas incluyen células de vertebrados y levaduras, entre otras. Entre las primeras células, pueden mencionarse como ejemplo la línea celular de mono COS [Cell, 23: 175 (1981)], células de ovario de hámster chino y la línea defectuosa en dihidrofolato reductasa de la misma [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 77: 4216 (1980)]. Como las últimas células, pueden mencionarse células de levaduras que pertenecen al género *Saccharomyces* aunque estas no son elecciones exclusivas.

Como huésped procariota, se emplean comúnmente diversos procariotas, tales como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, pueden emplearse libremente. Las células huésped preferidas son las derivadas de *Escherichia coli*, particularmente células de *E. coli* K12.

El vector de expresión no está particularmente restringido en la medida que albergue el gen de la presente invención y permita la expresión de dicho gen pero se selecciona generalmente con referencia a las clases de células huésped.

Cuando se utilizan células de un vertebrado como células huésped, generalmente puede utilizarse un vector de expresión que presenta una región promotora en el sentido de 5' del gen de la invención, un sitio de corte y empalme del ARN, un sitio de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción y, cuando sea necesario, puede incluir también un origen de replicación. Como ejemplo de tal vector de expresión, puede mencionarse pSV2dhfr [Mol. Cell. Biol., 1, 854 (1981)] que presenta el promotor temprano de SV40.

Cuando se utilizan células de microorganismos eucariotas tales como levaduras como células huésped, el vector de expresión que puede utilizarse incluye pAM82 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 1 (1983)] que presenta el promotor del gen de fosfatasa ácida, y el vector para su uso en la presente invención puede prepararse insertando el gen de la invención en el sentido de 5' de este promotor. Preferentemente, puede utilizarse un vector de fusión obtenible mediante hibridación con un gen procariota y, como ejemplos específicos de tal vector, pueden mencionarse pGEX-2TK y pGEX-4T-2 que presentan cada uno un dominio GST con un peso molecular de 26000 (derivado de *S. japonicum*).

Cuando se utilizan células procariotas como células huésped, el vector de expresión puede ser por ejemplo un vector equipado con una región promotora y una secuencia SD (Shine-Dalgarno) en el sentido de 5' del gen de modo que el gen puede expresarse en las mismas y adicionalmente un codón de iniciación (por ejemplo ATG) necesario para la iniciación de la síntesis de proteínas. Particularmente cuando se utilizan células de *Escherichia coli* (por ejemplo *Escherichia coli* K12) como células huésped, se utiliza a menudo como vector generalmente pBR322 como tal o modificado. Sin embargo, no hay elecciones exclusivas sino que pueden emplearse también otras cepas bacterianas conocidas y vectores conocidos. Como promotor, puede emplearse el promotor de triptófano (trp), el promotor lpp, el promotor lac, el promotor PL/PR, etc.

El procedimiento de introducción de dicho vector de expresión en la células huésped (procedimiento de transformación) no está particularmente restringido, tampoco, aunque pueden utilizarse diversos procedimientos normalizados.

El cultivo del transformante resultante puede realizarse también de manera rutinaria. Mediante tal cultivo, la proteína objeto codificada por el gen se expresa, se produce y se acumula en la célula transformante o se secreta extracelularmente o sobre la membrana celular.

El medio para dicho cultivo puede seleccionarse de manera sensata de entre los medios de cultivo convencionales según el tipo de células huésped adoptado, y el cultivo también puede llevarse a cabo en condiciones adecuadas para el crecimiento de las células huésped.

La proteína recombinante así producida puede aislarse y purificarse opcionalmente mediante diversos procedimientos de aislamiento utilizando sus propiedades físicas, químicas u otras [Seikagaku (Biochemical) Data Book II, págs.1175-1259, 1ª Ed., 1ª impresión, 23 de junio de 1980, Tokyo Kagaku Dojin; Biochemistry, 25 (25): 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163: 313 (1987); etc.].

Los procedimientos mencionados anteriormente de manera específica incluyen el tratamiento de reconstitución convencional, el tratamiento con un agente de precipitación de proteínas (precipitación con sales), centrifugación, el procedimiento de choque osmótico, rotura sónica, ultrafiltración, diversas clases de cromatografía, por ejemplo cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), etc., diálisis y sus combinaciones. El procedimiento particularmente preferido es cromatografía de afinidad utilizando una columna conjugada con un anticuerpo específico contra la proteína.

En el diseño del gen objeto que codifica para la proteína, pueden utilizarse con ventaja la secuencia de nucleótidos del gen p51A humano tal como se identifica mediante la secuencia de nucleótidos (145-1488) en SEC ID n°:2 o la secuencia de nucleótidos del gen p51B humano tal como se identifica mediante la secuencia de nucleótidos (145-2067) en SEC ID n°:5. Si se desea, este gen puede utilizarse con los codones que designan residuos de aminoácido respectivos cambiados de manera sensata.

Además, la modificación parcial de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen p51A humano o el gen p51B humano mediante la sustitución, delección o adición de algunos de los residuos de aminoácido de una secuencia parcial dada puede lograrse mediante las diversas técnicas mencionadas anteriormente en la presente memoria, por ejemplo mediante mutagénesis específica de sitio.

La proteína puede sintetizarse mediante la tecnología convencional para la síntesis química según la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n°:1

Esta tecnología incluye los procedimientos en fase líquida y en fase sólida para la síntesis de péptidos.

Más particularmente, la tecnología sintética incluye el denominado procedimiento de alargamiento por etapas en el que se acoplan secuencialmente un aminoácido tras otro entre sí según la información de secuencia de aminoácidos y el procedimiento de condensación de fragmentos en el que se sintetizan de antemano fragmentos que consisten cada uno en varios aminoácidos y luego se acoplan entre sí. El polipéptido puede sintetizarse mediante cualquiera de los procedimientos alternativos anteriores.

El procedimiento de condensación para su uso en la síntesis de péptidos anterior puede ser también el convencional, que incluye pero no se limita a el procedimiento de azida, el procedimiento de anhídrido de ácido mixto, el procedimiento de DCC, el procedimiento de éster activado, el procedimiento redox, el procedimiento de DPPA (difenilfosforilazida), el procedimiento de DCC + aditivo de (1-hidroxibenzotriazol, N-hidroxisuccinamida, N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida o similar) y el procedimiento de Woodward.

El disolvente para su utilización en estos procedimientos puede seleccionarse también de manera sensata de entre los disolventes comunes que conocen bien los expertos en la técnica de la condensación de péptidos. Como ejemplos, N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), hexafluoramida, dioxano, tetrahydrofurano (THF), acetato de etilo, etc. y disolventes mixtos de los mismos.

Los grupos carboxilo de aminoácidos o péptidos que no participan en la reacción para dicha síntesis de péptidos pueden protegerse generalmente mediante esterificación, por ejemplo en forma de un éster de alquilo inferior, por ejemplo, éster metílico, éster etílico, éster terc-butílico o similar, o un éster aralquílico, por ejemplo éster bencílico, éster p-metoxibencílico, éster p-nitrobencílico o similar.

El aminoácido que presenta un grupo funcional en su cadena lateral, por ejemplo el grupo hidroxilo del residuo de tirosina, puede protegerse con un grupo acetilo, bencilo, benciloxicarbonilo, terc-butilo u otro, aunque esta protección no es indispensable. Además, el grupo guanidino de un residuo de arginina, por ejemplo, puede protegerse con un grupo protector adecuado tal como nitro, tosilo, p-metoxibencenosulfonilo, metilen-2-sulfonilo, benciloxi-carbonilo, isoborniloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo o similar.

Las reacciones de desprotección de tales aminoácidos, péptidos y proteína de producto final protegidos de la presente invención para la eliminación de los grupos protectores puede llevarse a cabo también mediante el procedimiento convencional, por ejemplo el procedimiento de reducción catalítica o el procedimiento que utiliza amoniaco líquido/sodio, fluoruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, cloruro de hidrógeno, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico, ácido metanosulfónico o similar.

La proteína así producida puede purificarse mediante el procedimiento que se utiliza convenientemente en el campo de la química de péptidos, tal como dichos diversos procedimientos, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de reparto, cromatografía de permeación en gel, distribución en contracorriente, etc.

La proteína puede utilizarse con ventaja como inmunógeno en la preparación de un anticuerpo específico frente a la proteína p51, y utilizando un inmunógeno de este tipo, pueden obtenerse el anticuerpo monoclonal y antisuero (anticuerpo policlonal) deseados.

La tecnología de producción de anticuerpos como tal la entienden bien los expertos en la técnica y, en la práctica de la presente invención, también, pueden utilizarse los procedimientos convencionales [por ejemplo Zoku Seikagaku Jikken Koza (Supplemental Biochemical Experimental Series), Methods for Immunobiochemical Research, ed. por Japanese Biochemical Society (1986)]. El anticuerpo así obtenido puede utilizarse con ventaja, por ejemplo en la purificación de la proteína p51 y la caracterización o el ensayo inmunológicos de la proteína.

Además, la proteína encuentra aplicación en el campo farmacéutico, en la fabricación de productos farmacéuticos

que la contienen como componente activo.

(5) Composiciones farmacéuticas que contienen la proteína p51

5 La presente memoria, por tanto, se refiere además a dichos productos farmacéuticos que contienen la proteína

La proteína mencionada anteriormente incluye su sal farmacéuticamente aceptable. Tal sal incluye sales de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos y de amonio no tóxicas, tales como sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, bario y amonio. Además, dicha sal incluye sales de adición de ácidos no tóxicas que pueden obtenerse haciendo reaccionar el péptido de la invención con un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Las sales de adición de ácidos no tóxicas representativas son el clorhidrato, bromhidrato, sulfato, bisulfato, acetato, oxalato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, p-toluenosulfonato (tosilato), citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, sulfonato, glicolato, ascorbato, bencenosulfonato y naftalato, entre otras.

15 La presente memoria comprende además una composición farmacéutica o forma farmacéutica que contiene una cantidad farmacológicamente eficaz de la proteína como un principio activo junto con un diluyente o portador farmacéutico no tóxico adecuado.

20 El portador farmacéutico que puede utilizarse en dicha composición farmacéutica (o forma farmacéutica) incluye los diluyentes y excipientes que se utilizan comúnmente según el modo de utilización de la preparación farmacéutica, tal como una carga, un adyuvante de volumen, un humectante, un disgregante, un tensioactivo, un lubricante, etc. y éstos se emplean selectivamente según la forma farmacéutica unitaria de la composición farmacéutica.

25 La preparación farmacéutica particularmente preferida se produce utilizando diversas sustancias de formulación que pueden incorporarse en la preparación de proteínas convencional, tales como el estabilizante, el bactericida, el tampón, el agente isotónico, el agente quelante, el agente de control del pH, el tensioactivo, etc., en proporciones adecuadas.

30 El estabilizante mencionado anteriormente incluye pero no se limita a albúmina sérica humana, L-aminoácidos ordinarios, sacáridos y derivados de celulosa y éstos pueden utilizarse independientemente o en combinación con un tensioactivo o similar. Particularmente en la utilización en combinación, la estabilidad del principio activo puede mejorarse adicionalmente en ciertos casos.

35 Los L-aminoácidos mencionados anteriormente no están particularmente restringidos sino que pueden ser glicina, cisteína, ácido glutámico y así sucesivamente.

40 Los sacáridos mencionados anteriormente incluyen monosacáridos tales como glucosa, manosa, galactosa, fructosa, etc., alcoholes de azúcar tales como manitol, inositol, xilitol, etc. disacáridos tales como sacarosa, maltosa, lactosa, etc., polisacáridos tales como dextrano, hidroxipropilalmidón, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, etc., y sus derivados.

45 El tensioactivo no está particularmente restringido, tampoco. Por tanto, pueden mencionarse tensioactivos iónicos y tensioactivos no iónicos, tales como tensioactivos de la serie de éster alquílico de polioxietilenglicolsorbitano, alquil éter de polioxietileno, éster monoacílico de sorbitano y glicéridos de ácidos grasos.

Los derivados de celulosa no están particularmente restringidos, tampoco, sino que pueden mencionarse metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, etc.

50 El nivel de adición adecuado del sacárido por 1 µg del principio activo no es inferior a aproximadamente 0,0001 mg, preferentemente de manera aproximada 0,01-10 mg. El nivel de adición del tensioactivo por 1 µg del principio activo puede ser adecuadamente no inferior a aproximadamente 0,00001 mg, preferentemente de manera aproximada 0,0001-0,01 mg. El nivel de adición de albúmina sérica humana por 1 µg del principio activo puede ser adecuadamente no inferior a aproximadamente 0,0001 mg, preferentemente en algún punto dentro del intervalo de aproximadamente 0,001-0,1 mg. El nivel de adición de dicho aminoácido por pg del principio activo es adecuadamente de aproximadamente 0,001-10 mg. El nivel de adición del derivado de celulosa por µg de principio activo es adecuadamente no inferior a aproximadamente 0,00001 mg, preferentemente de manera aproximada 0,001-0,1 mg.

60 La cantidad del principio activo en la forma de dosificación farmacéutica puede seleccionarse libremente a partir de un amplio intervalo pero puede seleccionarse de manera sensata generalmente a partir del intervalo de aproximadamente el 0,00001-70% en peso, preferentemente de manera aproximada el 0,0001-5% en peso.

65 La forma de dosificación farmacéutica puede complementarse con diversos aditivos, tales como un tampón, un agente isotónico, un agente quelante, etc. El tampón mencionado anteriormente incluye ácido bórico, ácido fosfórico,

ácido acético, ácido cítrico, ácido ϵ -aminocaproico, ácido glutámico, etc. y/o las sales correspondientes (sales de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, por ejemplo sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, etc.). El agente isotónico incluye pero no se limita a cloruro de sodio, cloruro de potasio, azúcares y glicerina. El agente quelante incluye edetato de sodio y ácido cítrico, entre otros.

5 La composición farmacéutica puede utilizarse no sólo tal como está en forma de una disolución sino también proporcionada en forma de un producto liofilizado que puede conservarse y reconstituirse de manera extemporánea con agua o una disolución tampón incluida una solución salina fisiológica hasta una concentración adecuada.

10 La forma farmacéutica para la composición farmacéutica puede seleccionarse de diversas alternativas según el fin terapéutico, e incluye formas farmacéuticas sólidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos, polvos finos, gránulos, cápsulas, etc. y formas farmacéuticas líquidas, tales como disoluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. Estas formas farmacéuticas pueden clasificarse adicionalmente como formas farmacéuticas orales, parenterales, transnasales, rectales (supositorio) y sublinguales, pomadas y otros productos, y cada producto
15 puede fabricarse según la formulación establecida y el procedimiento de moldeo/procesamiento.

Considerando la fabricación de comprimidos como ejemplo, el portador farmacéutico que puede utilizarse incluye diversos excipientes tales como lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, urea, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa cristalina, ácido silícico, fosfato de potasio, etc.; aglutinantes tales como agua, etanol, propanol, jarabe simple, disolución de glucosa, disolución de almidón, disolución de gelatina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. disgregantes tales como carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa cálcica, hidroxipropilcelulosa de bajo grado de sustitución, almidón seco, alginato de sodio, polvo de agar, polvo de laminarina, hidrogenocarbonato de sodio, carbonato de calcio, etc.; tensioactivos tales como ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano, laurilsulfato de sodio, estearilmonoglicérido, etc.; inhibidores de la
20 disgregación tales como sacarosa, estearina, manteca de cacao, aceite hidrogenado, etc.; promotores de la absorción tales como bases de amonio cuaternario, laurilsulfato de sodio, etc.; humectantes tales como glicerina, almidón, etc.; adsorbentes tales como almidón, lactosa, caolín, bentonita, sílice coloidal, etc.; y lubricantes tales como talco purificado, sales de estearato, polvo de ácido bórico, polietilenglicol y así sucesivamente.

30 Además, pueden recubrirse opcionalmente comprimidos con un material de recubrimiento habitual para proporcionar comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos recubiertos de gelatina, comprimidos con recubrimiento entérico, comprimidos recubiertos con película, etc. o incluso procesarse para dar comprimidos de múltiples capas tales como comprimidos de doble capa.

35 Pueden fabricarse píldoras utilizando diversos portadores farmacéuticos incluidos excipientes tales como glucosa, lactosa, almidón, manteca de cacao, aceite vegetal hidrogenado, caolín, talco, etc.; aglutinantes tales como goma arábica, polvo de tragacanto, gelatina, etanol, etc.; y disgregantes tales como laminarina, agar y así sucesivamente.

Pueden prepararse cápsulas combinando el principio activo de la presente invención con dichos diversos portadores farmacéuticos y llenando vainas de cápsulas, tales como vainas de cápsulas de gelatina dura o vainas de cápsulas blancas, con la composición resultante.

40 Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen disoluciones, emulsiones, jarabes, elixires, etc. farmacéuticamente aceptables preparados utilizando el diluyente inerte convencional, tal como agua, y pueden contener adicionalmente agentes auxiliares tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión. Estas formas farmacéuticas pueden fabricarse mediante el procedimiento convencional.

Pueden fabricarse formas farmacéuticas líquidas para administración parenteral o no oral, tales como suspensiones, emulsiones y disoluciones acuosas o no acuosas estériles, utilizando un diluyente tal como agua, alcohol etílico, propilenglicol, polietilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polioxilado, éster de ácido graso de polioxietilensorbitano, un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva, y puede formularse con un éster orgánico inyectable, tal como oleato de etilo. Además, tales preparaciones pueden complementarse con el solubilizante, tampón, agente humectante, emulsionante, agente de suspensión, conservante, dispersante convencional y otros aditivos.

50 La esterilización puede llevarse a cabo mediante filtración a través de un filtro bacteriano, formulación de un bactericida, irradiación, calentamiento o similar. Además, dichas preparaciones pueden procesarse para dar formas farmacéuticas sólidas estériles que pueden disolverse de manera extemporánea en agua estéril o un medio esterilizable adecuado.

60 En la fabricación de supositorios rectales o una forma farmacéutica para administración vaginal, puede emplearse una base de pomada farmacéutica tal como polietilenglicol, manteca de cacao, un alcohol superior, un éster de alcohol superior, gelatina, glicérido semisintético o similar.

65 En la fabricación de pomadas incluidas pastas, cremas y geles, pueden emplearse diluyentes tales como vaselina blanca, parafina, glicerina, derivados de celulosa, propilenglicol, polietilenglicol, aceite de silicona, bentonita y aceites

vegetales tales como aceite de oliva.

Pueden prepararse composiciones para administración transnasal o sublingual con el excipiente convencional bien conocido de la manera convencional.

Cuando sea necesario, pueden incorporarse agentes colorantes, conservantes, agentes aromatizantes, correctores, edulcorantes y otras sustancias medicinales en los productos farmacéuticos de la presente invención.

El procedimiento de administración de dicho producto farmacéutico no está particularmente restringido sino que debe seleccionarse de manera sensata según la forma farmacéutica, factores del paciente tales como edad y sexo, gravedad de la enfermedad y otros factores. Por ejemplo, dichos comprimidos, píldoras, disoluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos y cápsulas se administran por vía oral. El producto parenteral se utiliza solo o mezclado con una infusión convencional, tal como una infusión de glucosa o aminoácidos, y se administra por vía intravenosa o, cuando sea necesario, se administra solo por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal. Los supositorios se administran por vía rectal; la preparación vaginal se administra al interior de la vagina. La preparación transnasal se administra al interior de los orificios nasales; los comprimidos sublinguales se administran por vía bucal; y las pomadas se administran de manera tópica por vía transdérmica.

La cantidad de la proteína en el producto farmacéutico y la dosificación del mismo no están particularmente restringidos sino que pueden seleccionarse de manera sensata de un amplio intervalo según el efecto terapéutico esperado, el procedimiento de administración, la duración o el ciclo de tratamiento, factores del paciente tales como edad y sexo, y otros factores. Generalmente, la dosificación es habitualmente de aproximadamente 0,01 µg ~ 10 mg/kg de peso corporal/día, preferentemente de aproximadamente 0,1 µg ~ 1 mg/kg de peso corporal/día, y esta cantidad puede administrarse una vez o en unas cuantas dosis divididas al día.

(6) Terapia génica

La presente memoria proporciona además un procedimiento de terapia génica que utiliza el gen p51 humano. Este procedimiento terapéutico puede considerarse como un procedimiento para conferir funciones del gen p51 de tipo natural a las células que albergan un gen p51 mutante. Confiriendo las funciones normales que presentan de manera inherente el producto génico o gen p51 de tipo natural a células, puede inhibirse el crecimiento neoplásico de las células diana/receptoras. El gen p51 de tipo natural mencionado anteriormente puede transferirse a las células objetivo por medio de un vector o plásmido que puede mantener el gen de manera extracromosómica. En este caso, el gen particular se expresa a partir del exterior del cromosoma.

En la introducción del gen p51 en células que albergan un gen p51 mutante de este tipo para hacer que se exprese una proteína p51 normal en las células receptoras, no es necesario que el gen p51 presente una secuencia de longitud completa sino que puede ser dicho gen modificado en tanto que este último presente funciones deseadas sustancialmente homólogas con respecto al gen no modificado. Como alternativa, puede emplearse un gen que presenta una secuencia parcial que conserva ciertas de tales funciones. Como ejemplo del gen mencionado justo anteriormente, puede mencionarse un gen que codifica para una parte de la proteína p51 que es necesaria para el crecimiento no tumoral de células (inhibición del crecimiento celular).

El gen p51 de tipo natural o un fragmento del mismo se introduce preferentemente en células mutantes de tal manera que tenga lugar una recombinación con el gen p51 mutante endógeno. Para una recombinación de este tipo, se dice que se requiere la aparición de una recombinación doble que corrija la mutación del gen p51.

Los vectores que pueden utilizarse en la transferencia del gen objeto para tanto tal recombinación como mantenimiento extracromosómico del gen se conocen ya en la técnica y puede utilizarse cualquiera de los vectores conocidos en la práctica de la misma. Por ejemplo, puede mencionarse un vector de virus o vector de plásmido que alberga una copia del gen p51 ligado a un elemento de control de la expresión y que puede garantizar la expresión del producto génico dentro de las células. Como un vector de este tipo, pueden utilizarse generalmente los vectores de expresión mencionados anteriormente aunque preferentemente vectores construidos utilizando vectores fuente tales como los vectores dados a conocer en la patente US nº 5.252.479 y el documento PCT WO 93/07282 (pWP-7A, pWP-19, pWU-1, pWP-8A; pWP-21 y/o pRSVL, entre otros) o pRC/CMV (Invitrogen). Los más preferidos son los diversos vectores de virus descritos a continuación en la presente memoria.

Como promotor para el vector que va a utilizarse en terapia génica, pueden utilizarse con ventaja los promotores intrínsecos a los tejidos diana afectados en diversas enfermedades.

Pueden mencionarse a continuación ejemplos específicos. Para el hígado, por ejemplo, pueden mencionarse a modo de ejemplo albúmina, α -fetoproteína, α 1-antitripsina, transferrina, transtiretina, etc. Para el colon, pueden mencionarse carboxil anhidrasa I, antígeno carcinoembrionario, etc. Para el útero y la placenta, pueden mencionarse estrógeno, aromatasa, citocromo P450, P450 que escinde la cadena lateral del colesterol, 17 α -hidroxilasa P450, etc.

Para la próstata, pueden mencionarse antígeno prostático, gen gp91-fox, calicreína específica de próstata, etc. Para

la mama, pueden mencionarse erb-B2, erb-B3, β -caseína, β -lactoglobulina, proteína de suero, etc. Para el pulmón, pueden mencionarse la proteína activadora C, uroglobulina, entre otros. Para la piel, pueden mencionarse K-14-queratina, queratina humana 1 ó 6, leucrina, etc.

Para el cerebro, pueden mencionarse la proteína ácida fibrilar neuroglial, proteína específica de astrocitos maduros, mielina, tirosina hidroxilasa, vilina pancreática, glucagón, polipéptido amiloide de islotes de Langerhans, etc. Para el tiroides, pueden mencionarse tiroglobina, calcitonina, etc. Para el hueso, pueden mencionarse colágeno α 1, osteocalcina, sialoglicoproteína ósea, etc. Para el riñón, pueden mencionarse, renina, fosfatasa alcalina hepática/ósea/renal, eritropoyetina, etc. Para la pancreasa, pueden mencionarse amilasa, PAP1, etc.

El gen (la totalidad o un fragmento) que va a utilizarse para la construcción de un vector de transferencia génica puede producirse y obtenerse fácilmente mediante la tecnología de ingeniería genética convencional basándose en la información de secuencia de nucleótidos sobre el gen p51 tal como se mencionó anteriormente en la presente memoria.

La introducción de un vector de transferencia génica en células puede llevarse a cabo mediante diversas técnicas alternativas conocidas por los expertos en la técnica, tales como electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, transducción viral y así sucesivamente. Las células transformadas con el gen p51 de tipo natural pueden utilizarse tal como están en forma aislada como agente para la supresión de tumores o la inhibición de la metástasis del cáncer o como sistema modelo para la investigación de compuestos terapéuticos.

En terapia génica, dicho vector de transferencia génica puede introducirse en las células tumorales de un paciente mediante administración tópica al sitio tumoral o mediante administración sistémica al paciente mediante inyección. Mediante administración sistémica, puede provocarse que el gen llegue a cualquier célula tumoral metastatizable a otros sitios. Si las células transformadas no pueden captarse permanentemente en los cromosomas de las células tumorales diana, la administración anterior puede repetirse periódicamente.

El procedimiento de terapia génica incluye tanto el procedimiento *in vivo* que comprende administrar un material para dicha transferencia génica (vector de transferencia génica) directamente al cuerpo como el procedimiento *ex vivo* que comprende extraer las células diana del cuerpo del paciente, introducir el gen de manera extracorpórea y devolver las células al cuerpo.

Una posible alternativa adicional es una terapia génica utilizando una ribozima que comprende introducir el gen p51 humano directamente en las células y escindir la cadena de ARN con la ribozima que es una molécula activa.

El vector de transferencia génica que alberga el gen p51 humano o un fragmento del mismo y un agente génico-terapéutico que comprende células transformadas con el gen humano por medio de dicho vector como principio activo se dirige especialmente a la terapia de cánceres, aunque la terapia génica (tratamiento) mencionado anteriormente puede aplicarse también a la terapia de enfermedades hereditarias y enfermedades virales tales como SIDA, así como para el fin de marcaje génico.

Las células diana a las que se transfiere el gen pueden seleccionarse de manera sensata según el objetivo de la terapia génica (tratamiento). Por ejemplo, como células diana, pueden mencionarse no solo células cancerosas y tejidos tumorales, sino también linfocitos, fibroblastos, hepatocitos, células madre hematopoyéticas y otras células.

El procedimiento de introducción del gen en las células en la terapia génica incluye un procedimiento de transferencia viral y un procedimiento de transferencia no viral.

Como procedimiento de transferencia no viral, puede utilizarse, por ejemplo, el procedimiento que utiliza un vector de retrovirus, en vista del hecho de que el gen p51 humano es un gen foráneo que se expresa en células normales. Como otros vectores de virus, pueden mencionarse vector de adenovirus, vector de VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), vector de virus adenoasociado (VAA), vector de virus del herpes, vector del virus del herpes simple (VHS) y vector de virus de Epstein-Barr (VEB), etc.

El procedimiento de transferencia génica no viral incluye el procedimiento de coprecipitación con fosfato de calcio; el procedimiento con liposomas de fusión de membranas que comprende fusionar liposomas que contienen ADN con un virus Sendai inactivado mediante exposición a radiación UV para la destrucción de los genes para construir liposomas de fusión de membranas e introducir el ADN en células mediante fusión directa con la membrana celular [Kato, K., *et al.*, J. Biol. Chem., 266, 22071-22074 (1991)]; el procedimiento que comprende recubrir el ADN de plásmido con oro e introducir el ADN físicamente en las células mediante descarga de alto voltaje [Yang, N. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 9568-9572 (1990)]; el procedimiento de ADN desnudo en el que el ADN de plásmido se inyecta directamente en un órgano o tumor *in vivo* [Wolff, J. A., *et al.*, Science, 247, 1465-1467 (1990)]; el procedimiento de liposomas catiónicos en el que el gen atrapado en liposomas multilamelares cargados positivamente se introduce en las células [Yagi, K., Advance in Medicine, vol. 175, n.º 9, 635-637 (1995)]; y el procedimiento de complejo de ligando-ADN en el que un ligando que se une a un receptor expresado en las células diana se acopla al ADN de modo que el gen puede introducirse exclusivamente en las células seleccionadas y no en

otras células y se administra el complejo resultante [Frindeis, *et al.*, Trends Biotechnol., 11, 202 (1993) ; Miller, *et al.*, FASEB J., 9, 190 (1995)] entre otros.

El procedimiento de complejo de ligando-ADN mencionado anteriormente incluye el procedimiento que comprende utilizar el receptor de asialoglicoproteína expresado en células hepáticas como diana y una asialoglicoproteína como ligando [Wu, *et al.*, J. Biol. Chem., 266, 14338 (1991); Ferkol, *et al.*, FASEB J., 7, 1081-1091 (1993)] y el procedimiento que comprende utilizar el receptor de transferrina expresado a un alto nivel en células tumorales como diana y transferrina como ligando [Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 87, 3410 (1990)], entre otros.

Además, el procedimiento de transferencia génica que puede utilizarse puede ser una combinación adecuada de dichos procedimientos de transferencia génica física y biológica. Como tal procedimiento de combinación, puede mencionarse el procedimiento en el que un plásmido de ADN que presenta un tamaño dado se utiliza en combinación con un anticuerpo conjugado con polilisina específico para la proteína de hexón de adenovirus. Según este procedimiento, el complejo formado se une al vector de adenovirus y el complejo trimolecular resultante puede utilizarse para infectar células y de ese modo transferir el gen. Según este procedimiento, puede tener lugar una unión eficaz, endogenización y degradación en endosomas antes de que se dañe el ADN acoplado al vector de adenovirus. Además, dicho complejo de liposoma/ADN puede mediar la transferencia génica *in vivo*.

A continuación, se describen el procedimiento de construcción de un vector de adenovirus para la transferencia del gen y el procedimiento de introducción del gen en las células diana o el tejido diana.

El sistema de vector de retrovirus comprende el vector de virus y células auxiliares (células de empaquetamiento). Las células auxiliares mencionadas anteriormente son células en las que se han expresados genes tales como la proteína gag estructural de retrovirus (la proteína estructural en la partícula de virus), pol (transcriptasa inversa) y env (proteína de la envuelta) pero no se han formado partículas de virus. Por otro lado, el vector de virus presenta una señal de empaquetamiento y LTR (repeticiones terminales largas) pero carece de genes estructurales necesarios para la replicación del virus, tales como gag, pol y env. La señal de empaquetamiento es una secuencia que sirve como etiqueta en el ensamblaje de una partícula de virus y los genes selectivos (neo, hyg) y el gen deseado (gen p51 o un fragmento del mismo) incorporados en el sitio de clonación se insertan en lugar del gen del virus. En este caso, con el fin de obtener un alto título de partículas de virus, es importante preparar el inserto tan corto como sea posible, ampliar la señal de empaquetamiento incluyendo una parte del gen gag y tener cuidado de no dejar el ATG del gen gag.

Introduciendo el ADN de vector que alberga el gen p51 objeto en las células auxiliares, se empaqueta el ARN genómico del vector con la proteína estructural del virus de las células auxiliares para formar y secretar partículas de virus. Tras haber infectado la partícula de virus como virus recombinante la célula diana, se integra el ADN transcrito de manera inversa a partir del ARN genómico del virus en el núcleo celular y se expresa el gen insertado en el vector.

Como procedimiento de mejora de la eficacia de la transferencia del gen objeto, puede emplearse el procedimiento que utiliza un fragmento que contiene el dominio de adhesión celular de fibronectina, el sitio de unión a heparina y el segmento de conjugación [Hanenberg, H., *et al.*, Exp. hemat., 23, 747 (1995)].

Como ejemplo del vector para su utilización en el sistema de vector de retrovirus anterior, puede mencionarse el retrovirus derivado del virus de la leucemia de ratón [McLachlin, J. R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Res. Molec. Biol., 38, 91-135 (1990)].

A continuación, se describe en detalle el procedimiento que comprende utilizar el vector de adenovirus.

La construcción de dicho vector de adenovirus puede llevarse a cabo según los procedimientos de Berkner [Berkner, K. L., Curr. Topics Microbiol. Immunol., 158, 39-66 (1992)], Setoguchi, Y. *et al.* [Setoguchi, Y., *et al.*, Blood, 84, 2946-2953 (1994)], Kanegae, H. *et al.* [Experimental Medicine, 12, 28-34 (1994)] y Ketner *et al.* [Ketner, G., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 91, 6186-6190 (1994)].

Por ejemplo, para la construcción de un vector de adenovirus no proliferativo, se eliminan en primer lugar el gen temprano E1 y/o las regiones del gen E3 de adenovirus. Entonces, se utilizan un vector de plásmido que alberga la unidad de expresión del gen foráneo objeto (que consiste en el gen que va a transferirse, que es el gen p51 y un promotor para la transcripción del gen, y poli-A que transfiere estabilidad al transcrito) y una parte del ADN genómico de adenovirus y un plásmido que alberga el genoma de adenovirus para transfectar de manera simultánea células, por ejemplo células 293. Provocando que tenga lugar una recombinación homóloga entre los dos y sustituyendo de ese modo la unidad de expresión génica para E1, puede construirse el vector de adenovirus no proliferativo que alberga el gen p51. También es posible integrar el ADN genómico de adenovirus en un vector de cósmido para construir un vector de adenovirus de extremo 3' con la proteína terminal añadida. Además, puede utilizarse también el vector YAC en la construcción de un vector de adenovirus recombinante.

A continuación, se describe resumidamente la producción de un vector de virus adenoasociado (VAA). Se descubrió

el VAA como un virus de tamaño pequeño que contaminaba un sistema de cultivo de adenovirus. De este virus, se han confirmado el género parvovirus que no requiere un virus auxiliar para la replicación sino que prolifera de manera autónoma en la célula huésped y el dependovirus que requiere un virus auxiliar. Este VAA es uno de los virus comunes que presenta un amplio intervalo de huéspedes e infecta a una variedad de células. Su genoma es un ADN monocatenario lineal que consiste en 4680 nucleótidos y los 145 nucleótidos en cualquiera de sus extremos presentan una secuencia característica denominada ITR (repetición terminal invertida). Esta región ITR es un punto de iniciación de la replicación y desempeña el papel de cebador. Además, esta ITR es indispensable para el empaquetamiento en la partícula de virus y la integración en el ADN cromosómico de la célula huésped. Además, con respecto a la proteína del virus, la mitad izquierda del genoma codifica para una proteína no estructural, es decir, la proteína regulatoria Rep que controla la replicación y transcripción.

La construcción de un VAA recombinante puede llevarse a cabo utilizando la propiedad de VAA de integrarse con el ADN cromosómico, mediante lo cual puede construirse un vector para la transferencia del gen deseado. Más particularmente, según este procedimiento, se construye en primer lugar un plásmido (plásmido de vector de VAA) que alberga el gen objeto que va a transferirse (gen p51 humano) insertado entre las ITR remanentes tanto en el extremo 5' como 3' del VAA de tipo natural. Por otro lado, se suministra la proteína del virus necesaria para la replicación del virus y la construcción de la partícula de virus a partir de un plásmido auxiliar independiente. Se garantiza que no habrá ninguna secuencia de nucleótidos común a ambos plásmidos de modo que no surgirá un virus de tipo natural recombinante. Entonces, se introducen ambos plásmidos mediante transfección en, por ejemplo, células 293, que se infectan además con adenovirus (que puede ser de tipo no proliferativo cuando se utilizan células 293) como virus auxiliar, mediante lo cual se produce el VAA recombinante objetivo del tipo no proliferativo. Puesto que este VAA recombinante existe en el núcleo, se recupera mediante congelación-descongelación y se inactiva el adenovirus contaminante mediante calentamiento a 56°C. Si es necesario, se aísla el VAA recombinante y se concentra mediante ultracentrifugación con cloruro de cesio. De esta manera, puede obtenerse el VAA recombinante objetivo para la transferencia del gen objeto.

La construcción del vector de VIH puede llevarse a cabo normalmente según el procedimiento de Shimada *et al.* [Shimada, T., *et al.*, J. Clin. Invest., 88, 1043-1047 (1991)].

Puesto que el virus VIH infecta específicamente células T auxiliares con CD4 como receptor, puede construirse un vector de VIH de transferencia génica específico de tejido adaptado para la introducción específica de un gen en células CD4 positivas humanas. Este vector de VIH es óptimo para la terapia génica del SIDA.

La construcción de un vector de VIH vector puede llevarse a cabo normalmente tal como sigue. En primer lugar, se construye el plásmido de empaquetamiento de tal manera que pueden expresarse los genes estructurales gag, pol y env y los genes control (tat, rev, etc.) necesarios para la expresión de los mismos con el promotor de citomegalovirus (CMV) y la señal de poli A del gen de globina humana (poly A). Entonces, puede construirse el plásmido de vector HXN de modo que se permite la proliferación eficaz en células COS insertando el gen de resistencia a neomicina bacteriano (neoR) que presenta un promotor para timidina cinasa (TK) como gen marcador entre las dos LTR de VIH e insertando además un mecanismo de replicación de SV40 en el vector de plásmido basal. Como el plásmido de empaquetamiento CGPE y el plásmido de vector HXN anteriores se introducen simultáneamente mediante transfección en células COS, el virus recombinante con el gen neoR objetivo integrado se produce y libera en el medio de cultivo en gran cantidad.

La producción del vector de VEB puede llevarse a cabo normalmente según el procedimiento de Shimidzu *et al.* [Shimidzu, N., Saibou Kougaku (Cell Engineering), 14(3), 280-287 (1995)].

A continuación se describe resumidamente la producción de un vector de VEB para la transferencia del gen. El virus de EB (virus de Epstein-Barr: VEB) es un virus que pertenece a la familia del herpes y se aisló a partir de células cultivadas derivadas del linfoma de Burkitt por Epstein y colaboradores en 1964 [Kieff, E. y Liebowitz, D.: Virology, 2ª ed. Raven Press, Nueva York, 1990, págs. 1889-1920]. El VEB presenta actividad de transformación celular y, por tanto, con el fin de que pueda utilizarse como vector de transferencia génica, debe prepararse el virus defectuoso para esta actividad de transformación. Esto puede hacerse tal como sigue.

Por tanto, en primer lugar, se clona un genoma de VEB cercano al ADN diana con el que va a integrarse el gen foráneo deseado. Con este clon, se integran un fragmento de ADN del gen foráneo y un gen de resistencia a fármaco para preparar un vector para la producción de un virus recombinante. Entonces, se corta el vector para la construcción de un virus recombinante con enzimas de restricción adecuadas y se introduce mediante transfección en células Akata positivas para VEB. El virus recombinante producido mediante la recombinación homóloga puede recuperarse, junto con el VEB Akata de tipo natural, a través de la estimulación de la producción de virus mediante tratamiento con inmunoglobulinas anti-superficie. Éste se utiliza para infectar células Akata negativas para VEB y se selecciona una cepa resistente en presencia del fármaco para lograr las células Akata deseadas infectadas exclusivamente por el virus recombinante y libre del VEB de tipo natural. Entonces, induciendo la actividad del virus en las células Akata infectadas con virus recombinantes, puede producirse el vector de virus recombinante objetivo en gran cantidad.

La producción de un vector no vírico para la introducción del gen deseado en células diana sin la utilización de un vector de virus recombinante puede llevarse a cabo mediante la técnica de transferencia génica utilizando una preparación de liposomas de fusión de membranas. Esta es una técnica tal que, confiriendo actividad de fusión a un liposoma de membrana (una vesícula que presenta una estructura de bicapa lipídica), se introduce directamente el contenido del liposoma en la célula.

La introducción del gen por medio de tales liposomas de fusión de membrana puede llevarse a cabo normalmente según el procedimiento de Nakanishi *et al.* [Nakanishi, M., *et al.*, Exp. Cell Res., 159, 399-499 (1985); Nakanishi, M., *et al.*, Gene introduction into animal tissues. En Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery (ed. por Lee, V. H. *et al.*), Harwood Academic Publishers GmbH. Amsterdam, 1995, págs. 337-349].

Este procedimiento de transferencia génica por medio de dichos liposomas de fusión de membranas se describe resumidamente a continuación. Así, liposomas en los que se han atrapado virus Sendai con su gen inactivado mediante irradiación UV, el gen objeto y una sustancia de alto peso molecular, tal como una proteína, se fusionan a 37°C. Este liposoma de fusión de membranas presenta una estructura denominada "pseudovirus" que consiste en una cavidad interna derivada de liposoma y una estructura de espícula externa similar a la de la envuelta del virus. Tras purificación mediante centrifugación en gradiente de densidad, se hace que los liposomas de fusión de membranas se adsorban sobre las células cultivadas diana o células de tejidos a 4°C. Entonces, a medida que la temperatura aumenta hasta 37°C, el contenido de los liposoma se introduce en la célula, mediante lo cual el gen deseado puede transferirse a las células diana. El lípido para dicho liposoma en este caso es un fosfolípido sintético compuesto por un 50% (en moles) cada uno de colesterol y lecitina y que presenta una carga negativa y está formado preferentemente como un liposoma unilamelar con un diámetro de 300 nm.

Como procedimiento alternativo de introducción del gen en la célula diana por medio de liposomas, puede mencionarse el procedimiento de transferencia génica utilizando liposomas catiónicos. Este procedimiento puede ponerse en práctica según el procedimiento de Yagi *et al.* [Yagi, K., *et al.*, B. B. R. C., 196, 1042-1048 (1993)]. Por tanto, prestándose atención al hecho de que los plásmidos y las células están ambos cargados negativamente, se confiere una carga positiva a las superficies tanto externa como interna de la membrana del liposoma de modo que se aumenta la captación del plásmido mediante electricidad estática para potenciar la interacción con las células. El liposoma utilizado en este caso es preferentemente una vesícula grande multilaminar (MLV) que presenta una carga positiva, aunque es posible utilizar una vesícula unilaminar grande (LUV) o una vesícula unilaminar pequeña (SUV) para construir un complejo con el plásmido para la introducción del gen deseado.

Se describe brevemente a continuación el procedimiento de preparación de una MLV catiónica que contiene plásmido.

En primer lugar, se prepara una disolución en cloroformo que contiene el lípido TMAG (cloruro de N-(α -trimetil-ammonioacetil)-didodecil-D-glutamato), DLPC (dialuroilfosfatidilcolina) y DOPE (dioleilfosfatidiletanolamina) en una razón molar de 1:2:2 (concentración de lípido: 1 mM). Entonces, se coloca un total de 1 μ mol de lípido en un tubo de centrífuga y se elimina por destilación el cloroformo a presión utilizando un evaporador rotatorio para preparar una película delgada de lípido. El cloroformo residual se elimina completamente a presión reducida y se seca la película. Entonces, se añaden 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco que contiene Mg y Ca que contiene 20 μ g del plásmido de transferencia génica y, tras la purga con nitrógeno, se agita la mezcla con una mezcladora de tipo vórtex durante 2 minutos para proporcionar una suspensión de MLV catiónica que contiene plásmido que alberga el gen.

Lo siguiente es un ejemplo de utilización de la MLV catiónica que contiene plásmido como agente de terapia génica. Por ejemplo, el plásmido de expresión integrado con el ADNc del gen objeto se atrapa en una cantidad de 0,6 μ g como ADN por 30 nmoles de lípido de liposoma en la MLV catiónica anterior, y los liposomas se suspenden en 2 μ l de solución salina tamponada con fosfato. Esta suspensión se administra a las células diana extraídas del paciente o el tejido diana del paciente cada dos días.

En este sentido, en las directrices establecidas por el Ministerio de Salud y Bienestar del Japón, la terapia génica se define como "administrar un gen o una célula con un gen integrado al cuerpo humano para la terapia de una enfermedad". Sin embargo, la terapia génica en el presente contexto abarca no sólo la terapia que se encuentra bajo la definición anterior sino también la terapia de diversas enfermedades incluido cáncer que comprende introducir un gen caracterizado como un gen supresor de tumores, tal como el gen p51 humano, en dichas células diana y la práctica que comprende introducir un gen marcador o células integradas con un gen marcador de este tipo en el cuerpo humano.

En la terapia génica, el procedimiento de introducción del gen objeto en los tejidos o las células diana incluye los siguientes dos procedimientos representativos.

El primer procedimiento comprende aislar las células diana del paciente que va a tratarse, hacer crecer las células de manera extracorpórea, por ejemplo en presencia de interleucina-2 (IL-2) o similar, introducir el gen p51 ligado al vector de retrovirus en las células y volver a trasplantar las células resultantes (procedimiento *ex vivo*). Este

procedimiento es adecuado para la terapia del síndrome de deficiencia de ADA, enfermedades hereditarias y cánceres asociados con genes defectuosos, SIDA y otras enfermedades.

El segundo procedimiento es un procedimiento de transferencia génica directa que comprende inyectar el gen objeto (gen p51 humano) directamente en el cuerpo del paciente o sitio diana, tal como un tejido tumoral (procedimiento directo).

Más particularmente, el primer procedimiento anterior de terapia génica puede llevarse a cabo normalmente tal como sigue. Así, las células mononucleares aisladas del paciente se separan de los monocitos con un separador de sangre, las células recogidas se cultivan en presencia de IL-2 en un medio adecuado tal como medio AIM-V durante aproximadamente 72 horas, y se añade el vector que alberga el gen que va a introducirse (gen p51 humano). Para lograr una eficacia de transferencia génica potenciada, el sistema puede centrifugarse a 2.500 rpm en presencia de protamina a 32°C durante 1 hora e incubarse en gas de dióxido de carbono al 10% a 37°C durante 24 horas. Tras repetirse el procedimiento anterior unas cuantas veces, se cultivan adicionalmente las células en presencia de IL-2 en AIM-V o u otro medio durante 48 horas. Se lavan las células con solución salina, se cuentan las células viables y se evalúa la transferencia génica llevando a cabo dicha PCR *in situ* o, cuando la función objeto es una actividad enzimática, sometiendo a ensayo la actividad para confirmar el efecto de transferencia génica.

Además, se lleva a cabo una comprobación de la seguridad que comprende el cultivo de las bacterias y los hongos que contaminan las células cultivadas y pruebas para detectar la infección por micoplasmas y para detectar endotoxinas para confirmar la seguridad. Entonces, las células cultivadas se integran con una dosis eficaz pronosticada del gen (gen p51 humano) y se devuelven al paciente mediante inyección por goteo intravenosa. Este procedimiento se repite a un intervalo de unas cuantas semanas o unos cuantos meses realizar la terapia génica.

La dosificación del virus puede seleccionarse de manera sensata según la clase de célula diana. Habitualmente, en cuanto a título de virus, se utiliza una dosis dentro del intervalo de 1×10^3 ufc $\sim 1 \times 10^8$ ufc por 1×10^8 células diana.

Una versión alternativa del primer procedimiento anterior, que puede emplearse, comprende cultivar conjuntamente células que producen virus que contienen un vector de retrovirus que alberga el gen deseado (gen p51 humano) con, por ejemplo, las células del paciente para introducir el gen (gen p51 humano) en las células diana.

Al llevar a cabo el segundo procedimiento de terapia génica (procedimiento directo), se realiza preferentemente un experimento preliminar, particularmente un experimento *ex vivo*, para confirmar si el gen objeto (gen p51 humano) puede transferirse realmente o no mediante una PCR del ADNc del gen del vector o un ensayo de PCR *in situ* o confirmar el efecto deseado de la terapia que resulta de la transferencia del gen objeto (gen p51 humano), por ejemplo una elevación de la actividad específica o una potenciación o supresión del crecimiento de células diana. Además, cuando se utiliza un vector de virus, es importante por supuesto, al realizar una terapia génica, confirmar la seguridad de la introducción del gen llevando a cabo la PCR para buscar retrovirus proliferativos, determinando la actividad de transcriptasa inversa o monitorizando el gen de proteína de membrana (env) mediante una técnica de PCR.

Cuando se aplica el procedimiento de terapia génica a cánceres o tumores malignos en particular, un protocolo típico para la terapia del cáncer puede comprender aislar células cancerosas del paciente, tratar las células con una enzima o similar para establecer una línea celular cultivada, introducir el gen deseado en las células cancerosas diana por medio de retrovirus o similar, llevar a cabo una selección con células G418, determinar la cantidad de expresión de IL-12 o similar (*in vivo*), someter las células a tratamiento con radiación e inocular las células en el tumor o paratumor del paciente.

El gen de timidina cinasa del virus del herpes simple (VHS-TK) provoca de manera notificada muerte celular debido a envejecimiento por división, particularmente convirtiendo el análogo de nucleótido ganciclovir (GCV) en un producto intermedio tóxico, y se conoce una terapia génica utilizando este gen en tumores [patente US nº 5.631.236; documento JP Kohyo H9-504784]. Este procedimiento es un procedimiento de terapia génica que utiliza el fenómeno de que cuando las células que pueden producir un vector de retrovirus que alberga dicho gen VHS-TK, conocido como gen suicida, se inyectan y, una semana más tarde, se administra el agente antiviral GCV, se activa el GCV en las células transformadas con el gen mediante fosforilación para inducir la muerte de estas células y la muerte de las células a las que no se transfirió el gen circundantes debido a contacto celular a través de uniones "comunicantes". El vector de transferencia génica o las células que contienen este vector pueden utilizarse también en la terapia génica anterior.

Un procedimiento alternativo de terapia génica comprende preparar inmunoliposomas que contienen el gen (gen p51 humano) acoplado al anticuerpo que puede acoplarse a la superficie de las células diana para introducir el ADNc atrapado en las células diana selectivamente y con buena eficacia. También es viable una terapia génica que comprende administrar dicho vector de virus que alberga el gen de citocina y dicho adenovirus que alberga el gen suicida al mismo tiempo. Estos procedimientos se encuentran de manera invariable dentro de la experiencia de los expertos en la técnica.

(7) Composición farmacéutica para terapia génica

La presente memoria proporciona además una composición farmacéutica o agente (agente génico-terapéutico) que comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de células a las que se ha transferido o bien el vector de transferencia génica o bien el gen objeto (por ejemplo, el gen p51 humano o similar) como principio activo junto con un portador o diluyente farmacéutico no tóxico adecuado.

El portador farmacéutico que puede formularse en la composición farmacéutica (preparación) de la presente invención incluye los diluyentes y excipientes convencionales, tales como carga, adyuvante de volumen, aglutinante, humectante, disgregante, tensioactivo, lubricante, etc. que se emplean comúnmente según el procedimiento de utilización de la preparación y estos portadores pueden utilizarse selectivamente con referencia a la forma farmacéutica unitaria deseada.

La forma farmacéutica unitaria para la composición farmacéutica incluye las mismas formas farmacéuticas que las mencionadas para la proteína p51 y pueden seleccionarse de manera sensata según el objetivo terapéutico.

Por ejemplo, puede proporcionarse una preparación farmacéutica que contiene el vector de transferencia génica en forma de dicho vector atrapado en liposomas o en forma de células cultivadas infectadas con un virus que contiene un vector de retrovirus que alberga el gen objeto.

Estas pueden prepararse como disoluciones en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), inyección de Ringer o una inyección de composición de fluido intracelular, por ejemplo, o en una forma tal que puede administrarse junto con una sustancia que puede potenciar la eficacia de transferencia génica, tal como protamina.

El procedimiento de administración de la preparación farmacéutica anterior no está particularmente restringido sino que se selecciona según la forma de dosificación, la edad del paciente, el sexo y otros factores, la gravedad de la enfermedad y otras condiciones.

La cantidad del principio activo que va a incorporarse en dicha preparación o composición farmacéutica no está particularmente restringida sino que puede seleccionarse libremente de un amplio intervalo según el efecto terapéutico deseado, el procedimiento de administración, la duración del tratamiento, los antecedentes del paciente incluido edad y sexo, y otras condiciones.

En términos generales, la dosis diaria del vector de retrovirus que alberga el gen como preparación farmacéutica por kilogramo de peso corporal puede ser por ejemplo de aproximadamente 1×10^3 ufp a 1×10^{15} ufp en cuanto a título de retrovirus.

En el caso de células en las que se ha introducido el gen objeto, la dosificación puede seleccionarse de manera sensata del intervalo de aproximadamente 1×10^4 células/cuerpo a aproximadamente 1×10^{15} células/cuerpo.

El producto farmacéutico puede administrarse una vez al día o en unas cuantas dosis divididas al día, y puede administrarse de manera intermitente, por ejemplo con una separación de una a varias semanas. Además, puede administrarse ventajosamente en combinación con una sustancia que puede potenciar la eficacia de la transferencia génica, tal como protamina, o una preparación farmacéutica que contiene dicha sustancia.

Cuando se aplica la terapia génica al tratamiento de un cáncer, pueden utilizarse los diversos procedimientos de terapia génica mencionados anteriormente en una combinación adecuada (terapia génica de combinación) y/o en combinación con la quimioterapia del cáncer convencional, radioterapia, inmunoterapia y/u otra terapia. Además, la terapia génica puede llevarse a cabo con referencia a las directrices del NIH, incluidos los aspectos de seguridad de la misma [véase Recombinant DNA Advisory Committee, Human Gene Therapy, 4, 365-389 (1993)].

(8) Aplicación a diagnóstico tumoral

Según la presente memoria, la presencia de un gen p51 mutante que promueve la tumorigénesis en células humanas puede detectarse mediante el procedimiento que comprende preparar una muestra de sangre, suero u otra muestra biológica, extraer opcionalmente el ácido nucleico y analizarlo para determinar la presencia o ausencia de un gen p51 mutante sensible. Además, puede detectarse la existencia de un cambio neoplásico en células o tejidos, un marcador de evolución hasta un estado prodrómico de malignidad o un marcador de pronóstico mediante el procedimiento que comprende preparar una muestra biológica que contiene el trastorno y analizarla para determinar la presencia o ausencia de un gen p51 mutante neoplásico. Mediante el procedimiento anterior, puede detectarse la presencia de un neoplasma en células o tejidos, un marcador de evolución hasta un estado prodrómico de malignidad o un marcador de pronóstico, permitiendo así establecer un diagnóstico, por ejemplo el diagnóstico de un cáncer, evaluar el efecto de una terapia del cáncer o predecir el pronóstico de los casos.

Según este procedimiento de detección, basándose en la información del gen p51 mutante obtenida de una muestra de un paciente que porta el tumor, por ejemplo en la información sobre el sitio de mutación del gen p51 y la

información de secuencia mutante, se prepara el fragmento de ADN mutante relevante y se diseña de modo que pueda utilizarse en la selección del gen mutante y/o la amplificación del mismo. Más particularmente, puede construirse la sonda para su utilización en la hibridación de placas, la hibridación de colonias, la transferencia de tipo Southern, la hibridación de tipo Northern, etc. o la sonda para la amplificación por PCR del fragmento de ADN mutante. Para tales fines, se prepara en primer lugar un cebador que presenta la misma secuencia que la mutación y se hace reaccionar, como sonda de selección, con una muestra biológica (muestra de ácido nucleico), mediante lo cual puede confirmarse la presencia de un gen que presenta una secuencia del gen p51 mutada. Para facilitar la detección de la secuencia diana, puede prepararse dicha muestra de ácido nucleico utilizando diversas técnicas tales como lisis, digestión con enzimas de restricción, electroforesis o transferencia puntual.

Haciendo referencia al procedimiento de selección mencionado anteriormente, se prefiere particularmente la utilización de un procedimiento de PCR desde el punto de vista de la sensibilidad, y este procedimiento no está particularmente restringido en la medida en que los fragmentos de p51 mutantes se utilicen como cebadores. Por tanto, pueden emplearse cualquiera de las técnicas conocidas hasta la fecha [Science, 230, 1350-1354 (1985)] y versiones de PCR que se han desarrollado recientemente o se utilizarán en el futuro [Sakaki, Y *et al.* (ed): Experimental Medicine, Supplemental Issue, 8 (9) (1990), Yodo-sha; Protein, Nucleic Acid and Enzyme, Special Supplemental Issue, 35(17) (1990), Kyoritsu Shuppan].

Los fragmentos de ADN para su utilización como cebadores son oligoADN sintetizados químicamente, y estos oligoADN pueden sintetizarse utilizando un hardware de sintetización de ADN automatizado, tal como el sintetizador de ADN Pharmacia LKB Gene Assembler Plus (Pharmacia). La longitud del cebador así sintetizado (cebador sentido o cebador antisentido) es preferentemente el equivalente de aproximadamente 10-30 nucleótidos. La sonda para su utilización en dicha selección está habitualmente marcada pero puede ser una no marcada, y la detección puede hacerse o bien directamente o bien indirectamente mediante unión específica con un ligando marcado. El marcador adecuado y el procedimiento de marcaje de la sonda o el ligando los conocen los expertos en la técnica, y el marcador radiactivo, biotina, grupo fluorescente, grupo quimioluminiscente, enzima, anticuerpo, etc. que puede incorporarse mediante las técnicas conocidas tales como traducción de mellas, cebado aleatorio o tratamiento con cinasa también están incluidos en la tecnología relevante.

El procedimiento de PCR para su utilización en dicha detección incluye RT-PCR, por ejemplo, y pueden aplicarse asimismo diversas modificaciones de PCR que se utilizan en la técnica.

También es posible detectar el gen p51 de tipo natural y/o el gen p51 mutante y cuantificar los ADN de estos genes. Esta tecnología incluye pero no se limita al ensayo competitivo tal como MSSA [Kinoshita, M. *et al.*, CCA, 228, 83-90 (1994)] y PCR-SSCP que se sabe que es una técnica de detección de mutaciones que utiliza el cambio en la movilidad asociada con un cambio en la estructura de orden superior de un ADN monocatenario [Orita, M. *et al.*, Genomics, 5, 874-879 (1989)].

Los procedimientos analíticos anteriores mencionados a modo de ejemplo pueden llevarse a cabo tal como sigue. Por ejemplo, se prepara en primer lugar uno o una pluralidad de cebadores que contienen la mutación de p51 (por ejemplo, la secuencia mutada basada en la información de mutación de sitio obtenida de un paciente con cáncer o similar) y se hibridan con el ADN obtenido de una muestra biológica. Entonces, se comparan la movilidad y el área pico medida mediante análisis de SSCP del fragmento de ADN de p51 de tipo natural convencional con la movilidad y el área pico en la muestra de prueba como el producto de amplificación utilizando dichos cebadores para detectar de ese modo la mutación en una región específica de p51 y cuantificar simultáneamente el producto de mutación.

La muestra de prueba que contiene el gen p51 mutante que va a medirse no está particularmente restringido en la medida en que contenga dicho gen mutante, incluyendo por tanto diversos materiales biológicos tales como sangre, suero, orina y tejidos extirpados. El gen p51 mutante puede extraerse de tales muestras de prueba, purificarse y prepararse de manera rutinaria. Por tanto, comparando la movilidad de dicho fragmento de ADN convencional de la invención, tal como se determina de antemano, con la movilidad del producto de amplificación en la muestra de prueba tal como se obtiene en la amplificación por PCR del ADN de p51 de la muestra de prueba utilizando un par de cebadores de p51 mutante, puede detectarse la mutación en una región específica del ADN de p51 de manera conveniente y precisa.

Además, cuando se utilizan patrones establecidos en etapas de cantidad conocidas, puede realizarse la cuantificación del p51 mutante en la muestra de prueba al mismo comparando las áreas pico de los patrones con el área pico del producto de amplificación del ADN de p51 en la muestra de prueba en la etapa de amplificación por PCR utilizando el conjunto de cebadores mutantes mencionado anteriormente. El conjunto de cebadores, los patrones, el análisis de PCR-SSCP y los medios de detección pueden modificarse libremente por los expertos en la técnica.

La tecnología de ensayo anterior se describe ahora más específicamente. En primer lugar, se extrae el ADN del suero de un paciente con cáncer mediante el procedimiento rutinario tal como tratamiento con álcali o ácido. Entonces, se hace que un conjunto de cebadores que comprende una secuencia parcial de cadena negativa de una longitud definida que consiste en una parte de la secuencia de nucleótidos (145-1488) mostrada en SEC ID nº:1 y

una secuencia parcial de cadena positiva de una longitud definida que consiste en una parte de la secuencia de nucleótidos marcada de manera fluorescente (145-1488) así como una ADN polimerasa resistente al calor actúen sobre la disolución de ADN obtenida anteriormente para amplificar el fragmento de ADN marcado.

Por otro lado, uno o una pluralidad de fragmentos de ADN que contienen una secuencia mutante químicamente sintetizada según la información de mutación de sitio de p51 obtenida de, por ejemplo, un paciente con cáncer se integran respectivamente en vectores de plásmido y se transforma *E. coli*. Tras cultivo en masa y purificación, se utilizan los plásmidos recombinantes purificados para preparar por ejemplo patrones de 10^3 copias, 10^4 copias, 10^5 copias, 10^6 copias, 10^7 copias y 10^8 copias. Dicho conjunto de cebadores comprende una secuencia parcial de cadena negativa que consiste en una secuencia parcial definida de dicha secuencia de nucleótidos (145-1488) y una secuencia parcial de cadena positiva que consiste en una secuencia parcial definida de la secuencia de nucleótidos marcada de manera fluorescente (145-1488) así como una ADN polimerasa resistente al calor para amplificar el fragmento de ADN marcado. La disolución de ADN amplificado anterior se calienta a aproximadamente 95°C durante aproximadamente 5 minutos, luego se enfría inmediatamente en hielo y se realiza un análisis de SSCP utilizando un secuenciador automático, tal como un secuenciador automático ALF (Pharmacia), mediante lo cual puede detectarse el pico fluorescente. La forensis en este análisis de SSCP se realiza preferentemente a aproximadamente 30°C±1°C.

El pico (movilidad) del ADN obtenido del suero del paciente se compara con los picos (movilidades) de los patrones y el pico de acuerdo con el patrón se determina a partir del tiempo de migración. De esta manera, puede determinarse el tipo (clase) de mutación de p51 del paciente. Además, calculando las áreas pico de los patrones y construyendo una curva patrón, puede cuantificarse el ADN de p51 a partir del área pico calculada del ADN del paciente.

(9) Procedimiento de detección de la mutación del gen p51 y diversos procedimientos de ensayo

La presente memoria, por tanto, proporciona un protocolo de prueba conveniente para la detección y cuantificación simultánea de una mutación en una región dada del ADN de p51 en la muestra de prueba a través de la medición anterior.

El procedimiento de ensayo puede llevarse a cabo convenientemente utilizando un kit de reactivos para detectar el gen p51 de tipo natural y el gen p51 mutante en una muestra.

Por tanto, la presente memoria proporciona además un kit de reactivos para la detección de p51 de tipo natural y p51 mutante caracterizado por comprender dicho fragmento de ADN de p51 de tipo natural y fragmento de ADN de p51 mutante.

Este kit de reactivo, en la medida en que contiene un fragmento de ADN que puede hibridar con una parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos (145-1488) mostrada en SEC ID n°:2 o su secuencia de oligonucleótidos complementaria o un fragmento de ADN que puede hibridar con una parte o la totalidad de una secuencia mutante de la secuencia de nucleótidos (145-1488) o una secuencia de nucleótidos complementaria a dicha secuencia, puede contener otros componentes tales como un agente de marcaje, reactivos esenciales para la PCR (por ejemplo, Taq ADN polimerasa, desoxinucleótidos trifosfato, cebadores, etc.). En lugar de la secuencia de nucleótidos (145-1488) mostrada en SEC ID n°:2, puede utilizarse la secuencia de nucleótidos (145-2067) mostrada en SEC ID n°: 5.

Como agente de marcaje, puede emplearse un radioisótopo o un modificador químico tal como una sustancia fluorescente, aunque el propio fragmento de ADN puede haberse conjugado con el agente de marcaje de antemano. Además, este kit de reactivos puede comprender además un diluyente de reacción adecuado, un anticuerpo convencional, un tampón, una disolución de lavado, un agente de detención de la reacción, etc. para la conveniencia en la realización de un ensayo.

La presente memoria proporciona además un procedimiento de diagnóstico que utiliza dicha técnica de ensayo y un agente de diagnóstico (para referencia) y un kit de diagnóstico para su utilización en dicho procedimiento de diagnóstico.

Además, mediante secuenciación directa o indirecta de la secuencia p51 mutante obtenida a partir de la muestra de prueba mediante el procedimiento anterior, es posible descubrir nuevos genes relacionados con p51 que presentan alta homología con p51 de tipo natural.

La presente memoria, por tanto, proporciona además un procedimiento de selección de genes humanos relacionados con p51 en muestras de prueba a través del ensayo descrito anteriormente y de secuenciación de ADN de p51 mutante en tales muestras de prueba.

Además, el p51 de tipo natural y/o el p51 mutante pueden identificarse sintetizando la proteína codificada por el gen p51A humano de SEC ID n°:1 o la proteína que corresponde a la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de SEC ID n°:1 mediante delección, sustitución o adición de uno o una pluralidad de aminoácidos o una

secuencia parcial de la misma, o sintetizando el anticuerpo contra cualquiera de tales proteínas. Además, en lugar de la proteína codificada por dicho gen p51A humano, puede utilizarse la proteína codificada por el gen p51B humano mostrado en SEC ID n°:4.

Por tanto, se proporciona un procedimiento para el ensayo de anticuerpos contra p51 de tipo natural y/o p51 mutante y para el ensayo del antígeno. Mediante este procedimiento de ensayo, puede estimarse el grado de alteración neoplásica o la malignidad de un tumor maligno basándose en el cambio de la proteína p51 de tipo natural. El cambio mencionado anteriormente puede determinarse mediante análisis de la secuencia de p51 mediante dicha tecnología de rutina pero más preferentemente el cambio en la proteína p51 o la presencia o ausencia de la proteína p51 se detecta utilizando un anticuerpo (un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal). Un ejemplo específico del procedimiento de ensayo es tal como sigue. Con el anticuerpo p51, la proteína p51 puede inmunoprecipitarse a partir de una disolución que contiene un material biológico humano aislado de un ser humano, tal como sangre o suero, y el anticuerpo puede hacerse reaccionar con la proteína p51 en una inmunotransferencia o transferencia de tipo Western en gel de poli(acrilamida). Además, con el anticuerpo frente a p51, puede detectarse la proteína p51 en una sección de parafina o sección de tejido congelado mediante una técnica inmunohistoquímica. Esta tecnología para la producción y purificación de anticuerpos se conoce bien en la técnica y las técnicas conocidas pueden emplearse selectivamente.

Los modos preferidos específicos de puesta en práctica del procedimiento de detección de p51 de tipo natural o un mutante del mismo incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) incluida la tecnología de tipo "sandwich" que utiliza un anticuerpo monoclonal y/o un anticuerpo monoclonal, radioinmunoanálisis (RIA), ensayo inmunoradiométrico (IRMA) y ensayo inmunoenzimométrico (IEMA).

Además, también es posible proporcionar una fracción de membrana celular que presenta actividad de unión a p51 para la proteína p51 o el receptor de p51 presente en la superficie celular. Para obtener dicho receptor de p51, se conjuga la proteína p51 marcada en una muestra biológica que contiene la fracción de membrana celular, se aísla el conjugado de p51 resultante mediante extracción y se purifica, y se determina la secuencia de aminoácidos del aislado. La obtención y secuenciación de esta proteína receptora de p51 se encuentra dentro de la experiencia del experto en la técnica.

(10) Aplicación a la selección de fármacos

La presente descripción puede aplicarse a la selección de compuestos (productos de reacción con el receptor de p51: el compuesto puede ser un compuesto de bajo peso molecular, una proteína, un fragmento de proteína, un antígeno, un anticuerpo o similar) utilizando el polipéptido de receptor de p51 o un fragmento de unión del mismo para la selección de diversos fármacos. Preferentemente, se utiliza la proteína de receptor de p51. El polipéptido de receptor de p51 o su fragmento para su utilización en una prueba de selección de este tipo puede inmovilizarse sobre un soporte sólido o utilizarse en forma de una suspensión en un fluido transportado a la superficie celular. Para mencionar un ejemplo de selección de fármacos, pueden utilizarse células huésped eucariotas o procariotas transformadas de manera estable con un polipéptido recombinante y que expresan el polipéptido o su fragmento, preferentemente en un ensayo de unión competitivo. Además, pueden utilizarse tales células en estado libre o inmovilizado en un ensayo de unión convencional. Más preferentemente, se cuantifica la formación de un complejo entre el polipéptido de receptor de p51 o su fragmento y una sustancia de prueba para detectar el grado de inhibición de dicha formación de un complejo entre el polipéptido o fragmento de receptor de p51 y se detecta el polipéptido o fragmento de p51 mediante la sustancia de prueba, mediante lo cual puede conseguirse la selección de un compuesto.

Por tanto, la presente invención proporcionada es un procedimiento de selección de fármacos caracterizado por poner en contacto una sustancia de este tipo con el polipéptido de receptor de p51 o un fragmento del mismo mediante una técnica conocida *per se* y, entonces, detectar la presencia de un complejo entre dicha sustancia y dicho polipéptido de receptor de p51 o fragmento o la presencia de un complejo entre dicho polipéptido de receptor de p51 o fragmento y un ligando. Además, se mide la actividad del receptor de p51 para observar si dicha sustancia puede antagonizar el receptor de p51 para presentar las actividades de p51 definidas anteriormente en la presente memoria, por ejemplo la actividad para modificar el ciclo celular o modular la inducción de la apoptosis. Específicamente, al llevar a cabo un ensayo de unión competitivo de este tipo, se marca el polipéptido de receptor de p51 o su fragmento. El polipéptido de receptor de p51 o fragmento libre se separa del complejo proteína-proteína. Entonces, la cantidad del marcador libre (que no forma complejo) puede ser una medida de la unión entre el factor que va a someterse a ensayo y el receptor p51 o la inhibición de la unión de receptor de p51-polipéptido de p51. Se analiza por tanto el péptido pequeño (pseudopéptido) del polipéptido de p51, y se determina el que presenta actividad inhibitoria del receptor de p51.

Otro procedimiento de selección de fármacos es un procedimiento de selección de compuestos que presentan una afinidad de unión adecuada por el polipéptido de receptor de p51. En resumen, se sintetiza un gran número de diferentes compuestos de prueba peptídicos sobre soportes sólidos tales como clavijas de plástico u otras superficies. Entonces, se hacen reaccionar los compuestos de prueba peptídicos con el polipéptido de receptor de p51, seguido por lavado. Entonces, se detecta el polipéptido de receptor de p51 unido y reaccionado mediante una

técnica conocida *per se* [documento PCT: WO84-03564]. El receptor de p51 purificado puede recubrirse directamente sobre una placa para su utilización en dicha selección de fármacos. Sin embargo, el polipéptido de receptor de p51 puede inmovilizarse sobre una fase sólida mediante complementación de anticuerpos utilizando un anticuerpo no neutralizante contra el polipéptido. Además, se da a conocer un ensayo de selección de fármacos competitivo en el que se hace que un anticuerpo neutralizante que se une específicamente al polipéptido de receptor de p51 y un compuesto de prueba compitan entre sí por la unión al polipéptido o fragmento de receptor de p51. Mediante este ensayo competitivo utilizando el anticuerpo, puede detectarse también la presencia de péptidos que presentan uno o más epítopos o sitios determinantes antigénicos del polipéptido de receptor de p51.

Haciendo referencia adicionalmente a la selección de fármacos, todavía otro procedimiento comprende la utilización de una línea celular eucariota huésped o células que contienen un gen p51 no funcional. Por tanto, tras dejar crecer las células o línea celular huésped en presencia de un compuesto farmacológico durante un tiempo predeterminado, se mide la tasa de proliferación de las células huésped para observar si el compuesto puede modular la apoptosis o el ciclo celular. Como medio para medir la tasa de proliferación, es posible medir la actividad biológica del receptor de p51.

Además, para el fin de desarrollar fármacos o derivados del polipéptido de p51 más activos o estables que potenciarán o interferirán con la función del polipéptido de p51 *in vivo*, pueden construirse diversos polipéptidos o análogos estructurales biológicamente activos interactivos, por ejemplo, agonistas de p51, inhibidores de p51, etc. Tales análogos estructurales pueden caracterizarse, por ejemplo, analizando las estructuras tridimensionales de complejos entre p51 y otras proteínas mediante cristalografía de rayos X, modelado por ordenador o una combinación de tales técnicas. Además, también puede generarse la información sobre análogos estructurales mediante modelado de proteínas basándose en las estructuras de proteínas homólogas.

El procedimiento de obtención de los derivados del polipéptido de p51 todavía más activos o estables puede implicar por ejemplo un análisis de barrido de alanina. En este procedimiento, se sustituye Ala por cada residuo de aminoácido y se determina el efecto de la sustitución sobre la actividad del péptido. Se analiza por tanto cada residuo de aminoácido en un péptido y se determinan la región o regiones de importancia para la actividad o estabilidad del péptido. Utilizando este procedimiento, pueden diseñarse derivados de p51 más activos o estables.

También es posible aislar el anticuerpo específico de diana seleccionado mediante un ensayo funcional y analizar su estructura cristalina. Como norma, puede obtenerse mediante este enfoque un farmacoro que proporciona la base para el diseño de fármacos adicionales. Es posible identificar o aislar un péptido a partir de un banco de péptidos construido de manera química o biológica provocando la formación de un anticuerpo anti-idiotipo contra un anticuerpo farmacoactivo funcional. Por tanto, se espera también que el péptido seleccionado sirva como farmacoro.

De esta manera, pueden diseñarse y desarrollarse fármacos que presentan estabilidad o actividad frente a p51 mejorada o fármacos que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de la actividad de p51.

Según la secuencia de p51 clonada, puede procurarse una cantidad suficiente de polipéptido de p51 y someterse a cristalografía de rayos X y otra investigación analítica. Además, la proteína p51 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 1 tal como se proporciona mediante la presente invención permite el establecimiento de un programa de modelado por ordenador que puede sustituir a la cristalografía de rayos X o complementar a esta última.

Además, construyendo un ratón deficiente que lleva el gen p51 humano (ratón mutante), es posible detectar sitios de la secuencia del gen p51 humano que influirán en dichas diversas actividades de p51 *in vivo*, es decir, qué funciones del producto del gen de p51 y productos del gen p51 mutante presentarán *in vivo*.

Esta es una tecnología para modificar de manera voluntaria la información genética de organismos utilizando recombinaciones homólogas de genes, y puede mencionarse como ejemplo el procedimiento que utiliza células madre embrionarias de ratón (células ES) [Capecchi, M. R. Science, 244, 1288-1292 (1989)].

El procedimiento de construcción de tales ratones mutantes anteriores lo conocen bien los expertos en la técnica, y aplicando el gen p51 mutante o el gen p51 de tipo natural humano a la tecnología anterior tal como se modifica (Noda, T. (ed.), Experimental Medicine, Supplemental Issue, 14(20) (1996), Yōdo-sha), pueden establecerse fácilmente ratones mutantes. Por tanto, utilizando la tecnología anterior, pueden diseñarse y desarrollarse fármacos que presentan estabilidad o actividad de p51 mejorada o fármacos que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de la actividad de p51.

La presente invención comprende lo siguiente.

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína p51 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 1, en el que dicha proteína p51 se produce mediante tecnología recombinante o síntesis química.

2. El anticuerpo aislado del punto 2, en el que la unión se determina utilizando inmunoprecipitación, inmunotinción, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA o radioinmunoanálisis (RIA).

3. Un kit para detectar la proteína p51 que comprende

(i) un anticuerpo aislado según la reivindicación 2, y

(ii) un medio para detectar el anticuerpo.

4. El kit del punto 4, en el que el medio para detectar el anticuerpo es uno o más de una enzima, una coenzima, un sustrato, un polipéptido, un anticuerpo o un marcador detectable.

5. El kit del punto 5, en el que el medio para detectar el anticuerpo es un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo.

6. El kit del punto 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

7. El kit del punto 4, en el que el anticuerpo está en una forma de una preparación purificada de anticuerpo policlonal.

Mejor modo de poner en práctica la invención

Los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales son ilustrativos adicionalmente de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que el alcance de la invención no se restringe de ningún modo por estos ejemplos y ejemplos experimentales.

Ejemplo 1 Aislamiento del gen p51 humano (para referencia sólo)

(1) Clonación y secuenciación del ADN del gen p51 humano

(a) Los presentes inventores llevaron a cabo una amplificación por PCR utilizando los siguientes cebador sentido p73-F1 y cebador antisentido p73-R1 y luego una segunda amplificación mediante una PCR anidada utilizando los siguientes cebador sentido p73-F2 y cebador antisentido p73-R2.

p73-F1: 5'-**TA**(CGT)GCA(CGT)**AAA**(G)**ACA**(CGT)**TGC**(T)CC-3'
 p73-R1: 3'-**TGC**(T)**GCA**(CGT)**TGC**(T)CCA(CGT)GGA(CGT)**A**(C)G-5'
 p73-F2: 5'-**TA**(CGT)**ATA**(CT)**A**(C)GA(CGT)GTA(CGT)**GAA**(G)**GG**-3'
 p73-R2: 3'-**ATGAAC**(T)**A**(C)**GA**(CGT)**A**(C)GA(CGT)CCA(CGT)**AT**-5'

Más específicamente, a partir del poliA+ARN del músculo esquelético humano (Clontech), se sintetizó el ADNc utilizando un cebador aleatorio y un cebador de oligo dT. Entonces, se amplificó una biblioteca de ADNc que consistía en aproximadamente 10^7 placas tal como se construyó utilizando ZipLox (Gibco BRL) como vector y se extrajo el ADN. Utilizando 0,2 µg del ADNc como molde y dichos p73-F1 y p73-R1 como cebadores, se llevó a cabo una reacción de amplificación en 25 ciclos de 94°C, 30 s, 45°C, 30 s y 72°C, 30 s según el manual de Tag polimerasa (Gibco-BRL). Entonces, utilizando 1/100 del producto de amplificación como molde y dichos p73-F2 y p73-R2 como cebadores, se llevó a cabo una amplificación adicional en las mismas condiciones.

Puesto que se obtuvo una banda de 172 pb tal como se dedujo a partir del gen p53, se preparó un mapa de escisión con enzimas de restricción de la banda. Como resultado, se detectó la presencia de un gen distinto de p53. Se subclonó esta banda en pGEM7 (Promega) y utilizando un secuenciador automático AB1377 (ABI), se determinó la secuencia de nucleótidos de manera rutinaria. Como resultado, se encontró que era un fragmento de ADN derivado de un nuevo gen que se parecía al gen p53 pero que presentaba una secuencia de nucleótidos nueva diferente.

Por separado, se llevó a cabo un análisis similar utilizando bibliotecas de ADNc derivadas de otros órganos (por ejemplo cerebro). Como resultado, se detectó un fragmento de ADN derivado de un gen nuevo diferente adicional que se parecía al gen p53 pero que se encontró que era un fragmento derivado del gen p73.

Se cortó este fragmento de ADN subclonado y utilizando el kit de marcaje BcaBest (Takara) se construyó una sonda marcada. El ensayo de hibridación de placas de una biblioteca no amplificada de $2,4 \times 10^6$ placas construida utilizando el cebador de oligo dt solo de por lo demás la misma manera que en la construcción de dicha biblioteca de ADNc dio 8 clones positivos. Puesto que λ ZipLox puede convertirse fácilmente en un plásmido utilizando el sistema Cre-LoxP, se llevó a cabo la secuenciación del plásmido obtenido mediante conversión de la misma manera utilizando el secuenciador automático de LICOR y el secuenciador automático ABI377 (ABI).

Entonces, entre la secuencia de nucleótidos del gen obtenido y la secuencias de nucleótidos de los genes p53 y p73 se hizo una búsqueda de homología con el programa FASTA utilizando software de GCG (Wisconsin Sequencing

Package, Genetics Computer Group) [Person, W. R. y Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 1435-1441 (1988)].

Como resultado de dicha búsqueda de homología, se encontró que dos de los clones seleccionados mediante el procedimiento anterior y secuenciados presentaban alta homología con respecto al gen p53 y el gen p73. Las masas moleculares calculadas a partir de los aminoácidos deducidos codificados por la secuencia génica de estos 2 clones eran de 50.894 Da y aproximadamente 71.900 Da, respectivamente. Los presentes inventores denominaron estos clones p51A y p51B, respectivamente.

La secuencia de nucleótidos de longitud completa del gen (gen p51A) que presenta el clon p51A obtenido anteriormente se muestra en SEC ID n°:2 y la secuencia de nucleótidos de longitud completa del gen (gen p51B) que presenta el clon p51B se muestra en SEC ID n°:5.

Tal como se muestra en SEC ID n°: 2, se encontró que el clon p51A presentaba un gen que presentaba una secuencia de nucleótidos (1344 nucleótidos) que codificaba para la secuencia de aminoácidos (448 aminoácidos) de SEC ID n°:1, como un marco de lectura abierto en la posición 145 - 1488. Además, la secuencia de aminoácidos deducida codificada por la secuencia de nucleótidos del gen que presentaba este clon presentaba un dominio de activación de la transcripción en la posición 1 - 59, el dominio de unión a ADN en la posición 142 - 321, y el dominio de oligomerización en la posición 359 - 397.

Por otro lado, tal como se muestra en SEC ID n°: 5, se encontró que el clon p51B presentaba un gen que presentaba una secuencia de nucleótidos (1923 nucleótidos) que codificaba para la secuencia de aminoácidos (641 aminoácidos) de SEC ID n°:4, como un marco de lectura abierto en la posición 145 - 2067. Además, la secuencia de aminoácidos deducida codificada por la secuencia de nucleótidos del gen que presentaba este clon presentaba un dominio de activación de la transcripción en la posición 1 ~ 59, un dominio de unión a ADN en la posición 142 ~ 321 y una posición de oligomerización en la posición 353 ~ 397. Además, se encontró que esta secuencia presentaba una secuencia adicional (dominio SAM) en la región C-terminal y la región 353 ~ 641 incluida esta secuencia adicional podría considerarse como un dominio de oligomerización en un sentido amplio de la expresión.

Se comparó la secuencia de aminoácidos codificada por el gen p51A con las secuencias de aminoácidos de la proteína p53 y la proteína p73β para una comparación de homología entre las tres secuencias (figura 2). En el diagrama, los aminoácidos comunes a las 3 secuencias están en recuadros.

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra características de los dominios estructurales de la proteína p51A junto con las de la proteína p53 y la proteína p73β. En el diagrama, "TA" representa un dominio de activación de la transcripción, "unión a ADN" representa un dominio de unión a ADN y "Oligo" representa un dominio de oligomerización. Se dedujeron las características estructurales de la proteína p51 y la proteína p73β a partir de las características estructurales de la proteína p53.

Como resultado, la homología de las secuencias de aminoácidos deducidas de la proteína p51A, la proteína p53 y la proteína p73β en cada uno de la secuencia de longitud completa, el dominio de activación de la transcripción, el dominio de unión a ADN y el dominio de oligomerización era respectivamente la siguiente: entre la proteína p51A y la proteína p53, el 36%, el 22%, el 60% y el 37%, respectivamente; entre proteína la p51A y la p73 proteína, el 42%, el 30%, el 87% y el 65%, respectivamente; y entre la proteína p53 y la proteína p73, el 28%, el 27%, el 63% y el 83%, respectivamente (tabla 1).

Además, aunque la estructura de 448 residuos de la proteína p51A era más corta que la estructura de 636 residuos de la proteína p73α, la estructura total de la proteína p51A se parecía a la proteína p73 con la región C-terminal escindida.

Estos resultados indicaban que aunque la secuencia de aminoácidos supuesta de la proteína p51A se parecía a las secuencias deducidas de tanto la proteína p53 como la proteína p73β, su homología con respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína p73β es superior a su homología con respecto a la proteína p53 y que la homología entre la proteína p51A y la proteína p73β es superior a la homología entre la proteína p53 y la proteína p73β en las regiones distintas del dominio de oligomerización. Además, entre la proteína p51A y la proteína p73β, se encontró una homología en la región en la que no se encontró homología entre la proteína p53 y la proteína p73β o entre la proteína p53 y la proteína p51A. Estos resultados sugieren que, al nivel de secuencia de aminoácidos, puede decirse que la proteína p51A está más próxima a la proteína p73β que a la proteína p53.

De manera similar, se comparó la secuencia de aminoácidos codificada por el gen p51B con la secuencia de aminoácidos de la proteína p73α para la comparación de homología (figura 3). En el diagrama, los aminoácidos comunes a las dos secuencias están en recuadros.

La figura 4 es un diagrama esquemático que muestra características de los dominios estructurales de variantes de corte y empalme codificadas por los genes p51 (A y B) junto con los de las proteínas p73 (α y β). Mientras que el

punto de divergencia entre la proteína p51A y la proteína p51B comienza en el intrón 10 y el punto de divergencia entre la proteína p73 α y la proteína p73 β comienza en el intrón 13.

Ejemplo 2 Confirmación de la expresión de ARNm de p51 en tejido humano normal (para referencia)

(1) Análisis de transferencia de tipo Northern

Se evaluó la expresión de ARNm de p51 en tejido humano normal mediante transferencia de tipo Northern utilizando como sonda un clon de ADNc humano marcado mediante el procedimiento de cebado con oligonucleótidos al azar.

Se llevó a cabo el análisis de transferencia de tipo Northern utilizando Human Multiple Tissue Northern Blot (Clontech, Palo Alto, Calif., USA) según el manual del producto.

Por tanto, se marcó el fragmento de EcoRI (600 pb: correspondiente al extremo 5' del ADNc) de un producto de amplificación por PCR del clon obtenido en el ejemplo 1 con [³²P]-dCTP (kit de marcaje de ADN Random Primed, Boehringer Mannheim) para su utilización como sonda.

Se realizó la transferencia utilizando disolución de hibridación ExpressHyb (Clontech) en las condiciones dictadas en el manual de usuario, y se realizó la detección utilizando BAS2000 (FUJI).

Los resultados se muestran en la figura 5 y la figura 6.

La figura 5 muestra el resultado de la hibridación de tipo Northern llevada a cabo con el filtro adquirido de Clontech, y la figura 6 muestra el resultado de la hibridación de tipo Northern llevada a cabo con un filtro construido por los presentes inventores utilizando el ARN adquirido de Clontech. La figura 5 muestra el electroforetograma con 2 μ g de poli A+ARN añadidos para cada carril, y la figura 6 es el electroforetograma con 0,5 μ g de poli A+ARN añadidos para cada carril.

Los carriles en la figura 5 representan el resultado para 1: corazón, 2: cerebro, 3: placenta, 4: pulmón, 5: hígado, 6: músculo esquelético, 7: bazo y 8: páncreas. Los carriles en la figura 6 representan el resultado para 1: glándula mamaria, 2: próstata, 3: glándula salival, 4: estómago, 5: timo, 6: tiroides, 7: tráquea y 8: útero.

Se encontró que la distribución de la expresión del ARNm (4,4 kb) del gen denominado "gen p51 humano" estaba bastante confinada en contraposición a la expresión ubicua del ARNm de p53, siendo el nivel de expresión el más alto en el músculo esquelético, y disminuyendo progresivamente en la placenta, la tráquea, la glándula mamaria, la próstata, la glándula salival, el timo, el útero, el estómago, el pulmón, el cerebro y el corazón en el orden mencionado. En otros tejidos (por ejemplo glándula suprarrenal, intestino delgado, médula espinal, bazo), no pudo detectarse expresión de ARNm de p51.

El patrón de expresión del gen p73 está también restringido a tejidos. Sin embargo, se encontró que mientras que la expresión del gen p51 se solapaba con la expresión del gen p73 (expresión en el mismo tejido), la distribución de la expresión era más amplia que la distribución de la expresión del gen p73.

La anterior diferencia en distribución de tejido de expresión entre el gen p51, el gen p53 y el gen p73 humanos sugiere que independientemente de la similitud en la actividad biológica entre estos genes, presentan funciones distintas dependiendo de los tejidos *in vivo*.

La investigación adicional también reveló que, en diversos tejidos humano, el ARNm de p51, como en el caso de la proteína p73, existe en formas cortadas y empalmadas de manera alternativa (variantes de corte y empalme alternativo), concretamente una forma corta que codifica para la proteína p51A y una forma larga que codifica para la proteína p51B. Se encontró que esta última forma larga que codificaba para p51B presentaba homología con el factor denominado ket que se había descubierto accidentalmente en una búsqueda para el receptor de glutamato de la lengua. El ARNm de 3 kb, que es un transcrito principal en músculo esquelético, era el ARNm más abundante observado en todos los tejidos investigados. Se sospechó que el clon de ADNc de forma corta se derivaba de este transcrito. De manera interesante, en contraposición al ARNm observado en tejidos normales, se encontró que esta forma corta (p51A) del ARNm de p51 se ha expresado en muchas líneas de células tumorales.

La figura 4 es un diagrama esquemático que compara las estructuras de las variantes de corte y empalme alternativo respectivas de la proteína p51 y la proteína p73. Este ARNm de p51B codificaba para una proteína que presenta una masa molecular (calculada) similar a la de p73 α .

Siguen sin conocerse las diferencias funcionales entre p51A y p51B.

Ejemplo 3 Mapeo cromosómico del gen p51 (para referencia)

Utilizando un panel híbrido de radiación (panel híbrido de radiación GeneBridge 4; Research Genetics), se mapeó el

gen p51 en el cromosoma humano. Como resultado, se localizó el gen p51 en la región 3q28-ter entre los marcadores AFBM327YD9 y WI-1189 (5,66cR del primer marcador).

Ejemplo 4 Mutación de p51 en diversas líneas celulares de cáncer humano y tumores humanos (para referencia)

La cuestión más intrigante sobre el gen p51 es la cuestión de si las características del gen supresor de tumores p53 las comparte también el gen p51 así como la relación de una mutación del presente gen con la morfogénesis de un tumor humano.

Por tanto, utilizando diversas líneas de células tumorales, se realizó una investigación para determinar la presencia o ausencia de mutación del gen p51. Para esta búsqueda, se utilizó el procedimiento para el análisis funcional de alelos separados en levaduras (FASAY), que utilizaron previamente los presentes inventores en la identificación y caracterización de la mutación de p53 [Ishioka *et al.*, Nat. Genet. 5, 124-129 (1993)].

Se amplificó un fragmento de ADN de longitud completa complementario que codificaba para el gen p51A humano mediante el mismo procedimiento de PCR que se utilizó en la determinación descrita anteriormente en la presente memoria para obtener la secuencia de nucleótidos del producto de amplificación que cubre la secuencia de longitud completa que codifica para el gen p51A y se determinó su secuencia de nucleótidos mediante secuenciación directa para detectar la presencia o ausencia de una mutación.

Se cultivaron respectivamente células tumorales en medio esencial modificado por Dulbecco complementado con suero de ternero fetal al 10% en un entorno de CO₂ al 5%. Puesto que todos los clones de ADNc de p51 pudieron amplificar el ADNc de p53 en el análisis previo, se garantizó la calidad de los ADNc de las líneas celulares.

De las 102 líneas celulares, 67 líneas analizadas pudieron amplificar el fragmento de ADN de p51A. Se determinó la secuencia de nucleótidos mediante secuenciación directa para 35 de las líneas celulares anteriores.

Se encontraron mutaciones en dos líneas celulares, concretamente Ho-1-u-1 (JCRB0828), que es una línea celular de cáncer de cabeza y cuello, y SKG-IIIa (JCRB0611), que es una línea celular de cáncer cervical.

La mutación era Ser¹⁴⁵→Leu en el primero y Gln¹⁶⁵→Leu en el último. Con respecto a la proteína p53, era probable que la función normal de la proteína p53 se hubiese hecho defectuosa mediante mutación en el primero y mediante infección con el virus del papiloma humano en el último. Además, en los ARNm derivados de células tumorales, se observaron diversas variantes de corte y empalme.

Haciendo referencia a cánceres primarios humanos, se determinaron las secuencias de nucleótidos de los productos de amplificación del ADN obtenidos mediante técnicas de SSCP y RT-PCR mediante secuenciación directa en la búsqueda de la mutación del gen p51A. En una población total de 66 casos de tumores humanos, concretamente 8 casos de neuroblastoma, 8 casos de cáncer de colon, 8 casos de cáncer de mama, 8 casos de cáncer de pulmón, 8 casos de cáncer cerebral, 8 casos de cáncer de esófago, 8 casos de cáncer hepatocelular, 6 casos de cáncer pancreático y 4 casos de cáncer renal, se detectó una mutación de Ala¹⁴⁸→Pro en un caso de cáncer de pulmón.

El análisis de los 3 casos anteriores era invariablemente un análisis de ADNc y estaba claro que la expresión se originaba a partir de un único locus cromosómico.

Ejemplo experimental 1 Supresión de la formación de colonias mediante transformación con p51

La proteína p53 presenta una capacidad para bloquear células en la fase G1 o inducir apoptosis.

Para investigar la actividad inhibitoria de la formación de colonias de la proteína p51 de la invención, se cotransfectó la línea celular de osteosarcoma SAOS2 (número de registro: ATCC HTB85) con un plásmido de expresión resistente a puomicina (pBABEpuro: Morgenstern J. Nuc. Acids Res. 18, 3587, 1990) así como un constructo de expresión de p51A, un constructo de expresión de p51A marcado con HA (ATGTATCCATATGATGTTCCAGATTATGCT marcado con HA, que codifica para la secuencia de aminoácidos MYPYDVPDYA), un constructo de expresión de p53 y un vector y se evaluó la capacidad de formación de colonias.

Se construyeron los vectores de expresión anteriores clonando el fragmento de región codificante del ADN de p51A (2816 nucleótidos; en SEC ID n°:2, números de oligonucleótido 1~2816), el fragmento preparado añadiendo el marcador de HA al ADNc de p51A y el fragmento de región codificante del ADNc de p53 (1698 nucleótidos; números de nucleótido 62~1760), respectivamente. Entonces, se cultivó la línea celular de osteosarcoma SAOS2 en medio esencial modificado por Dulbecco complementado con suero de ternero fetal al 10% en un entorno de CO₂ al 5%. Se sembró un disco de 6 cm con las células SAOS2 anteriores (1X10⁶ células/disco) y, tras 24 horas, se transfectaron las células con un vector de expresión de p51 de tipo natural que contenía la cadena de ADNc de p51A (pRcCMV/p51A). Se llevaron a cabo transformaciones similares utilizando el ADNc de p51A marcado con HA, el gen p53 de tipo natural y, como control, el vector de expresión pRcCMV solo.

Utilizando el kit de transfección de mamíferos (Stratagene), se introdujo 1 µg de pBABEpuro en las células. Se fijaron las células resultantes y se tiñeron con cristal violeta. Se fotografiaron las colonias teñidas. Se llevó a cabo cada transfección dos veces para analizar la formación de colonias.

Como resultado, se observaron disminuciones significativas en el número de colonias en los discos de cultivo de células transfectadas con el gen p53 y células transfectadas con el gen p51. En cambio, en el disco de cultivo de células tratadas con el vector solo, se observó crecimiento de un gran número de colonias. Por tanto, se encontró que el gen p51 presentaba una capacidad para suprimir la formación de colonias pero que esta capacidad era ligeramente peor en comparación con la capacidad del gen p53. Por otro lado, el gen p51 marcado con HA mostró una capacidad de supresión de la formación de colonias comparable a la del gen p53 (figura 7).

Ejemplo experimental 2 Prueba de la función de activación de la transcripción de la proteína p51

Puesto que la actividad de la proteína p53 para detener el crecimiento celular en la fase G1 o inducir apoptosis dependía de la función de activación de la transcripción de la proteína p53, se llevó a cabo una prueba para observar si la proteína p51 presentaba tal actividad.

En el sentido de 3' del promotor Waf1, que se sabe que está controlado por la función de activación de la transcripción de p53, y la secuencia RGC (agrupación génica ribosómica), se introdujo un plásmido indicador de luciferasa así como un constructo de expresión del gen p51A mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 5. Específicamente, se cotransfectaron células SAOS2 con dicho plásmido indicador de luciferasa y el vector de expresión de p51A, el vector de expresión de p53 o vector control y se sometió a ensayo la actividad luciferasa del lisado obtenido a partir del transformante resultante. Se calculó la actividad luciferasa con un sistema de ensayo de indicador luciferasa doble (ProMega) teniendo en cuenta la eficacia de transfección.

La figura 8 es un diagrama esquemático que muestra el constructo indicador en el experimento. Se muestran en el diagrama 3 constructos de gen de luciferasa unidos cada uno en el sentido de 3' de diversos promotores p21WAF1. En el diagrama, "WAF-1 promotor luc" representa un constructo de promotor p21WAF1 de tipo natural que conserva los dos elementos de control de p53; "del 1" representa el constructo privado del elemento en el sentido 5' de dichos elementos; y "del 2" representa el constructo privado de ambos de dichos elementos.

Los resultados se muestran en la figura 9 y la figura 10. La actividad relativa en la ordenada representa la actividad de luciferasa calculada utilizando el sistema de ensayo de indicador luciferasa teniendo en consideración la eficacia de transfección.

La figura 9 muestra la actividad de transactivación encontrada cuando se introdujo, en células SAOS2, el plásmido de expresión de p51 (p51A), el plásmido de expresión de p53 (p53) o el vector (Rc/CMV) sólo, que se ha unido a cada uno de los diversos constructos indicadores mostrados en la figura 8. Los resultados mostraron que como la proteína p53, la proteína p51 presenta actividad para inducir la expresión dependiente de número de la secuencia reactiva de p53.

La figura 10 muestra los resultados de un experimento similar que utiliza el plásmido de expresión de p51A (p51A), el plásmido de expresión de p51A marcado con HA (Hap51A), el plásmido de expresión de p53 (p53) o el vector (RcCMV), que se ha unido al constructo indicador PGC que se ha demostrado experimentalmente que presenta reactividad frente a p53. Como en el experimento mostrado en la figura 9, los resultados anteriores indicaron que tanto p51A como HAp51A, como p53, presentan actividad para inducir la expresión dependiente de número de la secuencia reactiva de p53. La débil actividad encontrada cuando se utilizó el plásmido de expresión de p51A puede atribuirse al hecho de que puesto que este plásmido se construyó en el vector de expresión con la secuencia líder conservada, la cantidad de expresión era pequeña.

Cuando se eliminó la secuencia líder en un experimento posterior, la proteína p51A mostró una acción de inducción de la expresión más fuerte que la proteína p53 y, en dicho ensayo de inhibición de la formación de colonias, también, se encontró que esta proteína presentaba una fuerte actividad.

Es evidente a partir de los resultados anteriores que la proteína p51 presentaba la capacidad para inducir la transcripción a través de su dominio de regulación de la transcripción. El hallazgo de que la actividad de transcripción se perdía al inducir la mutación de este elemento, sugiere que la proteína p51 también utiliza la misma secuencia de reconocimiento que la proteína p53.

A continuación, se pregunta si la misma relación de transcripción se mantiene verdaderamente *in vivo*, también. Se introdujo un constructo de expresión del gen p51A que presentaba un epítipo marcado con HA en células SAOS2 a lo largo de un corto tiempo. El hallazgo de la captación del gen p51A por células indicó que p51A se localiza en el núcleo y se encontró que todas las células elevaban el nivel de p21Waf1. Esto indica que la proteína p51 también puede inducir p21Waf1 que se sabe que está controlado por la proteína p53.

Ejemplo experimental 3 Mutación del gen p51 en tumores *in situ* (para referencia)

Se investigó la mutación del gen p51 en las células cancerosas *in situ* de 66 pacientes (neuroblastoma, 8 casos; cáncer de colon, 8 casos; cáncer de mama, 8 casos; cáncer de pulmón, 8 casos; tumor cerebral, 8 casos; cáncer de esófago, 8 casos; hepatocitoma, 8 casos; cáncer pancreático, 6 casos y cáncer renal, 4 casos) mediante el procedimiento de polimorfismo de estructura monocatenaria-PCR con transcripción inversa (RT-PCR-SSCP) y el procedimiento de secuenciación del ADN.

(1) Preparación de ARN

Se aislaron quirúrgicamente muestras de tumores recientes, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Se extrajo el ARN mediante el procedimiento descrito en el informe de Nakagawa *et al.* [Nakagawa, A., *et al.*, N. Engl. J. Med., 328, 847-854 (1993)].

(2) RT-PCR-SSCP y secuenciación del ADN

Se transcribió el ARN total, 5 g, a ADNc utilizando transcriptasa inversa Superscript II (Gibco-BRL) y cebadores al azar. Se utilizó el ADNc n.º 20 de este producto de reacción para la amplificación por PCR. Se realizó PCR-SSCP según el procedimiento de Mashiyama *et al.* [Mashiyama S. *et al.*, Oncogene, 6, 1313-1318 (1991)]. Específicamente, se amplificó el producto de PCR utilizando 3 cebadores para el ADNc de p51A.

Las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para la PCR son las siguientes.

p51-F1: 5'-AAAGAAAGTTATTACCGATG-3'
 p51-R1: 5'-CGCGTGGTCTGTGTTATAGG-3'
 p51-F2: 5'-CATGGACCAAGCAGATTCAGA-3'
 p51-R2: 5'-CATCACCTTGATCTGGATG-3'
 p51-F3: 5'-CCACCTGGACGTATTCCACT-3'
 p51-R3: 5'-TGGCTCATAAGGTACCAG-3'
 p51-F4: 5'-CATGAGCTGAGCCGTGAAT-3'
 p51-R4: 5'-TATCTTCATCCGCCTTCCTG-3'
 p51-F5: 5'-ATGAACCGCCGTCCAATT-3'
 p51-R5: 5'-GTGCTGAGGAAGGTACTGCA-3'
 p51-F6: 5'-TGAAGATCAAAGAGTCCCTG-3"
 p51-R6: 5'-CTAGTGGCTTTGTGCCTTTG-3'

Entonces, se diluyó el 32PdCTP 1:10 con tampón de carga. Tras 5 minutos de desnaturalización adicional a 98°C, se llevó a cabo la separación en un gel de poliacrilamida al 5%/glicerol al 5% a 200 voltios a temperatura ambiente durante 12-14 horas. Tras la electroforesis, se secó el gel y se expuso frente a una película de rayos X durante la noche de modo que pudieran hacerse visibles de manera definida las bandas de migración. Para confirmar la presencia o ausencia de mutación, se subclonó el producto de PCR en el vector pGEM-T Easy (Promega), seguido por secuenciación con el secuenciador de ADN ABI377.

Como resultado, en el tejido de cáncer de pulmón que pertenece al tipo de cáncer de células escamosas altamente diferenciadas, se encontró una mutación puntual por sustitución de un aminoácido (Ala¹⁴⁸→Pro) en la región de unión a ADN deducida de la proteína p51A. Este tumor mostró metástasis de ganglios linfáticos paratraqueales e invasión pleural. Puesto que los 5 clones seleccionados aleatoriamente presentaban la misma mutación, se sugirió que el gen p51 que presentaba esta célula tumoral era un único alelo o se había expresado de manera monoalélica.

Ejemplo experimental 4 Inducción de apoptosis mediante introducción de ADNc de p51 (para referencia)

Se exploró si, como la proteína p53, la proteína p51 podía inducir apoptosis celular.

Se llevó a cabo la prueba de inducción de apoptosis con la proteína p51 mediante el procedimiento de los presentes inventores, concretamente el procedimiento que, tal como se mencionó anteriormente, comprende la utilización de una línea celular de eritroleucemia de ratón transgénico (línea celular 1-2-3) que presenta rasgos típicos de apoptosis cuando se cultiva a 32°C [Kato, M. V., *et al.*, Int. J. Oncol., 9, 269 (1996)].

Se estableció esta línea celular de eritroleucemia de ratón (línea celular 1-2-3) a partir de la eritroleucemia derivada de ratones transgénicos para el gen gp55 del virus formador del foco de bazo de Friend [Xu *et al.*, Jpn. J. Cancer Res. 86, 284-291 (1995); Kato *et al.*, Int. J. Oncol. 9, 269-277] y es una cepa celular que expresa sólo una proteína p53 mutante sensible a temperatura (ts) (Ala1353Val: mutación puntual). Esta proteína p53 ts-mutante se localiza en el citoplasma a 37°C, que es una temperatura de cultivo habitual y, por tanto, no presenta la función de control de la molécula p53 que se descarga intrínsecamente en el núcleo sino que a 32°C migra al núcleo de modo que se induce la actividad de p53 [Levine, A. J. *et al.*, Nature 351, 453-456 (1991)]. Se ha descrito ya que, en esta línea celular, se induce una lenta apoptosis a 32°C.

Se cultivaron las células 1-2-3 en medio RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal al 10% en un entorno de CO₂ al 5%. Entonces, utilizando pRc/CMV como vector de expresión, se introdujo el gen p51A en las células anteriores. Se cultivaron entonces las células en un medio selectivo, y utilizando la resistencia a neomicina (Neo,) como prueba, se seleccionaron células resistentes a G418. Se llevó a cabo entonces un estudio de inducción de apoptosis en las células que expresaban p51A.

Por tanto, se sembraron respectivamente dos cepas de células 1-2-3 transfectadas con p51A (denominadas a continuación en la presente memoria "células 1C1" y "células 4B1") tal como se transfectaron con el vector de expresión que albergaba el gen p51A (pRcCMV/p51A) y, como control, células 1-2-3 transformadas con el vector solo y que no contenían el gen p51A, en placas de 10 cm (dia.) a una concentración de 1×10^5 /ml y se cultivaron a 2 temperaturas alternativas de 37°C y 32°C durante 24 horas. Se recogieron entonces las células y se trataron con proteinasa K y ARNasa A para preparar muestras de ADN. Se sometieron las muestras de ADN a electroforesis en agarosa. Se muestran las imágenes teñidas con bromuro de etidio en la figura 11.

Tal como puede observarse en la figura 11, en cultivo a 37°C, mientras que no se detectaron fragmentos de ADN en células 1-2-3 (carril 1), pudo detectarse fragmentación del ADN hasta oligómeros de 180 pb en las células 1C1 y 4B1 transfectadas con el gen p51A (carriles 2 y 3).

En cultivo a 32°C, se detectó fragmentación del ADN en células 1-2-3 (carril 4) y se promovió la fragmentación del ADN en células 1C1 y células 4B1 (carriles 5 y 6). Estos resultados estaban en consonancia con los resultados de la observación morfológica y los resultados de la prueba de inhibición del crecimiento de células a las que se les introdujo p51 (32°C, 37°C).

Se estudió la presencia o ausencia de cambios morfológicos apoptóticos en células fijando las células respectivas en portaobjetos de vidrio y, tras la tinción con Gimsa, observando la morfología celular y el grado de tinción microscópicamente. El recuento de células viables se realizó mediante tinción con azul tripano y recuento.

Como resultado, las células hechas crecer a 32°C presentaban proyecciones de superficie y presentaban una forma encogida, tensionada o constreñida. Además, en muestras celulares teñidas con Gimsa, se observó condensación de la cromatina o bien alrededor de la envuelta nuclear o bien en masas intracelulares. En cambio, en las células cultivadas a 37°C, no se observaron tales cambios morfológicos.

En el plazo de 24 horas de cultivo a 32°C, estaban presentes de manera mezclada células que se veían sometidas a muerte apoptótica y células que continuaban el ciclo celular y el crecimiento, y tras 24 horas el recuento celular viable de células que expresaban p51 era de 10^5 /ml y el recuento celular de células 1-2-3 era de $1,7 \times 10^5$ /ml.

Lo explicado anteriormente indicaba que las células que contenían el gen p51 tratadas a la temperatura 32°C experimentaban una apoptosis súbita en presencia de p53. Se confirmó por tanto que la proteína p51, como la proteína p53, induce apoptosis en una medida significativa.

Ejemplo experimental 5

Se preparó un anticuerpo específico contra la región C-terminal (posiciones 570-641 de la secuencia de aminoácidos) de la proteína p51B humana y se inmunotiñeron células humanas.

Por tanto, se ligó la región codificante (las posiciones 1851-206 de la secuencia de nucleótidos) del ADN de p51B humano con el vector de expresión de la proteína de fusión GST pGEX-1λT (Pharmacia) y se sintetizó una proteína de fusión en *Escherichia coli*. Utilizando esta proteína de fusión y ratones BALB/C, se preparó un antisuero (anticuerpo policlonal) de la manera rutinaria y se absorbió con la proteína GST para proporcionar un anticuerpo específico contra la región C-terminal de la proteína p51B.

Se sometió el anticuerpo anterior a una reacción primaria con una muestra congelada de tejido cutáneo humano y luego a una reacción secundaria con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado de manera fluorescente.

Como resultado, este anticuerpo teñía específicamente el núcleo celular de la capa de células espinales de la capa basal de la piel humana. Se encontró esta especificidad porque dicho tratamiento con proteína de fusión abolió esta reacción mientras que el tratamiento previo con proteína GST no pudo abolir la reacción.

Aplicabilidad industrial

Los genes pueden caracterizarse como genes relacionados del gen p53 que se conoce como un gen supresor de tumores. Con estos genes, pueden analizarse los niveles de expresión y las funciones en células y se espera que analizando sus productos de expresión, puedan dilucidarse las morbilidades en diversas enfermedades asociadas con estos genes (por ejemplo, tumores malignos) y puedan establecerse modalidades de diagnóstico y terapéuticas.

Además, los genes se expresan en los tejidos glandulares (próstata, glándula mamaria), tejidos musculares y timo y otros sistemas inmunitarios en contraposición a p73 que se expresa en el sistema nervioso y es probable que esté implicado en anomalías de estos tejidos. Por tanto, se espera que estos genes contribuyan al desarrollo de inhibidores o supresores de tales anomalías.

Se proporciona un gen p51 humano nuevo que es valioso como gen supresor de la proliferación celular. El nuevo gen se parece al gen que codifica para la proteína p53 o la proteína p73. Por tanto, el gen puede utilizarse en estudios sobre las relaciones de las funciones analizadas de estos genes relacionados con diversas enfermedades y utilizarse en estudios para la aplicación de diagnóstico genético y la utilización medicinal de estos genes en diversas enfermedades. Además, utilizando el gen, puede explorarse el patrón de expresión del gen en diversos tejidos humanos y pueden analizarse sus funciones en el cuerpo humano.

Además, con este gen, puede producirse la proteína p51 humana codificada por el gen en grandes cantidades mediante tecnología de ingeniería genética. Por tanto, el gen y los fragmentos génicos proporcionados pueden integrarse con vectores de expresión para construir proteínas p51 humanas recombinantes y estudiar la actividad y las funciones de la proteína p51, por ejemplo la actividad de unión de la proteína p51.

Además, la proteína p51 es útil para la dilucidación, el diagnóstico y la terapia patológicos de enfermedades asociadas con el gen p51 o su producto (por ejemplo enfermedades relacionadas con la actividad de transcripción de células y diversas enfermedades relacionadas con la apoptosis, particularmente cánceres).

La proteína p51 presenta acciones o funciones fisiológicas similares a las de la proteína p53. Por tanto, cuando diversas tensiones biológicas tales como infección por virus, estimulación con citocinas, hipoxia, un cambio en la reserva de nucleótidos, trastornos metabólicos inducidos por fármacos, etc. actúan sobre los tejidos vivos, la proteína de la invención presenta funciones tales como transducción de señales a través de interacciones con otras proteínas y control de la transcripción sobre los otros genes para de ese modo modular la replicación del ADN celular en los tejidos sometidos a dichas tensiones biológicas, interrumpir su ciclo celular para reparar las células, eliminar células a través de apoptosis o promover la diferenciación de células para controlar de ese modo la defensa de tejidos vivos frente a dichas tensiones.

Se proporcionan un vector de transferencia génica que contiene el gen p51 humano o un alelo del mismo que es útil para la terapia génica, células en las que se ha introducido dicho gen p51 o alelo, un agente génico-terapéutico que contiene dicho vector o células como principio activo, y un procedimiento de terapia génica que se aprovecha del mismo.

Además, se proporciona un producto farmacéutico que contiene la proteína p51 como principio activo que presenta actividad para suprimir el crecimiento de diversas células cancerosas y encuentra aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades neoplásicas y síntomas asociados a través de dicha actividad.

Las regiones funcionales del gen p51 humano y el gen de ratón correspondiente son completamente idénticas excepto por los 3 aminoácidos en el dominio de TA, reflejando así un alto grado de conservación y sugiriendo la importancia del presente gen [Las secuencias de nucleótidos de los dos genes se muestran de manera correlativa en las figuras 12~14 y la figura 15].

Listado de secuencias

<110> Ikawa, Yoji
Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.

<120> Gen p51 humano y su producto

<130> P99-16

<140>

<141>

<150> JP P1998-100467

<151> 27-03-1998

<160> 23

<170> PatentIn ver. 2.0

<210> 1

<211> 448

<212> PRT

<213> Ser humano

<220>

<221> DOMINIO

5 <222> (1).. (59)

<223> dominio de transactivación

<220>

<221> ADN_UNIÓN

10 <222> (142).. (321)

<223> dominio de unión a ADN

<220>

<221> DOMINIO

15 <222> (353).. (397)

<223> dominio de oligomerización

<400> 1

```

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

```

180										185					190						
Lys	Lys	Ala	Glu	His	Val	Thr	Glu	Val	Val	Lys	Arg	Cys	Pro	Asn	His						
		195						200				205									
Glu	Leu	Ser	Arg	Glu	Phe	Asn	Glu	Gly	Gln	Ile	Ala	Pro	Pro	Ser	His						
	210					215					220										
Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	Ser	His	Ala	Gln	Tyr	Val	Glu	Asp	Pro						
225					230					235				240							
Ile	Thr	Gly	Arg	Gln	Ser	Val	Leu	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Gln	Val						
				245					250					255							
Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Val	Leu	Tyr	Asn	Phe	Met	Cys	Asn	Ser	Ser						
			260					265					270								
Cys	Val	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Ile	Ile	Val	Thr	Leu						
		275				280						285									
Glu	Thr	Arg	Asp	Gly	Gln	Val	Leu	Gly	Arg	Arg	Cys	Phe	Glu	Ala	Arg						
	290					295					300										
Ile	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	Asp	Arg	Lys	Ala	Asp	Glu	Asp	Ser	Ile						
305					310					315				320							
Arg	Lys	Gln	Gln	Val	Ser	Asp	Ser	Thr	Lys	Asn	Gly	Asp	Gly	Thr	Lys						
				325					330					335							
Arg	Pro	Phe	Arg	Gln	Asn	Thr	His	Gly	Ile	Gln	Met	Thr	Ser	Ile	Lys						
			340					345					350								
Lys	Arg	Arg	Ser	Pro	Asp	Asp	Glu	Leu	Leu	Tyr	Leu	Pro	Val	Arg	Gly						
		355				360						365									
Arg	Glu	Thr	Tyr	Glu	Met	Leu	Leu	Lys	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Glu	Leu						
	370					375					380										
Met	Gln	Tyr	Leu	Pro	Gln	His	Thr	Ile	Glu	Thr	Tyr	Arg	Gln	Gln	Gln						
385					390					395				400							
Gln	Gln	Gln	His	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Lys	His	Leu	Leu	Ser	Ala	Cys						
				405				410						415							
Phe	Arg	Asn	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Arg	Arg	Glu	Thr	Pro	Lys	Gln	Ser						
			420					425					430								
Asp	Val	Phe	Phe	Arg	His	Ser	Lys	Pro	Pro	Asn	Arg	Ser	Val	Tyr	Pro						
		435				440						445									

<210> 2
 <211> 2816
 5 <212> ADN
 <213> Ser humano

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (145).. (1488)

<220>
 <221> señal de poliA
 <222> (2786).. (2791)

15 <400> 2

```

tcgttgatg caaagacagt tgaaggaaat gaattttgaa acttcacggt gtcaccacct 60
acagtactgc cctgaccctt acatccagcg ttctgtagaa acccagctca ttctcttgg 120
aaagaaagtt attaccgata cacc atg tcc cag agc aca cag aca aat gaa 171
Met Ser Gln Ser Thr Gln Thr Asn Glu

```

1										5										
ttc	ctc	agt	cca	gag	gtt	ttc	cag	cat	atc	tgg	gat	ttt	ctg	gaa	cag					219
Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	Val	Phe	Gln	His	Ile	Trp	Asp	Phe	Leu	Glu	Gln					
10					15					20				25						
cct	ata	tgt	tca	gtt	cag	ccc	att	gac	tig	aac	ttt	gtg	gat	gaa	cca					267
Pro	Ile	Cys	Ser	Val	Gln	Pro	Ile	Asp	Leu	Asn	Phe	Val	Asp	Glu	Pro					
				30					35					40						
tca	gaa	gat	ggg	gag	aca	aac	aag	att	gag	att	agc	atg	gac	tgt	alc					315
Ser	Glu	Asp	Gly	Ala	Thr	Asn	Lys	Ile	Glu	Ile	Ser	Met	Asp	Cys	Ile					
			45					50					55							
cgc	atg	cag	gac	tcg	gac	ctg	agt	gac	ccc	atg	tgg	cca	cag	tac	acg					363
Arg	Met	Gln	Asp	Ser	Asp	Leu	Ser	Asp	Pro	Met	Trp	Pro	Gln	Tyr	Thr					
		60				65						70								
aac	ctg	ggg	ctc	ctg	aac	agc	atg	gac	cag	cag	att	cag	aac	ggc	tcc					411
Asn	Leu	Gly	Leu	Leu	Asn	Ser	Met	Asp	Gln	Gln	Ile	Gln	Asn	Gly	Ser					
	75					80					85									
tcg	tcc	acc	agt	ccc	tat	aac	aca	gac	cac	gag	cag	aac	agc	gtc	acg					459
Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	Tyr	Asn	Thr	Asp	His	Ala	Gln	Asn	Ser	Val	Thr					
	90				95					100				105						
gag	ccc	tcg	ccc	tac	gca	cag	ccc	agc	tcc	acc	ttc	gat	gct	ctc	tct					507
Ala	Pro	Ser	Pro	Tyr	Ala	Gln	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Asp	Ala	Leu	Ser					
				110					115					120						
cca	tca	ccc	gcc	atc	ccc	tcc	aac	acc	gac	tac	cca	ggc	ccg	cac	agt					555
Pro	Ser	Pro	Ala	Ile	Pro	Ser	Asn	Thr	Asp	Tyr	Pro	Gly	Pro	His	Ser					
			125					130					135							
ttc	gac	gtg	tcc	ttc	cag	cag	tcg	agc	acc	gcc	aag	tcg	gcc	acc	tgg					603
Phe	Asp	Val	Ser	Phe	Gln	Gln	Ser	Ser	Thr	Ala	Lys	Ser	Ala	Thr	Trp					
	140						145					150								
acg	tat	tcc	act	gaa	ctg	aag	aaa	ctc	tac	tgc	caa	att	gca	aag	aca					651
Thr	Tyr	Ser	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Tyr	Cys	Gln	Ile	Ala	Lys	Thr					
	155					160					165									
tgc	ccc	atc	cag	atc	aag	gtg	atg	acc	cca	cct	cct	cag	gga	gct	gtt					699
Cys	Pro	Ile	Gln	Ile	Lys	Val	Met	Thr	Pro	Pro	Pro	Gln	Gly	Ala	Val					
	170				175					180				185						
atc	cgc	gcc	atg	cct	gtc	tac	aaa	aaa	gct	gag	cac	gtc	acg	gag	gtg					747
Ile	Arg	Ala	Met	Pro	Val	Tyr	Lys	Lys	Ala	Glu	His	Val	Thr	Glu	Val					
				190					195					200						
gtg	aag	cgg	tgc	ccc	aac	cat	gag	ctg	agc	cgt	gaa	ttc	aac	gag	gga					795
Val	Lys	Arg	Cys	Pro	Asn	His	Glu	Leu	Ser	Arg	Glu	Phe	Asn	Glu	Gly					
			205					210					215							
cag	att	gcc	cct	cct	agt	cat	tig	att	cga	gta	gag	ggg	aac	agc	cat					843
Gln	Ile	Ala	Pro	Pro	Ser	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	Ser	His					
		220					225						230							
gcc	cag	tat	gta	gaa	gat	ccc	atc	aca	gga	aga	cag	agt	gtg	ctg	gta					891
Ala	Gln	Tyr	Val	Glu	Asp	Pro	Ile	Thr	Gly	Arg	Gln	Ser	Val	Leu	Val					
	235					240						245								
cct	tat	gag	cca	ccc	cag	gtt	ggc	act	gaa	ttc	acg	aca	gtc	tig	tac					939
Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Val	Leu	Tyr					
	250				255					260				265						
aat	ttc	atg	tgt	aac	agc	agt	tgt	gtt	gga	ggg	atg	aac	cgc	cgt	cca					987
Asn	Phe	Met	Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Val	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	Arg	Pro					
				270					275					280						
att	tta	atc	att	gtt	act	ctg	gaa	acc	aga	gat	ggg	caa	gtc	ctg	ggc					1035
Ile	Leu	Ile	Ile	Val	Thr	Leu	Glu	Thr	Arg	Asp	Gly	Gln	Val	Leu	Gly					
				285				290					295							

cga cgc tgc ttt gag gcc cgg atc tgt gct tgc cca gga aga gac agg 1083
 Arg Arg Cys Phe Glu Ala Arg Ile Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg
 300 305 310

aag gcg gat gaa gat agc atc aga aag cag caa gtt tgc gac agt aca 1131
 Lys Ala Asp Glu Asp Ser Ile Arg Lys Gln Gln Val Ser Asp Ser Thr
 315 320 325

aag aac ggt gat ggt acg aag cgc ccg ttt cgt cag aac aca cat ggt 1179
 Lys Asn Gly Asp Gly Thr Lys Arg Pro Phe Arg Gln Asn Thr His Gly
 330 335 340 345

atc cag atg aca tcc atc aag aaa cga aga tcc cca gat gat gaa ctg 1227
 Ile Gln Met Thr Ser Ile Lys Lys Arg Arg Ser Pro Asp Asp Glu Leu
 350 355 360

tta tac tta cca gtg agg gcc cgt gag act tat gaa atg ctg ttg aag 1275
 Leu Tyr Leu Pro Val Arg Gly Arg Glu Thr Tyr Glu Met Leu Leu Lys
 365 370 375

atc aaa gag tcc ctg gaa ctc atg cag tac ctt cct cag cac aca att 1323
 Ile Lys Glu Ser Leu Glu Leu Met Gln Tyr Leu Pro Gln His Thr Ile
 380 385 390

gaa acg tac agg caa cag caa cag cag cag cac cag cac tta ctt cag 1371
 Glu Thr Tyr Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Gln His Leu Leu Gln
 395 400 405

aaa cat ctc ctt tca gcc tgc ttc agg aat gag ctt gtg gag ccc cgg 1419
 Lys His Leu Leu Ser Ala Cys Phe Arg Asn Glu Leu Val Glu Pro Arg
 410 415 420 425

aga gaa act cca aaa caa tct gac gtc ttc ttt aga cat tcc aag ccc 1467
 Arg Glu Thr Pro Lys Gln Ser Asp Val Phe Phe Arg His Ser Lys Pro
 430 435 440

cca aac cga tca gtg tac cca tagagcccta tcctatatt ttaagtgtg 1518
 Pro Asn Arg Ser Val Tyr Pro
 445

gtgttgiatt tccatgtgta tatgtgagtg tgtgtgtgtg tatgtgtgtg cgtgtgtatc 1578
 tagccclcat aaacaggact tgaagacact ttggctcaga gacccaactg ctcaaaggca 1638
 caaagccact agtgagagaa tcttttgaag ggaactcaaac cttacaaga aaggatgttt 1698
 tctgcagatt ttgtatcctt agaccggcca ttggtgggtg aggaaccact gtgtttgtct 1758
 gtgagctttc tttgttttcc tgggagggag ggttcaggte gggaaagggg cattaagatg 1818
 ttatattgaa cctttttctg tcttcttctg ttgttttctt aaaattcaca gggaagcttt 1878
 tgagcaggte tcaaaactta gatgtctttt taagaaaagg agaaaaaagt tttattgtc 1938
 tgtgcataag taagtgttag gtgactgaga gactcagica gaccctttta atgctggica 1998
 tgtaataata ttgcaagtag taagaaacca aggtgtcaag tgtactgctg ggcagcgagg 2058
 tgatcattac caaaagtaat caactttgtg ggtggagagt tctttgtgag aacttgcatt 2118
 atttgttcc tccctcatg ttaggtaga acatttcta atgctgtgta cctgcctctg 2178
 ccactgtatg ttggcatctg ttatgctaaa gtttttcttg tacatgaac cctggaagac 2238
 ctactacaaa aaac.tgttg ttggccccc atagcaggte aactatttt gtgcttttaa 2298
 tagaaagaca aatccacccc agtaatatg cctttacgta gttgtttacc attaticaaa 2358
 gctcaaaata gaatttgaag cctctcaca aaatctgtga ttaatttgct taattagagc 2418
 ttctatccct caagcctacc taccataaaa ccagccatat tactgatact gttcagtgca 2478
 tttagccagg agacttacgt tttagtaag tgagatcaa gcagacgtgt taanaacagc 2538

actcctggac tggaaattaa agattgaaag ggtagactac ttctcttttt ttactcaaa 2598
 agtttagaga atctctgttt ctttccattt taaaaacata tttaagata atagcataaa 2658
 gactttaaaa atgttccctcc cctccaicct cccacaccca gtcaccagca ctgtattttc 2718
 tgtcaccaag acaatgattt ctgttattg aggctgttgc ttgttggat gtgtgatttt 2778
 aattttcaat aaacttttgc atcttggttt aaaagaaa 2816

<210> 3

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Ser humano

<400> 3

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

```

Ile Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Lys Ala Asp Glu Asp Ser Ile
305          310          315          320
Arg Lys Gln Gln Val Ser Asp Ser Thr Lys Asn Gly Asp Gly Thr Lys
          325          330          335
Arg Pro Phe Arg Gln Asn Thr His Gly Ile Gln Met Thr Ser Ile Lys
          340          345          350
Lys Arg Arg Ser Pro Asp Asp Glu Leu Leu Tyr Leu Pro Val Arg Gly
          355          360          365
Arg Glu Thr Tyr Glu Met Leu Leu Lys Ile Lys Glu Ser Leu Glu Leu
370          375          380
Met Gln Tyr Leu Pro Gln His Thr Ile Glu Thr Tyr Arg Gln Gln Gln
385          390          395          400
Gln Gln Gln His Gln His Leu Leu Gln Lys His Leu Leu Ser Ala Cys
          405          410          415
Phe Arg Asn Glu Leu Val Glu Pro Arg Arg Glu Thr Pro Lys Gln Ser
          420          425          430
Asp Val Phe Phe Arg His Ser Lys Pro Pro Asn Arg Ser Val Tyr Pro
          435          440          445

```

<210> 4
 <211> 641
 5 <212> PRT
 <213> Ser humano

<220>
 <221> DOMINIO
 10 <222> (1).. (59)
 <223> dominio de transactivación

<220>
 <221> ADN_UNIÓN
 15 <222> (142).. (321)
 <223> dominio de unión a ADN

<220>
 <221> DOMINIO
 20 <222> (353).. (397)
 <223> dominio de oligomerización

<400> 4

```

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

```

130					135					140					
Ser	Ser	Thr	Ala	Lys	Ser	Ala	Thr	Trp	Thr	Tyr	Ser	Thr	Glu	Leu	Lys
145					150					155					160
Lys	Leu	Tyr	Cys	Gln	Ile	Ala	Lys	Thr	Cys	Pro	Ile	Gln	Ile	Lys	Val
				165					170					175	
Met	Thr	Pro	Pro	Pro	Gln	Gly	Ala	Val	Ile	Arg	Ala	Met	Pro	Val	Tyr
				180				185					190		
Lys	Lys	Ala	Glu	His	Val	Thr	Glu	Val	Val	Lys	Arg	Cys	Pro	Asn	His
		195					200					205			
Glu	Leu	Ser	Arg	Glu	Phe	Asn	Glu	Gly	Gln	Ile	Ala	Pro	Pro	Ser	His
	210					215					220				
Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	Ser	His	Ala	Gln	Tyr	Val	Glu	Asp	Pro
225						230					235				240
Ile	Thr	Gly	Arg	Gln	Ser	Val	Leu	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Gln	Val
				245					250					255	
Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Val	Leu	Tyr	Asn	Phe	Met	Cys	Asn	Ser	Ser
				260				265					270		
Cys	Val	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Ile	Ile	Val	Thr	Leu
		275					280					285			
Glu	Thr	Arg	Asp	Gly	Gln	Val	Leu	Gly	Arg	Arg	Cys	Phe	Glu	Ala	Arg
		290				295					300				
Ile	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	Asp	Arg	Lys	Ala	Asp	Glu	Asp	Ser	Ile
305						310				315				320	
Arg	Lys	Gln	Gln	Val	Ser	Asp	Ser	Thr	Lys	Asn	Gly	Asp	Gly	Thr	Lys
				325					330				335		
Arg	Pro	Phe	Arg	Gln	Asn	Thr	His	Gly	Ile	Gln	Met	Thr	Ser	Ile	Lys
				340				345					350		
Lys	Arg	Arg	Ser	Pro	Asp	Asp	Glu	Leu	Leu	Tyr	Leu	Pro	Val	Arg	Gly
				355			360					365			
Arg	Glu	Thr	Tyr	Glu	Met	Leu	Leu	Lys	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Glu	Leu
				370			375				380				
Met	Gln	Tyr	Leu	Pro	Gln	His	Thr	Ile	Glu	Thr	Tyr	Arg	Gln	Gln	Gln
385						390				395				400	
Gln	Gln	Gln	His	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Lys	Gln	Thr	Ser	Ile	Gln	Ser
				405					410				415		
Pro	Ser	Ser	Tyr	Gly	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro	Leu	Asn	Lys	Met	Asn	Ser
				420				425					430		
Met	Asn	Lys	Leu	Pro	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Ile	Asn	Pro	Gln	Gln	Arg
				435			440					445			
Asn	Ala	Leu	Thr	Pro	Thr	Thr	Ile	Pro	Asp	Gly	Met	Gly	Ala	Asn	Ile
				450			455				460				
Pro	Met	Met	Gly	Thr	His	Met	Pro	Met	Ala	Gly	Asp	Met	Asn	Gly	Leu
465						470				475				480	
Ser	Pro	Thr	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Leu	Ser	Met	Pro	Ser	Thr	Ser
				485					490				495		
His	Cys	Thr	Pro	Pro	Pro	Pro	Tyr	Pro	Thr	Asp	Cys	Ser	Ile	Val	Ser
				500				505					510		
Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Gly	Cys	Ser	Ser	Cys	Leu	Asp	Tyr	Phe	Thr	Thr
				515			520					525			

Gln Gly Leu Thr Thr Ile Tyr Gln Ile Glu His Tyr Ser Met Asp Asp
 530 535 540
 Leu Ala Ser Leu Lys Ile Pro Glu Gln Phe Arg His Ala Ile Trp Lys
 545 550 555 560
 Gly Ile Leu Asp His Arg Gln Leu His Glu Phe Ser Ser Pro Ser His
 565 570 575
 Leu Leu Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ser Thr Val Ser Val Gly Ser Ser
 580 585 590
 Glu Thr Arg Gly Glu Arg Val Ile Asp Ala Val Arg Phe Thr Leu Arg
 595 600 605
 Gln Thr Ile Ser Phe Pro Pro Arg Asp Glu Trp Asn Asp Phe Asn Phe
 610 615 620
 Asp Met Asp Ala Arg Arg Asn Lys Gln Gln Arg Ile Lys Glu Glu Gly
 625 630 635 640
 Glu

<210> 5
 <211> 2270
 5 <212> ADN
 <213> Ser humano

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (145).. (2067)

<400> 5

tcgttgatat caaagacagt tgaaggaaat gaatttigaa acttcacggt gtgccaccct 60
 acagtactgc cctgaccctt acatccagcg ttctctagaa acccagctca ttctcttgg 120
 aaagaaagtt attaccgata cacc atg tcc cag agc aca cag aca aat gaa 171
 Met Ser Gln Ser Thr Gln Thr Asn Glu
 1 5
 ttc ctc agt cca gag gtt ttc cag cat atc tgg gat ttt ctg gaa cag 219
 Phe Leu Ser Pro Glu Val Phe Gln His Ile Trp Asp Phe Leu Glu Gln
 10 15 20 25
 cct ata tgt tca gtt cag ccc att gac ttg aac ttt gtg gat gaa cca 267
 Pro Ile Cys Ser Val Gln Pro Ile Asp Leu Asn Phe Val Asp Glu Pro
 30 35 40
 tca gaa gat ggt gcg aca aac aag att gag att agc atg gac tgt atc 315
 Ser Glu Asp Gly Ala Thr Asn Lys Ile Glu Ile Ser Met Asp Cys Ile
 45 50 55
 cgc atg cag gac tcg gac ctg agt gac ccc atg tgg cca cag tac acg 363
 Arg Met Gln Asp Ser Asp Leu Ser Asp Pro Met Trp Pro Gln Tyr Thr
 60 65 70
 aac ctg ggg ctc ctg aac agc atg gac cag cag att cag aac ggc tcc 411
 Asn Leu Gly Leu Leu Asn Ser Met Asp Gln Gln Ile Gln Asn Gly Ser
 75 80 85
 tcg tcc acc agt ccc tat aac aca gac cac gcg cag aac agc gtc acg 459
 Ser Ser Thr Ser Pro Tyr Asn Thr Asp His Ala Gln Asn Ser Val Thr
 90 95 100 105
 gcg ccc tcg ccc tac gca cag ccc agc tcc acc ttc gat gct ctc tct 507
 Ala Pro Ser Pro Tyr Ala Gln Pro Ser Ser Thr Phe Asp Ala Leu Ser
 110 115 120
 cca tca ccc gcc atc ccc tcc aac acc gac tac cca gcc ccg cac agt 555
 Pro Ser Pro Ala Ile Pro Ser Asn Thr Asp Tyr Pro Gly Pro His Ser
 125 130 135

ttc gac gtg tcc ttc cag cag tgc agc acc gcc aag tgc gcc acc tgg Phe Asp Val Ser Phe Gln Gln Ser Ser Thr Ala Lys Ser Ala Thr Trp 140 145 150	603
acg tat tcc act gaa ctg aag aaa ctc tac tgc caa att gca aag aca Thr Tyr Ser Thr Glu Leu Lys Lys Leu Tyr Cys Gln Ile Ala Lys Thr 155 160 165	651
tgc ccc atc cag atc aag gtg atg acc cca cct cct cag gga gct gtt Cys Pro Ile Gln Ile Lys Val Met Thr Pro Pro Pro Gln Gly Ala Val 170 175 180 185	699
atc cgc gcc atg cct gtc tac aaa aaa gct gag cac gtc acg gag gtg Ile Arg Ala Met Pro Val Tyr Lys Lys Ala Glu His Val Thr Glu Val 190 195 200	747
gtg aag cgg tgc ccc aac cat gag ctg agc cgt gaa ttc aac gag gga Val Lys Arg Cys Pro Asn His Glu Leu Ser Arg Glu Phe Asn Glu Gly 205 210 215	795
cag att gcc cct cct agt cat ttg att cga gta gag ggg aac agc cat Gln Ile Ala Pro Pro Ser His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Ser His 220 225 230	843
gcc cag tat gta gaa gat ccc atc aca gga aga cag agt gtg ctg gta Ala Gln Tyr Val Glu Asp Pro Ile Thr Gly Arg Gln Ser Val Leu Val 235 240 245	891
cct tat gag cca ccc cag gtt ggc act gaa ttc acg aca gtc ttg tac Pro Tyr Glu Pro Pro Gln Val Gly Thr Glu Phe Thr Thr Val Leu Tyr 250 255 260 265	939
aat ttc atg tgt aac agc agt tgt gtt gga ggg atg aac cgc cgt cca Asn Phe Met Cys Asn Ser Ser Cys Val Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro 270 275 280	987
att tta atc att gtt act ctg gaa acc aga gat ggg caa gtc ctg ggc Ile Leu Ile Ile Val Thr Leu Glu Thr Arg Asp Gly Gln Val Leu Gly 285 290 295	1035
cga cgc tgc ttt gag gcc cgg atc tgt gct tgc cca gga aga gac agg Arg Arg Cys Phe Glu Ala Arg Ile Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg 300 305 310	1083
aag gcg gat gaa gat agc atc aga aag cag caa gtt tgc gac agt aca Lys Ala Asp Glu Asp Ser Ile Arg Lys Gln Gln Val Ser Asp Ser Thr 315 320 325	1131
aag aac ggt gat ggt acg aag cgc ccg ttt cgt cag aac aca cat ggt Lys Asn Gly Asp Gly Thr Lys Arg Pro Phe Arg Gln Asn Thr His Gly 330 335 340 345	1179
atc cag atg aca tcc atc aag aaa cga aga tcc cca gat gat gaa ctg Ile Gln Met Thr Ser Ile Lys Lys Arg Arg Ser Pro Asp Asp Glu Leu 350 355 360	1227
tta tac tta cca gtg agg ggc cgt gag act tat gaa atg ctg ttg aag Leu Tyr Leu Pro Val Arg Gly Arg Glu Thr Tyr Glu Met Leu Leu Lys 365 370 375	1275
atc aaa gag tcc ctg gaa ctc atg cag tac ctt cct cag cac aca att Ile Lys Glu Ser Leu Glu Leu Met Gln Tyr Leu Pro Gln His Thr Ile 380 385 390	1323
gaa acg tac agg caa cag caa cag cag cag cac cag cac tta ctt cag Glu Thr Tyr Arg Gln Gln Gln Gln Gln His Gln His Leu Leu Gln 395 400 405	1371
aaa cag acc tca ata cag tct cca tct tca tat ggt aac agc tcc cca Lys Gln Thr Ser Ile Gln Ser Pro Ser Ser Tyr Gly Asn Ser Ser Pro 410 415 420 425	1419
cct ctg aac aaa atg aac agc atg aac aag ctg cct tct gtg agc cag	1467

```

Pro Leu Asn Lys Met Asn Ser Met Asn Lys Leu Pro Ser Val Ser Gln
430                               435                               440

ctt atc aac cct cag cag cgc aac gcc ctc act cct aca acc att cct 1515
Leu Ile Asn Pro Gln Gln Arg Asn Ala Leu Thr Pro Thr Thr Ile Pro
445                               450                               455

gat gcc atg gga gcc aac att ccc atg atg gcc acc cac atg cca atg 1563
Asp Gly Met Gly Ala Asn Ile Pro Met Met Gly Thr His Met Pro Met
460                               465                               470

gct gga gac atg aat gga ctc agc ccc acc cag gca ctc cct ccc cca 1611
Ala Gly Asp Met Asn Gly Leu Ser Pro Thr Gln Ala Leu Pro Pro Pro
475                               480                               485

ctc tcc atg cca tcc acc tcc cac tgc aca ccc cca cct ccg tat ccc 1659
Leu Ser Met Pro Ser Thr Ser His Cys Thr Pro Pro Pro Pro Tyr Pro
490                               495                               500                               505

aca gat tgc agc att gtc agt ttc tta gcg agc ttg gcc tgt tca tca 1707
Thr Asp Cys Ser Ile Val Ser Phe Leu Ala Arg Leu Gly Cys Ser Ser
510                               515                               520

tgt ctg gac tat ttc acg acc cag ggc ctg acc acc atc tat cag att 1755
Cys Leu Asp Tyr Phe Thr Thr Gln Gly Leu Thr Thr Ile Tyr Gln Ile
525                               530                               535

gag cat tac tcc atg gat gat ctg gca agt ctg aaa atc cct gag caa 1803
Glu His Tyr Ser Met Asp Asp Leu Ala Ser Leu Lys Ile Pro Glu Gln
540                               545                               550

ttt cga cat gcg atc tgg aag gcc atc ctg gac cac cgg cag ctc cac 1851
Phe Arg His Ala Ile Trp Lys Gly Ile Leu Asp His Arg Gln Leu His
555                               560                               565

gaa ttc tcc tcc cct tct cat ctc ctg cgg acc cca agc agt gcc tct 1899
Glu Phe Ser Ser Pro Ser His Leu Leu Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ser
570                               575                               580                               585

aca gtc agt gtg gcc tcc agt gag acc cgg ggt gag cgt gtt att gat 1947
Thr Val Ser Val Gly Ser Ser Glu Thr Arg Gly Glu Arg Val Ile Asp
590                               595                               600

gct gtg cga ttc acc ctc cgc cag acc atc tct ttc cca ccc cga gat 1995
Ala Val Arg Phe Thr Leu Arg Gln Thr Ile Ser Phe Pro Pro Arg Asp
605                               610                               615

gag tgg aat gac ttc aac ttt gac atg gat gct cgc cgc aat aag caa 2043
Glu Trp Asn Asp Phe Asn Phe Asp Met Asp Ala Arg Arg Asn Lys Gln
620                               625                               630

cag cgc atc aaa gag gag ggg gag tgagcctcac catgtgagct ctctctatcc 2097
Gln Arg Ile Lys Glu Glu Gly Glu
635                               640

ctctcctaac tgcagcccc ctaaaagcac tcttgcctaa tcttcaaagc ctctcccta 2157
gctctcccc tctctctgt ctgattctt aggggaagga gaagtaagag gctacctctt 2217
acctaacatc tgacctggca tctaattctg attctggctt taagccttca aaa 2270

```

<210> 6

<211> 641

5 <212> PRT

<213> Ser humano

<400> 6

```

Met Ser Gln Ser Thr Gln Thr Asn Glu Phe Leu Ser Pro Glu Val Phe
1                               5                               10                               15

Gln His Ile Trp Asp Phe Leu Glu Gln Pro Ile Cys Ser Val Gln Pro
20                               25                               30

```

Ile Asp Leu Asn Phe Val Asp Glu Pro Ser Glu Asp Gly Ala Thr Asn
 35 40 45
 Lys Ile Glu Ile Ser Met Asp Cys Ile Arg Met Gln Asp Ser Asp Leu
 50 55 60
 Ser Asp Pro Met Trp Pro Gln Tyr Thr Asn Leu Gly Leu Leu Asn Ser
 65 70 75 80
 Met Asp Gln Gln Ile Gln Asn Gly Ser Ser Ser Thr Ser Pro Tyr Asn
 85 90 95
 Thr Asp His Ala Gln Asn Ser Val Thr Ala Pro Ser Pro Tyr Ala Gln
 100 105 110
 Pro Ser Ser Thr Phe Asp Ala Leu Ser Pro Ser Pro Ala Ile Pro Ser
 115 120 125
 Asn Thr Asp Tyr Pro Gly Pro His Ser Phe Asp Val Ser Phe Gln Gln
 130 135 140
 Ser Ser Thr Ala Lys Ser Ala Thr Trp Thr Tyr Ser Thr Glu Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Leu Tyr Cys Gln Ile Ala Lys Thr Cys Pro Ile Gln Ile Lys Val
 165 170 175
 Met Thr Pro Pro Pro Gln Gly Ala Val Ile Arg Ala Met Pro Val Tyr
 180 185 190
 Lys Lys Ala Glu His Val Thr Glu Val Val Lys Arg Cys Pro Asn His
 195 200 205
 Glu Leu Ser Arg Glu Phe Asn Glu Gly Gln Ile Ala Pro Pro Ser His
 210 215 220
 Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Ser His Ala Gln Tyr Val Glu Asp Pro
 225 230 235 240
 Ile Thr Gly Arg Gln Ser Val Leu Val Pro Tyr Glu Pro Pro Gln Val
 245 250 255
 Gly Thr Glu Phe Thr Thr Val Leu Tyr Asn Phe Met Cys Asn Ser Ser
 260 265 270
 Cys Val Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Ile Ile Val Thr Leu
 275 280 285
 Glu Thr Arg Asp Gly Gln Val Leu Gly Arg Arg Cys Phe Glu Ala Arg
 290 295 300
 Ile Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Lys Ala Asp Glu Asp Ser Ile
 305 310 315 320
 Arg Lys Gln Gln Val Ser Asp Ser Thr Lys Asn Gly Asp Gly Thr Lys
 325 330 335
 Arg Pro Phe Arg Gln Asn Thr His Gly Ile Gln Met Thr Ser Ile Lys
 340 345 350
 Lys Arg Arg Ser Pro Asp Asp Glu Leu Leu Tyr Leu Pro Val Arg Gly
 355 360 365
 Arg Glu Thr Tyr Glu Met Leu Leu Lys Ile Lys Glu Ser Leu Glu Leu
 370 375 380
 Met Gln Tyr Leu Pro Gln His Thr Ile Glu Thr Tyr Arg Gln Gln Gln
 385 390 395 400
 Gln Gln Gln His Gln His Leu Leu Gln Lys Gln Thr Ser Ile Gln Ser
 405 410 415
 Pro Ser Ser Tyr Gly Asn Ser Ser Pro Pro Leu Asn Lys Met Asn Ser
 420 425 430

Met Asn Lys Leu Pro Ser Val Ser Gln Leu Ile Asn Pro Gln Gln Arg
435 440 445
Asn Ala Leu Thr Pro Thr Thr Ile Pro Asp Gly Met Gly Ala Asn Ile
450 455 460
Pro Met Met Gly Thr His Met Pro Met Ala Gly Asp Met Asn Gly Leu
465 470 475 480
Ser Pro Thr Gln Ala Leu Pro Pro Pro Leu Ser Met Pro Ser Thr Ser
485 490 495
His Cys Thr Pro Pro Pro Pro Tyr Pro Thr Asp Cys Ser Ile Val Ser
500 505 510
Phe Leu Ala Arg Leu Gly Cys Ser Ser Cys Leu Asp Tyr Phe Thr Thr
515 520 525
Gln Gly Leu Thr Thr Ile Tyr Gln Ile Glu His Tyr Ser Met Asp Asp
530 535 540
Leu Ala Ser Leu Lys Ile Pro Glu Gln Phe Arg His Ala Ile Trp Lys
545 550 555 560
Gly Ile Leu Asp His Arg Gln Leu His Glu Phe Ser Ser Pro Ser His
565 570 575
Leu Leu Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ser Thr Val Ser Val Gly Ser Ser
580 585 590
Glu Thr Arg Gly Glu Arg Val Ile Asp Ala Val Arg Phe Thr Leu Arg
595 600 605
Gln Thr Ile Ser Phe Pro Pro Arg Asp Glu Trp Asn Asp Phe Asn Phe
610 615 620
Asp Met Asp Ala Arg Arg Asn Lys Gln Gln Arg Ile Lys Glu Glu Gly
625 630 635 640
Glu

<210> 7
<211> 27
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sentido p73-F1

<400> 7

tacgtgcacg taaagacacg ttgctcc

27

15 <210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: cebador antisentido p73-R1

<400> 8

25 tgctgcacgt tgctccacgt ggacgtacg

29

<210> 9
<211> 29
<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sentido p73-F2	
5	<400> 9	
	tacgtatact acgacgtgta cgtgaaggg	29
10	<210> 10	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador antisentido p73-R2	
	<400> 10	
20	atgaactaeg acgtacgacg tccacgtat	29
	<210> 11	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: constructo de expresión marcado con HA	
30	<400> 11	
	atgtatccat atgatgttc agattatgct	30
	<210> 12	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sentido p51-F1	
	<400> 12	
	aaagaaagtt attaccgatg	20
45	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador antisentido p51-R1	
	<400> 13	
55	cgcgtgtgtct gtgttatagg	20
	<210> 14	
	<211> 20	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sentido p51-F2	
65	<400> 14	

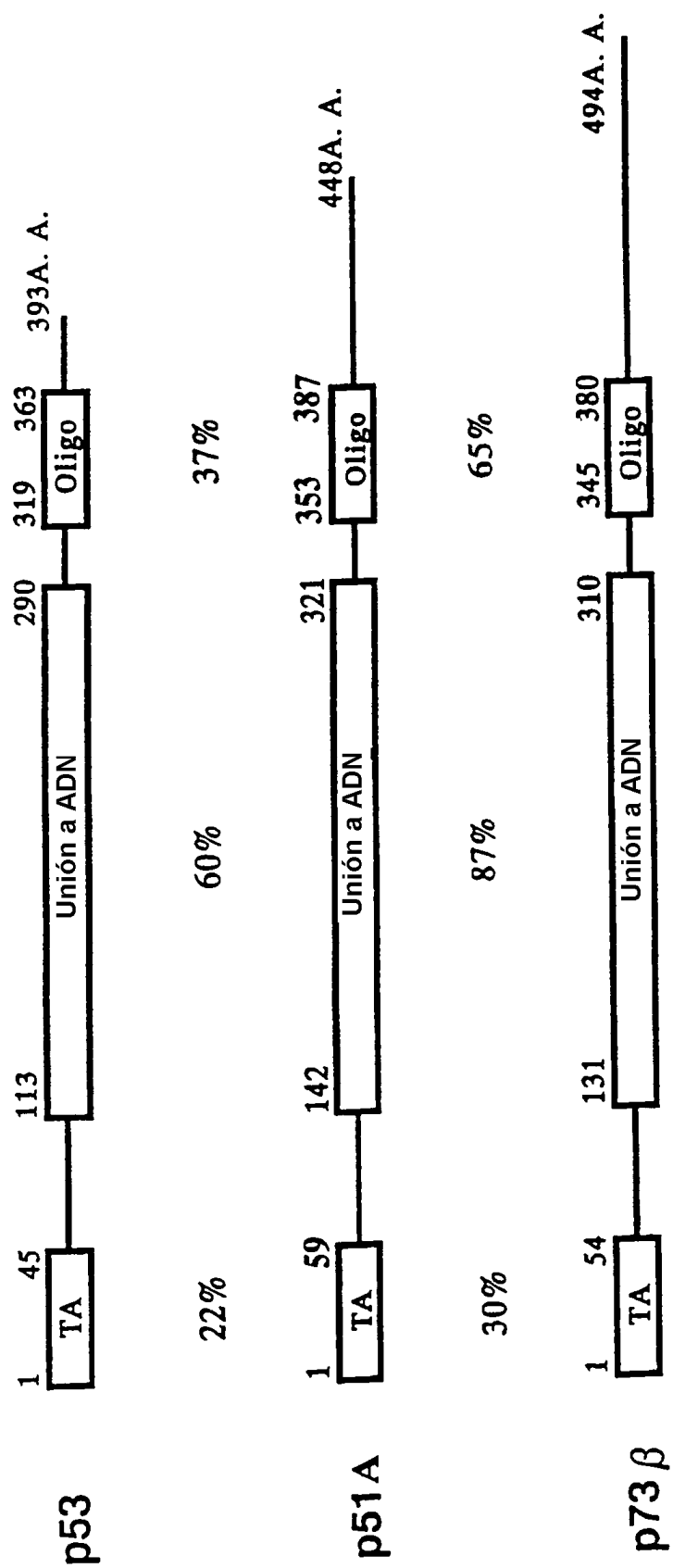
	catggaccag cagattcaga	20
5	<210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador antisentido p51-R2 <400> 15	
15	catcaccttg atctggatg	19
20	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sentido p51-F3 <400> 16	
30	ccacctggac gtattccact	20
35	<210> 17 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador antisentido p51-R3 <400> 17	
45	tggtcataa ggtaccag	18
50	<210> 18 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sentido p51-F4 <400> 18	
60	catgagctga gccgtgaat	19
65	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador antisentido p51-R4 <400> 19	
	tatcttcacgcgccttctg	20
	<210> 20 <211> 18 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sentido p51-F5	
5	<400> 20	
	atgaaccgcc gtccaatt	18
10	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador antisentido p51-R5	
	<400> 21	
20	gtgctgagga aggtactgca	20
	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sentido p51-F6	
30	<400> 22	
	tgaagatcaa agagtccttg	20
	<210> 23	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador antisentido p51-R6	
	<400> 23	
45	ctagtggtt tgtagcttgg	20

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína p51 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 1, en el que dicha proteína p51 se produce mediante tecnología recombinante o síntesis química.
2. Anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que la unión se determina utilizando inmunoprecipitación, inmunotinción, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA o radioinmunoanálisis (RIA).
3. Kit para detectar la proteína p51 que comprende
 - (i) un anticuerpo aislado según la reivindicación 1, y
 - (ii) un medio para detectar el anticuerpo.
4. Kit según la reivindicación 3, en el que el medio para detectar el anticuerpo es uno o más de entre una enzima, una coenzima, un sustrato, un polipéptido, un anticuerpo o un marcador detectable.
5. Kit según la reivindicación 4, en el que el medio para detectar el anticuerpo es un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo.
6. Kit según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
7. Kit según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo está en forma de una preparación purificada de anticuerpo policlonal.

F I G. 1



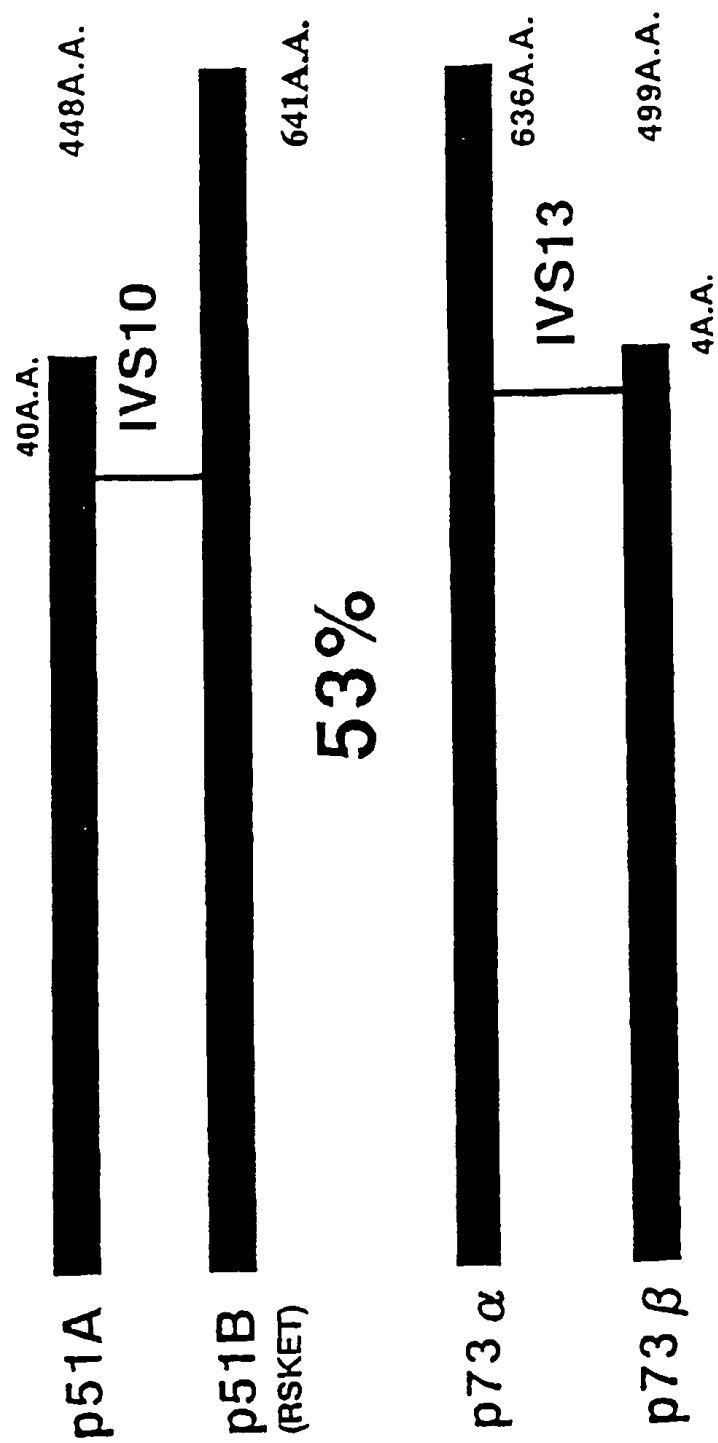
F I G. 2

p51A	MSSTQTNEF	LSPEVFQHW	DFLEQPICSV	QPIQLNFVDE	PSEDGATNKI	50
p73β	MAQSTATSP-	DGGTTFEHLW	SSUE-POSTY	--FQLP-QSS	RGNNVEVGGT	45
p53	KEEPQSDPS-	VEPPLSQETF	SQU-----	--WML-----L	PENNVLSPLP	36
Consenso	M.QST.T...	..P..FQH.W	SUE-P....	--.L...P.NN.....		50
p51A	EISMDQIRMQ	DSQSDPMWP	QYTNLGLLS	MDQIQNGSS	STSPRYNTDHA	100
p73β	DSSMDVFHLE	--GNTTSVMA	CF---NLLSS	TMDQSSRAA	SASFYTPPEHA	90
p53	SQAMQDLMLS	----PODI-E	CM----FTED	PGPDEAPRMP	EAAFR-RVAPA	76
Consenso	..SMD...L	---.D....	C....LL.S	...Q...R..	SASBY...HA	100
p51A	QNSVTAPSPY	AGFSSTFDAL	SPSPAIPSNY	QYFQPHSRDV	SFQSSSTAKS	150
p73β	-ASVPTMSPY	AGFSSTFDTH	SPAPVIPSNT	QYFQPHREY	TFQSSSTAKS	139
p53	-PAAPTAA-	PAPAPSN-PL	SSS--VPSQK	TYQSYQFRL	QFLHSSTAKS	121
Consenso	--SVPTSPY	AGFSSTFD.L	SPSP..PSNT	QYFQPH.E.V	EQSSSTAKS	150
p51A	ATMTYSTELK	KLYCQIAKTC	FQIINVTTP	PDGAVIRAMP	VYKKAENHTE	200
p73β	ATMTYSPULK	KLYCQIAKTC	FQIINVTTP	PDGAVIRAMP	VYKKAENHTE	189
p53	VTCTYSPAUN	KMFQIAKTC	FQIINVTTP	PDGAVIRAMP	VYKKAENHTE	171
Consenso	ATMTYSPULK	KLYCQIAKTC	FQIINVTTP	PDGAVIRAMP	VYKKAENHTE	200
p51A	VVRCPFHLE	SREFNEQQA	PPSHLIRVEG	NSHAQVLEP	ITQRQSWVVR	250
p73β	VVRCPFHLE	GRDFNEQQA	PPSHLIRVEG	NLSQVLEP	ITQRQSWVVR	239
p53	VVRCPFHLE	CSD-SQC-IA	PPSHLIRVEG	NLRVYLEP	ITQRQSWVVR	219
Consenso	VVRCPFHLE	.RDFNEQQA	PPSHLIRVEG	N...QVLEP	ITQRQSWVVR	250
p51A	YEPFQVTEF	TTIYVNMCH	SSQGGNRR	PILIITLET	RQQQLGRRC	300
p73β	YEPFQVTEF	TTIYVNMCH	SSQGGNRR	PILIITLET	RQQQLGRRS	289
p53	YEPFQVTEF	TTIYVNMCH	SSQGGNRR	PILIITLET	RQQQLGRMS	269
Consenso	YEPFQVTEF	TTIYVNMCH	SSQGGNRR	PILIITLET	RQQQLGRS	300
p51A	FBRTACAPG	RDRKAGEDSI	RKQVSD--S	TKNGDGKRP	FRQNTNGI-Q	347
p73β	FBRTACAPG	RDRKAGEDHY	REQQALNESS	AKNGAASKRA	FKQSPPAVPA	339
p53	FBRTACAPG	RDRTEENL	RKKGEPH--H	ELPPGSTKRA	LPNNTSS---	314
Consenso	FBRTACAPG	RDRKAGED..	RKQ...--S	.KNG..TKRA	F.QNT....	350
p51A	M-TSINKRRS	PDDELLYLPV	RGREYEMLL	KIMESLELMQ	YLPQHTIETY	396
p73β	LGAGVKKRRH	QEDTYLQV	RGRENREILM	KIMESLELME	LVPQPLVDYS	389
p53	--SPQKXKP	LDGEYFTLQI	RGRREEMFR	ELMESLELKD	AQAGKEPGGS	362
Consenso	KRR..	.D.E..YLQV	RGRE.REML.	KIMESLELM.	..PQ.....Y	400
p51A	RQQQQQHQ-	HL-----	---LOR-H-	-LLSACFRNE	LV-EPRRE--	427
p73β	RQQQQLLRP	SHLQPPSYGP	VLSPMNVHG	GWNKLPSVNG	LVGQPPPHSS	439
p53	RAHSS----	HL-----	---H-	---SKKGQ	---STSRH--	380
Consenso	RQQQQ....	HL-----	---H-	NQ	LV-.P.RH--	450
p51A	--TPKQSDV-	--FFR---HS	KPPN-----	-----	---RSVYP-	448
p73β	AATPNLGPVG	PGMLNMHGHA	VPANGEMSSS	MSAQSMVSGS	HCTPPPPYHA	489
p53	---KKL----	--MFK---T	EGPD-----	-----	---SD---	393
Consenso	--TPKL..V-	--MF....H.	.PPN-----	-----	---S.Y.-	500
p51A	-----	-----	-----	-----	-----	448
p73β	DPSLVRTWGP	-----	-----	-----	-----	499
p53	-----	-----	-----	-----	-----	393
Consenso	-----	-----	-----	-----	-----	510

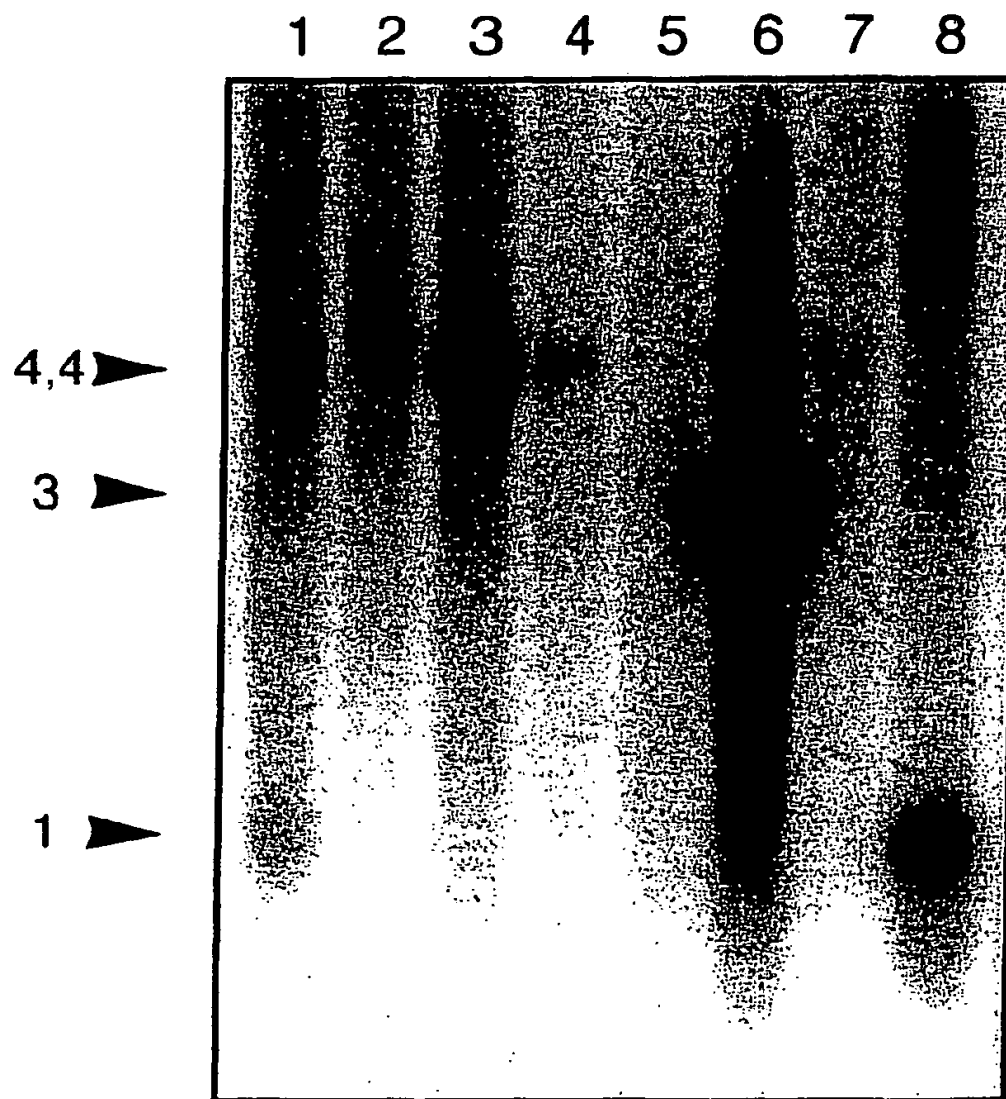
F I G. 3

p51B	MSQSTTNEF LSPENFCHW DMLLCFICSV QP DUNFVDE PSEDGATNKI	50
p73d	MAQSTATSP- DGGTTHHLLW SSLF-POSTY --RUXF-QSS RGNNEVVGCT	45
Consenso	W LOST I T E H W L L D	50
p51B	E SMDQIRMQ DSDLSQPMWP QYTNLGLMS MDQIIONGSS S SPYNTDHA	100
p73d	D SMDQVFHLE --GNTTSVMA QF---NLLSS TMDQSSRAA SASPYTPHA	90
Consenso	. SMD Q L L S S SPY	100
p51B	QMSVTAASPY AQPSSSTFQAL SPSPRAIPSNIT DYPGPHFQV SFQSSSTAKS	150
p73d	-ASVPTHSFY AQPSSSTFQTM SPSPRAIPSNIT DYPGPHFQV SFQSSSTAKS	139
Consenso	. SV SPY AQPSSSTF SPSPRAIPSNIT DYPGPHFQV SFQSSSTAKS	150
p51B	ATWTYSTELK KLYCQIAKTC PIQIKVTPP PQGAVIRAMP VYKKAHVTE	200
p73d	ATWTYSTELK KLYCQIAKTC PIQIKVTPP PQGAVIRAMP VYKKAHVTE	189
Consenso	ATWTYS . LK KLYCQIAKTC PIQIKVTPP P Q IRAMP VYKKAHVTE	200
p51B	VVKRCPMHEL SRFNEGQIA PSHLIRVEG NSHAQYVDP VTGRQSVVVF	250
p73d	VVKRCPMHEL SRFNEGQSA PSHLIRVEG NLSQYVDP VTGRQSVVVF	239
Consenso	VVKRCPMHEL SRFNEGQIA PSHLIRVEG N VDP VTGRQSV VVF	250
p51B	YEPPQVGTEF TTYLYNFMCH SSCVGMNRR PILIINTLET RDGQVLGRRC	300
p73d	YEPPQVGTEF TTYLYNFMCH SSCVGMNRR PILIINTLET RDGQVLGRRC	289
Consenso	YEPPQVGTEF TTYLYNFMCH SSCVGMNRR PILIINTLET RDGQVLGRRC	300
p51B	FEARICACPG RDRKADEDSI PQQVSD--S TKNDGKRP PQNTHGI-Q	347
p73d	FEARICACPG RDRKADEDTY PQQALNESS AKNGAASKRA PQSPPAVPA	339
Consenso	EF R I C A C P G R D R K A D E D P Q Q S T K N D K B	350
p51B	M-TSKKRPS PQDELTYLTV RGRETYENLL RKESLELMQ YLPQHTIET	396
p73d	LGAGVKKRPH QEDTYYLTV RGRBTFELM RKESLELME LVPQPLVDSY	389
Consenso	 K K R R Y I V R G R E R K E S L E L M P Q	400
p51B	RQQQQQCH LLQKQTSIQS PPSYQNSFP LMMH-SMNK LPSVQLINP	445
p73d	R-----CQQQ LLQRPSTLC PPSYQVLSF LMMHVGQMNK LPSVQLVQG	433
Consenso	R Q Q Q L L Q P P S Y Q P L M H M N K L P S V Q L	450
p51B	QQRNALTHIT IPDGMANIP MGTTHMPNAG DMNGISPTQA LPPPLSMPT	495
p73d	PPPHSSAATP NLGPNVPG-- MLNMHGHAVP ANGENSSH-- --SASQSVSG	478
Consenso	 T I M L S S M S	500
p51B	SHCTPPPPYP TQSTVQFLA RLQSSQLQY FTIQGLTIY QIEMYSMDL	545
p73d	SHCTPPPPYH AQPSSVSLFT RLQPNQIEY FTSQGLQSIY HLQNLTIEDL	528
Consenso	SHCTPPPPY I Q S V F L L Q Y F T Q G L I Y I L	550
p51B	ASLKIPEQFR MATHQILQH RQHHEFSPPS HLLRTPSSAS TVSVGSSETR	595
p73d	GALKIPEQFR MATHQILOOL RQHHDYSTAQ QLRSSSRAT ISIGGSCELQ	578
Consenso	. L K I P E Q R I M I Q H S L L R A G S E	600
p51B	GERVIDAVVF TIRPTTSFPP R-----DE MDPHFQMDA RRNKQCFIKE	638
p73d	RGRVMEAVVF RYRHTTITPN RGGPGGGFDE MADPFQLPD CKARKCFIKE	628
Consenso	. R V A V F T T R D E M D P H F Q M D A R R N K Q C F I K E	650
p51B	--EAE--	641
p73d	EFTAEIH	636
Consenso	 E A E	658

F I G. 4



F I G. 5



F I G. 6

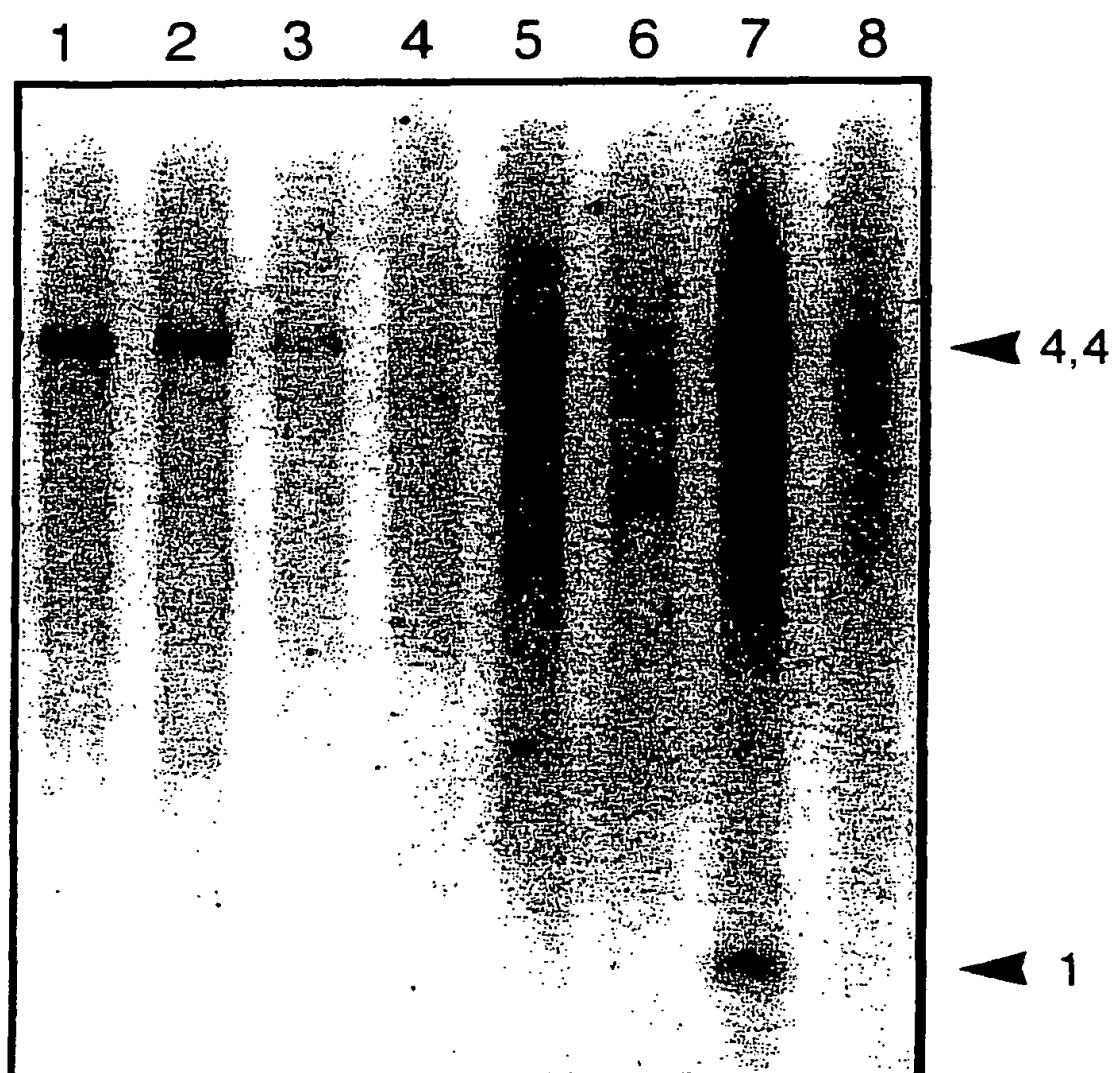
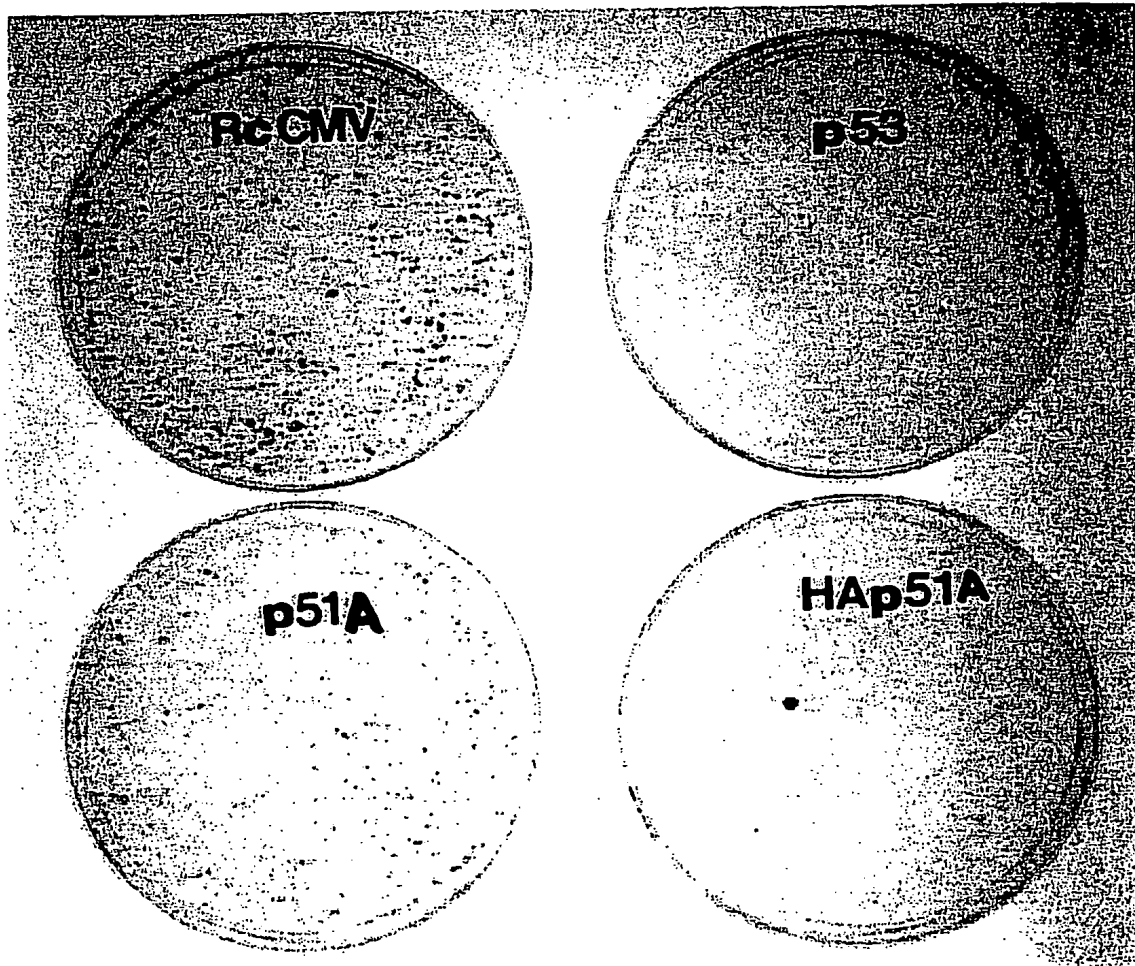
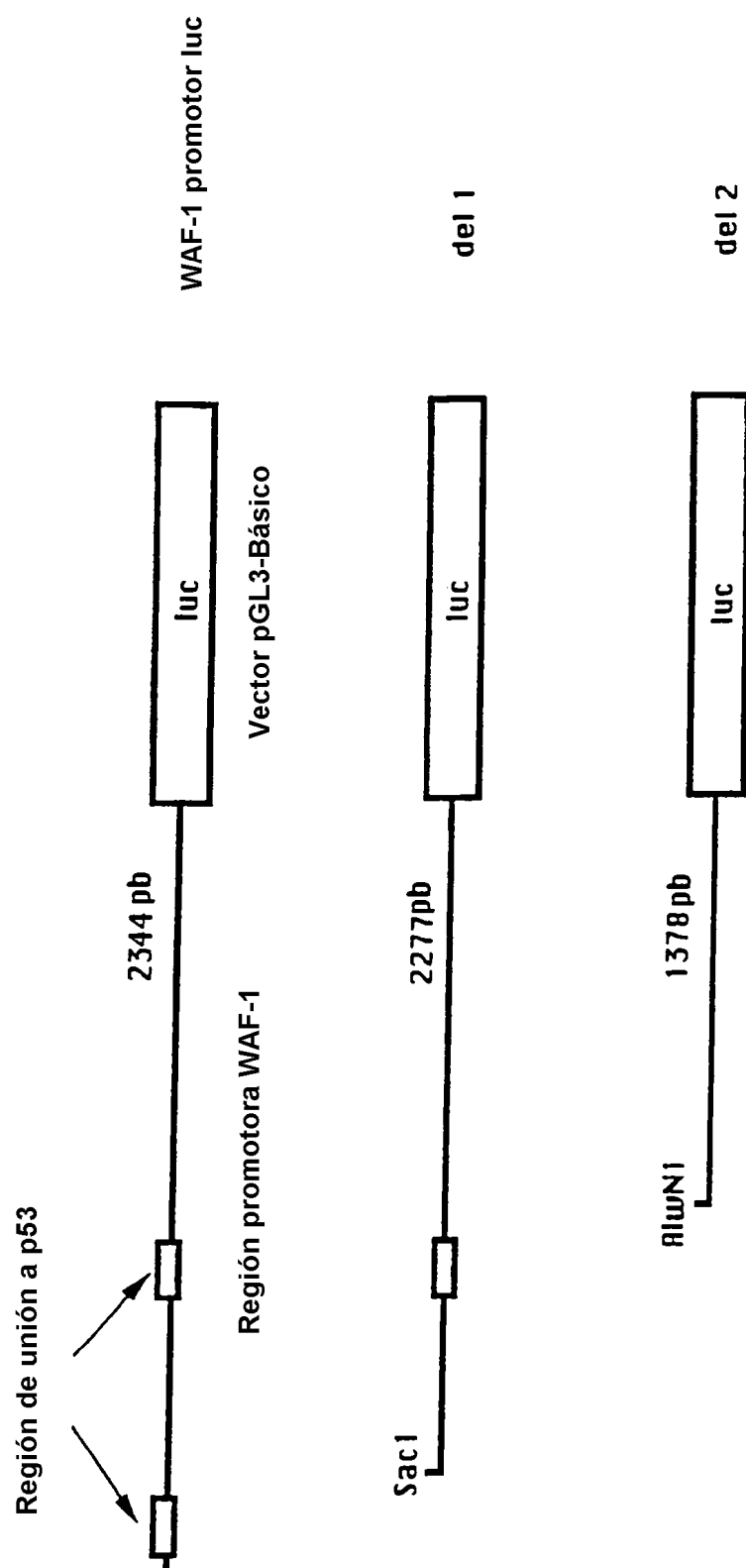


FIG. 7



F I G. 8



F I G. 9

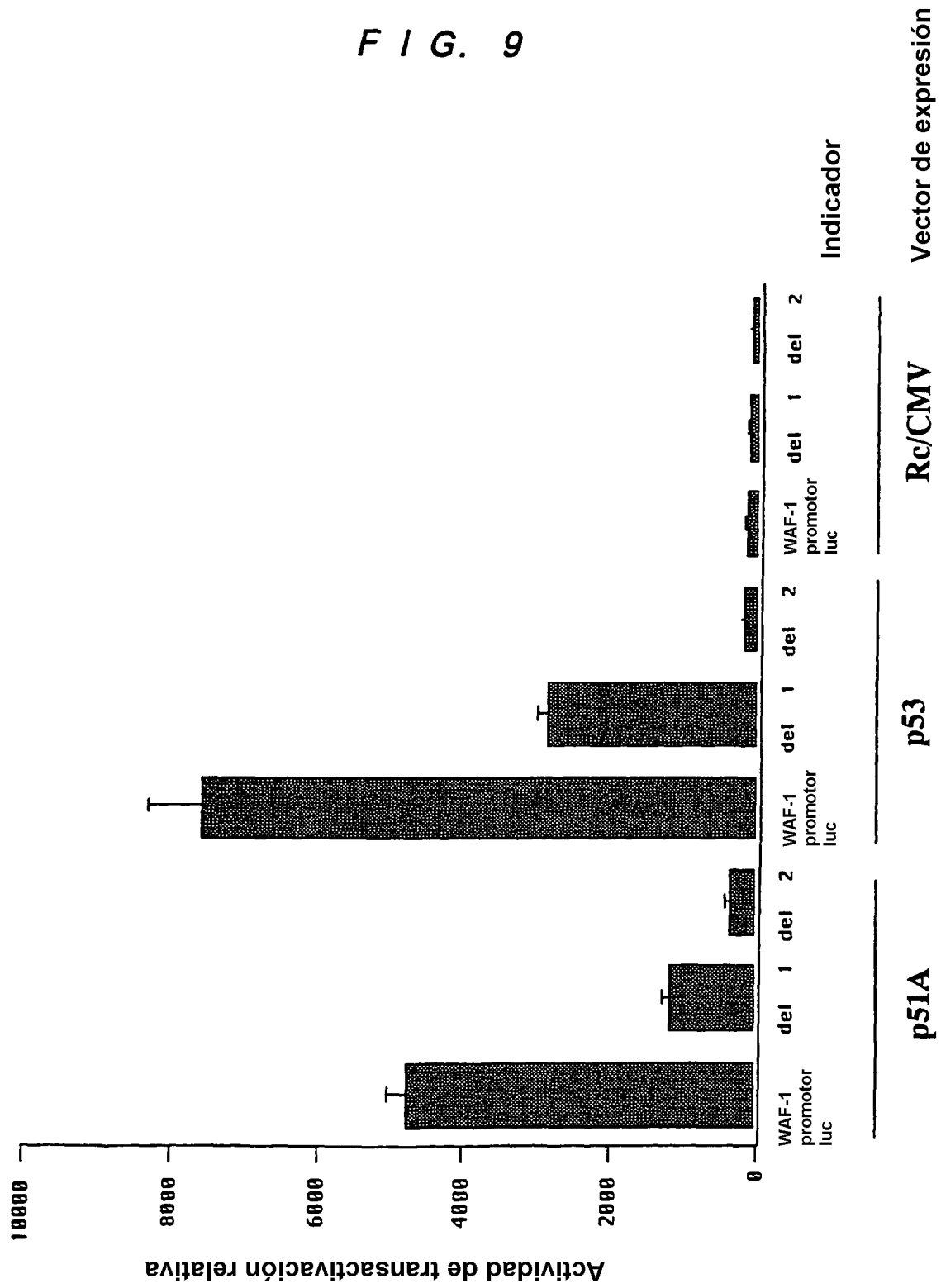


FIG. 10

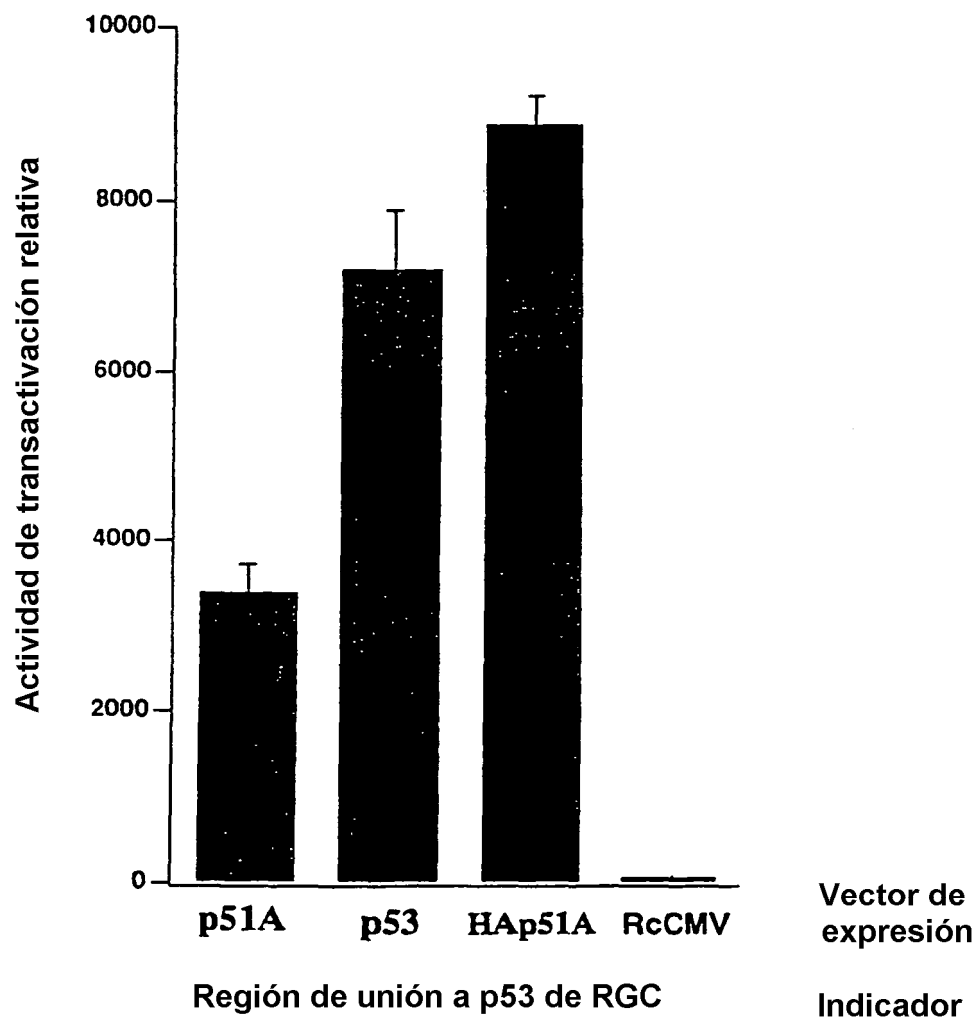
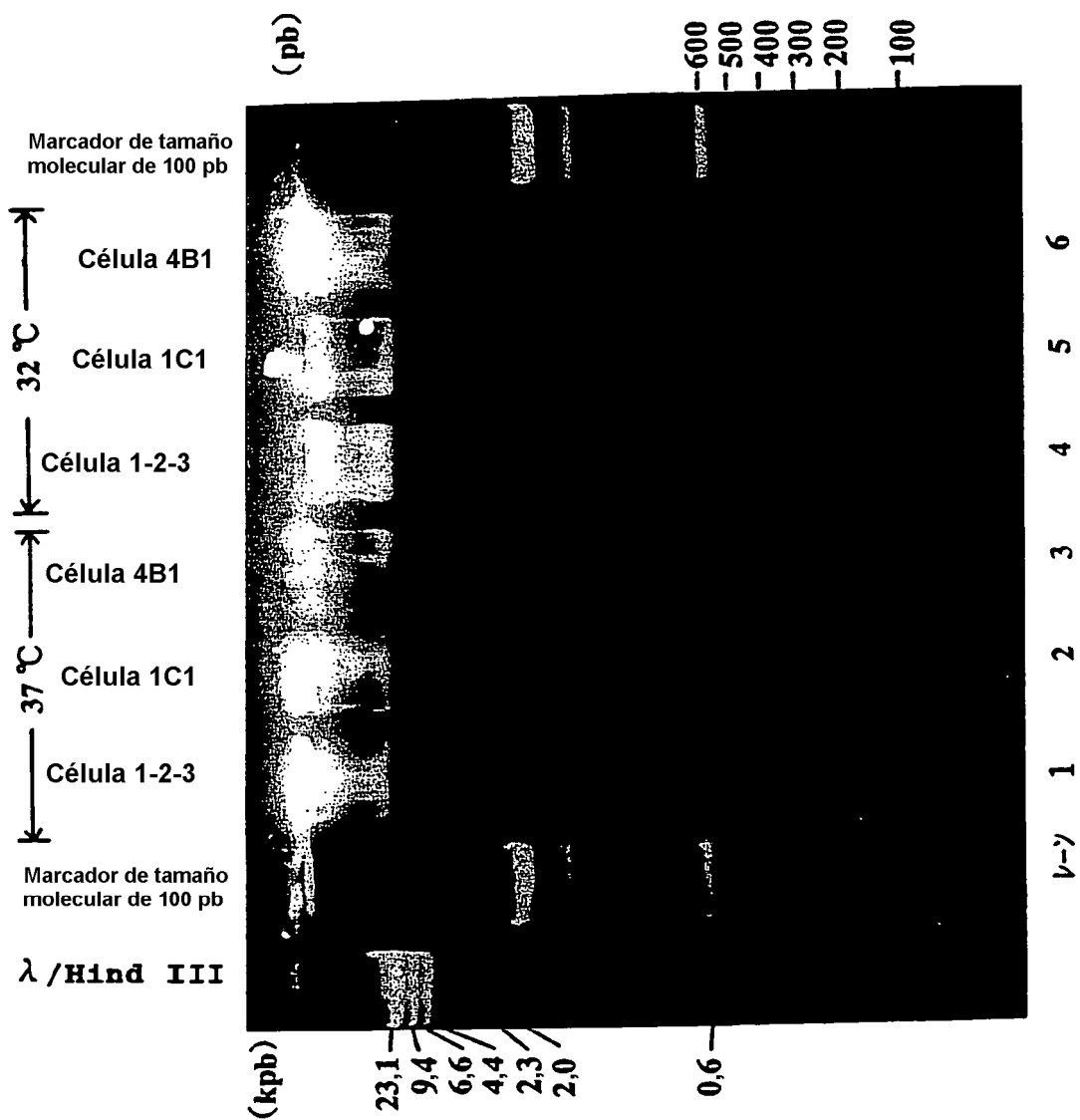


FIG. 11



F / G. 1 2

```

mp51 1 ATOTCGCAGAGCACCCAGACAAGCGAGTTCCTCAGCCCAGAGGTCTTCCAGCATATCTGG 60
p51B 1 ATGTCCAGAGCACACAGACAAATGAATTCTCAGTCCAGAGGTTTCCAGCATATCTGG 60
      *****

mp51 61 GATTTTCTGGAACAGCCTATATGCTCAGTACAGCCCATCGAGTTGAACTTTGTGGATGAA 120
p51B 61 GATTTTCTGGAACAGCCTATATGTTCAAGTTCAGCCCATGACTTGAACTTTGTGGATGAA 120
      *****

mp51 121 CCTTCCGAAAATGGTGCAACAAACAAGATTGAGATTAGCATGGATTGTATCCGCATGCAA 180
p51B 121 CCATCAGAAGATGGTGCGACAAACAAGATTGAGATTAGCATGGACTGTATCCGCATGCAG 180
      **.* *****

mp51 181 GACTCAGACCTCAGTGACCCCATGTGGCCACAGTACACGAACCTGGGGCTCCTGAACAGC 240
p51B 181 GACTCGGACCTGAGTGACCCCATGTGGCCACAGTACACGAACCTGGGGCTCCTGAACAGC 240
      *****

mp51 241 ATGGACCAGCAGATTTCAGAACGGCTCCTCGTCCACCAGCCCCTACACACAGACCACGCA 300
p51B 241 ATGGACCAGCAGATTTCAGAACGGCTCCTCGTCCACCAGTCCCTATAACACAGACCACGCG 300
      *****

mp51 301 CAGAATAGCGTGACGGCGCCCTCGCCCTATGCACAGCCCAGCTCCACCTTTGATGCCCTC 360
p51B 301 CAGAACAGCGTCACGGCGCCCTCGCCCTACGCACAGCCCAGCTCCACCTTCGATGCTCTC 360
      *****

mp51 361 TCTCCATCCCCTGCCATTCCTCTCCAACACAGATTACCCGGGCCCCACACAGCTTCGATGTG 420
p51B 361 TCTCCATCACC CGCCATCCCTCTCCAACACCGACTACCCAGGCCCGCACAGTTTCGACGTG 420
      *****

mp51 421 TCCTTCCAGCAGTCAAGCACTGCCAAGTCAGCCACCTGGACGTATTCCACCGAAGTGAAG 480
p51B 421 TCCTTCCAGCAGTCGAGCACCGCCCAAGTCGGCCACCTGGACGTATTCCACTGAAGTGAAG 480
      *****

mp51 481 AAGCTGTACTGCCAGATTGCGAAGACATGCCCCATCCAGATCAAGGTGATGACCCACCC 540
p51B 481 AAACCTCTACTGCCAATTGCAAGACATGCCCCATCCAGATCAAGGTGATGACCCACCT 540
      ** ** *****

mp51 541 CCACAGGGCGCTGTTATCCGTGCCATGCCTGTCTACAAGAAAGCTGAGCATGTCACCGAG 600
p51B 541 CCTCAGGGAGCTGTTATCCGCGCCATGCCTGTCTACAAAAAGCTGAGCACGTCACGGAG 600
      ** *****

mp51 601 GTTGTGAAACGATGCCCTAACCATGAGCTGAGCCGTGAGTTCAATGAGGGACAGATTGCC 660
p51B 601 GTGGTGAAGCGGTGCCCCAACCATGAGCTGAGCCGTGAATTCAACGAGGGACAGATTGCC 660
      ** *****

mp51 661 CCTCCAGTCATCTGATTGAGTAGAAGGGAACAGCCATGCCAGTATGTAGAAGATCCT 720
p51B 661 CCTCCTAGTCATTTGATTGAGTAGAGGGGAACAGCCATGCCAGTATGTAGAAGATCCC 720
      *****

mp51 721 ATCACGGGAAGGCAGAGCGTGCTGGTCCCTTATGAGCCACCACAGGTTGGCACTGAATTC 780
p51B 721 ATCACAGGAAGACAGAGTGCTGGTACCTTATGAGCCACCCAGGTTGGCACTGAATTC 780
      *****

```

F I G. 1 3

```

mp51 781 ACAACAGTCCTGTACAATTTTCATGTGTAAACAGCAGCTGCGTCGGAGGAATGAACAGACGT 840
p51B 781 ACCACAGTCCTGTACAATTTTCATGTGTAAACAGCAGTTGTGTTGGAGGGATGAACCGCCGT 840
      ** ***** ***** ** ** ***** ***** * ***

mp51 841 CCAATTTTAATCATCTGTTACTCTGGAACCAGAGATGGGCAAGTCCTGGGCCGACGGTGC 900
p51B 841 CCAATTTTAATCATCTGTTACTCTGGAACCAGAGATGGGCAAGTCCTGGGCCGACGGTGC 900
      ***** ***** ***** *****

mp51 901 TTTGAGGCCCGGATCTGTGCTTGCCCAGGAAGAGACCCGAAGGCAGATGAAGACAGCATC 960
p51B 901 TTTGAGGCCCGGATCTGTGCTTGCCCAGGAAGAGACAGGAAGGCCGATGAAGATAGCATC 960
      ***** ***** ***** *****

mp51 961 AGAAAGCAGCAAGTATCGGACAGCGCAAAGAACGGCGATGGTACGAAGCGCCCTTCCGT 1020
p51B 961 AGAAAGCAGCAAGTTTCGGACAGTACAAAGAACGGTGATGGTACGAAGCGCCCGTTTCGT 1020
      ***** ***** ***** *****

mp51 1021 CAGAATACACACGGGAATCCAGATGACTTCCATCAAGAAACGGAGATCCCCAGATGATGAG 1080
p51B 1021 CAGAACACACATGGTATCCAGATGACATCCATCAAGAAACGAAGATCCCCAGATGATGAA 1080
      ***** ***** ** ***** ***** *****

mp51 1081 CTGCTGTACCTACCAGTGAGAGGTCGTGACACGTACGAGATGTTGCTGAAGATCAAAGAG 1140
p51B 1081 CTGTTATACTTACCAAGTGAGGGGCCGTGAGACTTATGAAATGCTGTTGAAGATCAAAGAG 1140
      *** * *** ***** ** ***** ** ** *** ** *****

mp51 1141 TCACTGGAGCTCATGCAGTACCTCCCTCAGCACACGATCGAAACGTACAGGCAGCAGCAG 1200
p51B 1141 TCCCTGGAATCATGCAGTACCTTCCCTCAGCACACAATTGAAACGTACAGGCAACAGCAA 1200
      ** ***** ***** ***** ** ***** *****

mp51 1201 CAGCAGCAGCACCAGCACCTACTTCAGAAACAGACCTCGATGCAGTCTCAGTCTTCATAT 1260
p51B 1201 CAGCAGCAGCACCAGCACTTACTTCAGAAACAGACCTCAATACAGTCTCCATCTTCATAT 1260
      ***** ***** ***** ** ***** *****

mp51 1261 GGCAACAGTTCCTCCACCTCTGAACAAAATGAACAGCATGAACAAGCTGCCTTCCGTGAGC 1320
p51B 1261 GGTAAACAGCTCCCACTCTGAACAAAATGAACAGCATGAACAAGCTGCCTTCTGTGAGC 1320
      ** ***** ***** ***** *****

mp51 1321 CAGCTTATCAACCCACAGCAGCGCAATGCCCTCACTCCCAACCACCATGCCTGAGGGCATG 1380
p51B 1321 CAGCTTATCAACCCCTCAGCAGCGCAACGCCCTCACTCCTACAACCATTCCTGATGGCATG 1380
      ***** ***** ***** ** ***** *****

mp51 1381 GGAGCCAACATTCCCTATGATGGGCACCTCACATGCCAATGGCTGGAGACATGAATGGACTC 1440
p51B 1381 GGAGCCAACATTCCCATGATGGGCACCCACATGCCAATGGCTGGAGACATGAATGGACTC 1440
      ***** ***** ***** *****

mp51 1441 AGCCCTACCCAAGCTCTCCCTCCTCCACTCTCCATGCCCTCCACCTCCCACTGCACCCCA 1500
p51B 1441 AGCCCCACCCAGGCACTCCCTCCCCACTCTCCATGCCATCCACCTCCCACTGCACACCC 1500
      ***** ***** ** ***** ***** *****

mp51 1501 CCACCGCCCTACCCCAAGACTGCAGCATTTGTGAGTTTCTTAGCAAGGTTGGGCTGTCTCA 1560
p51B 1501 CCACCTCCGTATCCCAAGATTGCAGCATTTGTGAGTTTCTTAGCGAGGTTGGGCTGTCTCA 1560
      ***** ** ** ***** ***** *****

```

F I G. 1 4

```

mp51 1561 TCATGCCTGGACTATTTACGACCCAGGGGCTGACCACCATCTATCAGATTGAGCATTAC 1620
p51B 1561 TCATGTCTGGACTATTTACGACCCAGGGGCTGACCACCATCTATCAGATTGAGCATTAC 1620
      *****

mp51 1621 TCCATGGATGATTTGGCAAGTCTGAAGATCCCTGAACAGTTCCGACATGCCATCTGGAAG 1680
p51B 1621 TCCATGGATGATCTGGCAAGTCTGAAAATCCCTGAGCAATTTGACATGCGATCTGGAAG 1680
      *****

mp51 1681 GGCATCCTGGACCACAGGCAGCTGCACGACTTCTCCTCACCTCCTCATCTCCTGAGGACC 1740
p51B 1681 GGCATCCTGGACCACCGGCAGCTCCACGAATCTCCTCCCCTTCTCATCTCCTGCGGACC 1740
      *****

mp51 1741 CCAAGTGGTGCCTCTACCGTCAGTGTGGGCTCCAGTGAGACCCGTTGGTGAACGTGTGATC 1800
p51B 1741 CCAAGCAGTGCCTCTACAGTCAGTGTGGGCTCCAGTGAGACCCGGGTGAGCGTGTATT 1800
      *****

mp51 1801 GATGCCGTGCGCTTTACCCCTCCGCCAGACCATCTCTTTTCCACCCCGTGACGAGTGGAAT 1860
p51B 1801 GATGCTGTGCGATTACCCCTCCGCCAGACCATCTCTTTCCACCCCGAGATGAGTGGAAT 1860
      *****

mp51 1861 GATTTCAACTTTGACATGGATTCTCGTCGCAACAAGCAGCAGCGTATCAAAGAGGAAGGA 1920
p51B 1861 GACTTCAACTTTGACATGGATGCTCGCCGCAATAAGCAACAGCGCATCAAAGAGGAGGGG 1920
      **

mp51 1921 GAA 1923
p51B 1921 GAG 1923
      **

```

F I G. 1 5

mp51BnAA	MSQSTQTSEFLSPEVVFQHIWDFLEQPICSVQPIELNFVDEPSENGATNKIEISMDCIRMQ	60
p51B aa	MSQSTQTNEFLSPEVVFQHIWDFLEQPICSVQPIDLNFVDEPSEDGATNKIEISMDCIRMQ	60
	***** ,*****	
mp51BnAA	DSDLSDPMWPQYTNLGLLNSMDQQIQNGSSSTSPYNTDHAQNSVTAPSPYAQPSSTFDAL	120
p51B aa	DSDLSDPMWPQYTNLGLLNSMDQQIQNGSSSTSPYNTDHAQNSVTAPSPYAQPSSTFDAL	120

mp51BnAA	SPSPAIPSN TDYPGPHSFDVSFQSSSTAKSATWTYSTELKKLYCQIAKTCPIQIKVMTTP	180
p51B aa	SPSPAIPSN TDYPGPHSFDVSFQSSSTAKSATWTYSTELKKLYCQIAKTCPIQIKVMTTP	180

mp51BnAA	PQGAVIRAMPVYKKAESHVTEVVKRCPNHEL6REFNEGQIAPPSELIRVEGNSHAQYVEDP	240
p51B aa	PQGAVIRAMPVYKKAESHVTEVVKRCPNHEL6REFNEGQIAPPSELIRVEGNSHAQYVEDP	240

mp51BnAA	ITGRQSVLVPIEPPQVGTEFTTVLYNFMCNSSCVGGMNRRPILIIIVTLETRDGQVLGRRC	300
p51B aa	ITGRQSVLVPIEPPQVGTEFTTVLYNFMCNSSCVGGMNRRPILIIIVTLETRDGQVLGRRC	300

mp51BnAA	FEARICACPGDRKADSDSRKQVSDSAKNGDGTRPFRQNTBGIQMTSIRKRRSPDDE	360
p51B aa	FEARICACPGDRKADSDSRKQVSDSTKNGDGTRPFRQNTBGIQMTSIRKRRSPDDE	360
	***** ,*****	
mp51BnAA	LLYLPVVRGRETYEMLLKIKESLELMQYLPQHTIETIRQQQQQHQHLLQKQTSIQSSSY	420
p51B aa	LLYLPVVRGRETYEMLLKIKESLELMQYLPQHTIETIRQQQQQHQHLLQKQTSIQSPSSY	420
	***** ,** **	
mp51BnAA	GNSSPPLNKMNSMNKLPSVSQLINPQORNALTPPTMPEGMGANIPMMGTMPMAGDMNGL	480
p51B aa	GNSSPPLNKMNSMNKLPSVSQLINPQORNALTPPTIPDGMGANIPMMGTMPMAGDMNGL	480
	***** ,* ,*****	
mp51BnAA	SPTQALPPPLSMPSTSECTPPPPYPTDCSIVSFLARLGCSSCLDYFTTQGLTTIYQIEHY	540
p51B aa	SPTQALPPPLSMPSTSECTPPPPYPTDCSIVSFLARLGCSSCLDYFTTQGLTTIYQIEHY	540

mp51BnAA	SMDDLASLKIPEQFRHAIWKGILDERQLEDFSSPPLLRTPSGASTVSVGSSETRGERVI	600
p51B aa	SMDDLASLKIPEQFRHAIWKGILDERQLEEFSSPPLLRTPSASTVSVGSSETRGERVI	600
	***** ,**** *****	
mp51BnAA	DAVRFTLRQTISFFPRDEWNTFNFDMDERRNKQQRIRKEEGE	641
p51B aa	DAVRFTLRQTISFFPRDEWNTFNFDMDARRNKQQRIRKEEGE	641
	***** ,*****	