



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 369 502**

51 Int. Cl.:
C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08006175 .7**

96 Fecha de presentación : **16.12.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1961813**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **Cinasa de tipo humano dependiente de ciclina (hPNQALRE).**

30 Prioridad: **16.12.1998 US 112497 P**
15.12.1999 US 464065

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Reinhard, Christoph**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 502 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cinasa de tipo humano dependiente de ciclina (hPNQALRE).

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al área de las proteínas cinasa. Más particularmente, la invención se refiere a proteínas cinasas dependientes de ciclina.

10 **Antecedentes de la invención**

No se han descrito en su totalidad las rutas responsables de regular la mitosis y la migración y de transducir las señales del estrés ambiental en las células. Dichas proteínas se pueden manipular, por ejemplo, para proteger las células frente al estrés debido a enfermedad o a condiciones ambientales y para tratar los trastornos que implican alteraciones en la mitosis o migración, tales como las neoplasias. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de la identificación de proteínas que estén implicadas en estas rutas.

Resumen de la invención

20 A lo largo de la presente memoria descriptiva, la referencia a SeqIdNo:1 hace referencia a la secuencia marcada con3703.seq en la Figura 2 de la presente memoria descriptiva, la referencia a SeqIdNo:2 hace referencia a la secuencia marcada con3703.pep en la Figura 1 de la presente memoria descriptiva, la referencia a la SeqIdNo:3 hace referencia a la secuencia marcada con3702.seq en la Figura 2 de la presente memoria descriptiva, la referencia a SeqIdNo:4 hace referencia a la secuencia marcada con 3702.pep en la Figura 1 de la presente memoria descriptiva, la referencia a SeqIdNo:5 hace referencia a la secuencia marcada con3707.seq en la Figura 2 de la presente memoria descriptiva, la referencia a SeqIdNo:6 hace referencia a la secuencia marcada con3707.pep en la Figura 1 de la presente memoria descriptiva, la referencia a SeqIdNo:7 hace referencia a la secuencia marcada con3705.seq en la Figura 2 de la presente memoria descriptiva 2, la referencia a SeqIdNo:8 hace referencia a la secuencia marcada con3705.pep en la Figura 1 de la presente memoria descriptiva.

30 El documento WO9835015 describe una cdk humana que tiene un motivo PNQALRE (cdk 10), su implicación en la regulación del ciclo celular y la potencial aplicación médica en el cáncer (p.5 In.7; Ejemplo 8: "Tratamiento de enfermedades del ciclo celular"). El documento WO9835015 menciona composiciones diagnósticas basadas en cdk10 (p.24 último párrafo). En el documento WO9835015 no se hace mención de la sobreexpresión de cdk10 en líneas de células cancerosas.

40 La base de datos EMBL E.B.I. Hinxton Reino Unido, 1 de octubre de 1996, N° de Acceso P50613 se refiere a la proteína cinasa 7 de la división celular (EC 2.7.11.22) (EC 2.7.11.23) (cinasa activadora de CDR) (CAR) (CAR1) (subunidad cinasa del complejo del factor de transcripción basal TFIIF) (proteína cinasa de 39 kDa) (P39 Mo19) (STR1).

La base de datos EMBL E.B.I. Hinxton Reino Unido, 29 De enero de 1999, N° de Acceso AI386000 se refiere a mIS4n11.yl de testículo de ratón de Stratagene (n° 937308) del clon IMAGE:SIS 877 S' de ADNc de *Mus musculus* similar a la Proteína Cinasa R2 relacionada con SW:KC47-ORYSA P29620 CDC2⁺/CDC28⁻; secuencia de ARNm.

45 La presente invención proporciona, en varias formas de realización, reactivos y procedimientos para diagnosticar la neoplasia.

Una forma de realización de la invención proporciona un polipéptido aislado seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 50
- (a) un polipéptido que comprende al menos 223 aminoácidos contiguos de una proteína hPNQALRE que consiste en una secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID N: 6);
 - 55 (b) una polipéptido cinasa de pendiente de la ciclina PNQALRE que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 65% idéntica a los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6);
 - (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con3707 en la figura 1 (SEQ ID NO: 6); y
 - 60 (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6).

65 Otras formas de realización relacionadas proporciona polipéptidos cinasa aislados dependientes de la ciclina PNQALRE que comprenden las secuencias de aminoácidos que son al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a los aminoácidos 26-38 de la SEQ ID NO: 6. Los mencionados polipéptidos pueden tener también dicha identidad con los aminoácidos 181-201 de la SEQ ID NO: 3. Se proporcionan también polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

ES 2 369 502 T3

Otras formas de realización de la presente invención proporcionan una proteína de fusión que comprende un primer segmento de proteína y un segundo segmento de proteína en el que dicho primer segmento de proteína se fusiona a dicho segundo segmento de proteína por medio de un enlace peptídico y en el que dicho primer segmento de proteína comprende un polipéptido aislado de la invención.

5

Las primeras proteínas de la presente invención incluyen por ejemplo al menos 223 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. Se proporcionan también proteínas de fusión en las que el primer segmento de proteína comprende una secuencia de aminoácidos de la cinasa dependiente de la ciclina PNQALRE que es al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 26-38 o a los aminoácidos 181-201 de la SEQ ID NO: 6.

10

Otras formas de realización adicionales de la presente invención incluyen preparaciones de anticuerpos que se unen específicamente con una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. Las formas de realización relacionadas incluyen preparaciones de anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo definido en todo o en parte por los aminoácidos 26-38 de la SEQ ID NO: 6.

15

La presente invención proporciona una molécula de ADNc que codifica un polipéptido aislado de la invención. Una molécula de ADNc que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

20

- (a) una secuencia de nucleótidos que es al menos un 65% idéntica a los nucleótidos 76-114 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5);
- (b) una secuencia de nucleótidos que es idéntica a los nucleótidos 76-114 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5);
- (c) una secuencia de nucleótidos que es al menos un 90% idéntica a los nucleótidos 542-603 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5);
- (d) una secuencia de nucleótidos que es idéntica a los nucleótidos 542-602 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5); y
- (e) una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia d ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5).

35

Realizaciones adicionales proporcionan moléculas de ADNc que codifican polipéptidos que comprenden al menos 223 aminoácidos contiguos de una proteína *hPNQALRE* de la SEQ ID NO: 6. Las formas de realización similares incluyen moléculas de ADNc que codifican una polipéptido cinasa dependiente de la ciclina PNQALRE que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 65%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 26-38 de la SEQ ID NO:6. La presente invención proporciona también los ADNc que codifican polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. Se proporcionan también moléculas de ADNc inventivas que comprenden una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los nucleótidos 76-114 de la SEQ ID NO:5 y/o que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO:5. Se proporcionan también moléculas de ADNc que comprenden una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

40

45

Otras formas de realización adicionales de la presente invención incluyen un polinucleótido subgenómico aislado o su complemento que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones muy rigurosas con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

50

- (a) nucleótidos 76-114 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5); y
- (b) nucleótidos 542-603 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5).

55

Otras formas de realización inventivas incluyen construcciones que comprenden un promotor y un segmento de polinucleótido que codifica al menos 223 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 6. La invención proporciona además una construcción que comprende:

60

un promotor; y

un segmento de polinucleótido que comprende un ADNc de la invención, en el que dicho segmento de polinucleótido se localiza corriente abajo de dicho promotor y en el que la transcripción de dicho segmento de polinucleótido se inicia en el promotor.

65

ES 2 369 502 T3

Mediante construcciones a modo de ejemplo, el segmento del polinucleótido se localiza corriente abajo del promotor y la transcripción del segmento del polinucleótido se inicia en el promotor. Las formas de realización similares incluyen construcciones que comprenden un promotor y un segmento de polinucleótido que codifica una polipéptido cinasa dependiente de la ciclina PNQALRE que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 26-38 de la SEQ ID NO: 6. Se puede localizar el segmento del polinucleótido corriente abajo del promotor y se puede iniciar la transcripción del segmento del polinucleótido en el promotor. Las construcciones inventivas comprenden también un promotor y un segmento de polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Otras formas de realización inventivas incluyen una célula hospedadora que comprende cualquiera de las construcciones proporcionadas en el presente documento.

Las formas de realización adicionales proporcionan una célula homológamente recombinante que tiene incorporada en la anterior una nueva unidad de inicio de la transcripción, en la que dicha nueva unidad de inicio de la transcripción comprende:

- (a) una secuencia reguladora exógena;
- (b) un exón exógeno; y
- (c) un sitio donante de corte y empalme, en el que se localiza la nueva unidad de inicio de la transcripción corriente arriba de una secuencia de codificación de un gen, en el que dicho gen tiene una secuencia de codificación que consiste en una secuencia de ácido nucleico marcada con 3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5) y en el que dicha secuencia reguladora exógena dirige la transcripción de la secuencia de codificación del gen.

Dichas nuevas unidades de inicio de la transcripción de la presente invención pueden comprender una secuencia reguladora exógena, un exón exógeno y un sitio donante de corte y empalme. La nueva unidad de inicio de la transcripción se puede localizar corriente arriba de la secuencia de codificación de un gen que tiene una secuencia de codificación seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 5. La secuencia reguladora exógena puede dirigir la transcripción de la secuencia de codificación del gen.

Otras formas de realización adicionales proporcionan un procedimiento *in vitro* de diagnóstico o de pronóstico de la neoplasia, que comprende la etapa de comparar la expresión de un gen *hPNQALRE* en un primer tejido sospechoso de ser neoplásico, con la expresión del gen *hPNQALRE* en un segundo tejido que es normal, en el que dicho gen *hPNQALRE* comprende una secuencia de codificación seleccionada entre el grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de ácido nucleico marcada con 3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5);
- (b) los nucleótidos 76-114 de la secuencia de ácido nucleico marcada con 3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5); y
- (c) los nucleótidos 542-603 de la secuencia de ácido nucleico marcada con 3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5),

en el que la sobreexpresión de dicho gen *hPNQALRE* en dicho primer tejido indica neoplasia en dicho primer tejido.

Dichos procedimientos pueden comprender la etapa de comparar la expresión de un primer gen *hPNQALRE* en un primer tejido sospechoso de ser neoplásico con la expresión de un segundo gen *hPNQALRE* de un segundo tejido que es normal. Los genes *hPNQALRE* primero y segundo comprenden las secuencias de codificación de la SEQ ID NO: 5. Mediante estos procedimientos, la sobreexpresión del primer gen *hPNQALRE* en el primer tejido indica neoplasia en el primer tejido. Mediante procedimientos *in vitro* similares para el diagnóstico o pronóstico de la neoplasia, los genes *hPNQALRE* primero y/o segundo pueden comprender una secuencia de codificación seleccionada entre el grupo que consiste en los nucleótidos 76-114 de la SEQ ID NO: 5 y/o los nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO: 5.

La presente invención proporciona también un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos que es (i) idéntica, o (ii) al menos un 65% idéntica, a los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con 3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6). La invención proporciona además dicho anticuerpo o un fragmento del mismo, en el que dicho epítipo está que consiste en una secuencia de aminoácidos que es (i) idéntica, o (ii) al menos un 65% idéntica, a los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con 3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6).

Adicionalmente, la invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo proporcionando una señal de detección al menos 5 veces mayor para un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 26-38 marcados con 3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6) que la de una señal de detección de otros

ES 2 369 502 T3

epítos que carecen de los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6) cuando se usa en pruebas inmunoquímicas.

La presente invención proporciona también una construcción que comprende: un promotor; y un polinucleótido que comprende una molécula de ADNc que codifica un polipéptido aislado de la invención, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 65% idéntica a los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la Figura 1 (SEQ ID NO: 6); en el que dicho segmento de polinucleótido se localiza corriente abajo de dicho promotor y en el que la transcripción de dicho segmento de polinucleótido se inicia en el promotor. Se proporciona también una célula hospedadora que comprende la construcción.

La presente invención proporciona de esta manera la técnica con las secuencias de aminoácidos de *hPNQALRE* marcada con3707.PEP en la figura 1 (SEQ ID NO: 6), un miembro único de la familia de cinasas dependientes de ciclina, y las secuencias d ADN que codifican *hPNQALRE* marcada con3707.SEQ en la figura 2 (SEQ ID NO: 5).

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 compara las secuencias de aminoácidos de las cuatro formas de *hPNQALRE*.

La Figura 2 compara las secuencias de codificación de los nucleótidos que codifican las cuatro formas de *hPNQALRE*.

Descripción detallada de la invención

Una novedosa cinasa dependiente de ciclina denominada *hPNQALRE* marcada con3707.PEP en la figura 1 (SEQ ID NO: 6) es un descubrimiento de la presente invención. *hPNQALRE* marcada con3707.PEP en la figura 1 (SEQ ID NO: 6) es un miembro de la familia de la cinasa dependiente de ciclina. *hPNQALRE* marcada con3707.PEP en la figura 1 (SEQ ID NO: 6) se expresa en exceso en tumores y se puede usar de manera diagnóstica y terapéutica.

Se dan a conocer en el presente documento las secuencias de aminoácidos de las cuatro formas de la proteína *hPNQALRE* humana (SEQ ID NOS: 2, 4, 6 y 8), así como las secuencias de polinucleótidos que codifican las cuatro formas de *hPNQALRE* (SEQ ID NOS: 1, 3, 5 y 7). En esta proteína, se conservan todas las posiciones clave de las cinasas dependientes de ciclina. Los sitios de fosforilación reguladora en el extremo N de la molécula, que se encuentran en cdk2 (treonina en la posición 14 y tirosina en la posición 15) están sustituido en *hPNQALRE* por alanina e histidina, respectivamente, de manera similar a las cinasas dependientes de ciclina de tipo CDK7, que tienen también dos restos que no se pueden fosforilar (glutamina y fenilalanina) en estas posiciones. Los sitios de fosforilación reguladora de las cinasas dependientes de ciclina se describen entre otros en Shuttleworth, Progr. Cell Cycle Res. 1, 229-40 (1995), Lew & Kornbluth, Curr. Opin. Cell Biol. 8, 795-804 (1996); y Morgan, Ann. Rev. Cell. Biol. 13, 261-91 (1997). El motivo de la secuencia que caracteriza el dominio de unión a la ciclina de las cinasas dependientes de ciclina (PSTAIRE en cdk2; SEQ ID NO: 15) está sustituido en *hPNQALRE* por la secuencia PNQALRE (SEQ ID NO: 9), lo que indica que *hPNQALRE* tiene una especificidad distinta por su subunidad de ciclina reguladora.

Se pueden sustituir algunos aminoácidos de *hPNQALRE* para formar variantes de *hPNQALRE* con una o más actividades biológicas alteradas. Se pueden alterar, por ejemplo, la actividad de la cinasa dependiente de ciclina o el dominio de unión a la ciclina de *hPNQALRE*, o se pueden realizar sustituciones que permitan fosforilar a la proteína. Dichas sustituciones pueden proporcionar *hPNQALRE* con la regulación alterada o un subconjunto particular de actividades biológicas en comparación con *hPNQALRE* natural. Se pueden sustituir los dominios de unión a ciclina de otras cinasas dependientes de ciclina, tales como PFTAIRE (SEQ ID NO: 10), PISLRE (SEQ ID NO: 11), PITALRE (SEQ ID NO: 12), PLSTIRE (SEQ ID NO: 13), PISTVRE (SEQ ID NO: 14), PSTAIRE (SEQ ID NO: 15), y NRTALRE (SEQ ID NO: 16), por el dominio de unión a ciclina de *hPNQALRE*. PNQALRE (SEQ ID NO: 9; aminoácidos 58-64 de la SEQ ID NO: 6) con el fin de cambiar la especificidad de unión a ciclina de *hPNQALRE*. Se puede modificar la actividad cinasa de pendiente de ciclina de *hPNQALRE*, sustituyendo, por ejemplo, una asparagina por el ácido aspártico en la posición 145; esta sustitución da como resultado una forma de "cinasa desactivada" de *hPNQALRE*.

Se pueden realizar algunas sustituciones con el fin de permitir fosforilar *hPNQALRE*. Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina o una tirosina por la histidina en la posición 15, o la sustitución de una treonina por la alanina en la posición 14, permite la fosforilación de *hPNQALRE*. Los expertos en la técnica proporcionarán otras sustituciones que afectan a las propiedades de *hPNQALRE* y se pueden realizar para la proteína *hPNQALRE* usando técnicas normalizadas de ADN recombinante.

Otras sustituciones de aminoácidos que no afectan las actividades de unión a la cinasa o a la ciclina de *hPNQALRE* pueden producirse de manera natural o se pueden realizar en el laboratorio, para formar variantes de *hPNQALRE* biológicamente activas. Las variantes biológicamente activas de *hPNQALRE* están implicadas en la regulación del ciclo celular, mostrar actividad cinasa dependiente de ciclina, y se expresan en exceso en tumores. Se pueden encontrar directrices para determinar qué restos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar, o eliminar sin perder actividad biológica o inmunológica usando programas informáticos bien conocidos en la materia, tales como el software DNASTAR.

Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos en variantes de *hPNQALRE* biológicamente activas son cambios conservativos de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar.

ES 2 369 502 T3

Un cambio conservativo de aminoácido implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas secundarias. Los aminoácidos que se producen naturalmente se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato) básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), y polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina). Fenilalanina, triptófano, y tirosina se clasifican algunas veces de manera conjunta como aminoácidos aromáticos. Es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá mayor efecto sobre las propiedades de unión de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido en el sitio de unión a la ciclina de hPNQALRE o su dominio de la cinasa.

Las variantes de hPNQALRE biológicamente activas incluyen formas glicosiladas, conjugados agregados con otras moléculas, y conjugados covalentes con restos químicos no relacionados. Se pueden preparar variantes covalentes mediante funcionalidades de unión a grupos que se encuentran en la cadena de aminoácidos o en el resto terminal N o C, como se conoce en la técnica. Las variantes de hPNQALRE biológicamente activas incluyen también variantes alélicas, variantes de especies, y muteínas. Los truncamientos o las deleciones de regiones que no afectan a la actividad cinasa dependiente de ciclina de hPNQALRE son también variantes de hPNQALRE.

Se puede determinar fácilmente si una sustitución de aminoácido da como resultado una proteína o polipéptido hPNQALRE funcional, evaluando, por ejemplo, su actividad cinasa dependiente de ciclina. Los ensayos para la actividad cinasa dependiente de ciclina se enseñan, por ejemplo, en Lock y col., 1997, Cancer Chemother. Pharmacol. 39:399-409. Las variantes de hPNQALRE biológicamente activas que se producen de manera natural o no natural tienen secuencias de aminoácidos que son al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 6.

Se puede calcular el porcentaje de identidad usando cualquier procedimiento de algoritmo conocido en la técnica. Un ejemplo no limitante es el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman, que utiliza una búsqueda de huecos afines con los siguientes parámetros: penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 1. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en Smith y Waterman. Adv. Appl. Math. (1981) 2: 482-489.

Los polipéptidos hPNQALRE contienen menos de hPNQALRE de longitud completa y comprenden al menos 223, 225, 250, 275, 300, o 325 o más aminoácidos contiguos de una proteína hPNQALRE. Los polipéptidos hPNQALRE pueden comprender el dominio de unión a la ciclina de hPNQALRE. PNQALRE (SEQ ID NO: 9: aminoácidos 58-64 de la SEQ ID NO: 6), o pueden ser polipéptidos quiméricos que comprenden secuencias de aminoácidos de hPNQALRE junto con los dominios de unión a la ciclina de otras cinasas dependientes de ciclina, tal como se ha dado a conocer anteriormente. Se pueden construir también polipéptidos en los que se han realizado con el fin de permitir que se fosforile hPNQALRE o que disminuya la actividad cinasa de hPNQALRE.

Los polipéptidos hPNQALRE de la presente invención pueden comprender los aminoácidos 26-38 de la SEQ ID NO: 6. Adicionalmente, los polipéptidos hPNQALRE pueden comprender los aminoácidos 181-201 de la SEQ ID NO: 6.

La presente invención contempla variantes de polipéptidos hPNQALRE que son al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a los aminoácidos 26-38 de la SEQ ID NO: 6.

Se puede aislar hPNQALRE de células humanas productoras de hPNQALRE tales como de bazo, timo, próstata, testículos, intestino delgado, colon, linfocitos de sangre periférica, corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, o páncreas, usando procedimientos bioquímicos normalizados. Una proteína o polipéptido hPNQALRE aislada y purificada se separa de otros compuestos que se asocian normalmente con una proteína o polipéptido hPNQALRE en una célula, tal como ciclina u otras proteína, carbohidratos, lípidos, u orgánulos subcelulares. Una preparación de proteínas o polipéptidos hPNQALRE aisladas y purificadas es al menos un 80% pura; preferiblemente, las preparaciones son un 90%, 95%, o 99% puras.

Se pueden producir también proteínas y polipéptidos hPNQALRE mediante procedimientos de ADN recombinante o mediante procedimientos químicos sintéticos. Para la producción de proteínas o polipéptidos hPNQALRE recombinantes, las secuencias de codificación seleccionadas de las secuencias de nucleótidos de hPNQALRE que se muestran en SEQ ID NO: 5 o las variantes de de aquellas secuencias que codifican por ejemplo, una proteína hPNQALRE o las variantes de hPNQALRE biológicamente activas o alteradas, se pueden expresar en sistemas de expresión procariotas o eucariotas. Se pueden usar sistemas de expresión bacterianos, de levaduras, insectos, o mamíferos como se conoce en la técnica. Se pueden usar enzimas para generar polipéptidos hPNQALRE mediante proteólisis enzimática de la proteína hPNQALRE de longitud completa.

Alternativamente, se pueden usar procedimientos químicos sintéticos, tales como síntesis peptídica en fase sólida para sintetizar una proteína o polipéptido hPNQALRE. Los medios generales para la producción de péptidos análogos o derivados se reseñan en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES, AND PROTEINS -- A SURVEY OF RECENT DEVELOPMENTS, B. Weinstein, ed. (1983). Además, se puede llevar a cabo la sustitución

ES 2 369 502 T3

ción de aminoácidos D para el estereoisómero L normal para aumentar la semivida de la molécula. Se pueden producir de manera similar la hPNQALRE biológicamente activa o las variantes alteradas.

5 Se pueden construir también proteínas de fusión que comprendan al menos 223, 225, 250, 275, 300, o 315 o más aminoácidos contiguos de hPNQALRE. Las proteínas de fusión de hPNQALRE son útiles para generar anticuerpos que se unen específicamente con epítomos de hPNQALRE y para uso en algunos sistemas de ensayo. Se pueden usar, por ejemplo, proteínas de fusión de hPNQALRE para identificar proteínas que interactúan con la proteína hPNQALRE, tal como diferentes ciclinas, e influenciar su función. Se pueden usar también para este objetivo procedimientos físicos, tales como cromatografía de afinidad de proteínas, o ensayos basados en bibliotecas para interacciones proteína-proteína, tales como sistemas doble híbridos o de despliegue de proteínas en la superficie de fagos. Se conocen bien en la materia dichos procedimientos y se pueden usar como cribas de fármacos.

15 Una proteína de fusión hPNQALRE comprende dos segmentos de proteínas fusionados juntos por medio de un enlace peptídico. El primer segmento de proteína puede ser N terminal o C terminal, según sea conveniente. El primer segmento de proteína comprende al menos 223, 225, 250, 275, 300, o 315 o más aminoácidos contiguos de una proteína hPNQALRE. Se pueden seleccionar los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 6 o de la variante biológicamente activa o alterada de aquellas secuencias. Las proteínas de fusión preferidas de la presente invención pueden comprender los aminoácidos 26-38 de la SEQ ID NO:6. El primer segmento de proteína puede comprender también una proteína o variante de hPNQALRE de longitud completa. El primer segmento de proteína se puede localizar el primer segmento de proteína en el extremo N o C de la proteína de fusión, según sea conveniente.

25 El segundo segmento de proteína puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento de proteína o polipéptido. Las proteínas se usan comúnmente en la construcción de la proteína de fusión que incluye β -galactosidasa, β -glucuronidasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteínas autofluorescentes incluyendo proteína fluorescente azul (BFP), glutatión S transferasa (GST), luciferasa, peroxidasa de rábano picante (HRP), y cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Se pueden usar etiquetas de epítomos en las construcciones de proteínas de fusión, incluyendo etiquetas de histidina (His). Etiquetas FLAG, etiquetas de hemaglutinina de la gripe (HA), etiquetas Myc, etiquetas VSV-G, y etiquetas de tioredoxina (Trx). Otras construcciones de fusión pueden incluir una proteína de unión a maltosa (MBP). Etiqueta S. Fusiones del dominio de unión del ADN (DBD) de Lex A. Fusiones del dominio de unión del ADN GAL4. Proteínas de fusión BP16 del virus del herpes simple (VHS).

35 Se pueden preparar proteínas de fusión de hPNQALRE mediante enlace covalente del primer y segundo segmentos de proteína o mediante procedimientos normalizados en la técnica de la biología molecular. Se pueden usar procedimientos de ADN recombinante para preparar proteínas de fusión de hPNQALRE, preparando, por ejemplo, una construcción de ADN que comprenda las secuencias de codificación 08 SEQ ID NO: 5 en un marco de lectura apropiado con los nucleótidos que codifican el segundo segmento de proteína y que expresan la construcción de ADN en una célula hospedadora, tal como se conoce en la técnica. Están disponibles muchos kits para construir proteínas de fusión de compañías que suministran herramientas para experimentos a laboratorios de investigación, incluyendo, por ejemplo, Promega Corporation (Madison, WI). Stratagene (La Jolla, CA). Clontech (Mountain View, CA). Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA), y Quantum Biotechnologies (Montreal, Canadá).

45 Se pueden usar proteínas hPNQALRE aisladas y purificadas, polipéptidos, variantes biológicamente activas o alteradas o proteínas de fusión como inmunógenos para obtener preparaciones de anticuerpos que se unen específicamente a epítomos de una proteína hPNQALRE que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 6 o una variante de hPNQALRE biológicamente activa o alterada. Preferiblemente, se pueden distinguir los anticuerpos entre hPNQALRE y otras cinasas dependientes de ciclina, por ejemplo, mediante unión al sitio de unión a la ciclina de hPNQALRE. Más preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención se unirán a un epítomo definido en todo o en parte por los aminoácidos 26-38 de la SEQ ID NO: 6. Normalmente, se requieren al menos 6, 8, 10, o 12 aminoácidos contiguos para formar un epítomo de hPNQALRE. Sin embargo, epítomos que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo, al menos 15, 25, o 50 aminoácidos.

55 Se pueden usar anticuerpos que se unen específicamente a los epítomos de las proteínas hPNQALRE, polipéptidos, proteínas de fusión, o variantes biológicamente activas en pruebas inmunoquímicas, que incluyen, pero no se limitan a transferencias Western, ELISA, radioinmunoensayos, pruebas inmunohistoquímicas, inmunoprecipitaciones, u otras pruebas inmunoquímicas conocidas en la técnica. Normalmente, los anticuerpos de la invención proporcionan una señal de detección al menos 5, 10, o 20 veces mayor que una señal de detección proporcionada con otras proteínas cuando se usa en dichas pruebas inmunoquímicas. Preferiblemente, los anticuerpos que se unen específicamente a epítomos de hPNQALRE no detectan otras proteínas en las pruebas inmunoquímicas y pueden inmunoprecipitar las proteínas o los polipéptidos de hPNQALRE de la disolución.

65 Se pueden seleccionar epítomos de hPNQALRE que sean particularmente antigénicos, por ejemplo, mediante cribado rutinario de polipéptidos hPNQALRE para la antigenicidad o aplicando un procedimiento teórico para seleccionar regiones antigénicas de una proteína con la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID N: 6. Dichos procedimientos se enseñan, por ejemplo, en Hopp y Wood. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 3824-28 (1981). Hopp and Wood, Mol. Immunol. 20, 483-89 (1983), y Sutcliffe y col., Science 219, 660-66 (1983).

ES 2 369 502 T3

Se puede generar cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica para unirse específicamente a los epítomos de hPNQALRE. Se pueden preparar, por ejemplo, preparaciones de anticuerpos policlonales y monoclonales usando procedimientos normalizados que son bien conocidos en la materia. De manera similar, se pueden preparar también anticuerpos monocatenarios. Se pueden aislar anticuerpos monocatenarios que se unen específicamente a epítomos de hPNQALRE procedentes de bibliotecas de expresión de inmunoglobulinas monocatenarias, como se conoce en la técnica. La biblioteca se “criba” frente a secuencias de aminoácidos de hPNQALRE, y se pueden aislar numerosos anticuerpos monocatenarios que se unen con elevada afinidad a diferentes epítomos de la proteína hPNQALRE. Hayashi y col., 1995, Gene 160:129-30. Se pueden construir también anticuerpos monocatenarios usando un procedimiento de amplificación del ADN, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando ADNc de hibridoma como plantilla. Thirion y col., 1996, Eur. J. Cancer Prev. 5: 507-11,

Los anticuerpos monocatenarios pueden ser monoespecíficos o biespecíficos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. Se enseña la construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos tetravalentes por ejemplo, en Coloma y Morrison. 1997, Nat. Biotechnol. 15: 159-63. Se enseña la construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos bivalentes, *entre otros*, en Mallender y Voss. 1994, J. Biol. Chem. 269:199-206.

Se puede construir una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monocatenario usando la síntesis de nucleótidos manual o automatizada, clonarse en una construcción de expresión usando procedimientos de ADN recombinante normalizados, e introducirse en una célula para expresar la secuencia de codificación, tal como se describe a continuación. Alternativamente, se pueden producir anticuerpos monocatenarios directamente, usando, por ejemplo, tecnología de fagos filamentosos. Verhaar y col., 1995, Int. J. Cancer 61:497-501; Nicholls y col., 1993, J. Immunol. Meth. 165:81-91.

Se pueden “humanizar” también anticuerpos monoclonales y otros con el fin de evitar a un paciente que se produzca una respuesta inmune contra el anticuerpo cuando éste se usa terapéuticamente. Dichos anticuerpos pueden ser suficientemente similares en la secuencia a los anticuerpos humanos que se van a usar directamente en la terapia o pueden requerir la alteración de unos pocos restos clave. Se pueden minimizar las diferencias de secuencias entre, por ejemplo, anticuerpos de roedores y secuencias humanas sustituyendo restos que difieren de aquellos en las secuencias humanas, por ejemplo, mediante mutagénesis sitiodirigida de restos individuales usando procedimientos recombinantes, tal como se describe en el documento GB2188638B. Los anticuerpos que se unen específicamente a epítomos de hPNQALRE pueden contener sitios de unión a antígenos que están tanto parcial como completamente humanizados, tal como se da a conocer en el documento U.S. 5.565.332.

Se pueden construir otros tipos de anticuerpos y usarse en los procedimientos de la invención. Se pueden construir, por ejemplo, anticuerpos quiméricos tal como se da a conocer, por ejemplo, en el documento WO 93/03151. Se pueden preparar también proteínas de unión, que se derivan de inmunoglobulinas y que son multivalentes y multispecíficas, tales como los diacuerpos descritos en el documento WO 94/13804.

Se pueden purificar los anticuerpos de la invención mediante procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, se pueden purificar los anticuerpos por afinidad pasando los anticuerpos sobre una columna a la cual se une un polipéptido de la proteína hPNQALRE, una variante biológicamente activa, o la proteína de fusión. A continuación se pueden eluir los anticuerpos unidos de la columna, usando un tampón con una elevada concentración salina.

Se pueden generar también polipéptidos de unión específicos de hPNQALRE diferentes de los anticuerpos. Los polipéptidos de unión específicos de hPNQALRE son polipéptidos que se unen con hPNQALRE o sus variantes y que tienen una afinidad de unión mediblemente mayor por hPNQALRE y los derivados de polipéptidos de hPNQALRE que por los otros polipéptidos ensayados para la unión. Se prefiere una mayor afinidad en un factor de 10, más preferiblemente un factor de 100. Se pueden encontrar dichos polipéptidos, por ejemplo, el sistema de levadura doble híbrida.

Se pueden usar los anticuerpos, entre otros, para detectar la proteína hPNQALRE natural en tejido humano y sus fracciones. Se pueden usar también los anticuerpos para detectar la presencia de mutaciones en el gen hPNQALRE que dan como resultado una expresión en defecto o en exceso de una proteína hPNQALRE o en la expresión de una proteína hPNQALRE con tamaño alterado o movilidad electroforética. Opcionalmente, se pueden usar los anticuerpos de la invención para bloquear los sitios de unión de la ciclina a hPNQALRE o para alterar los niveles efectivos de proteína hPNQALRE funcional. Alternativamente, se pueden usar los anticuerpos para detectar polipéptidos que comprenden los aminoácidos 26-38 de la SEQ ID NO: 6. Los anticuerpos se unen a y bloquean la actividad biológica definida por la región del bucle T que incluye los aminoácidos 181-201 de la SEQ ID NO: 6.

Se describen también polinucleótidos subgenómicos que codifican proteínas, polipéptidos variantes biológicamente activas o alteradas, proteínas de fusión y similares de hPNQALRE. Los polinucleótidos subgenómicos de hPNQALRE contienen menos de un cromosoma completo y pueden ser bi o mono catenarios. Preferiblemente, los polinucleótidos están exentos de intrones.

Los polinucleótidos subgenómicos de hPNQALRE comprenden al menos 1562, 1563, 1670, 1575, 1800, 1859, 1900, 1950, 2000, 2050, o 2100 o más nucleótidos contiguos seleccionados entre las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 1, 3, 5, o 7 o sus complementos. Las secuencias de nucleótidos complementarias que se pueden usar proporcionan oligonucleótidos de sentido contrario de hPNQALRE. Se prefieren los oligonucleó-

ES 2 369 502 T3

tidos de sentido contrario que están abarcados por los nucleótidos 76-114 de la SEQ ID NO: 5. Se prefieren también los oligonucleótidos de sentido contrario que están abarcados por los nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO: 5. Los polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* incluyen también polinucleótidos que codifican anticuerpos monocatenarios específicos de *hPNQALRE*, ribozimas, y las variantes biológicamente activas o alteradas de *hPNQALRE*.

5 Las secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican las secuencias de aminoácidos de la proteína *hPNQALRE* o las variantes biológicamente activas de *hPNQALRE*, así como las secuencias de nucleótidos homólogas que son al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 5 son también polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE*.
10 Los polinucleótidos subgenómicos incluyen nucleótidos que son al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a 76-114 de la SEQ ID NO: 5 y nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO: 5. Se puede determinar el porcentaje de identidad de la secuencia usando programas informáticos que emplean el algoritmo de Smith-Waterman, por ejemplo, tal como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford molecular), usando una búsqueda de huecos afines con los siguientes parámetros: una penalización por apertura de
15 hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 1.

Las secuencias de nucleótidos que hibridan a la secuencia de codificación que se muestra en SEQ ID NO: 5 o sus complementos con al menos un 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, o 35% de correspondencia de pares de bases son también polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE*. Las secuencias de nucleótidos se hibridarán clon al menos 1, 2, 3, 4, 5,
20 10, 15, 20, 25, 30, o 35% de correspondencias de pares de bases con los nucleótidos 76-114 de la SEQ ID NO: 5 así como con los nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO: 5. Usando, por ejemplo, las siguientes condiciones de lavado - 2X SSC (cloruro de sodio 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M, pH 7,0). SDS al 0,1%, dos veces la temperatura ambiente, 30 minutos cada una; a continuación 2X SSC, SDS al 0,1%, una vez 50°C, 30 minutos; a continuación 2X SSC, dos veces la temperatura ambiente 10 minutos cada una - se pueden identificar secuencias homólogas de *hPNQALRE*
25 que contienen al menos aproximadamente 25-30% de correspondencias de pares de bases con SEQ ID NO: 5 o sus componentes. Más preferiblemente, las cadenas homólogas de ácido nucleico contienen 15-25% de correspondencias de pares de bases, incluso más preferiblemente 5-15% correspondencias de pares de bases.

Se pueden identificar también especies homólogas de polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* preparando
30 sondas o cebadores adecuados y cribando bibliotecas de expresión de ADNc procedentes de otras especies, tales como ratones, monos, levaduras, o bacterias. Se sabe bien que la T_m de un ADN bicatenario disminuye en 1-1,5°C con cada 1% de disminución en la homología (Bonner y col., J. Mol. Biol. 81. 123 (1973)). Se pueden identificar por tanto polinucleótidos homólogos de *hPNQALRE*, hibridando por ejemplo un posible polinucleótido homólogo de *hPNQALRE*
35 con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 comparando la temperatura de fusión del híbrido de prueba con la temperatura de fusión de un híbrido que comprende un polinucleótido que tiene SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que es perfectamente complementario con esta secuencia, y calculando el número del porcentaje de correspondencias de pares de bases en el híbrido de prueba.

Las secuencias de nucleótidos que se hibridan con las secuencias de codificación que se muestran en SEQ ID NO: 5
40 o sus complementos tras hibridación rigurosa y/o condiciones de lavado son también polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE*. Se conocen bien las condiciones de lavado rigurosas y se entienden en la materia y se dan a conocer, por ejemplo, en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., 1989, en las páginas 9.50-9.51. Las especies homólogas de los polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* se hibridarán en condiciones rigurosas a los nucleótidos 76-114 de la SEQ ID NO: 5 o a los nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO: 5.
45

Normalmente, para condiciones de hibridación rigurosas, debería seleccionarse una combinación de temperatura y concentración salina que es aproximadamente de 12-20°C por debajo de la T_m calculada el híbrido en estudio. Se puede calcular la T_m de un híbrido entre la secuencia de *hPNQALRE* que se muestra en las SEQ ID NOS: 1, 3, 5, o 7
50 y una secuencia de polinucleótidos que es un 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, usando, por ejemplo, la ecuación de Bolton y McCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1390(1962):

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6 (\log_{10}[\text{Na}]) + 0,41 (\%G + C) - 0,63 (\% \text{ de formamida}) - 600/l,$$

55 en la que l = la longitud del híbrido en los pares de bases.

Las condiciones de lavado riguroso incluyen, por ejemplo, 4X SSC a 65°C, o 50% de formamida, 4X SSC a 42°C, o 0,5 X SSC, SDS al 0,1% a 65°C. Las condiciones de lavado muy riguroso incluyen, por ejemplo, 0,2 X SSC a 65°C.

60 Se pueden aislar los polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* y purificarse exentos de otras secuencias de nucleótidos usando técnicas normalizadas de purificación de ácido nucleico. Se pueden usar, por ejemplo, enzimas de restricción y sondas para aislar fragmentos de polinucleótidos que comprenden secuencias de polinucleótidos que codifican una proteína o variante de *hPNQALRE*. Los polinucleótidos subgenómicos aislados y purificados están en preparaciones que están exentas o al menos exentas en un 90% de otras moléculas.
65

Las moléculas de ADN complementario (ADNc) que codifican las proteínas *hPNQALRE* son también polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE*. Se pueden preparar moléculas de ADNc de *hPNQALRE* con técnicas normalizadas de biología molecular, usando ARNm de *hPNQALRE* como plantilla. Posteriormente se pueden replicar

moléculas de ADNc de *hPNQALRE* usando técnicas de biología molecular conocidas en la materia y dadas a conocer en manuales tales como Sambrook y col., 1989. Se puede usar una técnica de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener copias adicionales de polinucleótidos subgenómicos, usando tanto ADN genómico como ADNc como plantilla.

Alternativamente, se pueden usar técnicas de química sintética para sintetizar moléculas de polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* de la invención. La degeneración del código genético permite sintetizar secuencias de nucleótidos alternados que codificarán una proteína *hPNQALRE* que tiene las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 2, 4, 6 u 8 o una variante biológicamente activa de aquellas secuencias.

Se describen también sondas de polinucleótidos que se pueden usar para detectar secuencias de *hPNQALRE*, por ejemplo, en protocolos de hibridación tales como transferencia Northern o Southern o en hibridación *in situ*. Las sondas de polinucleótidos comprenden al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, o 40 o más nucleótidos contiguos seleccionados entre las SEQ ID NOS: 1, 3, 5, o 7. Las sondas comprenden al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, o 40 o más nucleótidos contiguos seleccionados entre los nucleótidos 76-114 de la SEQ ID NO: 5 nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO: 5. Las sondas de polinucleótidos pueden comprender una marca detectable, tal como una marca radioisotópica, fluorescente, enzimática, o quimioluminiscente.

Una construcción de *hPNQALRE* puede ser una construcción de expresión que comprende un promotor que es funcional en una célula hospedadora seleccionada. El técnico experto puede seleccionar fácilmente un promotor apropiado entre el gran número de promotores específicos del tipo celular conocidos y usados en la materia. La construcción de la expresión puede contener también un terminador de la transcripción que sea funcional en la célula hospedadora. La construcción de la expresión comprende un segmento de polinucleótido que codifica, por ejemplo, toda o una parte de una proteína *hPNQALRE*, variante, proteína de fusión, anticuerpo, o ribozima, el segmento de polinucleótido se localiza corriente abajo a partir del promotor. La transcripción del segmento de polinucleótido se inicia en el promotor.

Se puede construir una célula hospedadora recombinante que comprende una construcción de *hPNQALRE*, por ejemplo, para expresar toda o una parte de una proteína *hPNQALRE*. Las células hospedadoras preferidas expresan una porción de una proteína *hPNQALRE* que comprende los aminoácidos 26-38 de la SEQ ID NO: 6. Las células hospedadoras recombinantes que comprenden construcciones de expresión de *hPNQALRE* pueden ser procariontes o eucariontes. Están disponibles una variedad de células hospedadoras para el uso en sistemas de expresión bacterianos, de levaduras, de insectos, y humanos, y se pueden usar para expresar o para propagar construcciones de expresión de *hPNQALRE*.

Se pueden introducir construcciones en células hospedadoras usando cualquier técnica conocida en la materia. Estas técnicas incluyen transferencia de ADN mediada por transferrina policatiónica, transfección con ácidos nucleicos puros o encapsulados, fusión celular mediada por liposomas, transporte celular de perlas de látex recubiertas de ADN, fusión de protoplastos, infección vírica, electroporación, y transfección mediada por fosfato de calcio.

Los sistemas bacterianos para expresar las construcciones de expresión de *hPNQALRE* incluyen los descritos en Chang y col., Nature (1978) 275: 615, Goeddel y col., Nature (1979) 281: 544. Goeddel y col., Nucleic Acids Res. (1980) 8: 4057, documentos EP 36.776, U.S. 4.551.433. de Boer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 21-25, y Siebenlist y col., Cell (1980) 20: 269.

Los sistemas de expresión en levaduras incluyen los descritos en Hinnen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75: 1929; Ito y col., J. Bacteriol. (1983) 153: 163; Kurtz y col., Mol. Cell. Biol. (1986) 6: 142; Kunze y col., J. Basic Microbiol. (1985) 25: 141; Gleeson y col., J. Gen. Microbiol. (1986) 132: 3459, Roggenkamp y col., Mol. Gen. Genet. (1986) 202: 302; Das y col., J. Bacteriol. (1984) 158: 1165; De Louvencourt y col., J. Bacteriol. (1983) 154: 737. Van den Berg y col., Bio/Technology (1990) 8: 135; Kunze y col., J. Basic Microbiol. (1985) 25: 141; Cregg y col., Mol. Cell. Biol. (1985) 5: 3376. Documentos U.S. 4.837.148, US 4.929.555: Beach y Nurse. Nature (1981) 300: 706; Davidow y col., Curr. Genet. (1985) 10: 380, Gaillardin y col., Curr. Genet. (1985) 10: 49, Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983) 112: 284-289; Tilburn y col., Gene (1983) 26: 205-221. Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81: 1470-1474. Kelly y Hynes. EMBO J. (1985) 4: 475479; documentos EP 244.234, y WO 91/00357.

Se puede llevar a cabo la expresión de las construcciones de la expresión de *hPNQALRE* en insectos tal como se describe en el documento U.S. 4.745.051, Friesen y col. (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression" en: THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (W. Doerfler, ed.). Documentos EP 127.839, EP 155.476, y Vlak y col., J. Gen. Virol. (1988) 69: 765-776. Miller y col., Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42: 177, Carbonell y col., Gene (1988) 73: 409, Maeda y col., Nature (1985) 315: 592-594, Lebacqz-Verheyden y col., Mol. Cell. Biol. (1988) 8: 3129; Smith y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82: 8404, Miyajima y col., Gene (1987) 58: 273; y Martin y col., DNA (1988) 7: 99. Se describen numerosas cepas baculovíricas y variantes y las correspondientes células hospedadoras de insectos permisivas en Luckow y col., Bio/Technology (1988) 6: 47-55, Miller y col., en GENETIC ENGINEERING (Setlow, J. K. y col. eds.), Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986). pp. 277-279, y Maeda y col., Nature, (1985) 315: 592-594.

Se puede conseguir la expresión de mamíferos en construcciones de expresión de *hPNQALRE* tal como se describe en Dijkema y col., EMBO J. (1985) 4: 761. Gorman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79: 6777, Boshart y

col., Cell (1985) 41: 521 y en el documento U.S. 4.399.216. Se pueden facilitar otras características de la expresión de mamíferos de las construcciones de expresión de *hPNQALRE* tal como se describe en Ham y Wallace, Meth. Enz. (1979) 58: 44, Barnes y Sato. Anal. Biochem. (1980) 102: 255, documentos U.S. 4.767.704, US 4.657.866, US 4.927.762. US 4.560.655, WO 90/103430, WO 87/00195, y U.S. RE 30.985.

5 Se pueden usar también polinucleótidos subgenómicos en vehículos de liberación génica, a objeto de liberar un ARNm de *hPNQALRE* o un oligonucleótido (tanto con la secuencia del ARNm de *hPNQALRE* como de su complemento), la proteína *hPNQALRE* de longitud completa, la proteína de fusión de *hPNQALRE*, el polipéptido de *hPNQALRE*, la variante biológicamente activa o alterada, o la ribozima específica de *hPNQALRE* o el anticuerpo monocatenario en una célula, preferiblemente una célula eucariota. Un vehículo de liberación génica puede ser, por ejemplo, ADN plásmido puro, un vector de expresión vírica que comprende un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE*, o un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE*, junto con un liposoma o un agente de condensación.

15 En un aspecto, el vehículo de liberación génica comprende un promotor y un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE*. Los promotores preferidos son promotores específicos de tejidos y promotores que se activan mediante proliferación celular, tal como los promotores de la timidina cinasa y de la timidina sintasa. Otros promotores preferidos incluyen promotores que son activables mediante infección con un virus, tal como los promotores - e -interferón, y los promotores que son activables mediante una hormona, tal como estrógeno. Otros promotores que se pueden usar incluyen el LTR del virus Moloney, el promotor del CMV, y el promotor de la albúmina de ratón.

20 Un vehículo de liberación del gen *hPNQALRE* puede comprender secuencias víricas tales como un origen vírico de la replicación o señal de empaquetamiento. Se pueden seleccionar estas secuencias víricas entre virus tales como astrovirus, coronavirus, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus, retrovirus, togavirus o adenovirus. En un aspecto, el vehículo de liberación del gen *hPNQALRE* es un vector retroviral recombinante. Se han descrito retrovirus recombinantes y sus diversos usos en numerosas referencias que incluyen, por ejemplo, Mann y col., Cell 33: 153, 1983, Cane y Mulligan, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81: 6349, 1984, Miller y col., Human Gene Therapy 1: 5-14, 1990, Patentes de los Estados Unidos N^{os}. 4.405.712, 4.861.719, y 4.980.289, y Solicitudes PCT N^{os} WO 89/02.468, WO 89/05.349, y WO 90/02.806.

30 Se pueden utilizar numerosos vehículos retrovirales de liberación génica en la presente invención, que incluyen, por ejemplo los descritos en los documentos EP 0.415.731: WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; Patente de los Estados Unidos N^o 5.219.740; WO 9311230; WO 9310218; Vile y Hart. Cancer Res. 53: 3860-3864, 1993; Vile y Hart, Cancer Res. 53:962-967, 1993; Ram y col., Cancer Res. 53:83-88, 1993; Takamiya y col., J. Neurosci. Res. 33:493-503, 1992; Baba y col., J. Neurosurg. 79:729-735, 1993 (Patente de los estados Unidos N^o. 4.777.127, documentos GB 2.200.651, EP 0.345.242 y WO91/02805).

40 Los retrovirus particularmente preferidos se derivan de retrovirus que incluyen el virus de la leucosis aviar (ATCC N^{os} VR-535 y VR-247), el virus de la leucemia bovina (VR-1315), el virus de la leucemia murina (VLM), virus inductor de focos en células del visón (Koch y col., J. Vir. 49:828, 1984; y Oliff y col., J. Vir. 48:542, 1983), virus del sarcoma murino (ATCC N^{os} VR-844. 45010 y 45016). Virus de la reticuloendoteliosis (ATCC N^{os} VR-994. VR-770 y 45011). Virus del sarcoma de Rous. Virus del mono Mason Pfizer, virus endógeno del babuino, retrovirus felino endógeno (*por ejemplo*, RD114) y las secuencias gL30 de ratón o rata usadas como vector retroviral.

45 Las cepas particularmente preferidas de VLM que pueden generar retrovirus recombinantes incluyen 4070A y 1504A (Hartley y Rowe, J. Vir. 19:19, 1976). Abelson (ATCC N^o VR-999), Friend (ATCC N^o VR-245), Graffi (Ru y col., J. Vir. 67: 4722. 1993; y Yantchev Neoplasma 26: 397, 1979), Gross (ATCC N^o VR-590), Kirsten (Albino y col., J. Exp. Med. 164: 1710, 1986). Virus del sarcoma de Harvey (Manly y col., J. Vir. 62:3540, 1988; y Albino y col., J. Exp. Med 164:1710, 1986) y Rauscher (ATCC N^o. VR-998), y VLM de Moloney (ATCC N^o. VR-190).

50 Un retrovirus no de ratón particularmente preferido es el virus del sarcoma de Rous. Los virus del sarcoma de Rous preferidos incluyen los virus de Bratislava (Manly y col., J. Vir. 62: 3540, 1988; y Albino y col., J. Exp. Med. 164:1710, 1986), Bryan de título elevado (*por ejemplo*, ATCC N^{os} VR-334, VR-657, VR-726, VR-659, y VR-728), Bryan estándar (ATCC N^o VR-140). Carr- Zilber (Adgighitov y col., Neoplasma 27:159, 1980). Engelbreth-Holm (Laurent y col., Biochem Biophys Acta 908: 241, 1987). Harris. Praga (*por ejemplo*, ATCC N^{os} VR-772, y 45033), y Schmidt-Ruppin (*por ejemplo*, ATCC N^{os} VR-724, VR-725, VR-354).

55 Se puede utilizar cualquiera de los anteriores retrovirus con el fin de ensamblar o construir vehículos retrovirales de liberación del gen *hPNQALRE* contenidos en la divulgación proporcionada mediante el presente documento y las técnicas recombinantes normalizadas (*por ejemplo*, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, y Kunkle. PNAS 82: 488, 1985) conocidas en la materia. Se pueden derivar porciones de vectores retrovirales de expresión de *hPNQALRE* de diferentes retrovirus. Por ejemplo, se pueden derivar LTR retrovirales de un virus de sarcoma murino, un sitio de unión a ARNt de un virus del sarcoma de Rous, una señal de empaquetamiento de un virus de la leucemia murina y un origen de síntesis de la segunda cadena de un virus de la leucosis aviar.

65 Se pueden usar vectores retrovirales recombinantes para generar partículas de vectores retrovirales competentes en la transducción introduciéndolas en las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas. Se pueden producir retrovirus recombinantes que dirijan la integración sitioespecífica del genoma retroviral recombinante en regiones específicas

ES 2 369 502 T3

del ADN de la célula hospedadora. La integración sitioespecífica puede estar mediada por una integrasa quimérica incorporada en la partícula retrovímica. Es preferible que el vehículo de liberación del gen vírico recombinante sea un virus recombinante defectivo en la replicación.

5 Las líneas celulares de empaquetamiento para uso con los vehículos de liberación de genes retrovíricos anteriormente descritos se pueden preparar fácilmente (véase el documento WO 92/05266) y usarse para crear líneas de células productoras (denominadas también líneas de células de vectores o "VCL") para la producción de partículas víricas recombinantes. En un aspecto particularmente preferido, se preparan líneas celulares de empaquetamiento a partir de líneas de células humanas (*por ejemplo*, células HT1080) o parentales de visón lo que permite por tanto la producción
10 de vehículos de liberación de genes retrovíricos que son capaces de sobrevivir a la inactivación en suero humano. Se describe en detalle en el documento WO 91/02805 la construcción de vehículos de liberación de genes retrovíricos.

Se pueden usar vehículos de liberación de genes retrovíricos recombinantes en líneas de células de empaquetamiento apropiadas, de manera similar, se pueden preparar también fácilmente vehículos de liberación de genes de adenovirus y utilizarse proporcionando la divulgación proporcionada en el presente documento (véase también Berkner. *Biotechniques* 6:616-627. 1988. y Rosenfeld y col., *Science* 252:431-434, 1991, WO 93/07283, WO 93/06223, y WO 93/07282).

Un vehículo de liberación del gen hPNQALRE puede ser también un vehículo de liberación de un gen adenovírico recombinante. Dichos vehículos se pueden preparar fácilmente y utilizarse contenidos en la divulgación proporcionada mediante el presente documento (véase Berkner, *Biotechniques* 6: 616. 1988, y Rosenfeld y col., *Science* 252: 431, 1991, WO 93/07283, WO 93/06223, y WO 93/07282). Se pueden construir también vehículos de liberación del gen hPNQALRE vírico adenoasociado y usarse para liberar aminoácidos o nucleótidos de hPNQALRE.

25 Se describe el uso *in vitro* de vehículos de liberación del gen vírico adenoasociado en Chatterjee y col., *Science* 258: 1485-1488 (1992), Walsh y col., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 89: 7257-7261 (1992), Walsh y col., *J. Clin. Invest.* 94: 1440-1448 (1994), Flotte y col., *J. Biol. Chem.* 268: 3781-3790 (1993), Ponnazhagan y col., *J. Exp. Med.* 179: 733-738 (1994). Miller y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 91: 10183-10187 (1994). Einerhand y col., *Gene Ther.* 2: 336-343 (1995). Luo y col., *Exp. Hematol.* 23: 1261-1267 (1995), y Zhou y col., *Gene Therapy* 3: 223-229 (1996). Se describe el uso *in vivo* de estos vehículos en Flotte y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 90: 10613-10617 (1993), y Kaplitt y col., *Nature Genet.* 8: 148-153 (1994).

En otro aspecto, un vehículo de administración del gen hPNQALRE se deriva de un togavirus. Los togavirus preferidos incluyen alfavirus, en particular los descritos en el documento WO 95/07994. Los virus alfa, que incluyen los virus Sindbis y ELVS pueden ser vehículos de liberación del gen para polinucleótidos de hPNQALRE. Los virus alfa se describen en el documento WO 94/21792, WO 92/10578 y WO 95/07994. Se pueden construir algunos sistemas de liberación de diferentes vehículos de liberación del gen del alfavirus y usarse para liberar polinucleótidos subgenómicos de hPNQALRE a una célula. Los ejemplos representativos de dichos sistemas incluyen los descritos en las patentes de los Estados Unidos 5.091.309 y 5.217.879. Los vehículos de liberación del gen del alfavirus particularmente preferidos para uso en la presente invención incluyen los que se describen en el documento WO 95/07994.

Preferiblemente, el vehículo vírico recombinante es un vehículo vírico de alfavirus recombinante basado en un virus Sindbis. Se pueden preparar fácilmente construcciones Sindbis, así como numerosas construcciones similares. Los vehículos de liberación del gen vírico Sindbis comprenden normalmente una secuencia 5' capaz de iniciar la transcripción del virus Sindbis, una secuencia de nucleótidos que codifican proteínas no estructurales de Sindbis, una región de unión vírica inactivada de tal manera que evita la transcripción del fragmento subgenómico, y una secuencia de reconocimiento de la ARN polimerasa de Sindbis. Opcionalmente, se puede modificar la región de unión vírica de tal manera que se reduzca, aumente, o se mantenga la transcripción del polinucleótido subgenómico. Como apreciarán los expertos en la técnica, se pueden usar las correspondientes regiones de otros alfavirus en lugar de las descritas anteriormente.

La región de unión vírica de un vehículo de liberación del gen derivado de alfavirus pueden comprender una primera región de unión vírica que se ha inactivado para evitar la transcripción del polinucleótido subgenómico y una segunda región de unión vírica que se ha modificado de tal manera que se reduzca la transcripción del polinucleótido subgenómico. Un vehículo derivado de alfavirus puede incluir también un promotor 5' capaz de iniciar la síntesis de ARN vírico del ADNc y una secuencia 3' que controla la terminación de la transcripción.

Otros vehículos de liberación togavíricos recombinantes que se pueden utilizar en la presente invención incluyen los derivados del virus del Bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus Middleberg (ATCC VR-370), virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246), virus de la encefalitis equina de Venezuela (ATCC VR923; ATCC VR-1250; ATCC VR1249; ATCC VR-532), y los descritos en las Patentes de los Estados Unidos 5.091.309 y 5.217.879 y en el documento WO 92/10578. Se pueden preparar fácilmente los vehículos de Sindbis descritos anteriormente, así como numerosas construcciones similares.

65 Otros vehículos de liberación del gen vírico adecuados para el uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, los derivados de poliovirus (Evans y col., *Nature* 339: 385, 1989, y Sabin y col., *J. Biol. Standardization* 1:115. 1973) (ATCC VR58); rinovirus (Arnold y col., *J. Cell. Biochem.* L401, 1990) (ATCC VR-1110); virus de la viruela, tales como el virus de la viruela del canario o el virus vaccinia (Fisher-Hoch y col., *PNAS* 86: 317. 1989; Flexner y col.,

ES 2 369 502 T3

Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86, 1989; Flexner y col., Vaccine 8: 17, 1990; documentos U.S. 4.603.112 y U.S. 4.769.330; WO 89/01973) (ATCC VR-111: ATCC VR-2010); SV40 (Mulligan y col., Nature 277: 108, 1979) (ATCC VR-305), (Madzak y col., J. Gen. Vir. 73: 1533, 1992); y el virus de la gripe (Luytjes y col., Cell 59: 1107, 1989; McMichael y col., The New England Journal of Medicine 309: 13, 1983; y Yap y col., Nature 273: 238, 1978) (ATCC VR-797).

Otros virus que se pueden usar para derivar los vehículos de liberación del gen incluyen parvovirus tales como virus adenoasociados (Samulski y col., J. Vir. 63: 3822, 1989, y Mendelson y col., Virology 166: 154, 1988) (ATCC VR-645); virus del herpes simple (Kit y col., Adv. Exp. Med. Biol. 215:219, 1989) (ATCC VR-977; ATCC VR-260); Nature 277: 108, 1979); virus de la inmunodeficiencia humana (documento EPO 386.882, Buchschacher y col., J. Vir. 66:2731, 1992); y el virus de las paperas (documento EPO 440,219) (ATCC VR-24); A (ATCC VR-67; ATCC VR-1247).

Se pueden usar también Aura (ATCC VR-368), el virus Bebaru (ATCC VR-600; ATCC VR-1240). Cabassou (ATCC VR-922), el virus Chikungunya (ATCC VR-64; ATCC VR-1241), Fort Morgan (ATCC VR-924), el virus Getah (ATCC VR-369; ATCC VR-1243), Kyzylgach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), el virus Mucambo (ATCC VR-580; ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), el virus Pixuna (ATCC VR-372; ATCC VR-1245), Tonate (ATCC VR-925), Trinita (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), Whataroa (ATCC VR-926), Y-62-33 (ATCC VR-375), el virus O'Nyong, el virus de la encefalitis oriental (ATCC VR65; ATCC VR-1242), el virus de la encefalitis occidental (ATCC VR-70; ATCC VR-1251; ATCC VR-622; ATCC VR-1252), y el coronavirus (Hamre y col., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121: 190, 1966) (ATCC VR-740) para proporcionar vehículos de liberación del gen.

Se puede combinar un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* con un agente de condensación para formar un vehículo de liberación del gen. En una forma de realización preferida, el agente de condensación es un polication, tal como polilisina, poliarginina, poliornitina, protamina, espermina, espermidina, y putrescina. Se conocen en la materia muchos procedimientos adecuados para preparar dichas uniones.

Alternativamente, un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* puede ser con un liposoma para formar un vehículo de liberación del gen. Los liposomas son pequeñas vesículas de lípidos comprendidas por un compartimento acuoso encerrado por una bicapa de lípidos, normalmente estructuras esféricas o ligeramente alargadas de algunos cientos de angstroms de diámetro. En las condiciones apropiadas, un liposoma puede fusionarse con la membrana plasmática de una célula o con la membrana de una vesícula endocítica en el interior de una célula que ha internalizado el liposoma, liberan do por tanto sus contenidos en el citoplasma. Antes de la interacción con la superficie de una célula, sin embargo, la membrana del liposoma actúa como una barrera relativamente impermeable que secuestra y protege sus contenidos, por ejemplo, de las enzimas degradativas.

Adicionalmente, debido a que un liposoma es una estructura sintética, se pueden producir liposomas especialmente diseñados que incorporen características deseables. Véase Stryer. Biochemistry, pp. 236-240, 1975 (W.H. Freeman. San Francisco. CA); Szoka y col., Biochim. Biophys. Acta 600: 1, 1980; Bayer y col., Biochim. Biophys. Acta. 550: 464, 1979; Rivnay y col., Meth. Enzymol. 149:119, 1987; Wang y col., PNAS 84: 7851, 1987; Plant y col., Anal. Biochem. 176: 420, 1989, y la patente de los Estados Unidos 4.762.915. los liposomas pueden encapsular una variedad de moléculas de ácido nucleico que incluyen ADN, ARN, plásmidos, y construcciones de expresión que comprenden polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* tales como los dados a conocer en la presente invención.

Las preparaciones liposómicas incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Los liposomas catiónicos han demostrado mediar en la liberación intracelular de ADN plásmido (Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7416, 1987), ARNm (Malone y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6077-6081, 1989), y factores de transcripción purificados (Debs y col., J. Biol. Chem. 265: 10189-10192, 1990), en forma funcional. Están fácilmente disponibles liposomas catiónicos. Por ejemplo, están disponibles liposomas de N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) con la marca comercial Lipofectina, de GIBCO BRL. Grand Island. NY. Véase también Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5148-5152.87, 1994.

Otras liposomas comercialmente disponibles incluyen Transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boerhinger). Se pueden preparar otros liposomas catiónicos a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, Szoka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4194-4198, 1978; y documento WO 90/11092 para las descripciones de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-trimetilamonio)propano).

De manera similar, están fácilmente disponibles liposomas aniónicos y neutros, tales como de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), o pueden prepararse fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Dichos materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre otros. Se pueden mezclar también estos materiales con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en las relaciones apropiadas. Son bien conocidos en la materia los procedimientos para preparar liposomas usando estos materiales.

Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), pequeñas vesículas unilamelares (SUV), o grandes vesículas unilamelares (LUV). Los diversos complejos de liposoma-ácido nucleico se preparan usando procedimientos conocidos en la materia. Véanse, por ejemplo Straubinger y col., METHODS OF IMMUNOLOGY (1983).

Vol. 101, pp. 512-527; Szoka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3410-3414, 1990; Papahadjopoulos y col., Biochim. Biophys. Acta 394: 483, 1975; Wilson y col., Cell 17: 77, 1979; Deamer y Bangham. Biochim. Biophys. Acta 443: 629, 1976; Ostro y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 836 1977; Fraley y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3348, 1979; Enoch y Strittmatter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 145, 1979; Fraley y col., J. Biol. Chem. 255: 10431, 1980; Szoka y Papahadjopoulos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 145, 1979; y Schaefer-Ridder y col., Science 215: 166, 1982.

Adicionalmente, se pueden incluir las lipoproteínas con un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* para la liberación a una célula. Los ejemplos de dichas lipoproteínas incluyen quilomicrones, HDL, IDL, LDL, y VLDL. Se pueden usar también mutantes, fragmentos, o fusiones de estas proteínas. Se pueden usar también modificaciones de lipoproteínas que se producen naturalmente, tales como LDL acetilada. Estas lipoproteínas pueden dirigir la liberación de polinucleótido a células que expresan receptores de lipoproteínas. Preferiblemente, si se incluyen lipoproteínas con un polinucleótido, no se incluyen ligandos directores en la composición.

Se pueden usar también moléculas “puras” de polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* como vehículos de liberación del gen tal como se describe en el documento en el documento WO 90/11092 y en la patente de los Estados Unidos 5.580.859. Dichos vehículos de liberación del gen pueden ser tanto ADN o ARN de *hPNQALRE* y, en algunas realizaciones, se unen a adenovirus muertos. Curiel y col., Hum. Gene. Ther. 3:147-154. 1992. Otros vehículos adecuados incluyen ADN-ligando (Wu y col., J. Biol. Chem. 264: 16985-16987. 1989), combinaciones lípido-ADN (Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 7417, 1989), liposomas (Wang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 7851-7855. 1987) y microproyectiles (Williams y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 2726-2730. 1991).

Se puede aumentar la eficacia de la captación del polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* “puro” recubriendo los polinucleótidos sobre perlas de látex biodegradable, que se transportan y concentran eficazmente en la región perinuclear de las células. Se pueden inyectar perlas de látex recubiertas de polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* en las células y se transportarán eficazmente en las células después que las perlas inician la endocitosis, aumentando de esta manera la transferencia génica y la eficiencia de la expresión. Se puede mejorar este procedimiento adicionalmente tratando las perlas para aumentar su hidrofobia, facilitando por tanto la perturbación del endosoma y la liberación de los polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* en el citoplasma.

hPNQALRE puede interactuar con diferentes ciclinas para conseguir diferentes efectos en el interior de una célula. Por ejemplo, las ciclinas que se unen a *hPNQALRE* pueden funcionar para regular la transcripción. Se pueden identificar ciclinas que se unen a *hPNQALRE* usando cribas tales como la prueba de la levadura doble híbrida. Esta prueba se describe, entre otros, en Fields & Song, Nature 340: 245-46, 1989.

El ARNm de *hPNQALRE* se expresa en exceso en tumores en comparación con los niveles de expresión del ARNm de *hPNQALRE* en tejido normal. Se pueden tratar los tumores poniendo en contacto el tumor con una composición que puede disminuir el nivel de la proteína *hPNQALRE* funcional en el tumor, disminuyendo, por ejemplo, los niveles de *hPNQALRE*, bloqueando o reduciendo su función. Las neoplasias que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a carcinomas colorrectales, melanomas, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas hepatocelulares, carcinomas de células renales, sarcomas, miosarcomas, carcinomas de pulmón de células no pequeñas, leucemias, linfomas, osteosarcomas, tumores del sistema nervioso central tales como gliomas, astrocitomas, oligodendrogliomas, y neuroblastomas, tumores de mamas, tumores de origen mixto, tales como tumor de Wilm, y teratocarcinomas, y tumores metastásicos. Se pueden tratar también de acuerdo con la invención trastornos proliferativos, tales como displasia ectodérmica hereditaria anhidra, displasia alveolar congénita, displasia epitelial del cuello de la matriz, displasia fibrosa de hueso, y displasia mamaria. Se pueden tratar también hiperplasias, por ejemplo, hiperplasias endometrial, adrenal, de mama, de próstata, o de tiroides, o la hiperplasia pseudoepiteliomatosa de la piel.

La composición comprende un reactivo que se une específicamente a un producto de expresión de *hPNQALRE* de tal manera que disminuye el nivel de una proteína *hPNQALRE* funcional en una célula, tal como una célula tumoral. El reactivo puede ser una ribozima, una molécula de ARN con actividad catalítica. Véanse, por ejemplo, Cech, Science 236: 1532-1539; 1987; Cech. Ann. Rev. Biochem. 59: 543-568; 1990. Cech, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 605-609; 1992, Couture y Stinchcomb, Trends Genet. 12: 510-515, 1996. Se pueden usar ribozimas para inhibir la función génica escindiendo una secuencia de ARN, como se conoce en la técnica (por ejemplo, Haseloff y col., patente de los Estados Unidos 5.641.673).

Se puede usar una secuencia de codificación de un gen *hPNQALRE* para generar ribozimas para generar ribozimas que se unirán específicamente al ARNm transcrito del gen *hPNQALRE*. Se han desarrollado y descrito en la materia los procedimientos de diseñar y construir ribozimas que pueden escindir otras moléculas de ARN en trans de una manera muy específica de la secuencia (véase Haseloff y col Nature 334: 585-591, 1988). Se puede dirigir, por ejemplo, la actividad de escisión de las ribozimas a los ARN específicos de *hPNQALRE* diseñando una región de “hibridación” discreta en la ribozima. La región de hibridación contiene una secuencia complementaria a la del ARN diana de *hPNQALRE*, y de esta manera, se hibrida específicamente con la diana (véase, por ejemplo, Gerlach y col., documento EP 321.201). La secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 5 proporciona una fuente de secuencias adecuadas de la región de hibridación. Las regiones de “hibridación” de la ribozima preferidas comprenden en todo o en parte los nucleótidos 76-114 de la SEQ ID NO: 5 29. Otras regiones de “hibridación” de la ribozima comprenden en todo o en parte los nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO: 5. Se pueden usar secuencias complementarias más largas para aumentar la afinidad de la secuencia de hibridación de la diana. Las regiones de hibridación y escisión de

ES 2 369 502 T3

la ribozima de *hPNQALRE* pueden estar integralmente relacionadas. De esta manera, tras hibridar el ARN diana de *hPNQALRE* a través de las regiones complementarias, la región catalítica de la ribozima puede escindir la diana.

Se pueden introducir las ribozimas de *hPNQALRE* en las células como parte de una construcción, como se conoce en la técnica y se describe anteriormente. Se pueden usar procedimientos mecánicos, tales como la microinyección, la transfección mediada por liposomas, la electroporación, o la precipitación con fosfato de calcio, para introducir la construcción que contiene la ribozima en las células en las que se desea disminuir la expresión de *hPNQALRE*, tal como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, si se desea que las células retengan de manera estable la construcción, se puede suministrar ésta en un plásmido y mantenerse como un elemento separado lo integrarse en el genoma de las células, como se conoce en la técnica. La construcción puede incluir elementos reguladores de la transcripción, tales como un elemento promotor, un elemento potenciador o UAS, y una señal terminadora de la transcripción, para controlar la transcripción de las ribozimas de *hPNQALRE* en las células.

En otro nivel de aspecto, se disminuye la proteína de *hPNQALRE* usando una secuencia de oligonucleótido de sentido contrario. La secuencia de sentido contrario es complementaria a al menos una porción de una secuencia que codifica *hPNQALRE* F, SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, la secuencia de oligonucleótido de sentido contrario tiene al menos 11 nucleótidos de longitud, pero puede tener al menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 o más nucleótidos de longitud. Más preferiblemente, las secuencias de oligonucleótidos de sentido contrario de 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 o más nucleótidos son complementarios a los nucleótidos 76-114 de la SEQ ID NO: 5 lo son complementarios a los nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO: 5. Se pueden usar también secuencias más largas, se pueden proporcionar moléculas de oligonucleótidos de sentido contrario de *hPNQALRE* en una construcción, e introducirse en células tal como se da a conocer en el presente documento, para disminuir el nivel de proteína *hPNQALRE* funcional en las células.

Los oligonucleótidos de sentido contrario de *hPNQALRE* pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o una combinación de ambos. Se pueden sintetizar los oligonucleótidos manualmente o mediante un sintetizador automatizado, enlazando de manera covalente el extremo 5' de un nucleótido con el extremo 3' de otro nucleótido con enlaces internucleótidos no fosfodiéster, tales como alquifosfonatos, fosforotioatos, fosfordiotioatos, alquifosfonotioatos, alquifosfonatos, fosforoamidatos, ésteres de fosfato, carbamatos, acetamida, ésteres de carboximetilo, carbonatos, y triésteres de fosfato. Véanse Brown. Meth. Mol. Biol. 20: 1-8, 1994; Sonveaux, Meth. Mol. Biol. 26: 1-72, 1994; Uhlmann y col., Chem. Rev. 90: 543-583, 1990.

No se requiere complementariedad precisa para la formación satisfactoria del dúplex entre una molécula de sentido contrario y la secuencia de codificación complementaria de un gen *hPNQALRE*. Las moléculas de sentido contrario que comprenden, por ejemplo, 2, 3, 4, o 5 o más tramos de nucleótidos contiguos que sean precisamente complementarios a una secuencia de codificación de *hPNQALRE*, separados cada uno por un tramo de nucleótidos contiguos que no sean complementarios a las secuencias de codificación adyacentes a *hPNQALRE*, pueden proporcionar una especificidad dirigida para el ARNm de *hPNQALRE*. Preferiblemente, cada tramo de nucleótidos contiguos tiene al menos 4, 5, 6, 7 u 8 o más nucleótidos de longitud. Las secuencias intervinientes no complementarias tienen preferiblemente 1, 2, 3, o 4 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica puede usar fácilmente el punto de fusión calculado de una pareja de sentido contrario-sentido directo para determinar el grado de incorrecta correspondencia que se tolerará entre un oligonucleótido particular de sentido contrario y una secuencia de codificación particular de *hPNQALRE*.

Se pueden modificar los oligonucleótidos de sentido contrario de *hPNQALRE* sin afectar a su capacidad para hibridarse con una secuencia de codificación de *hPNQALRE*. Estas modificaciones pueden ser internas, en uno o ambos extremos de la molécula de sentido contrario. Por ejemplo, se pueden modificar los enlaces internucleósidos de fosfato añadiendo restos colesteroil o diamina con números variables de restos de carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal, se sustituyen bases y/o azúcares modificados, tales como arabinosa en vez de ribosa, o un oligonucleótido 3', 5' sustituido en el que el grupo 3' hidroxilo o el grupo 5' fosfato están sustituidos, se pueden emplear también en un oligonucleótido de sentido contrario modificado. Se pueden preparar estos oligonucleótidos modificados mediante procedimientos bien conocidos en la materia. Véanse, por ejemplo, Agrawal y col., Trends Biotechnol. 10: 152-158, 1992. Uhlmann y col., Chem. Rev. 90:543-584, 1990; Uhlmann y col., Tetrahedron. Lett. 215: 3539-3542, 1987.

Los anticuerpos que se unen específicamente a epítomos de *hPNQALRE*, particularmente al dominio de unión a la ciclina de *hPNQALRE*, se pueden usar también para alterar los niveles de la proteína *hPNQALRE* funcional, uniéndose a una proteína *hPNQALRE* y disminuyendo el nivel de proteína *hPNQALRE* que puede funcionar en la célula. Se pueden introducir polinucleótidos que codifican anticuerpos monocatenarios de la invención en las células, tal como se ha descrito anteriormente.

Preferiblemente, el mecanismo usado para disminuir el nivel de *hPNQALRE* funcional en una célula disminuye el nivel de proteína *hPNQALRE* en al menos un 50%, 60%, 70%, u 80%. Lo más preferiblemente, el nivel de proteína *hPNQALRE* funcional disminuye en al menos un 90%, 95%, 99%, o 100%. Se puede evaluar la eficacia del mecanismo seleccionado para disminuir el nivel de proteína *hPNQALRE* usando procedimientos bien conocidos en la materia, tales como hibridación de sondas de nucleótidos con ARNm de *hPNQALRE*, detección mediante RT-PCR cuantitativa, detección de la proteína *hPNQALRE* usando anticuerpos específicos de *hPNQALRE* de la invención, o medida de la actividad de la cinasa dependiente de ciclina. Se enseñan las pruebas de actividad de la cinasa dependiente de ciclina, por ejemplo, en Lock y col., 1997, Cancer Chemother. Pharmacol. 39: 399-409.

ES 2 369 502 T3

Las composiciones que comprenden anticuerpos, ribozimas, u oligonucleótidos de sentido contrario de hPNQALRE pueden comprender opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la materia conocen bien los vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichos vehículos incluyen, pero no se limitan a, grandes macromoléculas metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y partículas víricas inactivas. Se pueden usar también sales farmacéuticamente aceptables en las composiciones de hPNQALRE, por ejemplo, sales minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos, las composiciones de hPNQALRE pueden contener también líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol, y etanol, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsificantes, o agentes tamponantes del pH. Se pueden usar también liposomas, tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos 5.422.120 y en los documentos WO 95/13796, WO 91/14445, o EP 524,968 B 1, como vehículo para una composición de hPNQALRE.

Normalmente, una composición de hPNQALRE se prepara como un inyectable, tanto como una disolución líquida como una suspensión; sin embargo; se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. Se puede formular también una composición de hPNQALRE en un comprimido con revestimiento entérico o en una cápsula de gel de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos 4.853.230, y en los documentos EP 225.189, AU 9.224.296, y AU 9.230.801.

La administración de composiciones de hPNQALRE puede incluir la administración local o sistémica incluyendo la inyección, administración oral, cañón de partículas, o administración cateterizada, y administración tópica. Se pueden usar diversos procedimientos para administrar una composición de hPNQALRE directamente en un sitio específico en el cuerpo. Para inducir la apoptosis en un tumor, por ejemplo, una composición de hPNQALRE apropiada inyectada varias veces en algunas localizaciones diferentes en el interior del cuerpo del tumor. Alternativamente, se pueden identificar las arterias que sirven al tumor, y se puede inyectar una composición de hPNQALRE en dicha arteria con el fin de liberar la composición en el tumor.

Se puede aspirar un tumor que tiene un centro necrótico, y se puede inyectar una composición de hPNQALRE directamente en el centro ahora vacío del tumor. Se puede administrar también una composición de hPNQALRE directamente en la superficie de un tumor, por ejemplo, mediante la aplicación tópica de la composición, se pueden usar imágenes de rayos X para ayudar en algunos de estos procedimientos de liberación. Se puede administrar de manera simultánea o secuencial una combinación de agentes terapéuticos, que incluyen un anticuerpo una ribozima, u oligonucleótido específicos de hPNQALRE, o un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* que codifica un anticuerpo, ribozima u oligonucleótido específicos de hPNQALRE junto con otros agentes terapéuticos.

Se pueden liberar composiciones de hPNQALRE en tejidos específicos usando liberación dirigida mediada por receptor. Las técnicas de liberación de ADN mediada por receptor se enseñan en, por ejemplo, Findeis y col. Trends in Biotechnol. 11, 202-05, (1993); Chiou y col., GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A. Wolff. ed.) (1994); Wu & Wu. J. Biol. Chem. 263. 621-24, 1988; Wu y col., J. Biol. Chem. 269, 542-46, 1994; Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3655-59, 1990; Wu y col., J. Biol. Chem. 266, 338-42, 1991.

Se pueden determinar la dosis de una composición de hPNQALRE particular y los medios de administrar la composición basándose en las calidades específicas de la composición de hPNQALRE, la condición, la edad, y el peso del paciente, la progresión de la enfermedad concreta que se está tratando y otros factores relevantes. Si la composición contiene anticuerpos de hPNQALRE, las dosificaciones eficaces de la composición están en el intervalo de aproximadamente 5 μg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente, aproximadamente 50 μg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 100 μg a aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del paciente, y aproximadamente 200 a aproximadamente 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Las composiciones que contienen polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE*, que incluyen oligonucleótidos de sentido contrario y secuencias que codifican ribozimas o anticuerpos, se pueden administrar en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local. Las concentraciones adecuadas varían de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 μg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 μg a aproximadamente 500 μg , y aproximadamente 20 μg a aproximadamente 100 μg de ADN. Factores tales como el procedimiento de acción y la eficacia de la transformación y la expresión son consideraciones que afectarán la dosificación requerida para la eficacia en última instancia de la composición de hPNQALRE. Si se desea una expresión mayor sobre un gran área de tejido, puede necesitarse grandes cantidades de una composición de hPNQALRE o la misma cantidad administrada sucesivamente, o varias administraciones de diferentes porciones de tejido adyacentes o cercanos de, por ejemplo, un sitio tumoral, para efectuar un resultado terapéutico positivo. En todos los casos, la experimentación rutinaria en pruebas clínicas determinará los intervalos específicos para un óptimo efecto terapéutico.

Se puede alterar la expresión de un gen *hPNQALRE* endógeno en una célula introduciendo en marco con el gen *hPNQALRE* endógeno una construcción de ADN que comprende una secuencia directora de *hPNQALRE*, una secuencia reguladora, un exón, y un sitio donante de corte y empalme no emparejado mediante recombinación homóloga, tal como una célula homológamente recombinante que comprende que se forme una nueva unidad de transcripción

ES 2 369 502 T3

de *hPNQALRE*. Se puede usar la nueva unidad de transcripción para volver a activar o desactivar el gen *hPNQALRE*. Este procedimiento de afectar la expresión endógena del gen se enseña en la patente de los estados Unidos 5.641.670.

5 La secuencia directora es un segmento de al menos 10, 12, 15, 20, o 50 nucleótidos contiguos procedentes de una secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 5. Las secuencias directoras preferidas se seleccionan entre los nucleótidos 76-114 de la SEQ ID NO: 5 así como entre los nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO: 5. La nueva unidad de transcripción se localiza corriente arriba de una secuencia de codificación del gen *hPNQALRE* endógeno. La secuencia reguladora exógena dirige la transcripción de la secuencia de codificación del gen *hPNQALRE*.

10 La invención proporciona también un procedimiento *in vitro* de diagnóstico o pronóstico de neoplasia en un mamífero, preferiblemente un ser humano. Se puede comparar la expresión de un gen *hPNQALRE* en un primer tejido sospechoso de ser neoplásico con la expresión de un gen *hPNQALRE* en un segundo tejido que es normal. El gen *hPNQALRE* tiene una secuencia de codificación que se muestra en SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, el gen *hPNQALRE* comprenderá los nucleótidos 76-114 de la SEQ ID NO: 5 o los nucleótidos 542-603 de la SEQ ID NO: 5.

15 Se pueden realizar comparaciones, por ejemplo, midiendo los niveles del ARNm de *hPNQALRE* o de la proteína *hPNQALRE* en el primer y segundo tejidos, tal como se conoce en la técnica. El primer y segundo tejidos pueden originarse del mismo sujeto o de diferentes sujetos. El primer y segundo tejidos pueden ser de diferentes tipos, pero son preferiblemente del mismo tipo de tejido, tal como un pólipo intestinal. Alternativamente, se pueden determinar las curvas patrón de la expresión del gen *hPNQALRE* a partir de numerosas muestras de tejido normal y usarse para la comparación con la expresión del gen *hPNQALRE* en un tejido sospechoso de ser neoplásico.

20 La sobreexpresión del gen *hPNQALRE* en el primer tejido en comparación con la expresión del gen *hPNQALRE* en el segundo tejido de la curva patrón indica neoplasia en el primer tejido. Puede correlacionarse los niveles de sobreexpresión con las etapas de la neoplasia, y se pueden usar, por ejemplo, para vigilar el tratamiento de un paciente, preferiblemente un paciente humano.

25 Se puede liberar también un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* a sujetos a objeto de cribar los compuestos de prueba para aquellos que son útiles para aumentar la transferencia de los polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* a la célula o para aumentar los posteriores efectos biológicos de los polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* en el interior de la célula. Dichos efectos biológicos incluyen la hibridación con ARNm complementario de *hPNQALRE* y la inhibición de su traducción, la expresión de un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* para formar un ARNm de *hPNQALRE*, un anticuerpo monocatenario, una ribozima, un oligonucleótido o una proteína y/
30 *hPNQALRE* y la replicación e integración de un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE*. El sujeto puede ser un cultivo celular o un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

35 Los compuestos de prueba que se pueden cribar incluyen cualquier sustancia, tanto productos naturales como sintéticos, que se pueden administrar al sujeto *in vitro* o *in vivo*. Se pueden probar bibliotecas o mezclas de compuestos. Los compuestos o sustancias pueden ser aquellos para los cuales un efecto farmacéutico es previamente conocido o desconocido. Los compuestos o sustancias que se pueden liberar antes, después, o de manera simultánea con un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE*. Se pueden administrar por separado o en premezcla con un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE*.

40 Se puede vigilar la integración de un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* liberado mediante cualquier medio conocido en la materia. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la transferencia Southern del polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* liberado. Un cambio en el tamaño de los fragmentos de un polinucleótido liberado indica la integración. Se puede vigilar la replicación de un polinucleótido liberado entre otras, detectando la incorporación de nucleótidos marcados combinada con la hibridación con una sonda de *hPNQALRE*. Se puede vigilar la expresión de un polinucleótido subgenómico de *hPNQALRE* detectando la producción del ARNm de *hPNQALRE* que se hibrida a polinucleótido liberado o detectando la proteína *hPNQALRE*, se puede detectar la proteína *hPNQALRE* inmunológicamente. De esta manera, la administración de polinucleótidos subgenómicos de *hPNQALRE* proporciona un excelente sistema de cribar compuesto de prueba para su capacidad de aumentar la transferencia de polinucleótidos de *hPNQALRE* en una célula, aumentando la liberación, integración, hibridación, expresión, replicación o integración en una célula *in vitro* o *in vivo* en un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

55 Ejemplos

Ejemplo 1

60 Este ejemplo demuestra la expresión del ARNm de *hPNQALRE* en tejidos humanos y líneas celulares.

Se evaluaron transferencias Northern de corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, ovarios, intestino delgado, colon, y linfocitos de sangre periférica humanos para la expresión de *hPNQALRE*. Se evaluaron también líneas de células HL-60, HeLa, Molt-4, K565, Raji, SW480, A549, y
65 G361, para la expresión del ARNm de *hPNQALRE*.

Se expresó el ARNm de *hPNQALRE* en la mayoría de los tejidos a niveles muy bajos. La expresión fue más pronunciada en cerebro, páncreas, testículos, y ovarios. En contraste, el ARNm de *hPNQALRE* se expresó a niveles

ES 2 369 502 T3

mayores en líneas de células cancerosas. La expresión del ARNm de *hPNQALRE* fue más elevada en las líneas de células K565, A549, G361, y SW480.

5 Estos resultados indican que *hPNQALRE* se expresó en exceso en líneas de células cancerosas en comparación con los niveles de expresión en los tejidos normales correspondientes.

Ejemplo 2

10 Este ejemplo describe la distribución de ARNm de *hPNQALRE* en embriones de ratones en desarrollo.

Se procesaron los embriones de ratones para el montaje completo de la hibridación *in situ* tal como se describe en Nieto y col., 1996, Meth. Cell Biol. 51:219-35, y se puede llevar a cabo mediante procedimientos que son bien conocidos en la técnica tal como se describe en Lyn, S. D., 1998, Meth. Mol. Biol. 89:67-69. La hibridación *in situ* en montajes completos de embriones indicó que el ARNm de *hPNQALRE* se expresó globalmente en tejido embrionario, particularmente en el desarrollo de las extremidades.

15 Estos resultados indican que *hPNQALRE* puede llegar a expresarse diferencialmente en tejidos concretos durante el curso del desarrollo embrionario.

20 Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra la generación de anticuerpos policlonales frente a *hPNQALRE* (ejemplo comparativo).

25 Se inmunizaron conejos con un fragmento peptídico de *hPNQALRE* con la secuencia N-HDFHVDRPLEESLIN PELIRP-C (SEQ ID NO: 17) acoplada con hemocianina de lapa californiana. Se generó una preparación de anticuerpos policlonales que reconoció la proteína *hPNQALRE* expresada en células COS y U87.

Estos resultados demuestran que se pueden usar fragmentos del polipéptido *hPNQALRE* como inmunógenos.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 369 502 T3

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 5
- (a) un polipéptido que comprende al menos 223 aminoácidos contiguos de una proteína *hPNQALRE* que consiste en una secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID N: 6);
 - 10 (b) una polipéptido cinasa dependiente de la ciclina PNQALRE que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 65% idéntica a los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6);
 - (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con3707 en la figura 1 (SEQ ID NO: 6); y
 - 15 (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6).

2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 que es una polipéptido cinasa dependiente de la ciclina PNQALRE que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 65% idéntica a los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6).

3. Una proteína de fusión que comprende un primer segmento de proteína y un segundo segmento de proteína en el que dicho primer segmento de proteína se fusiona a dicho segundo segmento de proteína por medio de un enlace peptídico y en el que dicho primer segmento de proteína comprende un polipéptido aislado de la reivindicación 1.

4. Una molécula de ADNc que codifica el polipéptido aislado de la reivindicación 1.

5. Una molécula de ADNc que codifica el polipéptido aislado de la reivindicación 2.

30 6. Una molécula de ADNc que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 35
- (a) una secuencia de nucleótidos que es al menos un 65% idéntica a los nucleótidos 76-114 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5);
 - (b) una secuencia de nucleótidos que es idéntica a los nucleótidos 76-114 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5);
 - 40 (c) una secuencia de nucleótidos que es al menos un 90% idéntica a los nucleótidos 542-603 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5);
 - (d) una secuencia de nucleótidos que es idéntica a los nucleótidos 542-602 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5); y
 - 45 (e) una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia d ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5).

7. Un polinucleótido subgenómico aislado o su complemento que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones muy rigurosas con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 50
- (a) nucleótidos 76-114 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5); y
 - 55 (b) nucleótidos 542-603 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5).

8. Una construcción que comprende:

60 un promotor; y

un segmento de polinucleótido que comprende un ADNc de la reivindicación 4, en el que dicho segmento de polinucleótido se localiza corriente abajo de dicho promotor y en el que la transcripción de dicho segmento de polinucleótido se inicia en el promotor.

65 9. Una construcción que comprende:

un promotor; y

ES 2 369 502 T3

un segmento de polinucleótido que comprende un ADNc de la reivindicación 6, en el que dicho segmento de polinucleótido se localiza corriente abajo de dicho promotor y en el que la transcripción de dicho segmento de polinucleótido se inicia en el promotor.

5 10. Una célula huésped que comprende la construcción de la reivindicación 8.

11. Una célula huésped que comprende la construcción de la reivindicación 9.

10 12. Una célula homológamente recombinante que tiene incorporada en la misma una nueva unidad de inicio de la transcripción, en la que dicha nueva unidad de inicio de la transcripción comprende:

(a) una secuencia reguladora exógena;

(b) un exón exógeno; y

15 (c) un sitio donante de corte y empalmen, en el que se localiza la nueva unidad de inicio de la transcripción corriente arriba de una secuencia de codificación de un gen, en el que dicho gen tiene una secuencia de codificación que consiste en una secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5) y en el que dicha secuencia reguladora exógena dirige la transcripción de la secuencia de codificación del gen.

20 13. Un procedimiento *in vitro* de diagnóstico o pronóstico de la neoplasia, que comprende la etapa de comparar la expresión de un gen *hPNQALRE* en un primer tejido sospechoso de ser neoplásico con la expresión del gen *hPNQALRE* en un segundo tejido que es normal, en el que dicho gen *hPNQALRE* comprende una secuencia de codificación seleccionada entre el grupo que consiste en:

(a) una secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5);

30 (b) los nucleótidos 76-114 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5); y

(c) los nucleótidos 542-603 de la secuencia de ácido nucleico marcada con3707.seq en la figura 2 (SEQ ID NO: 5),

35 en el que la sobreexpresión de dicho gen *hPNQALRE* en dicho primer tejido indica neoplasia en dicho primer tejido.

40 14. Una construcción que comprende: un promotor; y un segmento de polinucleótido que comprende un ADNc de la reivindicación 5; en el que dicho segmento de polinucleótido se localiza corriente abajo de dicho promotor y en el que la transcripción de dicho segmento de polinucleótido se inicia en el promotor.

15. Una célula huésped que comprende la construcción de la reivindicación 14.

45 16. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos que es (i) idéntica, o (ii) al menos un 65% idéntica, a los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6).

50 17. Un anticuerpo o un fragmento del mismo de la reivindicación 16, en el que dicho epítipo está que consiste en una secuencia de aminoácidos que es (i) idéntica, o (ii) al menos un 65% idéntica, a los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6).

55 18. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que proporciona una señal de detección al menos 5 veces mayor para un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 26-38 marcados con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6) que una señal de detección de otros epítipos que carecen de los aminoácidos 26-38 de la secuencia de aminoácidos marcada con3707.pep en la figura 1 (SEQ ID NO: 6) cuando se usa en pruebas inmunoquímicas.

60

65

ES 2 369 502 T3

con3707.pep 201 WSVGCI MGELLNGSPLFPGKNDIEQLCYVLRILGTPNPQVWPEL TELPDY 250
con3705.pep 201 WSVGCI MGELLNGSPLFPGKNDIEQLCYVLRILGTPNPQVWP----- 242
con3703.pep 168 -SVGCI MGELLNGSPLFPGKNDIEQLCYVLRILGTPNPQVWPEL TELPDY 216
con3702.pep 188 WSVGCI MGELLNGSPLFPGKNDIEQLCYVLRILGTPNPQVWPEL TELPDY 237

con3707.pep 251 NKISFKEQVPMPL EEVLPDVSPQALDLLGQFLLYPPHQRIAASKALLHQY 300
con3705.pep 243 -----EQVPMPL EEVLPDVSPQALDLLGQFLLYPPHQRIAASKALLHQY 286
con3703.pep 217 NKISLKEQVPMPL EEVLPDVSPQALDLLGQFLLYPPHQRIAASKALLHQY 266
con3702.pep 238 NKISFKEQVPMPL EEVLPDVSPQALDLLGQFLLYPPHQRIAASKALLHQY 287

con3707.pep 301 FFTAPLPAHPSEL PVPQRLGGPAPKAHPGPPHIHDFHVDRPLEESLLNPE 350
con3705.pep 287 FFTAPLPAHPSEL PIPQRLGGPAPKAHPGPPHIHDFHVDRPLEESLLNPE 336
con3703.pep 267 FFTAPLPAHPSEL PIPQRLGGPAPKAHPGPPHIHDFHVDRPLEESLLNPE 316
con3702.pep 288 FFTAPLPAHPSEL PIPQRLGGPAPKAHPGPPHIHDFHVDRPLEESLLNPE 337

con3707.pep 351 LIRPFILEG 359
con3705.pep 337 LIRPFILEG 345
con3703.pep 317 LIRPFILER 325
con3702.pep 338 LIRPFILER 346

ES 2 369 502 T3

con3702.seq	150	GGAGATTAAGGCTCTGCAGGAGATGGAGGACAATCAGTATGTGGTACAAC	199
con3703.seq	162	GGAGATTAAGGCTCTGCAGGAGATGGAGGACAATCAGTATGTGGTACAAC	211
con3707.seq	189	GGAGATTAAGGCTCTGCAGGAGATGGAGGACAATCAGTATGTGGTACAAC	238
con3705.seq	189	GGAGATTAAGGCTCTGCAGGAGATGGAGGACAATCAGTATGTGGTACAAC *****	238
con3702.seq	200	TGAAGGCTGTGTTCCACACGGTGGAGGCTTTGTGCTGGCCTTTGAGTTC	249
con3703.seq	212	TGAAGGCTGTGTTCCACACGGTGGAGGCTTTGTGCTGGCCTTTGAGTTC	261
con3707.seq	239	TGAAGGCTGTGTTCCACACGGTGGAGGCTTTGTGCTGGCCTTTGAGTTC	288
con3705.seq	239	TGAAGGCTGTGTTCCACACGGTGGAGGCTTTGTGCTGGCCTTTGAGTTC *****	288
con3702.seq	250	ATGCTGTCCGATCTGGCCGAGGTGGTGCGCCATGCCAGAGGCCGCTAGC	299
con3703.seq	262	ATGCTGTCCGATCTGGCCGAGGTGGTGCGCCATGCCAGAGGCCACTAGC	311
con3707.seq	289	ATGCTGTCCGATCTGGCCGAGGTGGTGCGCCATGCCAGAGGCCACTAGC	338
con3705.seq	289	ATGCTGTCCGATCTGGCCGAGGTGGTGCGCCATGCCAGAGGCCACTAGC *****	338
con3702.seq	300	CCAGGCACAGGTCAAGAGCTACCTGCAGATGCTGCTCAAGGGTGTGCGCT	349
con3703.seq	312	CCAGGCACAGGTCAAGAGCTACCTGCAGATGCTGCTCAAGGGTGTGCGCT	361
con3707.seq	339	CCAGGCACAGGTCAAGAGCTACCTGCAGATGCTGCTCAAGGGTGTGCGCT	388
con3705.seq	339	CCAGGCACAGGTCAAGAGCTACCTGCAGATGCTGCTCAAGGGTGTGCGCT *****	388
con3702.seq	350	TCTGCCATGCCAACAAACATTGTACATCGGGACCTGAAACCTGCCAACCTG	399
con3703.seq	362	TCTGCCATGCCAACAAACATTGTACATCGGGACCTGAAACCTGCCAACCTG	411
con3707.seq	389	TCTGCCATGCCAACAAACATTGTACATCGGGACCTGAAACCTGCCAACCTG	438
con3705.seq	389	TCTGCCATGCCAACAAACATTGTACATCGGGACCTGAAACCTGCCAACCTG *****	438
con3702.seq	400	CTCATCAGCGCCTCAGGCCAGCTCAAGATAGCGGACTTTGGCCTGGCTCG	449
con3703.seq	412	CTCATCAGCGCCTCAGGCCAGCTCAAGATAGCGGACTTTGGCCTGGCTCG	461
con3707.seq	439	CTCATCAGCGCCTCAGGCCAGCTCAAGATAGCGGACTTTGGCCTGGCTCG	488
con3705.seq	439	CTCATCAGCGCCTCAGGCCAGCTCAAGATAGCGGACTTTGGCCTGGCTCG *****	488
con3702.seq	450	AGTCTTTTCCCAGACGGCAGCCGCCTCTACACACACCAGGTGGCCACCA	499
con3703.seq	462	AGTCTTTTCCCAGACGGCAGCCGCCTCTACACACACCAGGTGGCCACCA	511
con3707.seq	489	AGTCTTTTCCCAGACGGCAGCCGCCTCTACACACACCAGGTGGCCACCA	538
con3705.seq	489	AGTCTTTTCCCAGACGGCAGCCGCCTCTACACACACCAGGTGGCCACCA *****	538

Fig. 2B

ES 2 369 502 T3

con3702.seq	500	GGTGGTACCGAGCCCCGAGCTCCTGTATGGTGCCCGCCAGTATGACCAG	549
con3703.seq	512	GGT-----	514
con3707.seq	539	GGTGGTACCGAGCCCCGAGCTCCTGTATGGCGCCCGCCAGTATGACCAG	588
con3705.seq	539	GGTGGTACCGAGCCCCGAGCTCCTGTATGGTGCCCGCCAGTATGACCAG	588

con3702.seq	550	GGCGTCGATCTGTGGTCTGTGGGCTGCATCATGGGGGAGCTGTTGAATGG	599
con3703.seq	515	-----CTGTGGGCTGCATCATGGGGGAGCTGTTGAATGG	548
con3707.seq	589	GGCGTCGATCTGTGGTCTGTGGGCTGCATCATGGGGGAGCTGTTGAATGG	638
con3705.seq	589	GGCGTCGATCTGTGGTCTGTGGGCTGCATCATGGGGGAGCTGTTGAATGG	638

con3702.seq	600	GTCCCCCCTTTTCCCGGGCAAGAACGATATTGAACAGCTTTGCTATGTGC	649
con3703.seq	549	GTCCCCCCTTTTCCCGGGCAAGAACGATATTGAACAGCTTTGCTATGTGC	598
con3707.seq	639	GTCCCCCCTTTTCCCGGGCAAGAACGATATTGAACAGCTTTGCTATGTGC	688
con3705.seq	639	GTCCCCCCTTTTCCCGGGCAAGAACGATATTGAACAGCTTTGCTATGTGC	688

con3702.seq	650	TTCGCATCTTGGGCACCCCAAACCCTCAAGTCTGGCCGGAGCTCACTGAG	699
con3703.seq	599	TTCGCATCTTGGGCACCCCAAACCCTCAAGTCTGGCCGGAGCTCACTGAG	648
con3707.seq	689	TTCGCATCTTGGGCACCCCAAACCCTCAAGTCTGGCCGGAGCTCACTGAG	738
con3705.seq	689	TTCGCATCTTGGGCACCCCAAACCCTCAAGTCTGGCCGGAGC-----	730

con3702.seq	700	CTGCCGGACTACAACAAGATCTCCTTTAAGGAGCAGGTGCCCATGCCCT	749
con3703.seq	649	CTGCCGGACTACAACAAGATCTCCTTTAAGGAGCAGGTGCCCATGCCCT	698
con3707.seq	739	CTGCCGGACTACAACAAGATCTCCTTTAAGGAGCAGGTGCCCATGCCCT	788
con3705.seq	731	-----AGGTGCCCATGCCCT	746

con3702.seq	750	GGAGGAGGTGCTGCCTGACGTCTCTCCCAGGCATTGGATCTGCTGGGTC	799
con3703.seq	699	GGAGGAGGTGCTGCCTGACGTCTCTCCCAGGCATTGGATCTGCTGGGTC	748
con3707.seq	789	GGAGGAGGTGCTGCCTGACGTCTCTCCCAGGCATTGGATCTGCTGGGTC	838
con3705.seq	747	GGAGGAGGTGCTGCCTGACGTCTCTCCCAGGCATTGGATCTGCTGGGTC	746

con3702.seq	800	AATTCCTTCTCTACCCTCCTCACCAGCGCATCGCAGCTTCCAAGGCTCTC	849
con3703.seq	749	AATTCCTTCTCTACCCTCCTCACCAGCGCATCGCAGCTTCCAAGGCTCTC	798
con3707.seq	839	AATTCCTTCTCTACCCTCCTCACCAGCGCATCGCAGCTTCCAAGGCTCTC	888
con3705.seq	797	AATTCCTTCTCTACCCTCCTCACCAGCGCATCGCAGCTTCCAAGGCTCTC	846

Fig. 2C

ES 2 369 502 T3

con3702.seq	850	CTCCATCAGTACTTCTTCACAGCTCCCCTGCCTGCCCATCCATCTGAGCT	899
con3703.seq	799	CTCCATCAGTACTTCTTCACAGCTCCCCTGCCTGCCCATCCATCTGAGCT	848
con3707.seq	889	CTCCATCAGTACTTCTTCACAGCTCCCCTGCCTGCCCATCCATCTGAGCT	938
con3705.seq	847	CTCCATCAGTACTTCTTCACAGCTCCCCTGCCTGCCCATCCATCTGAGCT	896

con3702.seq	900	GCCGATTCCTCAGCGTCTAGGGGGACCTGCCCCCAAGGCCCATCCAGGGC	949
con3703.seq	849	GCCGATTCCTCAGCGTCTAGGGGGACCTGCCCCCAAGGCCCATCCAGGGC	898
con3707.seq	939	GCCGGTTCCTCAGCGTCTAGGGGGACCTGCCCCCAAGGCCCATCCAGGGC	988
con3705.seq	897	GCCGATTCCTCAGCGTCTAGGGGGACCTGCCCCCAAGGCCCATCCAGGGC	946
		**** *****	
con3702.seq	950	CCCCCACAATCCATGACTTCCACGTGGACCGGCCTCTTGAGGAGTCGCTG	999
con3703.seq	899	CCCCCACAATCCATGACTTCCACGTGGACCGGCCTCTTGAGGAGTCGCTG	948
con3707.seq	989	CCCCCACAATCCATGACTTCCACGTGGACCGGCCTCTTGAGGAGTCGCTG	1038
con3705.seq	947	CCCCCACAATCCATGACTTCCACGTGGACCGGCCTCTTGAGGAGTCGCTG	996

con3702.seq	1000	TTGAACCCAGAGCTGATTCGGCCCTTCATCCTGGAGGGGTGAGGATCCTG	1049
con3703.seq	949	TTGAACCCAGAGCTGATTCGGCCCTTCATCCTGGAGAGGTGAGGATCCTG	998
con3707.seq	1039	TTGAACCCAGAGCTGATTCGGCCCTTCATCCTGGAGGGGTGAGGATCCTG	1088
con3705.seq	997	TTGAACCCAGAGCTGATTCGGCCCTTCATCCTGGAGGGGTGA	1038
		***** *****	
con3702.seq	1050	AGAA	1053
con3703.seq	999	AGAA	1002
con3707.seq	1089	AGAA	1092
con3705.seq	1038		1038

Fig. 2D

ES 2 369 502 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Chiron Corporation

<120> CINASA DE TIPO HUMANO DEPENDIENTE DE CICLINA (hPNQALRE)

<130> 200130.459PC

<140> PCT

<141> 16-12-1999

<160> 17

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 1002

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
ggaccttcta gaatggacca gtactgcata ctgggccgca tcggggaggg cgcccacggc      60
atcgtcttca aggccaagca cgtggagact ggcgagatag ttgccctcaa gaaggtggcc      120
ctaaggcggg tgggaagcgg cttccctaac caggccctgc gggagattaa ggctctgcag      180
gagatggagg acaatcagta tgtggtacaa ctgaaggctg tgttcccaca cggtggaggc      240
tttgtgctgg cctttgagtt catgctgtcg gatctggccg aggtggtgcg ccatgccag      300
aggccactag cccaggcaca ggtcaagagc tacctgcaga tgctgctcaa ggggtgcgcc      360
ttctgccatg ccaacaacat tgtacatcgg gacctgaaac ctgccaacct gctcatcagc      420
gctcaggcc agctcaagat agcggacttt ggcctggctc gactcttttc cccagacggc      480
agccgcctct acacacacca ggtggccacc aggtctgtgg gctgcatcat gggggagctg      540
ttgaatgggt cccccctttt cccgggcaag aacgatattg aacagctttg ctatgtgctt      600
cgcatcttgg gcaccccaaa cctcaagtc tggccggagc tcactgagct gccggactac      660
aacaagatct ccttaagga gcaggtgccc atgccctgg aggagtgct gcctgacgtc      720
tctccccagg cattggatct gctgggtcaa ttccttctt accctcctca ccagcgcata      780
gcagcttcca aggtctcct ccatcagtac ttcttcacag ctccccctgcc tgcccatcca      840
tctgagctgc cgattcctca gcgtctaggg ggacctgccc ccaaggccca tccagggcc      900
ccccacatcc atgacttcca cgtggaccgg cctcttgagg agtcgctgtt gaaccagag      960
ctgatcgggc ccttcaccc tggagaggtga ggatcctgag aa      1002
```

<210> 2

<211> 325

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

55

60

65

ES 2 369 502 T3

<400> 2

5 Met Asp Gln Tyr Cys Ile Leu Gly Arg Ile Gly Glu Gly Ala His Gly
1 10 15
Ile Val Phe Lys Ala Lys His Val Glu Thr Gly Glu Ile Val Ala Leu
20 30
10 Lys Lys Val Ala Leu Arg Arg Leu Glu Asp Gly Phe Pro Asn Gln Ala
35 40 45
Leu Arg Glu Ile Lys Ala Leu Gln Glu Met Glu Asp Asn Gln Tyr Val
50 55 60
15 Val Gln Leu Lys Ala Val Phe Pro His Gly Gly Gly Phe Val Leu Ala
65 70 75 80
Phe Glu Phe Met Leu Ser Asp Leu Ala Glu Val Val Arg His Ala Gln
85 90 95
Arg Pro Leu Ala Gln Ala Gln Val Lys Ser Tyr Leu Gln Met Leu Leu
100 105 110
20 Lys Gly Val Ala Phe Cys His Ala Asn Asn Ile Val His Arg Asp Leu
115 120 125
Lys Pro Ala Asn Leu Leu Ile Ser Ala Ser Gly Gln Leu Lys Ile Ala
130 135 140
25 Asp Phe Gly Leu Ala Arg Val Phe Ser Pro Asp Gly Ser Arg Leu Tyr
145 150 155 160
Thr His Gln Val Ala Thr Arg Ser Val Gly Cys Ile Met Gly Glu Leu
165 170 175
Leu Asn Gly Ser Pro Leu Phe Pro Gly Lys Asn Asp Ile Glu Gln Leu
180 185 190
30 Cys Tyr Val Leu Arg Ile Leu Gly Thr Pro Asn Pro Gln Val Trp Pro
195 200 205
Glu Leu Thr Glu Leu Pro Asp Tyr Asn Lys Ile Ser Leu Lys Glu Gln
210 215 220
35 Val Pro Met Pro Leu Glu Glu Val Leu Pro Asp Val Ser Pro Gln Ala
225 230 235 240
Leu Asp Leu Leu Gly Gln Phe Leu Leu Tyr Pro Pro His Gln Arg Ile
245 250 255
40 Ala Ala Ser Lys Ala Leu Leu His Gln Tyr Phe Phe Thr Ala Pro Leu
260 265 270
Pro Ala His Pro Ser Glu Leu Pro Ile Pro Gln Arg Leu Gly Gly Pro
275 280 285
Ala Pro Lys Ala His Pro Gly Pro Pro His Ile His Asp Phe His Val
290 295 300
45 Asp Arg Pro Leu Glu Glu Ser Leu Leu Asn Pro Glu Leu Ile Arg Pro
305 310 315 320
Phe Ile Leu Glu Arg
325

50

<210> 3

<211> 1053

55

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 369 502 T3

<400> 3

```

atggaccagt actgcatcct gggccgcac c ggggagggcg cccacggcat cgtcttcaag      60
gccaagcacg tggagactgg cgagatagtt gccctcaaga aggtggccct aaggcggttg      120
5  gaagacggct tccctaacca ggccctgcgg gagattaagg ctctgcagga gatggaggac      180
aatcagtatg tggtagaact gaaggctgtg tccccacacg gtggaggctt tgtgctggcc      240
tttgagtcca tgctgtcgga tctggccgag gtggtgcgcc atgcccagag gccgctagcc      300
caggcacagg tcaagagcta cctgcagatg ctgctcaagg gtgtcgctt ctgccatgcc      360
10 aacaacattg tacatcggga cctgaaacct gccaacctgc tcatcagcgc ctcaggccag      420
ctcaagatag cggactttgg cctggctcga gtcttttccc cagacggcag ccgcctctac      480
acacaccagg tggccaccag gtggtaccga gcccccgagc tctgtatagg tgcccgccag      540
tatgaccagg gcgtcgatct gtggtctgtg ggctgcac ca tgggggagct gttgaatggg      600
tcccccttt tcccgggcaa gaacgatatt gaacagcttt gctatgtgct tcgcatcttg      660
15 ggaccccaa accctcaagt ctggccggag ctcaactgagc tgccggacta caacaagatc      720
tccttaagg agcagggtgcc catgcccctg gaggagggtc tgccctgacgt ctctccccag      780
gcattggatc tgctgggtca attccttctc taccctctc accagcgcac cgcagcttcc      840
aaggctctcc tccatcagta cttcttcaca gctcccctgc ctgcccaccc atctgagctg      900
cagattcctc acgtcttagg gggacctgcc cccaaggccc atccaggggcc cccccacatc      960
20 ctgacttcc acgtggaccg gcctcttgag gagtcgctgt tgaaccacaga gctgattcgg      1020
cccttcatcc tggaggggtg aggatcctga gaa      1053

```

<210> 4

25 <211> 346

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 4

```

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

```

ES 2 369 502 T3

Pro His Gln Arg Ile Ala Ala Ser Lys Ala Leu Leu His Gln Tyr Phe
 275 280 285
 Phe Thr Ala Pro Leu Pro Ala His Pro Ser Glu Leu Pro Ile Pro Gln
 290 295 300
 Arg Leu Gly Gly Pro Ala Pro Lys Ala His Pro Gly Pro Pro His Ile
 305 310 315 320
 His Asp Phe His Val Asp Arg Pro Leu Glu Glu Ser Leu Leu Asn Pro
 325 330 335
 Glu Leu Ile Arg Pro Phe Ile Leu Glu Arg
 340 345

<210> 5

15 <211> 1092

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 5

atggaccagt actgcatcct gggccgcac ggggagggcg cccacggcat cgtcttcaag 60
 gccaaacacg tggagccgag ggtgggctgg cagtgtctgc cttctatcct gcagactggc 120

25

gagatagttg ccctcaagaa ggtggcccta aggcggttgg aagacggctt ccctaaccag 180
 gccctgcggg agattaaggc tctgcaggag atggaggaca atcagtatgt ggtacaactg 240
 aaggctgtgt tcccacacgg tggaggcttt gtgctggcct ttgagttcat gctgtcggat 300
 ctggccgagg tgggtgcgca tgcccagagg ccactagccc aggcacaggt caagagctac 360
 ctgcagatgc tgetcaaggg tgtcgccttc tgccatgcca acaacattgt acatcgggac 420
 ctgaaacctg ccaacctgct catcagcgcc tcaggccagc tcaagatagc ggactttggc 480
 ctggctcgag tcttttcccc agacggcagc cgctctaca cacaccaggt ggccaccagg 540
 tggtagcgag cccccgagct cctgtatggc gcccgccagt atgaccaggg cgtcgatctg 600
 tggctctgtg gctgcatcat gggggagctg ttgaatgggt cccccctttt cccgggcaag 660
 aacgatattg aacagctttg ctatgtgctt cgcactcttg gcaccccaaa ccctcaagtc 720
 tggccggagc tcaactgagc gccggactac aacaagatct cctttaagga gcaggtgccc 780
 atgcccctgg aggaggtgct ccctgacgtc tctcccagg cattggatct gctgggtcaa 840
 ttccttctct accctectca ccagcgcac gcagcttcca aggcctcctt ccatcagtac 900
 ttcttcacag ctcccctgcc tgcccateca tctgagctgc ccttccctca gcgtctaggg 960
 ggacctgccc ccaaggcca tccagggccc ccccacatcc atgacttcca cgtggaccgg 1020
 cctcttgagg agtcgctgtt gaaccagag ctgattcggc ccttcatcct ggaggggtga 1080
 ggatcctgag aa 1092

45

<210> 6

<211> 359

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

55

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

65

ES 2 369 502 T3

<400> 7

```

5   atggaccagt actgcatcct gggccgcate ggggagggcg cccacggcat cgtcttcaag      60
   gccaagcacg tggagccgag ggtgggctgg cagtgtctgc cttctatcct gcagactggc      120
   gagatagttg ccctcaagaa ggtggcccta aggcggttgg aggacggctt ccctaaccag      180
   gccctgcggg agattaaggc tctgcaggag atggaggaca atcagtatgt ggtacaactg      240
   aaggctgtgt tcccacacgg tggaggcttt gtgctggcct ttgagttcat gctgtcggat      300
   ctggccgagg tggtgcgcca tgcccagagg ccactagccc aggcacaggt caagagctac      360
10  ctgcagatgc tgctcaaggg tgctgccttc tgccatgccca acaacattgt acatcgggac      420
   ctgaaacctg ccaacctgct catcagcgcc tcaggccagc tcaagatagc ggactttggc      480
   ctggctcgag tcttttcccc agacggcagc cgctctaca cacaccaggt ggccaaccag      540
   tggtagccgag cccccgagct cctgtatggt gcccgccagt atgaccaggg cgtcgcgatctg      600
   tggctctgtg gctgcatcat gggggagctg ttgaatgggt cccccctttt cccgggcaag      660
15  aacgatattg aacagctttg ctatgtgctt cgcctcttgg gcaccccaaa ccttcaagtc      720
   tggccggagc aggtgcccac gccctggag gaggtagctg ctgacgtctc tccccagca      780
   ttgatctgct tgggtcaatt ccttctctac cctctcacc agcgcctcgc agcttccaag      840
   gctctcctcc atcagtactt cttcacagct cccctgctg cccatccatc tgagctgccg      900
20  attcctcagc gtctaggggg acctgcccc aaggcccatc cagggcccc ccacatccat      960
   gacttccacg tggaccggcc tcttgaggag tcgctgttga acccagagct gattcggccc     1020
   ttcacacctg aggggtga                                     1038

```

<210> 8

<211> 345

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 8

```

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

```

ES 2 369 502 T3

Ser Pro Gln Ala Leu Asp Leu Leu Gly Gln Phe Leu Leu Tyr Pro Pro
 260 265 270
 His Gln Arg Ile Ala Ala Ser Lys Ala Leu Leu His Gln Tyr Phe Phe
 275 280 285
 5 Thr Ala Pro Leu Pro Ala His Pro Ser Glu Leu Pro Ile Pro Gln Arg
 290 295 300
 Leu Gly Gly Pro Ala Pro Lys Ala His Pro Gly Pro Pro His Ile His
 305 310 315 320
 10 Asp Phe His Val Asp Arg Pro Leu Glu Glu Ser Leu Leu Asn Pro Glu
 325 330 335
 Leu Ile Arg Pro Phe Ile Leu Glu Gly
 340 345

15 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Secuencia que caracteriza el dominio de unión a la ciclina de las cinasas dependientes de ciclina.
 25 <400> 9

Pro Asn Gln Ala Leu Arg Glu
 1 5

30 <210> 10
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Secuencia que caracteriza el dominio de unión a la ciclina de las cinasas dependientes de ciclina.
 40 <400> 10

Pro Phe Thr Ala Ile Arg Glu
 1 5

45 <210> 11
 <211> 7
 50 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 55 <223> Secuencia que caracteriza el dominio de unión a la ciclina de las cinasas dependientes de ciclina.
 <400> 11

Pro Ile Ser Ser Leu Arg Glu
 1 5

60 <210> 12
 65 <211> 7
 <212> PRT

ES 2 369 502 T3

<213> Desconocido
<220>
<223> Secuencia que caracteriza el dominio de unión a la ciclina de las cinasas dependientes de ciclina.
5
<400> 12

Pro Ile Thr Ala Leu Arg Glu
10 1 5

<210> 13
<211> 7
15 <212> PRT
<213> Desconocido
<220>
20 <223> Secuencia que caracteriza el dominio de unión a la ciclina de las cinasas dependientes de ciclina.
<400> 13

Pro Leu Ser Thr Ile Arg Glu
25 1 5

<210> 14
30 <211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
35 <223> Secuencia que caracteriza el dominio de unión a la ciclina de las cinasas dependientes de ciclina.
<400> 14

Pro Ile Ser Thr Val Arg Glu
40 1 5

45 <210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido
50 <220>
<223> Secuencia que caracteriza el dominio de unión a la ciclina de las cinasas dependientes de ciclina.
55 <400> 15

Pro Ser Thr Ala Ile Arg Glu
60 1 5

<210> 16
<211> 7
65 <212> PRT
<213> Desconocido
<220>

