

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 976**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00** (2006.01)

**C12N 15/19** (2006.01)

**C07K 16/26** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2008 E 08770065 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2158327**

54 Título: **Isoformas relativas al cáncer de componentes de complejos de factores de transcripción como biomarcadores y dianas de fármacos**

30 Prioridad:

**03.06.2007 US 941678 P**

**04.06.2007 US 941747 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.10.2013**

73 Titular/es:

**ONCOTX, INC. (100.0%)  
2121 AVENUE OF THE STARS SUITE 2550  
LOS ANGELES, CA 90067, US**

72 Inventor/es:

**KAZANTSEVA, ANNA y  
KAZANTSEVA, JEKATERINA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 424 976 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**

Isoformas relativas al cáncer de componentes de complejos de factores de transcripción como biomarcadores y dianas de fármacos

5 La solicitud actual contiene un largo listado de secuencias que se ha presentado por la vía de archivo de texto (.txt) en lugar de copia impresa en papel (o pdf). La solicitud actual también contiene una tabla larga (Tabla 1) que describe las secuencias desveladas en este documento y que se ha presentado por la vía de archivo de texto (.txt) en lugar de copia impresa en papel (o pdf).

10 Esta solicitud reivindica los beneficios de las solicitudes de patentes provisionales de EE.UU. de número de serie 60/941.678, presentada el 3 de junio de 2007 y de número de serie 60/941.747, presentada el 4 de junio de 2007.

15 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a detección y terapia del cáncer. La invención se refiere más específicamente a isoformas de componentes de complejos de factores de transcripción que se expresan específicamente en células cancerosas. Estas isoformas se pueden usar como biomarcadores para detección, diagnosis, prognosis y monitorización de tratamientos de cáncer y como dianas de fármacos de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de diversos cánceres que expresan las isoformas que son dianas.

20 Antecedentes de la invención

25 El cáncer sigue siendo un significativo problema de salud en todo el mundo. Se sigue demostrando que las terapias actuales, que generalmente se basan en una combinación de quimioterapia, cirugía y radiación, son inadecuadas en muchos pacientes.

30 La biología molecular y celular del cáncer es enormemente compleja. Hasta ahora, miles de genes que representan virtualmente todos los subgrupos de genes han estado implicados en la fisiopatología del cáncer, que incluye los mecanismos que regulan el crecimiento incontrolado de células tumorales y la metástasis. Actualmente, está bien establecido que muchos cánceres, si no todos, se desarrollan desde la proliferación de células troncales o progenitoras ya sea con genes mutados o con cromosomas reordenados. Como resultado de estas alteraciones genéticas, las células tumorales poseen expresión de gen y proteína alterada en comparación con la de células normales (Perou y col., 2000, Hedenfalk y col., 2001, West y col., 2001, Zajchowski y col., 2001). Además, existen diferencias en expresión de gen entre diferentes tipos del mismo cáncer y entre tumores histológicamente similares. Por ejemplo, los datos de análisis sobre genoma completo han demostrado que los entramados reguladores que determinan la expresión de genes específicos también son diferentes en células malignas y no malignas.

40 La regulación de la expresión del gen a nivel transcripcional es un proceso biológico clave para determinar el tipo de célula y los patrones de la expresión de gen específica a la señal. Los objetivos precedentes se enfocan principalmente sobre las proteínas que forman los entramados reguladores que controlan los procesos biológicos fundamentales en contextos de células normales y cancerosas. La ejecución con éxito de la regulación del gen de la célula específica, que combina esfuerzos interdisciplinarios, promete nuevos avances muy importantes en el campo de la regulación de la transcripción y del cáncer, puesto que se dirige a aspectos nuevos en el proceso, que incluyen:

- las funciones específicas de complejos de transcripción de polimerasa II de ARN basal individual y cómo participan en la regulación de la expresión del gen en células normales y cancerosas;
- 50 • cómo se logra la transcripción específica del gen durante la diferenciación celular en células normales y cancerosas; y
- cómo el proceso de transcripción de la célula normal y de la célula cancerosa se organiza espacialmente en el núcleo.

55 Los autores de la presente invención postulan que un número virtualmente infinito de complejos transcripcionales pueden adquirir la maquinaria de transcripción basal de una manera específica de gen para regular con precisión la expresión de genes durante la diferenciación, crecimiento y desarrollo en respuesta a señales externas (fármacos, productos químicos, estrés, etc.). Los materiales y métodos que se desvelan en este documento sirven para descifrar cómo se desajustan estos complejos de transcripción en las células cancerosas.

60 La regulación precisa temporal y espacial de la transcripción de genes que codifican proteínas por la ARN polimerasa II (Pol II) es vital para la ejecución de programas celulares, tales como crecimiento, respuestas a señales complejas desarrolladoras y homeostáticas, etc. La circuitería molecular que permite la expresión coordinada del gen se basa en factores de transcripción (TF) de unión con ADN y en varios complejos co-reguladores de transcripción (TCC) que modulan la estructura de la cromatina y que forman puentes de TF a Pol III incluyendo

complejos que contienen SWI/SNF, MED, GTF y TAF. Numerosos datos muestran que diferentes tipos de células que incluyen células cancerosas expresan patrones específicos de componentes de TF y TCC. La expresión de componentes de TCC (y sus isoformas) específica del tipo de célula es la base del ensamblaje de los complejos de transcripción con diferentes funciones. Diferentes complejos de transcripción se dirigen a dianas de conjuntos diferentes de factores de unión a ADN conduciendo a inactivación de diferentes conjuntos de genes diana y en último término a la realización de diferentes programas celulares.

Una de las características bien conocidas de las células cancerosas es la expresión de variantes de ajuste de ARNm que codifican isoformas específicas de proteínas que no están presentes en células normales. Un gran número de estudios reseñan la identificación de variantes de ajuste alternativo de ARNm específicos de cáncer o enriquecidos en cáncer. Por ejemplo, un cribado computacional de genoma amplio de 11.014 genes usando 3.471.822 secuencias humanas de marcadores de secuencia expresada (EST) identificaron 26.258 transcritos/ARNm ajustados alternativamente de los que 845 estaban asociados significativamente con cáncer (Wang y col., 2003). Se ha puesto de manifiesto que varias de las variantes de ajuste específicas de genes tienen valor para pronóstico. Un nivel alto de expresión de isoformas de ciclina E de bajo peso molecular tiene una fuerte correlación con la supervivencia de pacientes de cáncer de mama tanto nodo-negativos como nodo-positivos (Porter y Keyomarsi, 2000, Keyomarsi y col., 2002). Pacientes con una alta expresión de la variante de ajuste alternativo del factor de transcripción hélice-bucle-hélice ARNT tienen peor supervivencia sin recaída y global que los pacientes con baja expresión (Qin y col., 2001).

El análisis computacional de bases de datos de EST humanos identificó un gran número de variantes de ajuste de ARNm de factores reguladores (TCC) que se expresan en diversas células cancerosas. La presente invención se basa en un análisis informático que usa diversas bases de datos de expresión de genes y de EST, que ha revelado un gran número de variantes de ajuste alternativo de (TCC) que tienen expresión específica del tipo celular y de la enfermedad. Las variantes de ajuste que codifican isoformas de proteínas se expresan en células cancerosas como isoformas relativamente abundantes. Estas isoformas modifican la maquinaria transcripcional lo que da como resultado una expresión de gen alterada y puede contribuir al desarrollo de cáncer.

El papel central de los complejos transcripcionales en los mecanismos reguladores celulares los hace atractivas dianas de fármacos. La interferencia en la función o formación de la maquinaria de transcripción específica de cáncer puede capacitar a los investigadores y especialistas clínicos para que controlen o corrijan la expresión de gran número de genes. Los TCC contienen al menos 100 subunidades, mientras que su composición en diferentes tipos de células y en diferentes promotores varía y contiene diferentes miembros de complejos de TCC. Esta variabilidad de complejos de TCC específica de célula garantiza la especificidad de los tratamientos potenciales a los que apuntan los TCC. Los autores de la presente invención han aislado un gran número de isoformas de componentes de TCC con actividad potencialmente alterada desde diversas células cancerosas. Se ha puesto de manifiesto que complejos que contienen TAF controlan varios aspectos de la proliferación y metástasis de células cancerosas (Guipaud y col., 2006). Además, varias isoformas de TAF-4 funcionan como formas dominantes negativas para regular las dianas nucleares de receptor de hormona (Brunkhorst y col., 2004).

#### Sumario de la invención

La invención proporciona una isoforma de un co-regulador transcripcional que se selecciona entre las isoformas MED 12 que se muestran en SEC ID N.<sup>os</sup>: 100-104. El péptido puede comprender una proteína de fusión que comprende una isoforma de la invención que se fusiona con un péptido heterólogo. En algunas realizaciones, el péptido heterólogo es un CPP o NLS, tal como una de SEC ID N.<sup>os</sup>: 1-3. En algunas realizaciones opcionales, el péptido se fusiona con un agente tóxico.

La invención proporciona además un anticuerpo que se une específicamente con una isoforma de la invención. En una realización, el anticuerpo se etiqueta con un marcador detectable. En otra realización, el anticuerpo se conjuga con un agente tóxico. Las isoformas, péptidos y anticuerpos de la invención pueden ser útiles en composiciones terapéuticas y/o de diagnóstico. Por consiguiente, la invención también proporciona una composición que comprende una de estas moléculas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona adicionalmente un método para detectar cáncer en un espécimen de tejido. El método comprende detectar la presencia de una isoforma de la reivindicación 1 en el espécimen de tejido. La presencia de la isoforma es indicativa de cáncer. En una realización, la detección comprende poner en contacto un espécimen de tejido con una molécula detectable que se une específicamente con una isoforma de la invención y detectar la unión de la molécula detectable. Por ejemplo, la detección puede que comprenda detectar ARNm o isoformas de proteínas de TCC específicas de cáncer. La presencia o unión de la molécula detectable es indicativa de cáncer.

En otra realización, la invención proporciona un método para monitorizar cáncer en un sujeto. El método comprende analizar un espécimen de tejido que se obtiene del sujeto para medir la cantidad de una isoforma de la invención presente en el espécimen y comparar la cantidad de isoforma presente en el espécimen con la cantidad determinada en una situación anterior, en donde el cambio en la cantidad de la isoforma es indicativo de un cambio en el progreso del cáncer. Por ejemplo, un aumento en el nivel indica que el cáncer está progresando, mientras que una

disminución indica que el cáncer está en regresión. La situación anterior puede haber sido anterior al curso del tratamiento de la situación cancerosa o una etapa más temprana del mismo y una disminución de la cantidad de isoforma presente puede ser indicativa de eficacia del tratamiento. En una realización, el método comprende poner en contacto un espécimen de tejido obtenido del sujeto con una molécula detectable que se une específicamente con una isoforma de la invención. El método comprende además determinar un nivel de unión de la molécula detectable con la isoforma. Como alternativa, el método puede que comprenda detectar el nivel de isoforma presente en el espécimen. El nivel de unión de la molécula detectable con la isoforma, o el nivel de la isoforma presente, se compara entonces con el nivel de unión determinado, o el nivel de isoforma presente en una situación anterior. El cambio en los niveles de expresión de las isoformas de TCC, o de la unión de la molécula detectable es indicativo de un cambio en el progreso del cáncer.

Cánceres representativos que se van a detectar o monitorizar por los métodos de la invención incluyen, aunque no se limitan a ellos, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, hepatoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, tumores cerebrales (astrocitoma, glioblastoma, neuroblastoma), sarcoma, condrosarcoma, cáncer de mama, cáncer ovárico, o teratocarcinoma. En una realización típica, la molécula que se une específicamente a la isoforma es un péptido. El péptido se etiqueta opcionalmente con un marcador detectable, por ejemplo para generar una imagen en vivo.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Análisis de complejos BAF de células HeLa y melanoma humano SK-Mel y WM266-4. Se cromatografiaron partes alícuotas de extractos nucleares celulares de HeLa, SKMel 28 y WM 266-4 en una columna que contenía PE 11 de intercambio iónico. Después de lavar abundantemente la columna con tampón que contenía KCl 0,1 M, se eluyeron las proteínas combinadas con tampón que contenía KCl 0,2 M (canales 2, 8 y 14), KCl 0,3 M (canales 3, 9 y 15), KCl 0,5 M (canales 4, 10 y 16), KCl 0,75 M (canales 5 y 11) y KCl 1,0 M (canales 6 y 14). El "flujo de paso" inicial se representa en los canales 1, 7 y 13.

Figura 2. Análisis del fraccionamiento del complejo GTF detectando p62 (subunidad TFIIH) usando detección de prueba de bandas de Western a partir de células HeLa y células de melanoma humano SK-Mel 28 y WM 266-4. Se cromatografiaron partes alícuotas de extractos nucleares celulares de HeLa, SKMel 28 y WM 266-4 en una columna de intercambio iónico PE 11. Después de lavar abundantemente la columna con tampón que contenía KCl 0,1 M, se eluyeron las proteínas combinadas con tampón que contenía KCl 0,2 M (canales 2, 8 y 14), KCl 0,3 M (canales 3, 9 y 15), KCl 0,5 M (canales 4, 10 y 16), KCl 0,75 M (canales 5, 11 y 17) y KCl 1,0 M (canales 6, 12 y 18). El "flujo de paso" inicial se representa en los canales 1, 7 y 13.

Figura 3. Se evaluaron las condiciones de purificación del complejo mediador detectando MED-16 en fracciones NER desde células HeLa en comparación con células SK-Mel 28 de melanoma. Se cromatografiaron partes alícuotas de extractos nucleares celulares de HeLa y SKMel 28 en una columna de intercambio iónico PE 11. Después de lavar abundantemente la columna con tampón que contenía KCl 0,1 M, se eluyeron las proteínas combinadas con tampón que contenía KCl 0,2 M (canales 2 y 8), KCl 0,3 M (canales 3 y 9) KCl 0,5 M (canales 4 y 10), KCl 0,75 M (canales 5 y 11) y KCl 1,0 M (canales 6 y 12). El "flujo de paso" inicial se representa en los canales 1 y 7.

Figura 4. Unión del péptido BAF57p12 con proteínas purificadas GST-BAF57 y GST-BAF57iso en disolución. La unión se representa como la intensidad de fluorescencia del péptido liberado en unidades arbitrarias.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de isoformas específicas de cáncer de componentes de complejos de factores de transcripción, o complejos co-reguladores de transcripción (TCC), que son específicos para cánceres humanos. Estas isoformas proporcionan nuevas dianas para tratamiento y detección del cáncer.

#### Isoformas de componentes de TCC como nuevas y prometedoras dianas de fármacos

Los reguladores transcripcionales determinan entramados reguladores que controlan la transcripción específica de genes. La regulación inadecuada de estos entramados se correlaciona con un número creciente de enfermedades humanas que se caracterizan por patrones alterados de expresión de genes. El descubrimiento de alteraciones específicas del cáncer en composición y función de TCC sugiere que dirigiendo a una diana estos componentes modificados de TCC con compuestos químicos específicos se tendrá como resultado la modificación de patrones de expresión de genes que suprimirá la proliferación e inducirá apoptosis de las células específicas del cáncer. Dado que la expresión de isoformas de co-reguladores transcripcionales es específica de cáncer, entonces los tratamientos que se dirigen a estas moléculas como dianas son probablemente también específicos del cáncer sin efectos secundarios significativos. Durante mucho tiempo se ha considerado que los TCC son dianas difíciles para desarrollo eficaz de fármacos. Recientemente, numerosos informes muestran que se pueden desarrollar moléculas pequeñas que interaccionan con TF y TCC específicos para controlar la actividad de TCC específicos.

Cáncer y control transcripcional

El cáncer es una enfermedad de enorme complejidad. Hasta ahora, miles de genes que representan virtualmente todos los subgrupos de genes se han implicado en el cáncer. Actualmente, se piensa que el cáncer se desarrolla desde la proliferación de células troncales o progenitoras ya sea con genes mutados o con cromosomas reordenados. Como resultado de estas alteraciones genéticas, las células tumorales también poseen expresión de gen y proteína alterada en comparación con la de células no malignas. El análisis de genoma completo de la expresión de genes muestra claramente diferencias específicas entre células normales y cancerosas así como entre tipos de cánceres. Esto sugiere que los entramados reguladores que determinan la expresión de genes específicos son diferentes en células malignas y no malignas.

Los pacientes de cáncer tienen evolución y resultados clínicos muy variables. Se ha sugerido que la heterogeneidad genética intrínseca del tumor primario desempeña un papel en esta variabilidad y puede explicarla en parte (Chang y col., 2003). Los factores patológicos y clínicos son insuficientes para captar la compleja cascada de acontecimientos que impulsan el comportamiento clínico de los tumores. Extensos análisis de los patrones de expresión de genes de diversos tumores han dado como resultado la comprensión de que tumores histológicamente similares tienen diferentes patrones de expresión de genes. Las técnicas de oligonucleótido y micromatrices de ADNc han identificado subgrupos moleculares de tipos específicos de cáncer (Perou y col., 2000, Hedenfalk y col., 2001, West y col., 2001, Zajchawski y col., 2001). También se ha usado el trazado del perfil molecular de tumores para predecir la supervivencia de pacientes y para seleccionar pacientes para terapia coadyuvante (van't Veer y col., 2002, van de Vijver y col., 2002).

Isoformas de TCC específicas de cáncer-nuevas dianas de fármacos con alta especificidad

Unas características muy conocidas de las células cancerosas son las mutaciones en diversas moléculas reguladoras que incluyen factores de transcripción, expresión inadecuada de factores de transcripción, expresión de variantes de ajuste de ARNm que codifican isoformas específicas de proteínas y presencia de modificaciones postraduccionales que no están presentes en células normales. En casi todos los tipos individuales de cáncer se describen mutaciones y expresión de proteínas de fusión (Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C., CEBPA apuntan mutaciones en enfermedades hematológicas malignas. *Leukemia*. 2005 Mar; 19(3): 329-34; Xia y Barr, Chromosome translocations in sarcomas and the emergence of oncogenic transcription factors. *Eur J Cancer*. de noviembre de 2005; 41(16): 2513-27). Un gran número de publicaciones reseñan la identificación de variantes de ajuste alternativo de ARNm específicos o enriquecidos de cáncer. Por ejemplo, un cribado computacional de genoma amplio de 11.014 genes usando 3.471.822 secuencias humanas de marcadores de secuencia expresada (EST) identificó 26.258 transcritos/ARNm ajustados alternativamente de los que 845 estaban asociados significativamente con cáncer (Wang y col., 2003). Se ha puesto de manifiesto que varias de las variantes de ajuste específicas de genes tienen valor para pronóstico. Pacientes con una alta expresión de la variante de ajuste alternativo del factor de transcripción hélice-bucle-hélice ARNT tienen peor supervivencia sin recaída y global que los pacientes con baja expresión (Qin y col., 2001). Como regla, la expresión de ARNm ajustados alternativamente específicos o enriquecidos de cáncer no se refiere a las mutaciones en los sitios de donante o receptor sino a las debidas a los cambios en la expresión de los factores de ajuste.

Los autores de la presente han identificado 204 isoformas específicas o enriquecidas de cáncer de complejos de GTF (51) TAF (30), SWI/SNF (37) y MED (80) y co-activadores y co-represores (6). También han demostrado que algunas de las isoformas llegan a ser componentes integrales de TCC. Estos TCC cambiados pueden contribuir al desarrollo de cáncer. La incorporación de isoformas a TCC funcionales confirma que estas isoformas son dianas de fármacos adecuadas y se pueden usar fármacos que modifican la función de esas isoformas o TCC que contienen esas isoformas para tratar el cáncer.

Definiciones

Todos los términos científicos y técnicos usados en esta solicitud tienen los significados que se usan comúnmente en la técnica salvo que se especifique otra cosa. Según se usan en esta solicitud, las siguientes palabras y frases tienen los significados que se especifican.

Según se usa en este documento, "péptido" o "polipéptido" incluye fragmentos de proteínas y péptidos, ya sean aislados de fuentes naturales, producidos mediante técnicas recombinantes, o sintetizados químicamente. Los polipéptidos (y péptidos) de la invención comprenden típicamente al menos 6 aminoácidos aproximadamente. En algunas realizaciones, los polipéptidos son de una longitud de al menos 12 aminoácidos aproximadamente.

Según se usa en este documento "molécula de diana de CSTC" (en donde CSTC se refiere a complejo de transcripción específico de cáncer) incluye péptidos de diana de CSTC, polinucleótidos que codifican péptidos de diana de CSTC, polinucleótidos complementarios a los que codifican péptidos de diana de CSTC, péptidos que reconocen y se unen específicamente a CSTC y otras moléculas pequeñas que exhiben la misma actividad de diana.

Una "molécula pequeña" significa una molécula que tiene un peso molecular de menos de 2000 Dalton, en algunas realizaciones menos de 1000 Dalton y todavía en otras realizaciones menos de 500 Dalton o menos. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, compuestos heterocíclicos, compuestos carboxílicos, esteroides, aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos.

5 Según se usa en este documento "diana de CSTC" se refiere a la unión específica de una molécula de diana de CSTC a un complejo de transcripción específico de cáncer, en donde la especificidad es tal que la molécula de diana de CSTC no se une esencialmente al complejo de transcripción normal o nativo.

10 Según se usa en este documento, "vector" significa una construcción, que es capaz de suministrar y preferiblemente expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula hospedadora. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a ellos, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmido, cósmido o fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes catiónicos de condensación, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, tales como células productoras

15 Según se usa en este documento, "secuencia de control de expresión" significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de expresión puede ser un promotor tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de expresión está enlazada operativamente con la secuencia de ácido nucleico que se ha de transcribir.

20 Los términos "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refieren a polímero de desoxirribonucleótido o de ribonucleótido en forma de hebra tanto sencilla como doble y salvo que se limite de alguna otra manera, abarca los análogos conocidos de nucleótidos naturales que se hibridan con ácidos nucleicos de manera similar a los nucleótidos que se producen naturalmente.

Según se usa en este documento, "proteína de tumor" es una proteína que está expresada por células de tumor. Una proteína de tumor es específica del tumor si no está expresada en células que no son de tumor.

30 Según se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el ingrediente conserve la actividad biológica y no sea reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a ellos, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar tales como disolución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como la emulsión aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Diluyentes preferidos para administración parenteral o en aerosol son la disolución salina tamponada con fosfato o la disolución salina normal (0,9 %).

35 Mediante métodos convencionales muy conocidos, se formulan composiciones que comprenden vehículos de este tipo (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990).

40 Según se usa en este documento, "un" o "uno" significa al menos uno, salvo que se indique claramente otra cosa.

#### Péptidos de diana de CSTC

45 Los péptidos y polipéptidos de diana de CSTC según se describen en este documento pueden ser de cualquier longitud. Pueden estar presentes secuencias adicionales derivadas de secuencias de proteínas nativas y/o heterólogas y dichas secuencias conservan la capacidad de modular el complejo de transcripción. En una realización típica, el péptido comprende también alguna secuencia adicional seleccionada para facilitar el suministro a las células y a los núcleos. Por ejemplo, se puede añadir un péptido de penetración en la célula (CPP), tal como la siguiente secuencia de aminoácido: RRRRRRR (SEC ID N.º: 1). Los expertos en la técnica están al tanto de otros CPP que pueden ser adecuados para uso con la invención, tales como los que se describen Ulo Langel, ed., Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications, Culinary & Hospitality Industry Publications Services (CHIPS), Weimar, Texas, 2002. Un ejemplo de un péptido que facilita el suministro nuclear es una señal de localización nuclear (NLS). Típicamente, esta señal consiste en unas pocas secuencias cortas de lisinas o argininas cargadas positivamente, tal como PPKRKV (SEC ID N.º: 2). En una realización, la NLS tiene la secuencia de aminoácido PPKRKV (SEC ID N.º: 3).

60 En algunas realizaciones, el péptido comprende aminoácidos-D y/o ha sido modificado estructuralmente para potenciar su utilidad para un propósito dado. En algunas realizaciones, el péptido comprende aminoácidos modificados químicamente. Se abarcan también aptámeros dentro de la invención.

65 Los expertos en la técnica apreciarán que ciertas variantes de los mismos serán útiles en el tratamiento y detección del cáncer. Una "variante" de péptido, según se usa en este documento, es un péptido que difiere de un péptido nativo de diana de CSTC en una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones, tales que la actividad de dirigirse a la diana del complejo de transcripción del péptido no disminuye sustancialmente. En otras palabras, la capacidad de una variante para unirse al complejo de transcripción se puede potenciar o mantener sin cambio, con

relación al péptido nativo, o se puede disminuir en menos del 50 % y preferiblemente menos del 20 %, con relación al péptido nativo. Dichas variantes se pueden identificar generalmente modificando una de las secuencias de los péptidos anteriores y evaluando la unión del péptido modificado con el complejo de transcripción de diana según se describe en este documento. Las variantes de péptido exhiben preferiblemente al menos aproximadamente 85 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 % y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95 % de identidad (determinada como se ha descrito anteriormente) con los péptidos identificados.

Preferiblemente, una variante contiene sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es aquella en la que un aminoácido está sustituido con otro aminoácido que tiene propiedades similares, de tal manera que un experto en la técnica de la química de péptidos podría esperar que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del péptido se mantengan sustancialmente sin cambio. Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer generalmente sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia, y/o naturaleza anfipática de los restos. Por ejemplo, aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y aminoácidos con grupos con cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservadores incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; and (5) phe, tyr, trp, his. Una variante puede contener, también o como alternativa, cambios no conservadores. En una realización preferida, los péptidos variantes difieren de la secuencia nativa por sustitución, supresión o adición de cinco aminoácidos o menos.

Péptidos recombinantes codificados por secuencias de ADN según se describen en este documento se pueden preparar fácilmente a partir de las secuencias de ADN que usan cualquiera de los diversos vectores de expresión conocidos por un experto ordinario en la técnica. La expresión se puede conseguir en cualquier célula hospedadora apropiada que haya sido transformada o transfectada con un vector de expresión que contenga una molécula de ADN que codifique un péptido recombinante. Células hospedadoras adecuadas incluyen procariontes, levadura y células eucarióticas superiores. Preferiblemente, las células hospedadoras empleadas son *E. coli*, levadura, células de insectos, o una línea celular de mamífero tal como COS o CHO. Los líquidos sobrenadantes de sistemas adecuados hospedador/vector que segregan proteína o péptido recombinante en el medio de cultivo se pueden concentrar en primer lugar usando un filtro disponible comercialmente. Después de la concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada tal como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Finalmente se puede emplear una o más etapas de HPLC de fase inversa para purificar más el péptido recombinante.

Porciones de otras variantes que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos y generalmente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, también se pueden generar por medios sintéticos, usando técnicas muy conocidas por los expertos ordinarios en la técnica. En algunas realizaciones, se prefieren polipéptidos de 10-50 aminoácidos de longitud, con longitudes de 15-30 aminoácidos particularmente adecuadas para algunos usos. Dichos péptidos se pueden sintetizar usando cualquiera de las técnicas de fase sólida disponibles comercialmente tales como el método de síntesis en fase sólida Merrifield, donde se añaden secuencialmente los aminoácidos a una cadena de aminoácidos en crecimiento. Véase Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2146, 1963. El aparato para síntesis automatizada de péptidos está disponible comercialmente de proveedores tal como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA) y puede funcionar según las instrucciones del fabricante.

Se pueden sintetizar péptidos en un sintetizador de péptidos 430 A de Perkin Elmer/Applied BioSystems Division usando la técnica química Fmoc con activación de HPTU (O-BenzotriazolN,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato). Se puede agregar una secuencia Gly-Cys-Gly al término amino del péptido para proporcionar un método de conjugación uniéndolo a una superficie inmovilizada o etiquetándolo al péptido. La división de los péptidos desde el soporte sólido se puede llevar a cabo usando la siguiente mezcla de división: ácido trifluoroacético:etanoditiol:tioanisol:agua:fenol (40:1:2:3). Después de la división durante 2 horas, se pueden precipitar los péptidos en éter metil-t-butílico frío. Los aglomerados de péptido se pueden disolver entonces en agua que contiene ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % y se pueden liofilizar antes de la purificación por HPLC en fase inversa C18. Se puede usar un gradiente de acetonitrilo 0 %-60 % (que contiene TFA al 0,1 %) en agua para eluir los péptidos. Después de la liofilización de las fracciones puras, se pueden caracterizar los péptidos usando electropulverización u otros tipos de espectrometría de masas y mediante análisis de aminoácidos.

En general, se aíslan péptidos (que incluyen proteínas de fusión) y polinucleótidos según se describe en este documento. Un péptido o polinucleótido "aislado" es aquel que se retira de su medio natural. Por ejemplo, una proteína que existe naturalmente se aísla si se separa de alguno o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente, dichos péptidos son al menos aproximadamente 90 % puros, más preferiblemente al menos aproximadamente 95 % puros y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99 % puros. Se considera que un polinucleótido está aislado si, por ejemplo, está clonado en un vector que no es parte del medio natural.

Anticuerpos

El término "anticuerpo" se usa en el más amplio sentido y cubre específicamente anticuerpos monoclonales sencillos anti-isoforma y composiciones de anticuerpos anti-isoforma con especificidad poliepitópica. Los términos "anticuerpo monoclonal" (mAb) según se usan en este documento se refieren a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, esto es, los anticuerpos que comprenden la población de individuos son idénticos salvo en lo que se refiere a las posibles mutaciones que se produzcan naturalmente que puedan estar presentes en cantidades menores.

La invención proporciona anticuerpos que se unen a isoformas. Los anticuerpos más preferidos se unirán específicamente a una isoforma y no se unirán (o se unirán débilmente) a contrapartes que no son isoformas o especímenes no cancerosos. Los anticuerpos que se contemplan particularmente incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales así como fragmentos que contienen el dominio que se une al antígeno y/o una o más regiones determinantes complementarias de estos anticuerpos. Según se usa en este documento, un fragmento de anticuerpo se define como al menos una porción de la región variable de la molécula de inmunoglobulina que se une a su diana, esto es, la región que se une al antígeno.

Los anticuerpos de la invención pueden ser particularmente útiles en los análisis de diagnóstico y pronóstico del cáncer y en metodologías de generación de imágenes. Los anticuerpos que se expresan intracelularmente (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla) pueden ser útiles terapéuticamente para tratar cánceres en los que está involucrada la expresión de isoforma.

La invención también proporciona diversos análisis inmunológicos útiles para la detección y cuantificación de isoformas. Dichos análisis generalmente comprenden uno o más anticuerpos capaces de reconocer y de unirse a una isoforma de la invención y se pueden realizar dentro de diversos formatos de análisis inmunológicos muy conocidos en la técnica, que incluyen pero no se limitan a ellos, diversos tipos de radioinmunoanálisis, análisis de inmunosorbente asociado a enzimas (ELISA), análisis de inmunofluorescente asociado a enzimas (ELIFA) y similares. Además, también se proporcionan por la invención métodos inmunológicos de generación de imágenes capaces de detectar cánceres que expresan isoformas, que incluyen pero no se limitan a ellos, métodos de generación de imágenes por radiocentelleografía usando anticuerpos etiquetados. Dichos análisis pueden ser útiles clínicamente en la detección, monitorización y pronóstico de cánceres que expresan isoformas.

En la técnica son muy conocidos diversos métodos de preparación de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos inmunizando a un mamífero hospedador adecuado, usando una isoforma o un fragmento de la misma, en forma aislada o inmuoconjugada (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow, and Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Además, también se pueden usar proteínas de fusión de isoformas tales como proteína de fusión-GST. En otra realización, se puede sintetizar una isoforma y usarla como un inmunógeno.

También se pueden producir los anticuerpos o fragmentos, usando tecnología actual, por medios recombinantes. Regiones que se unen específicamente a las regiones deseadas de la isoforma también se pueden producir en el contexto de anticuerpos quiméricos o injertados con CDR de origen de especies múltiples. También se pueden producir anticuerpos humanos o humanizados y se prefieren para usos en contextos terapéuticos. Se conocen bien métodos para humanizar anticuerpos de murinos y otros no humanos sustituyendo uno o más de los CDR de anticuerpos no humanos con las correspondientes secuencias de anticuerpos humanos (véanse, por ejemplo, Jones y col., 1986, Nature 321: 522 525; Riechmann y col., 1988, Nature 332: 323 327; Verhoeyen y col., 1988, Science 239: 1534 1536). Véanse también, Carteret y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 4285 y Sims y col., 1993, J. Immunol. 151: 2296. Métodos para producir anticuerpos monoclonales enteramente humanos incluyen presentación en fagos y métodos transgénicos (para su revisión, véase Vaughan y col., 1998, Nature Biotechnology 16: 535 539).

Se pueden generar anticuerpos monoclonales enteramente humanos usando técnicas de clonación que emplean grandes bibliotecas combinatorias de genes de Ig humana (es decir, presentación en fagos) (Griffiths y Hoogenboom, Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries. En: Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications en Man. Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, página 4564 (1993); Burton y Barbas, Human Antibodies from combinatorial libraries. Id., páginas 65-82). También se pueden producir anticuerpos monoclonales enteramente humanos usando ratones generados mediante ingeniería que contienen lugares de genes de inmunoglobulina humana según se describe en la solicitud de patente PCT WO98/24893, Kucherlapati y Jakobovits y col., publicada el 3 de diciembre de 1997 (véase también, Jakobovits, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4): 607-614). Este método evita la manipulación in vitro que se requiere con la tecnología de la presentación en fagos y produce eficazmente anticuerpos humanos auténticos de alta afinidad.

La reactividad de anticuerpos con una isoforma de la invención se puede establecer mediante varios medios muy conocidos, que incluyen prueba de bandas de Western, inmunoprecipitación, ELISA y análisis FACS, usando, según sea apropiado, isoformas, células que expresan isoformas o extractos de las mismas.

Un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención se puede etiquetar con un marcador detectable o conjugado

con una segunda molécula. Marcadores detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a ellos, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimiluminiscente, un quelato de metal o una enzima. Se puede seleccionar una segunda molécula para conjugación con el anticuerpo en conformidad con el uso pretendido. Además, se pueden generar anticuerpos bi-específicos que son específicos para dos o más epítomos de isoformas usando métodos generalmente conocidos en la técnica. También se pueden generar anticuerpos homodiméricos mediante técnicas de reticulación conocidas en el sector (por ejemplo, Wolff y col., Cancer Res. 53: 2560-2565).

#### Polinucleótidos de la invención

La invención proporciona polinucleótidos que codifican uno o más péptidos de diana de CSTC, o una isoforma de un componente de un TCC, como se ha descrito anteriormente. La secuencia codificante para una isoforma particular se puede obtener del GenBank buscando el nombre de la isoforma correspondiente (véase Tabla 1). Polinucleótidos preferidos comprenden al menos 15 nucleótidos consecutivos, preferiblemente al menos 30 nucleótidos consecutivos y más preferiblemente 35 nucleótidos consecutivos, que codifican un péptido de diana de CSTC, o una isoforma de un TCC, tal como los que se enumeran en la Tabla de abajo (véase Ejemplo 1). Polinucleótidos que son enteramente complementarios con cualquiera de dichas secuencias también están abarcados dentro de la presente invención. Los polinucleótidos pueden ser de hebra sencilla (codificante o antisentido) o de doble hebra y pueden ser ADN (genómico, ADNc o sintético) o moléculas de ARN. Secuencias adicionales codificantes o no codificantes pueden estar presentes, aunque no se necesita, dentro de un nucleótido de la presente invención y un polinucleótido puede estar enlazado, aunque no se necesita, a otras moléculas y/u otros materiales de soporte. Porciones de dichos polinucleótidos de diana de CSTC pueden ser útiles como iniciadores y sondas para la amplificación y detección de moléculas de diana de CSTC.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (por ejemplo, una secuencia que codifica un péptido de diana de CSTC o isoforma de un TCC según se ha descrito anteriormente o una porción de la misma) o puede comprender una variante de dicha secuencia o un aptámero. Las variantes de polinucleótido contienen una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones tales que la actividad (que incluye unión específica) del péptido codificado no disminuye, con relación al péptido nativo. Las variantes exhiben preferiblemente al menos aproximadamente 60 % de identidad, más preferiblemente al menos aproximadamente 80 % de identidad y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90 % de identidad con una secuencia de polinucleótido que codifica un péptido nativo de diana de CSTC o una porción del mismo.

Se dice que dos secuencias de polinucleótido o péptido son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para correspondencia máxima según se describe abajo. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan típicamente comparando las secuencias a lo largo de una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" según se usa en este documento se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente 30 a aproximadamente 75, 40 a aproximadamente 50, en las que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que dos secuencias estén alineadas óptimamente.

Se puede llevar a cabo el alineamiento óptimo de secuencias para comparación usando el programa Megalign en la sucesión Lasergene del soporte lógico de Bioinformatics (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando los parámetros por defecto. Este programa realiza varios esquemas de alineamiento que se describen en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins -Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC vol. 5. supl. 3, páginas 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis páginas 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5: 151-153; Myers, E.W. y Muller W. (1988) CABIOS 4: 11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor. 11: 105; Santou, N., Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 80: 726-730.

Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en donde la porción de la secuencia de polinucleótido o péptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (esto es, huecos) de 20 por ciento o menos, habitualmente 5 a 15 por ciento, o 10 a 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones ni supresiones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce idéntico resto de bases de ácido nucleico o aminoácido en ambas secuencias para dar el número de posiciones que coinciden, dividiendo el número de posiciones que coinciden entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (esto es, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de la secuencia.

Las variantes pueden ser también, o como alternativa, sustancialmente homólogas con el gen nativo, o una porción

o complemento del mismo. Dichas variantes de polinucleótido son capaces de hibridación en condiciones moderadamente restrictivas con una secuencia de ADN que existe naturalmente que codifica una proteína nativa (o una secuencia complementaria).

- 5 "Condiciones moderadamente restrictivas" adecuadas incluyen prelavado en una disolución de \*\*\*5 X SSC, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50 °C-65 °C, 5 X SSC, toda la noche; a lo que sigue lavar dos veces a 65 °C durante 20 minutos con cada una de 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contiene SDS al 0,1 %.

10 Según se usa en este documento, "condiciones muy restrictivas" o "condiciones de restricción alta" son las que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, 5 X SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M) fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio 0,1 %, 5 X disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sometido a ultrasonidos (50 µg/ml), SDS al 0,1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2 X SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50 % a 55 °C, a la que sigue un lavado de alta restricción que consiste en 0,1 X SSC que contiene EDTA a 55 °C. La persona experta sabrá como ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. que sean necesarias para acomodar factores tales como longitud de sonda y similares.

20 Se apreciará por los expertos ordinarios en la técnica que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un péptido como se ha definido en este documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen homología mínima con la secuencia de nucleótido de algún gen nativo. No obstante, se contemplan específicamente por la presente invención los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codón. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos que se proporcionan en este documento están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como supresiones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. La proteína y el ARNm resultantes pueden tener, pero no se necesita, una estructura o una función alterada. Los alelos se pueden identificar usando técnicas estándar (tales como hibridación, 25 amplificación y/o comparación de secuencia de base de datos).

30 Se pueden preparar polinucleótidos usando cualquiera de las diversas técnicas conocidas en el sector, que incluyen, por ejemplo, síntesis de oligonucleótido. Se pueden someter a cribado bibliotecas con sondas diseñadas para identificar el gen de interés del péptido codificado por él. El cribado de la biblioteca de ADNc u otro con la sonda 35 seleccionada se puede llevar a cabo usando procedimientos estándar, tales como los que se describen en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

40 Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberán ser suficientemente largas y suficientemente inambiguas para que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido se etiqueta preferiblemente de tal manera que se pueda detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se está sometiendo a cribado. Los métodos de etiquetado son muy conocidos en la técnica, e incluyen el uso de radioetiquetas tales como ATP etiquetado con <sup>32</sup>P, biotilación, o etiquetado con enzimas. En Sambrook y col., *supra*, se proporcionan condiciones de hibridación, que incluyen restricción moderada y restricción alta.

45 Se pueden preparar generalmente variantes de polinucleótido por cualquier método conocido en la técnica, que incluye síntesis química, por ejemplo, por síntesis química con fosforamidita en fase sólida. También se pueden introducir modificaciones en una secuencia de polinucleótido usando técnicas estándar de mutagénesis, tales como mutagénesis dirigida a oligonucleótido específica del sitio (véase Adelman y col., *DNA 2*: 183, 1983). Como alternativa, se pueden generar moléculas de ARN mediante transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN 50 que codifican un péptido de diana de CSTC, o porción del mismo, con la condición de que el ADN se incorpore al vector con promotor adecuado de ARN polimerasa (tal como T7 o SP6). Se pueden usar ciertas porciones para preparar un péptido codificado, según se describe en este documento. Además, o como alternativa, se puede administrar una porción a un paciente de tal manera que se genere un péptido codificado *in vivo* (por ejemplo transfectando células que presentan antígeno, tales como células dendríticas, con una construcción de ADNc que 55 codifica un péptido de diana de CSTC y administrando las células transfectadas al paciente).

60 Cualquier polinucleótido se puede modificar adicionalmente para aumentar la estabilidad *in vivo*. Posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a estas, la adición de secuencias de terminación en los extremos 5' y 3'; el uso de fosforotioato o 2' O-metilo en lugar de conexiones fosfodiesterasa en la columna vertebral; y/o la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wybutosina, así como acetil-, metil-, tío- y otras formas modificadas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina: Típicamente se modifican los aptámeros, oligonucleótidos que reconocen y se unen a superficies de proteína específicas y por lo tanto pueden interferir con la actividad proteínica de isoformas del co-regulador, para uso terapéutico. Sin embargo, cuando se desea tránsito rápido se pueden usar aptámeros sin modificar en los métodos de la invención.

65 Se pueden juntar secuencias de nucleótidos con diversas secuencias de otros nucleótidos usando técnicas de ADN

recombinante establecidas. Por ejemplo, se puede clonar un polinucleótido en alguno de los diversos vectores de clonación, que incluyen plásmidos, faguémidos, derivados de lambda fago y cósmidos. Vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sonda y vectores de secuenciación. En general, un vector contendrá un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios convenientes de restricción de endonucleasa y uno o más marcadores seleccionables. Otros elementos dependerán del uso deseado y serán evidentes para los expertos ordinarios en la técnica.

Dentro de ciertas realizaciones, los polinucleótidos se pueden formular para permitir la entrada en una célula de un mamífero y para permitir su expresión. Dichas formulaciones son particularmente útiles para propósitos terapéuticos, según se describe abajo. Los expertos ordinarios en la técnica apreciarán que hay muchas maneras de conseguir la expresión de un polinucleótido en una célula diana y se puede emplear cualquier método adecuado. Por ejemplo, se puede incorporar un polinucleótido en un vector viral tal como, pero sin limitarse a ellos, adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus o vaccinia u otros virus pox (por ejemplo, virus de la viruela aviar). Las técnicas para incorporar ADN en dichos vectores son muy conocidas por los expertos ordinarios en el sector. Un vector retroviral se puede transferir o incorporar adicionalmente a un gen para tener un marcador seleccionable (para ayudar en la identificación o selección de células transducidas) y/o un resto de diana, tal como un gen que codifica un ligando para receptor sobre una célula diana específica para volver al vector específico a la diana. El direccionamiento a la diana también se puede lograr usando un anticuerpo, por métodos conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Algunas de las realizaciones de los péptidos de la invención se han descrito en este documento con un péptido de penetración en la célula (CPP) que se incorpora en el péptido para facilitar la entrada en la célula.

Otras formulaciones para propósitos terapéuticos incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, gránulos y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido para uso como vehículo de suministro *in vitro* o *in vivo* es un liposoma (esto es, una vesícula de membrana artificial). La preparación y uso de sistemas de este tipo es muy conocida en la técnica.

#### Moléculas antisentido y de ácido nucleico inhibidor

Las moléculas antisentido de la presente invención comprenden una secuencia sustancialmente complementaria, o preferiblemente enteramente complementaria, para la totalidad o un fragmento de una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido de diana de CSTC y/o isoforma específica de cáncer de un modulador de transcripción según se describe en este documento. Se incluyen fragmentos de oligonucleótidos dentro de una secuencia de codificación y nucleótidos inhibidores que inhiben la expresión de CSTC y/o isoformas específicas de cáncer de moduladores de transcripción. Se pueden emplear oligonucleótidos antisentido de ADN y ARN complementarios a secuencias en el límite entre intrones y exones para prevenir la maduración de transcripciones de ARN nuclear nuevamente generadas de genes específicos a ARNm para transcripción. Se puede hibridar ARN antisentido, que incluye ARNip, complementario a genes específicos, con el ARNm específico para ese gen y prevenir su translación. La molécula antisentido puede ser ADN, ARN, o un derivado o híbrido de las mismas tal como un gámpero quimérico. Ejemplos de moléculas derivadas de este tipo incluyen, pero no se limitan a ellas, ácido nucleico de péptido (PNA) y moléculas a base de fosforotioato tales como guanidina desoxirribonucleica (DNG) o guanidina ribonucleica (RNG).

Las moléculas antisentido de la invención son complementarias a las secuencias de ácido nucleico que codifican una isoforma de la invención. El grado de homología necesario dependerá del polinucleótido particular de la invención. Una homología de al menos 60 % es suficiente para ARNip, mientras que las moléculas antisentido más grandes y los iniciadores de PCR requieren una homología de aproximadamente 70 % o mayor.

Se puede proporcionar ARN antisentido a la célula como un ARN "listo para usar" sintetizado *in vitro* o como un gen antisentido establemente transfectado en células que producirá ARN antisentido tras la transcripción. La hibridación con ARNm da como resultado la degradación de la molécula hibridada por ARNse H y/o inhibición de la formación de complejos de translación. Ambos dan como resultado el fracaso para producir el producto del gen original.

Ambas moléculas antisentido de ADN y ARN y ribozimas de la invención se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica para síntesis de moléculas de ARN. Estos incluyen técnicas para sintetizar químicamente oligonucleótidos tales como síntesis química con fosoramidita en fase sólida. Como alternativa, se pueden generar moléculas de ARN mediante transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN antisentido. Dichas secuencias de ADN se pueden incorporar a una amplia variedad de vectores con promotores adecuados de ARN polimerasa tales como T7 o SP6. Como alternativa, se pueden introducir en líneas celulares, células o tejidos, construcciones antisentido de ADNc que sintetizan ARN antisentido de modo constitutivo o de modo inducible.

El diseño de moléculas de ARNip es conocido en la técnica y puede ser proporcionado por proveedores (por ejemplo, Applied Biosystem/Ambion, Austin, Texas). Empezando con el codón de partida AUG de la transcripción, se puede empezar escaneando respecto a la secuencia de dinucleótido AA. Cada AA y los 19 nucleótidos 3' adyacentes se pueden identificar como sitios potenciales de diana de ARNip. Esta estrategia para elegir sitios de

diana de ARNip se basa en la observación por Elbashir y col., (2001, EMBO J 20:6877-6888) de que los ARNip con dinucleótidos UU que sobresalen en 3' son los más eficaces. Esto es también compatible con usar ARN pol III para transcribir ARNip de horquilla porque ARN pol III termina la transcripción en las extensiones 4-6 nucleótido poli(T) creando moléculas de ARN con una cola corta poli(U). En algunas realizaciones, la selección de la secuencia diana de ARNip se determina de un modo puramente empírico, siempre que la secuencia diana empiece con GG y no comparta homología de secuencia significativa con otros genes, según se analiza mediante la búsqueda BLAST. Como alternativa, cualquier sitio accesible en ARN endógeno puede ser considerado diana para degradación por el método de oligodesoxirribonucleótido/RNasa H sintética (Lee, N.S. y col., (2002) Nature Biotechnology 20: 500-505). Cualquier sitio accesible identificado de esta manera se usa entonces como secuencia de inserción en las construcciones de ARNip impulsado por promotor U6. Típicamente, la cassette de expresión de ARNip tiene una longitud de tronco de 19 nucleótidos. También pueden ser útiles en el silenciamiento de genes troncos de ARNip que oscilan desde 21 nucleótidos de largo hasta 25-29 nucleótidos de largo.

Se pueden modificar moléculas de ADN para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a ellas, la adición de secuencias de terminación de los extremos 5' y/o 3' de la molécula o del uso de fosforotioato o 2' O-metilo en lugar de conexiones fosfodiesterasa dentro de la columna vertebral de la molécula. Otras modificaciones incluyen el uso de compuestos quiméricos antisentido. Se pueden formar compuestos quiméricos antisentido de la invención como estructuras de materiales compuestos de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos. Dichos compuestos han sido denominados en la técnica híbridos o gámperos. Patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de estructuras de híbridos de este tipo incluyen, pero no se limitan a ellas, las patentes de EE.UU. N.<sup>os</sup>: 5.700.922 y 6.277.603.

Los compuestos antisentido que se usan en conformidad con esta invención se pueden elaborar convenientemente y regularmente mediante una técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. El equipamiento para dicha síntesis se vende por diversos proveedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Cualquier otro medio conocido en la técnica para dicha síntesis se puede emplear adicionalmente o como alternativa. Es muy conocido usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados.

Composiciones antisentido de la invención incluyen oligonucleótidos formados de homopirimidinas que pueden reconocer tramos locales de homopurinas de la doble hélice de ADN y se unen a ellos en el surco principal para formar una hélice triple. Véase: Helen, C y Toulme, J J. Specific regulation of gene expression by antisense, sense, and antigene nucleic acids. Biochem. Biophys Acta, 1049: 99-125, 1990. La formación de la hélice triple podría interrumpir la capacidad del gen específico para emprender la transcripción por ARN polimerasa. Se ha observado formación de hélice triple usando oligonucleótidos específicos myc. Véase Cooney, M. y col., Science 241: 456-459.

Las secuencias antisentido de ADN o ARN se pueden suministrar a las células. Se han desarrollado varias modificaciones químicas para prolongar la estabilidad y mejorar la función de estas moléculas sin interferir en su capacidad para reconocer secuencias específicas. Estas modificaciones incluyen aumentar su resistencia a la degradación por DNasas, incluyendo fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforotioatos, alfa-anómeros, aumentar su afinidad hacia los compañeros de unión mediante enlace covalente a diversos agentes de intercalación tales como psoralenos y aumentar la captación por células mediante conjugación con diversos grupos que incluyen polisilina. Estas moléculas reconocen secuencias específicas codificadas en ARNm y su hibridación previene la translación y aumenta la degradación de estos mensajes.

Composiciones antisentido que incluyen oligonucleótidos, derivados y análogos de los mismos, protocolos de conjugación y estrategias antisentido para inhibición de transcripción y translación se describen generalmente en: Antisense Research Applications, Crooke, S. y B. Lebleu, eds. CRC Press, Inc. Boca Raton Fla. 1993; Nucleic Acids in Chemistry and Biology Blackburn, G. y M. J. Gait, eds. IRL Press at Oxford University Press, Inc. Nueva York 1990; y Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach Eckstein, F. ed., IRL Press at Oxford University Press, Inc. Nueva York 1991.

#### Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona isoformas específicas de cáncer de moduladores de transcripción, proteínas de fusión, anticuerpos y polinucleótidos que se incorporan en composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas comprenden uno o más compuestos de este tipo y opcionalmente, un vehículo aceptable fisiológicamente. Las vacunas pueden comprender uno o más compuestos de este tipo y un coadyuvante que sirva como potenciador no específico de la respuesta inmunitaria. El coadyuvante puede ser cualquier sustancia que potencie una respuesta inmunitaria a un antígeno exógeno. Ejemplos de coadyuvantes incluyen coadyuvantes convencionales, microesferas biodegradables (por ejemplo galactida poliláctica), oligonucleótidos estimuladores y liposomas (dentro de los que se incorpora el compuesto; véase por ejemplo, Fullerton, patente de EE.UU. N.º: 4.235.877). La preparación de vacuna se describe generalmente, por ejemplo, en M.F.Powell y M.J. Newman, eds., "Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)", Plenum Press (NY, 1995). Las composiciones farmacéuticas y vacunas dentro del alcance de la presente invención también pueden contener otros compuestos que pueden ser biológicamente activos o inactivos. Por ejemplo, pueden estar presentes una o más porciones inmunogénicas u otros antígenos de tumor,

tanto si se incorporan en un polipéptido de fusión o como un compuesto separado, dentro de la composición o vacuna.

5 Una composición farmacéutica puede contener ADN que codifica uno o más de los péptidos que se han descrito anteriormente, de manera que el péptido se genera in situ. Como se ha apuntado anteriormente, el ADN puede estar presente en cualquiera de los sistemas de suministro conocidos por los expertos ordinarios en la técnica, que incluyen sistemas de expresión de ácido nucleico, sistemas de expresión virales y de bacterias. Numerosas técnicas de suministro de genes son muy conocidas en el sector, tales como las que se describen por Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15: 143-198, 1998 y referencias que se citan en el documento. Los sistemas apropiados de expresión de ácido nucleico contienen las secuencias de ADN necesarias para expresión en el paciente (tales como un promotor adecuado y señal de terminación). Sistemas de suministro bacteriano implican la administración de una bacteria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*) que expresa una porción inmunogénica de un polipéptido sobre su superficie celular o segrega dicho epítipo.

15 En una realización preferida, se puede introducir el ADN usando un sistema de expresión viral (por ejemplo vaccinia u otros virus pox, retrovirus, o adenovirus), que pueden implicar el uso de un virus componente de replicación no patógeno (defectuoso). Se describen sistemas adecuados, por ejemplo, en Fisher-Hoch y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 317-321, 1989; Flexner y col., Ann. N. Y. Acad. Sci. 569: 86-103, 1989; Flexner y col., Vaccine 8: 17-21, 1990; Patentes de los EE.UU. N.<sup>os</sup>: 4.603.112, 4.769.330 y 5.017.487; documento WO 89/01973; Patente de los EE.UU. N.<sup>o</sup>: 4.777.127; documento GB 2.200.651; documento EP 0.345.242; documento WO 91/02805; Berkner-Biotechniques 6: 616-627, 1988; Rosenfeld y col., Science 252: 431-434, 1991; Kolls y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 215-219, 1994; Kass-Eisler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 11498-11502, 1993; Guzmán y col., Circulation 88: 2838-2848, 1993; y Guzmán y col., Cir. Res. 73: 1202-1207, 1993. Las técnicas para incorporar ADN en dichos sistemas de expresión son muy conocidas por los expertos ordinarios en el sector. El ADN puede estar "desnudo" como se describe, por ejemplo en Ulmer y col., Science 259: 1745-1749, 1993 y se ha revisado por Cohen, Science 259: 1691-1692, 1993. La captación de ADN desnudo se puede aumentar revistiendo ADN sobre gránulos biodegradables, que se transportan eficazmente a las células.

30 Aun cuando en las composiciones farmacéuticas de esta invención se puede emplear cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos ordinarios en la técnica, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Se pueden formular composiciones de la presente invención para cualquier manera apropiada de administración, incluyendo por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intravenosa intracraneal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica o intramuscular. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo comprende preferiblemente agua, disolución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, se puede emplear cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. También se pueden emplear microesferas biodegradables (por ejemplo polilactato poliglicolato) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de esta invención. Se describen microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en los patentes de EE.UU. N.<sup>os</sup>: 4.897.268 y 5.075.109.

40 Además, el vehículo puede contener otros excipientes aceptables farmacológicamente para modificar o mantener el pH, osmolaridad, viscosidad, limpidez, color, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución, u olor de la formulación. De modo similar, el vehículo todavía puede contener otros excipientes aceptables farmacológicamente para modificar o mantener la estabilidad, velocidad de disolución, liberación, o absorción o penetración a través de la barrera hemato-encefálica de la molécula que se suministra. Dichos excipientes son aquellas sustancias que se emplean habitualmente y regularmente para formular dosificaciones para administración parenteral en forma tanto de dosis unitaria como multidosis o para infusión directa en el CSF mediante infusión continua o periódica desde una bomba implantada.

50 Dichas composiciones también pueden comprender tampones (por ejemplo disolución salina tamponada neutra o disolución salina tamponada con fosfato), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, coadyuvantes (por ejemplo hidróxido de aluminio) y/o conservantes. Como alternativa, las composiciones de la presente invención se pueden formular como liofilizado. Los compuestos también pueden estar encapsulados dentro de liposomas usando tecnología muy conocida.

60 Las composiciones que se describen en este documento se pueden administrar como parte de una formulación de liberación sostenida (esto es, una formulación tal que una cápsula o esponja efectúa la liberación del compuesto después de la administración). Dichas formulaciones se pueden preparar generalmente usando tecnología muy conocida y se pueden administrar, por ejemplo, mediante implantación oral, rectal, o subcutánea, o mediante implantación en el sitio de la diana deseada, tal como un sitio de escisión quirúrgica de un tumor. Las formulaciones de liberación sostenida pueden contener un péptido, polinucleótido o anticuerpo disperso en una matriz de vehículo y/o contenido dentro de un reservorio rodeado por una membrana que controle el caudal. Los vehículos para uso dentro de dichas formulaciones son biocompatibles y también pueden ser biodegradables; preferiblemente la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación de componente activo. La cantidad de compuesto activo contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implantación, del

caudal y duración esperada de la liberación y de la naturaleza de la enfermedad que se ha de tratar o prevenir.

Métodos terapéuticos y profilácticos

5 El tratamiento incluye profilaxis y terapia. Se puede conseguir profilaxis o terapia mediante inyección sencilla directa en un punto sencillo en el tiempo o múltiples puntos en el tiempo para sitios sencillos o múltiples. La administración también puede ser casi simultánea para sitios múltiples. Los pacientes o sujetos incluyen mamíferos, tales como seres humanos y animales bovinos, equinos, caninos, felinos, porcinos y ovinos. El sujeto es preferiblemente un ser humano.

10 Se puede diagnosticar un cáncer usando criterios generalmente aceptados en la técnica, que incluyen la presencia de un tumor maligno. Se pueden administrar composiciones farmacéuticas y vacunas tanto antes como después de la eliminación quirúrgica de tumores primarios y/o de tratamiento tal como administración de radioterapia o fármacos quimioterápicos convencionales.

15 Los cánceres que se han de tratar incluyen, pero no se limitan a ellos, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón (carcinoma de células pequeñas y no pequeñas), hepatoma (cáncer de hígado primario), cáncer pancreático, cáncer de próstata, tumores cerebrales que incluyen glioblastoma, astrocitoma y neuroblastoma, sarcomas, que incluyen condrosarcoma, cáncer de mama, cáncer ovárico y teratocarcinoma.

20 Se pueden suministrar a las células péptidos y fármacos a base de ácido nucleico (por ejemplo ARNs antisentido, ARNip, ARNm) por vía de medios químicos, medios biológicos, péptidos vehículo, vectores, o sistemas físicos de suministro. Medios químicos representativos incluyen, pero no se limitan a ellas, sustancias químicas específicas, que incluyen polímeros catiónicos tales como polietilenimina (PEI) y lípidos catiónicos. Un ejemplo de un medio biológico de suministro es el de los péptidos de penetración en la célula (CPP). Un péptido vehículo ejemplar es transportado. Los vectores incluyen plásmidos y virus, o células. Sistemas físicos de suministro representativos incluyen, pero no se limitan a ellos, sistemas de base eléctrica y aquellos que usan fuerza mecánica, tales como cañones de genes.

25 30 Las isoformas de la invención pueden ser consideradas dianas como miembros de complejos de proteínas o como proteínas singulares mediante interacción específica con péptidos que reconocen solamente a estas isoformas. La actividad de un péptido en la neutralización de la actividad de la isoforma también se puede detectar usando métodos proteómicos convencionales (por ejemplo, inmunoprecipitación, que incluye inmunoprecipitación con cromatina (ChIP), análisis reportero, inmunodetección usando anticuerpos específicos), o monitorizando la actividad celular.

35 Dentro de ciertas realizaciones, se puede emplear inmunoterapia, tal como inmunoterapia activa, en la que el tratamiento tiene por fundamento la estimulación *in vivo* del sistema inmunitario endógeno del hospedador para que reaccione frente a tumores o células infectadas con la administración de agentes que modifican la respuesta inmunitaria (tales como los péptidos y polinucleótidos descritos en este documento).

40 Dentro de otras realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia pasiva, en la que el tratamiento implica el suministro de agentes con reactividad inmuno-tumoral establecida (tales como células efectoras o anticuerpos) que pueden mediar directa o indirectamente en los efectos antitumorales y que no dependen necesariamente de un sistema inmunitario intacto del hospedador. Ejemplos de células efectoras incluyen células T según se ha discutido anteriormente, linfocitos T (tales como linfocitos T citotóxicos CD8+ y linfocitos de infiltración tumoral coadyuvantes CD4+ T-), células asesinas (tales como células asesinas naturales y células asesinas activadas por linfocina), células B y células que presentan antígeno (tales como células dendríticas y macrófagos) que expresan un péptido proporcionado en este documento. En una realización preferida, se modifican células dendríticas *in vitro* para que presenten el péptido y estas APC modificadas se administran al sujeto. Los receptores de células T y receptores de anticuerpos específicos para los péptidos citados en este documento se pueden clonar, expresar y transferir a otros vectores o células efectoras para inmunoterapia adoptiva. Los péptidos que se proporcionan en este documento también se pueden usar para generar anticuerpos o anticuerpos anti-idiotípicos (según se describe anteriormente y en la patente de EE.UU. N.º: 4.918.164) para inmunoterapia pasiva.

55 Administración y dosificación

60 Las composiciones se administran de cualquier manera adecuada, a menudo con vehículos aceptables farmacéuticamente. Hay disponibles métodos adecuados para administrar células en el contexto de la presente invención a un sujeto y aunque se puede usar más de una ruta para administrar una composición celular particular, a menudo una ruta particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra ruta.

65 La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, deberá ser suficiente para que se efectúe una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente en un tiempo, o para se inhiba el progreso de la enfermedad. Así, la composición se administra a un sujeto en una cantidad suficiente para aliviar, reducir y curar o al menos detener parcialmente los síntomas y/o complicaciones de la enfermedad y/o para hacer explícita una

respuesta inmunitaria eficaz para los antígenos específicos. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéutica eficaz".

5 Las rutas y la frecuencia de administración de las composiciones que se describen en este documento, así como la dosificación, pueden variar de un individuo a otro y se pueden establecer fácilmente usando técnicas estándar. En general, las composiciones farmacéuticas y vacunas se pueden administrar, mediante inyección (por ejemplo, intracutánea, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea), intranasalmente (por ejemplo, mediante aspiración) u oralmente. Preferiblemente, se pueden administrar entre 1 y 10 dosis a lo largo de un período de 52 semanas. Preferiblemente se administran 6 dosis, a intervalos de 1 mes y se pueden dar periódicamente  
10 después de ello vacunaciones de recuerdo. Protocolos alternos pueden ser apropiados para pacientes individuales. En una realización, se administran 2 inyecciones intradérmicas de la composición con una separación de 10 días. En otra realización, se administra una dosis diaria o una vez cada 2 o 3 días a lo largo de un extenso período, de semanas o meses.

15 Una dosis adecuada es una cantidad de un compuesto que, cuando se administra según se describe anteriormente, es capaz de promover una respuesta antitumoral y está al menos 10-50 % por encima del nivel basal (esto es, sin tratar). Dicha respuesta se puede monitorizar, por ejemplo, midiendo la reducción del tamaño del tumor o del nivel de anticuerpos antitumorales en el paciente o por la generación dependiente de la vacuna de células efectoras citolíticas capaces de matar las células tumorales del paciente *in vitro*. Dichas terapias también deberían ser  
20 capaces de desencadenar una respuesta que conduzca a un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia sin enfermedad completa, parcial o más larga) en pacientes en comparación con los pacientes sin tratar. En general, para las composiciones farmacéuticas y vacunas que comprenden uno o más péptidos, la cantidad de cada péptido presente en una dosis oscila de aproximadamente 100 µg a 5 mg por kg de hospedador. Los volúmenes adecuados variarán con el tamaño del paciente pero estarán típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 ml.

En general, una dosis y un régimen de tratamiento adecuados proporcionan el o los compuestos activos en una cantidad suficiente para proporcionar beneficio terapéutico y/o profiláctico. Dicha respuesta se puede monitorizar para establecer un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia sin enfermedad completa, parcial o más larga) en pacientes tratados en comparación con los pacientes sin tratar. Los aumentos en las respuestas inmunitarias preexistentes a una proteína tumoral generalmente se correlacionan con un resultado clínico mejorado. Dichas respuestas inmunitarias se pueden evaluar generalmente usando análisis estándar de proliferación, citotoxicidad o citocina, que se pueden llevar a cabo usando muestras obtenidas de un  
30 paciente antes y después del tratamiento.

### 35 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

La invención proporciona un método para detectar cáncer en un tejido que comprende poner en contacto el tejido con una molécula que reconoce y se une a un CSTC o isoforma específica de cáncer de un modulador de transcripción (o TCC) descrito en este documento. La molécula puede ser, por ejemplo, un péptido de diana de  
40 CSTC, un anticuerpo que se dirige contra un CSTC o isoforma específica de cáncer de un modulador de transcripción o una sonda de oligonucleótido o molécula antisentido dirigida contra una molécula específica de cáncer.

45 El tejido puede ser de un mamífero, tal como tejido de un ser humano, de bovino, equino, canino, felino, porcino u ovino. El tejido es preferiblemente humano. El tejido puede comprender un espécimen de tumor, espécimen de tejido, espécimen de fluido corporal, que incluye sangre, fluido ductal, saliva, orina, fluido cerebroespinal, u otro espécimen adecuado.

50 En una realización, el método comprende el uso de un análisis tipo ELISA. En otra realización, el método comprende el uso de PCR cuantitativa y otras evaluaciones del nivel de isoforma presente en el tejido. En algunas realizaciones el análisis hace uso de un espécimen histológico o preparación de cultivo. Los expertos en la técnica apreciarán variaciones adicionales adecuadas para el método de detección de cáncer en tejido a través de la detección de una molécula específica de cáncer en un espécimen. La detección puede ser detección directa de la forma de proteína de las isoformas específicas de cáncer de co-reguladores, o por detección de ARNm. Para ARNm se usan típicamente técnicas basadas en RT-PCR, pero también se puede detectar ARN mediante análisis de prueba de  
55 bandas de Northern, análisis de protección de RNasa, transferencia por puntos, hibridación in situ, análisis run-on y similares. Para análisis basados en proteínas, se usan típicamente anticuerpos específicos para análisis inmunocitoquímico-histológico, análisis por inmunoprecipitación, análisis ChIP. Otra opción es monitorizar la actividad proteínica, usando análisis basado en células. En una realización, el análisis comprende determinar la desaparición de la función relevante de la proteína. Por ejemplo, ciertas isoformas de co-regulador actúan tras la supervivencia de células cancerosas. El bloqueo de su actividad podría hacer que las células cancerosas dejaran de proliferar e inducir la muerte celular programada.

65 Este método también se puede usar para monitorizar los niveles de la molécula específica de cáncer en tejido de un paciente que está sometido a tratamiento de cáncer. Se puede determinar la conveniencia de un régimen

terapéutico de diana de CSTC para tratamiento inicial o continuado monitorizando dichos niveles usando este método.

5 En algunas realizaciones, se pueden etiquetar el péptido y/o el ácido nucleico, según se desee para la generación de imágenes en tiempo real *in vivo* u otros análisis en los que una etiqueta detectable facilita la identificación de la unión. El péptido o los ácidos nucleicos interfieren con la síntesis o actividad de la isoforma de co-regulador y esto se puede monitorizar mediante técnicas convencionales de identificación de ARNm o proteína haciendo innecesario el uso de una etiqueta detectable.

10 La invención proporciona adicionalmente un método para identificar una molécula que inhibe la proliferación de células cancerosas. El método comprende poner en contacto una molécula candidata con un CSTC y determinar si la molécula candidata interrumpe la actividad biológica del CSTC. La interrupción de la actividad biológica del CSTC es indicativa de una molécula que inhibe la proliferación de células cancerosas. Moléculas representativas incluyen proteínas, péptidos, aptámeros y nucleótidos.

15 KITS

También están dentro del alcance de esta invención los kits para uso en las aplicaciones diagnósticas y terapéuticas que se describen en este documento. Dichos kits pueden comprender un vehículo, envase o recipiente que está compartimentado para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados que se han de usar en el método. Por ejemplo, los recipientes pueden comprender una sonda que está o puede estar etiquetada detectablemente. La sonda puede ser un polipéptido o polinucleótido específico para una molécula específica de cáncer de la invención. El kit también puede incluir recipientes que contienen nucleótidos para amplificación de una secuencia diana de ácido nucleico y/o un recipiente que comprende un medio reportero, tal como una proteína que se une a biotina, por ejemplo avidina o estreptavidina, unida a una etiqueta detectable, por ejemplo, una etiqueta enzimática, fluorescente o de radioisótopo. El kit puede incluir toda o parte de una secuencia de aminoácidos de las secuencias que se describen en este documento, o una molécula de ácido nucleico que codifica dichas secuencias de aminoácidos.

30 El kit de la invención comprenderá típicamente el recipiente anteriormente descrito y uno o más recipientes distintos que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas, e inserciones en el envase con instrucciones de uso. Además, se puede proporcionar una etiqueta en el recipiente para indicar que la composición se usa para una aplicación específica terapéutica o no terapéutica y también puede indicar recomendaciones para uso tanto *in vivo* como *in vitro*, tales como las anteriormente descritas. Las recomendaciones y/u otra información también se pueden incluir en una inserción que se incluye con el kit.

Ejemplos

40 Ejemplo 1. Aislamiento y secuenciación de ARNm que codifica isoformas de componentes de TCC.

Identificación de isoformas de co-reguladores transcripcionales en células de melanoma

45 Se aisló ARN desde líneas celulares de cáncer humano usando el KIT de aislamiento de ARN (Qiagen). Se usó RT-PCR identificando isoformas de co-reguladores.

50 Se sintetizó la primera hebra de ADNc con transcriptasa reversa (superscript II, Life Technologies Inc.,) usando 5-10 µg de ARNm de diferentes líneas celulares como plantilla. Se realizaron reacciones PCR en el volumen de 25 µl que contenía un décimo de la reacción RT como plantilla y kit GC-Rich PCR System o Expand.™ Long Distance PCR System (Roche) según las instrucciones del fabricante. Se secuenciaron todos los productos PCR amplificados y se analizaron las secuencias identificando nuevas isoformas de proteínas de componentes de TCC.

Tabla 1: Secuencias de proteínas de isoformas identificadas de componentes de TCC

55 GTF: 51 isoformas

TAF: 30 isoformas

60 SWI/SNF: 37 isoformas

MED: 80 isoformas

Co-activadores/Co-represores: 6 isoformas

65 Se proporcionan detalles completos de la Tabla 1 en un documento de texto separado que se remite con el presente.

Ejemplos 2. Identificación de isoformas en complejos transcripcionales: Análisis MudPIT.

5 Se prepararon extractos nucleares según el método de Dignam y col. (1983) a partir de células HeLa parenterales y seis líneas celulares HeLa que expresan establemente subunidades mamíferas Mediator humanas Nut2 (MED 10) (Malik y col., 2000), de ratón Med25 (MED 9) (Tomomori-Sato y col., 2003), Intersex humano (MED29) (Sato y col., 2003a), LCMR1 humano (MED19) (Sato y col., 2003a), AK007855 humano (MED28), o CRSP70 humano (MED26), todos con marcadores de epítipo FLAG N-terminal. Se sometieron extractos nucleares a cromatografía de inmutafinidad de agarosa anti-FLAG que se realiza esencialmente según se describe para la purificación del complejo Mediator TRAP/SMCC desde células HeLa que expresan FLAG-Nut2 (Malik y col., 2000).

Cromatografía con fosfocelulosa

15 Se prepararon extractos nucleares de células HeLa (30 ml) según el método de Dignam y col., (1983) y se dializaron frente a tampón HEG [HEPES-NaOH 20 mM (pH 7,6), EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM y glicerol al 10 % (v/v), benzamidina 1 mM, PMSF 0,25 mM, aprotinina 2 g/mt] hasta una conductividad equivalente a la de HEG que contiene KCl 0,1 M.

20 Tras la centrifugación durante 30 minutos a 40.000 rpm con un rotor Ti-45, se aplicó el líquido sobrenadante (130 mg de proteína) a dos volúmenes por hora de columna de relleno a una columna de fosfocelulosa (10 mg de proteína por ml de volumen de lecho de columna de relleno) equilibrada en HEG que contenía KCl 0,9 M. La columna se lavó con el mismo caudal con HEG que contenía KCl 0,1 M y se eluyó escalonadamente con HEG que contenía KCl 0,3, 0,5 y 1,0 M. Se recogieron fracciones de un quinto del volumen de la columna. La proteína eluida de la columna con KCl 0,5 M y KCl 1,0 M se sometió a inmunopurificación FLAG según lo anteriormente descrito.

25 Se realizó la identificación de subunidades Mediatos y proteínas asociados a Mediator usando una modificación del procedimiento MudPIT descrito por Washburn y col., (2001). Para cada análisis, se usaron partes alícuotas de 60 µl de eluatos de agarosa anti-FLAG.

Resultados

30 El análisis MudPIT identificó las siguientes isoformas de componentes de complejos MED a partir de complejos MED inmunoprecipitados:

**MED1.3 (SEQ ID NO: 4).**

**MKAQGETEESEKLSKMSSLLERLHAKFNQNRPWSETIKLVRQVMEKRVMSSGGH  
QHLVSCLETLQKALKVTSLPAMTDRLESIAEQNGLGSHLSASGTECYITSDMFYVEV**

QLDPAGQLCDVKVAHHGENPVSCPELVQQLREKNFDEFKHLKGLVNLNLPDGN  
KLKTKMYLALQSLEQDLSKMAIMYWKATNAGPLDKILHGSVGYLTPRSGGHLMLNK  
YYVSPDLLDDKTASPIILHENVSRSLGMNASVTIEGTSAVYKLPAPLIMGSHVPD  
NKWTSPSFSSITSANSVDLPACFFLKFPQPIPVSRFAVQKLQNCCTGIPLFETQPTYAPL  
YELITQFELSKDPDPIPLNHNMRFYAALPGQQHCYFLNKDAPLPDGRSLQGTLSKI  
TFQHPGRVPLILNLRHQVAYNTLIGSCVKRRTILKEDSPGLLQFEVCPLSESFRFSVSF  
QHPVNDSLVCCVMDVQDSTHVSCLYKGLSDALICTDDFIAKVVQRCMSIPVTMRAI  
RRKAETIQADTPALSIAETVEDMVKKNLPPASSPGERGVYHWLESDPSSSHAATC  
LFDGRQHQEPPDAHEPS\*

35

MED24.1 (SEQ ID NO: 5).

MKVVNLKQAILQAWKERWSDYQWAINMKKFFPKGATWDILNLADALLEQAMIGPSP  
 NPLILSYLKYAISSQMVSYSVLTAKSKFDDFSRDLQVQALLDIMDMFCDRLSCHGKA  
 EECIGLCRALLSALHWLLRCTAASAERLREGLEAGTPAAGEKQLAMCLQRLEKTL  
 STKNRALLHIAKLEEASLHTSQGLGQGGTRANQPTASWTAIEHSLLKLGEILANLSN  
 PQLRSQAEQCGTLIRSIPTMLSVHAEQMHKTGFPTVHAVILLEGTMNLTGETQSLVE  
 QLTMVKRMQHIPTPLFVLEIWKACFVGLIESPEGTEELKWTAFITFLKIPQVLVKKKY  
 SHGDKDFTEDEVNCAFELLLKLTPLLDKADQRCNCDCNLFLLQECGKQGLLSEASVN  
 NLMKRKADREHAPQKSGENANIQPNILRAEPTVTNILKTMDADHSKSPEGLL  
 GVLGHMLSGKSLDLLAAAAATGKLSFARKFINLNEFTTYGSEESTKPASVRALLF  
 DISFLMLCHVAQTYGSEVILSESRTGAEVPPFETWMQTCMPEEGKILNPDHPCFRP  
 DSTKVESLVALLNNSSEMMLVQMKWHEACLSISAAILEILNAWENGVAFESIQTID  
 NIKGKVCSLAVCAVAWLVAHVRMLGLDEREKSLQMIQRLAGPLFSENTLQFYNERV  
 VIMNSILERMCADVLQQTATQIKFPSTGVDTPYWNLLPPKRPIKEVLTDFIAKVEK  
 GWVDSRSIHIFDTHLMGGVYWFNLIKELLKETRKEHTLRVELLYSIFCLDMQQ  
 VTLVLLGHILPGLLTDSSKWHSLMDPPGTALAKLAVWCALSSYSSHKQASTRQKK  
 RHREDIEDYISLPLDDVQPSKLMRLLSSNEDDANILSSPTDRSMSSLSASQLHTV  
 NMRDPLNRVLANLFLLISSILGSRTAGPHTQFVQWFMEECVDCLEQGGGRGSVLQF  
 MPFTTVSELVKVSAMSSPKVVLAITDLSLPLGRQVAAKAIAAL

Ejemplo 3. Identificación de isoformas en complejos transcripcionales: fraccionamiento bioquímico.

5 Materiales y métodos

Preparación de extractos nucleares de células de mamífero

Recoger células de cultivos monocapa.

- 10 1. Retirar el medio de cultivo de los cultivos monocapa confluyentes. Lavar las células pipeteando suficiente PBS para cubrir las, sacudiendo suavemente y vertiendo fuera el PBS. Raspar las células en PBS nuevo y reunir las en un tubo cónico graduado de centrifuga.
- 15 2. Aglomerar las células centrifugando 10 min a 3000 rpm.
3. Decantar los líquidos sobrenadantes y descartarlos. Usando las graduaciones del tubo, medir el pcv.
- 20 4. Resuspender rápidamente los aglomerados de células en un volumen de tampón isotónico de 5 veces el pcv.
- Centrifugar las células 5 min a 3000 rpm y descartar el líquido sobrenadante. Hacer esta etapa rápidamente porque la proteína puede escapar de la célula en este punto y ser descartada con el líquido sobrenadante. Esta etapa retira sal de la disolución de PBS de modo que se puede producir hinchamiento eficaz en la siguiente etapa; sin embargo, algo de hinchamiento se producirá durante esta etapa.
- 25 5. Resuspender las células compactadas en tampón hipotónico hasta un volumen final de 3 veces el pcv original (etapa 3) y dejar que se hinche sobre hielo 10 min. Por ejemplo, si un pcv original de 10 ml se ha hinchado hasta 20 ml en la etapa 4, solo se requieren 10 ml de tampón adicional en esta etapa. Las células se deberían hinchar al menos al doble.
- 30 6. Transferir las células a una jeringuilla de insulina. Homogeneizar con diez sacudidas arriba y abajo. Realizar la homogeneización lentamente, especialmente en las sacudidas hacia abajo.
- 35 7. Transferir las células a tubos de centrifuga. Recoger los núcleos centrifugando 15 min a 4000 rpm (3300 g). Retirar el líquido sobrenadante y guardarlo para preparación de extracto citoplásmico S-100.

Extracción de complejos de cromatina

## ES 2 424 976 T3

5 8. Usando las graduaciones de los tubos, medir el volumen nuclear compactado (pnv) de la etapa 7. Resuspender los núcleos en un volumen de tampón bajo en sal igual a 12 pnv. La resuspensión de los núcleos con un pequeño volumen de tampón bajo permite mezclado rápido a fondo de los núcleos durante la adición del tampón alto en sal (etapa 9).

10 9. Añadir gota a gota, al tiempo que se agita suavemente, un volumen de tampón alto en sal igual a 12 pnv (de etapa 8). El tampón alto en sal tiene que ser añadido gota a gota con mezclado frecuente o continuo. Si se añade demasiado rápidamente, la concentración local de sal puede llegar a ser alta y algunos núcleos se lisarán. La concentración final de cloruro de potasio debería ser 300 mM.

10. Dejar que se extraigan los núcleos durante 30 min con mezclado continuo suave. El mezclado se puede hacer usando agitación muy suave sobre un agitador magnético o balanceando en un aparato de balanceo.

15 11. Aglomerar los núcleos extraídos centrifugando 30 min a 14.500 rpm (25,000 g). Expulsar el líquido sobrenadante resultante. Esto es el extracto nuclear.

### Dializar y almacenar el extracto.

20 12. Colocar el extracto nuclear en tubería de diálisis. Dializar contra 50 vol de tampón de diálisis hasta que el extracto alcance KCl 100 mM.

25 13. Retirar el extracto de la bolsa de diálisis. Centrifugar el extracto 20 min a 14.500 rpm. Descartar el aglomerado. Esto retirará la proteína y el ácido nucleico que precipita cuando la concentración de cloruro de potasio se rebaja durante la diálisis.

14. Determinar la concentración de proteína del líquido sobrenadante. Colocar partes alícuotas en tubos si se desea y congelarlas rápidamente sumergiéndolas en nitrógeno líquido. Almacenar los extractos a 80 °C.

### 30 Tampón de diálisis

HEPES 20 mM, pH 7,9 a 4 °C

35 glicerol 20 %

KCl 100 mM

EDTA 0,2 mM

40 PMSF\* 0,2 mM

DTT\* 0,5 mM

### 45 Tampón alto en sal

HEPES 20 mM, pH 7,9 a 4 °C

glicerol 25 %

50 MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM

KCl 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 o 1,6 M

EDTA 0,2 mM

55 PMSF\* 0,2 mM

DTT\* 0,5 mM

60 \* Añadir los ingredientes inmediatamente antes de uso (véase nota introductora para reactivos y disoluciones)

### Tampón hipotónico

65 HEPES 10 mM, pH 7,9 a 4 °C

MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM

## ES 2 424 976 T3

KCl 10 mM

PMSF\* 0,2 mM

5

DTT\* 0,5 mM

Tampón bajo en sal

10 Preparar tampón alto en sal, poniendo KCl 0,02 M en el lugar de KCl 1,2 M

\* Añadir los ingredientes inmediatamente antes de uso (véase nota introductora para reactivos y disoluciones)

Fraccionamiento de complejos de cromatina

15

Preciclado de resina P11

1. Agitar la resina en 25 volúmenes de NaOH 0,5 M durante 5 minutos.

20

2. Lavar con mQ hasta que el pH del filtrado sea 11,0.

3. Agitar la resina en 25 volúmenes de HCl 0,5 M durante 5 minutos.

4. Lavar con mQ hasta que el pH del filtrado esté por encima de 3,0.

25

5. Transferir el PC preciclado inmediatamente a 20 volúmenes de disolución tampón concentrada 5x:

HEPES 100 mM, pH 7,9

30

glicerol 20 % v/v

DTT 2,5 mM

EDTA 1,0 mM

35

KCl 0,5 M

6. Valorar la suspensión al pH correcto

40

7. Decantar el líquido sobrenadante

8. Agitar en PC en 20 volúmenes del tampón de elución de partida

9. Dejar durante 3-4 minutos

45

10. Repetir el lavado hasta que el pH sea correcto y almacenar a +4 °C durante la semana.

Purificación del lote de complejos de transcripción

50

Para 25 mg de proteína es necesario un volumen de lecho de 1 ml de resina compactada.

11. Añadir resina de preciclado de calidad apropiada al extracto nuclear de células

12. Rotar aproximadamente 1 hora a +4 °C

55

13. Centrifugar 3 minutos a 2000 rpm a +4 °C

14. El líquido sobrenadante se hace fluir a través de la fracción, mantenerlo a -80 °C hasta análisis

60

15. Lavar la resina paso a paso aumentando la concentración de KCl de tampón de elución de 0,2 a 1,0 M, añadiendo 2 volúmenes de tampón a 1 volumen de lecho de PC. En cada etapa rotar la resina durante 30 minutos a +4 °C y hacerla bajar durante 3 minutos a 2000 rpm. Recoger las fracciones.

Tampón de elución

65

HEPES 20 mM, pH 7,9

glicerol 20 %

5 EDTA 0,2 mM

DTT 0,5 mM

1x PIC

10 KCl 0,2 M-1,0 M

#### Análisis de prueba de bandas de Western

15 Se realizó el análisis de prueba de bandas de Western según el protocolo publicado en Ali Sadra, Tomas Cinek and John B. Imboden. "Multiple Probing of an Immunoblot Membrane Using a Non-Block Technique: Advantages in Speed and Sensitivity." Analytical Biochemistry. 278, 2000. p. 235-237

20 En resumen, 15 µg de muestras de proteína se solubilizaron en tampón de muestra de SDS y se sometieron a electroforesis de gel de 10 % SDS-poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron entonces a membranas PVDF (Amersham) usando blotter Bio-Rat semiseco y tampón Towbin estándar (10 x concentrado (Tris 0,25 M y glicina 1,92 M en disolución acuosa)). Para análisis adicional se usó la técnica sin bloque, después de la transferencia de proteínas a la membrana PVDF, se secó al aire la membrana durante 15 min y se pasó por tres ciclos de hidratación con metanol-agua 50 %. La membrana coagulada se dejó entonces en metanol al 90 % durante 2 min y se dejó secar completamente en una incubadora durante 10 min a 37 °C. Después de que la membrana estuviera seca, se incubó con la disolución de anticuerpo primario (hecha en leche-TBS-T sin grasa al 3 %) toda la noche a +4 °C. La membrana se lavó entonces 3 veces con TBS-T durante 10 min por cada lavado, seguidos por incubación con la disolución de anticuerpo secundario (hecha en leche-TBS-T sin grasa al 3 %) durante 30 min a temperatura ambiente y con batido suave. Después de tres lavados de 20 min cada uno con TBS-T, se realizó la detección de ECL (Amersham) de las señales de las proteínas diana.

#### Anticuerpos:

Anticuerpos primarios:

35 • Baf57 (C-20) contra un epítipo dentro de la región interna de Baf57 humano, (Santa Cruz), dilución 1:500;

• P62/THIIH1 (ratón monoclonal, MAb 3C9,, amable regalo de J.M. Egly), dilución 1:10.000;

40 • Med-16/TRAP 95 (C-19) contra un epítipo dentro del término-C de TRAP 95 humano, dilución 1:500;

Anticuerpos secundarios: (anti-cabra para Baf57 y Med-16/TRAP 95, anti-ratón para p62/THIIH1), dilución 1:10.000.

#### Resultados

45 El fraccionamiento de extractos nucleares después de aplicar prueba de bandas de Western detectando isoformas de TCC puso de manifiesto claramente que hay presentes isoformas en los complejos de transcripción y se pueden fraccionar de modo parecido a las isoformas de tipo natural.

#### Complejos BAF

50 Se analizó el fraccionamiento de complejos BAF usando fosfocelulosa P11. El análisis de prueba de bandas de Western de fracciones BAF identifica isoformas y BAF57 de tipo natural en las mismas fracciones, lo que es una indicación de que hay presentes isoformas BAF57 en el complejo activo BAF57.

55 La Figura 1 muestra los resultados de análisis de complejos BAF desde células HeLa y de melanoma humano SK-Mel 28 y WM266-4. Partes alícuotas de extractos nucleares de células HeLa, SKMel28 y WM266-4 se cromatografiaron sobre columna de intercambio iónico que contenía PE11. Después de lavar abundantemente la columna con tampón que contenía KCl 0,1 M, se eluyeron las proteínas combinadas con tampón que contenía KCl 0,2 M (canales 2, 8 y 14), KCl 0,3 M (canales 3, 9 y 15) KCl 0,5 M (canales 4, 10 y 16), KCl 0,75 M (canales 5 y 11) y 60 KCl 1,0 M (canales 6 y 12). El "flujo de paso" inicial se representa en los canales 1, 7 y 13.

#### Complejo GTF

65 Se analizó el fraccionamiento de complejos GTF usando fosfocelulosa P11. El análisis de prueba de bandas de Western de la subunidad TFIIH de p62 identificó isoformas y p62 de tipo natural en las mismas fracciones, lo que es una indicación de que hay presentes isoformas de la subunidad TFIIH en el complejo activo.

La Figura 2 muestra los resultados de análisis de fraccionamiento de complejo GTF detectando p62 (subunidad TFIIH) usando detección de prueba de bandas de Western desde células HeLa y células de melanoma humano SK-Mel 28 y WM266-4. Partes alícuotas de extractos nucleares de células HeLa, SKMel28 y WM266-4 se cromatografiaron sobre columna de intercambio iónico PE11. Después de lavar abundantemente la columna con tampón que contenía KCl 0,1 M, se eluyeron las proteínas combinadas con tampón que contenía KCl 0,2 M (canales 2, 8 y 14), KCl 0,3 M (canales 3, 9 y 15) KCl 0,5 M (canales 4, 10 y 16), KCl 0,75 M (canales 5, 19 y 17) y KCl 1,0 M (canales 6, 12 y 18). El "flujo de paso" inicial se representa en los canales 1, 7 y 13.

#### 10 Complejo MED

Se analizó el fraccionamiento de complejo MED usando fosfocelulosa P11. El análisis de prueba de bandas de Western de la subunidad MED de MED 16 identificó isoformas y MED 16 de tipo natural en las mismas fracciones, lo que es una indicación de que hay presentes isoformas de la subunidad MED en el complejo activo.

15 La Figura 3 muestra resultados de evaluación las condiciones de purificación del complejo mediador detectando MED-16 en fracciones NER de células HeLa en comparación con células de melanoma SK-Mel 28. Partes alícuotas de extractos nucleares de células HeLa y SKMel28 se cromatografiaron sobre columna de intercambio iónico PE11. Después de lavar abundantemente la columna con tampón que contenía KCl 0,1 M, se eluyeron las proteínas combinadas con tampón que contenía KCl 0,2 M (canales 2 y 8), KCl 0,3 M (canales 3 y 9), KCl 0,5 M (canales 4 y 10), KCl 0,75 M (canales 5 y 11) y KCl 1,0 M (canales 6 y 12). El "flujo de paso" inicial se representa en los canales 1 y 7.

#### 25 Ejemplo 4. Unión de péptido BAF57p12 a isoforma de BAF57iso.

##### 25 Materiales y métodos

30 Purificación de proteína. Los autores de la presente han clonado y expresado BAF57, BAFiso, en vector de expresión pGEX-4T-1 (N-terminal GST) y han expresado tanto el tipo natural como la isoforma de BAF57.

Se indujo la expresión de proteínas 8 horas a 30°C con IPTG 1 mM. Después de la inducción se aglomeraron las células y se lavaron en tampón de extracción nativo:

35 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM (pH 7,3)

NaCl 140 mM

KCl 2,7 mM

40 Tritón X100 1 %

Mezcla inhibidora de proteasa (Rock Diagnostics, complete, número de cat.:11 836 145 001)

45 Purificación de proteína GST-Baf57 y GST-BAF57iso: Se lisaron células usando aplicación de ultrasonidos: 3x15 seg sobre hielo, dejando enfriar el lisado entre aplicaciones de ultrasonidos.

Se centrifugó el lisado 10 min a 11.000 x g retirando material insoluble. Se transfirió el líquido sobrenadante a un nuevo tubo.

50 Se añadieron 100 µl de suspensión al 50 % de glutatión sefarosa 4B (GE Healthcare) a cada líquido sobrenadante de lisado y se mezcló suavemente durante 5 min a TA.

Se añadieron 500 µl de tampón de extracción 1x sin Triton X100, se movieron en círculo brevemente y se centrifugaron durante 1 minuto sedimentando los gránulos de sefarosa.

55 Se descartaron los líquidos sobrenadantes y se repitió 2 veces el lavado teniendo un total de 3 lavados.

Se eluyó la proteína de fusión mediante adición de 30 µl de tampón de elución de glutatión (glutatión reducido 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) y se incubó durante 5 min a TA.

60 Se centrifugaron las disoluciones durante 5 min a máximas rpm y se transfirió el líquido sobrenadante a tubos limpios.

65 Se analizó la pureza de las proteínas usando SDS PAGE y prueba de bandas de Western, usando anticuerpos contra BAF57 que reconocen tanto el tipo natural como la isoforma de BAF57.

Estudios de unión. Se usaron proteínas GST-BAF57 y GST-BAF57iso extraídas y purificadas usando condiciones nativas realizando los estudios de unión.

5 Se usó péptido BAF57p12 etiquetado inicialmente con fluoresceína analizando su unión a GST-BAF57 y GST-BAF57iso unidas a Glutathione Sepharose o en disolución después de unión a Glutathione Sepharose. Ambos protocolos dieron resultados similares, el péptido BAF57p12 se une a BAF57iso con alta afinidad, pero también se une a BAF57, aunque la afinidad es menor (Fig. 4). Estos experimentos se hicieron usando péptidos que se habían sintetizado 1,5 años antes.

10 Unión de péptidos a proteínas unidas a matriz. Se incubaron proteínas unidas a matriz (10 µg/50 µl) con diferentes concentraciones de péptidos etiquetados (0,01 nM-10 µM) en tampón de unión (fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, espermidina 2 mM, DDT 0,3 mM, pH 7,9) durante 15 min a temperatura ambiente. Después de incubación, se lavó la matriz con un tampón de incubación 3 veces de 10 volúmenes. Se detectó la fluorescencia unida después de la liberación de proteína de la matriz usando glutatión reducido 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

15 Unión de péptidos a proteínas en disolución. Se mezclaron proteínas purificadas a concentración de 10 µg/100 µl con péptidos etiquetados (0,01 nM-10 µM) en tampón de unión (fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, espermidina 2 mM, DDT 0,3 mM, pH 7,9) durante 15 min a temperatura ambiente. Después de incubación se añadió un reactivo de captura (50 µl, Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare)) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Después de lavar (5 veces) con tampón de unión, se liberaron las proteínas unidas usando glutatión reducido 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

25 Análisis de resonancia de plasmón en superficie. Analizando la unión de BAF57p12 a proteínas purificadas GST-BAF57 y GST-BAF57iso los autores de la presente también usaron análisis de resonancia de plasmón en superficie usando el sistema Biacore 3000 de University of Helsinki (Finlandia). Con este sistema, las moléculas de interés (ligandos-proteínas GST-BAF57 y GST-BAF57iso) se inmovilizaron sobre una superficie de sensor y se pasaron entonces los compañeros de unión (analitos-péptido BAFp12) sobre la superficie en una fase móvil acuosa. La interacción entre ellos sobre la superficie del sensor se puede monitorizar posteriormente en tiempo real sin uso de etiquetas. Las proteínas GST-BAF57 y GST-BAF57iso se inmovilizaron por métodos de acoplamiento con aminas, según el manual de instrucciones de la placa del sensor CM5 de Biacore 3000, que utiliza un grupo amino primario de proteínas para unión covalente a la matriz. Estimando las interacciones proteína-péptido, se determinó la afinidad de la interacción (la constante del equilibrio de disociación (K<sub>D</sub>)) a partir del nivel de unión en el equilibrio como función de las concentraciones de muestra mediante el programa BIAevaluation versión 4.1 (Biacore, Inc.). El péptido BAFp12 se disolvió en tampón en circulación (tampón de unión) y se realizaron experimentos de unión a 25 °C en tampón en circulación con un caudal de 20 µl/min. Los resultados preliminares de análisis muestran que al unirse BAF57p12 a GST-BAFiso tiene un valor de K<sub>d</sub> de 5,5x10<sup>-7</sup> M y al unirse BAF57p12 a GST-BAF tiene un valor de K<sub>d</sub> de 3x10<sup>-4</sup> M. Estos resultados confirman los datos de los autores de la presente obtenidos usando péptidos etiquetados con fluoresceína.

40 Ejemplo 5 Expresión de isoformas en diversos cánceres.

Este ejemplo manifiesta la expresión de isoformas de componentes de complejo de factor de transcripción (TCC) en diversos tipos de cáncer. La expresión se determinó mediante análisis RT-PCR de muestras clínicas de cáncer así como de numerosas líneas celulares. El análisis RT-PCR semicuantitativo se siguió mediante análisis de secuencia de ADN de fragmentos de PCR. El análisis de tejidos normales y de líneas celulares no cancerosas no reveló expresión de estas isoformas, indicando que su expresión es específica de cáncer. La Tabla 2 a continuación enumera los tipos de cánceres mostrados expresando diversas isoformas en genes.

Tabla 2. Expresión de isoformas de componentes TCC en diferentes tipos de cánceres.

<u>Gen</u>	<u>Expresión de isoformas en cánceres</u>
MED24	melanoma, cáncer colorrectal, glioblastoma
MED1	melanoma, cáncer colorrectal, glioma, pulmón
MED4	melanoma, cáncer colorrectal, pulmón, glioma
MED12	melanoma, cáncer colorrectal, mama, glioma
MED13	pulmón, mama
MED14	ovárico, mama, hígado
MED15	condrosarcoma, próstata,
MED28	cáncer colorrectal, mama
MED30	cáncer colorrectal, mama, neuroblastoma, glioma

BAF57	melanoma, cáncer colorrectal, glioblastoma
BAF250	cáncer colorrectal, mama, neuroblastoma, glioma
BAF155	pulmón, mama, próstata
BAF170	pulmón, mama, próstata
BAF60	pulmón, mama, próstata
BAF53	cáncer colorrectal, mama
BAF47	glioma, neuroblastoma, próstata
TAF1	pulmón, hepatoma
TAF4	neuroblastoma, glioma, pancreático
TAF7L	mama, próstata

A partir de lo anterior se apreciará que, aunque se han descrito en este documento para ilustración realizaciones específicas de la invención, se pueden hacer diversas modificaciones sin desviarse del alcance de la invención. Por consiguiente, la invención no está limitada, salvo por las reivindicaciones que se adjuntan.

5

Listado de secuencias

<110> ONCOTX, INC.

10 <120> ISOFORMAS RELATIVAS AL CÁNCER DE COMPONENTES DE COMPLEJOS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN COMO BIOMARCADORES Y DIANAS DE FÁRMACOS

<130> ONC.2-WO-U2

<140>

<141>

15 <150> 60/941.747

<151> 4-6-2007

<150> 60/941.678

<151> 3-6-2007

<160> 207

<170> PatentIn version 3.3

20 <210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 1

**Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg**

**1**

**5**

<210> 2

<211> 7

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2

**Pro Pro Lys Lys Arg Lys Val**

35 **1**

**5**

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 3

**Pro Lys Lys Arg Lys Val**

45 **1**

**5**

<210> 100

<211> 2116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

ES 2 424 976 T3

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

ES 2 424 976 T3

Val Ser Phe Asn Pro Ala Lys Ile Ser Ser Asn Phe Ser Ser Ile Ile  
 100 105 110  
 Ala Glu Lys Leu Arg Cys Asn Thr Leu Pro Asp Thr Gly Arg Arg Lys  
 115 120 125  
 Pro Gln Val Asn Gln Lys Asp Asn Phe Trp Leu Val Thr Ala Arg Ser  
 130 135 140  
 Gln Ser Ala Ile Asn Thr Trp Phe Thr Asp Leu Ala Gly Thr Lys Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Gln Leu Ala Lys Lys Val Pro Ile Phe Ser Lys Lys Glu Glu  
 165 170 175  
 Val Phe Gly Tyr Leu Ala Lys Tyr Thr Val Pro Val Met Arg Ala Ala  
 180 185 190  
 Trp Leu Ile Lys Met Thr Cys Ala Tyr Tyr Ala Ala Ile Ser Glu Thr  
 195 200 205  
 Lys Val Lys Lys Arg His Val Asp Pro Phe Met Glu Trp Thr Gln Ile  
 210 215 220  
 Ile Thr Lys Tyr Leu Trp Glu Gln Leu Gln Lys Met Ala Glu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Arg Pro Gly Pro Ala Gly Ser Gly Gly Cys Gly Ser Thr Ile Gly Pro  
 245 250 255  
 Leu Pro His Asp Val Glu Val Ala Ile Arg Gln Trp Asp Tyr Thr Glu  
 260 265 270  
 Lys Leu Ala Met Phe Met Phe Gln Asp Gly Met Leu Asp Arg His Glu  
 275 280 285  
 Phe Leu Thr Trp Val Leu Glu Cys Phe Glu Lys Ile Arg Pro Gly Glu  
 290 295 300  
 Asp Glu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Arg Tyr Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Glu Phe Val Gln Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Arg Leu Ala Tyr Phe Cys  
 325 330 335  
 Thr Arg Arg Leu Ala Leu Gln Leu Asp Gly Val Ser Ser His Ser Ser  
 340 345 350  
 His Val Ile Ser Ala Gln Ser Thr Ser Thr Leu Pro Thr Thr Pro Ala  
 355 360 365

ES 2 424 976 T3

Pro Gln Pro Pro Thr Ser Ser Thr Pro Ser Thr Pro Phe Ser Asp Leu  
 370 375 380  
 Leu Met Cys Pro Gln His Arg Pro Leu Val Phe Gly Leu Ser Cys Ile  
 385 390 395 400  
 Leu Gln Thr Ile Leu Leu Cys Cys Pro Ser Ala Leu Val Trp His Tyr  
 405 410 415  
 Ser Leu Thr Asp Ser Arg Ile Lys Thr Gly Ser Pro Leu Asp His Leu  
 420 425 430  
 Pro Ile Ala Pro Ser Asn Leu Pro Met Pro Glu Gly Asn Ser Ala Phe  
 435 440 445  
 Thr Gln Gln Val Arg Ala Lys Leu Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Lys  
 450 455 460  
 Glu Arg Gly Gln Ala Val Glu Val Arg Trp Ser Phe Asp Lys Cys Gln  
 465 470 475 480  
 Glu Ala Thr Ala Gly Phe Thr Ile Gly Arg Val Leu His Thr Leu Glu  
 485 490 495  
 Val Leu Asp Ser His Ser Phe Glu Arg Ser Asp Phe Ser Asn Ser Leu  
 500 505 510  
 Asp Ser Leu Cys Asn Arg Ile Phe Gly Leu Gly Pro Ser Lys Asp Gly  
 515 520 525  
 His Glu Ile Ser Ser Asp Asp Ala Val Val Ser Leu Leu Cys Glu  
 530 535 540  
 Trp Ala Val Ser Cys Lys Arg Ser Gly Arg His Arg Ala Met Val Val  
 545 550 555 560  
 Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Gln Ala Glu Ile Glu Ala Glu Arg Cys  
 565 570 575  
 Gly Glu Ser Glu Ala Ala Asp Glu Lys Gly Ser Ile Ala Ser Gly Ser  
 580 585 590  
 Leu Ser Ala Pro Ser Ala Pro Ile Phe Gln Asp Val Leu Leu Gln Phe  
 595 600 605  
 Leu Asp Thr Gln Ala Pro Met Leu Thr Asp Pro Arg Ser Glu Ser Glu  
 610 615 620  
 Arg Val Glu Phe Phe Asn Leu Val Leu Leu Phe Cys Glu Leu Ile Arg  
 625 630 635 640

ES 2 424 976 T3

His Asp Val Phe Ser His Asn Met Tyr Thr Cys Thr Leu Ile Ser Arg  
645 650 655

Gly Asp Leu Ala Phe Gly Ala Pro Gly Pro Arg Pro Pro Ser Pro Phe  
660 665 670

Asp Asp Pro Ala Asp Asp Pro Glu His Lys Glu Ala Glu Gly Ser Ser  
675 680 685

Ser Ser Lys Leu Glu Asp Pro Gly Leu Ser Glu Ser Met Asp Ile Asp  
690 695 700

Pro Ser Ser Ser Val Leu Phe Glu Asp Met Glu Lys Pro Asp Phe Ser  
705 710 715 720

Leu Phe Ser Pro Thr Met Pro Cys Glu Gly Lys Gly Ser Pro Ser Pro  
725 730 735

Glu Lys Pro Asp Val Glu Lys Glu Val Lys Pro Pro Pro Lys Glu Lys  
740 745 750

Ile Glu Gly Thr Leu Gly Val Leu Tyr Asp Gln Pro Arg His Val Gln  
755 760 765

Tyr Ala Thr His Phe Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ser Cys Ser His Glu  
770 775 780

Cys Asn Gln Arg Leu Val Val Leu Phe Gly Val Gly Lys Gln Arg Asp  
785 790 800

Asp Ala Arg His Ala Ile Lys Lys Ile Thr Lys Asp Ile Leu Lys Val  
805 810 815

Leu Asn Arg Lys Gly Thr Ala Glu Thr Asp Gln Leu Ala Pro Ile Val  
820 825 830

Pro Leu Asn Pro Gly Asp Leu Thr Phe Leu Gly Gly Glu Asp Gly Gln  
835 840 845

Lys Arg Arg Arg Asn Arg Pro Glu Ala Phe Pro Thr Ala Glu Asp Ile  
850 855 860

Phe Ala Lys Phe Gln His Leu Ser His Tyr Asp Gln His Gln Val Thr  
865 870 875 880

Ala Gln Val Ser Arg Asn Val Leu Glu Gln Ile Thr Ser Phe Ala Leu  
885 890 895

Gly Met Ser Tyr His Leu Pro Leu Val Gln His Val Gln Phe Ile Phe  
900 905 910

ES 2 424 976 T3

Asp Leu Met Glu Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu Ile Asp Phe Ala  
 915 920 925  
 Ile Gln Leu Leu Asn Glu Leu Ser Val Val Glu Ala Glu Leu Leu Leu  
 930 935 940  
 Lys Ser Ser Asp Leu Val Gly Ser Tyr Thr Thr Ser Leu Cys Leu Cys  
 945 950 955 960  
 Ile Val Ala Val Leu Arg His Tyr His Ala Cys Leu Ile Leu Asn Gln  
 965 970 975  
 Asp Gln Met Ala Gln Val Phe Glu Gly Leu Cys Gly Val Val Lys His  
 980 985 990  
 Gly Met Asn Arg Ser Asp Gly Ser Ser Ala Glu Arg Cys Ile Leu Ala  
 995 1000 1005  
 Tyr Leu Tyr Asp Leu Tyr Thr Ser Cys Ser His Leu Lys Asn Lys  
 1010 1015 1020  
 Phe Gly Glu Leu Phe Ser Asp Phe Cys Ser Lys Val Lys Asn Thr  
 1025 1030 1035  
 Ile Tyr Cys Asn Val Glu Pro Ser Glu Ser Asn Met Arg Trp Ala  
 1040 1045 1050  
 Pro Glu Phe Met Ile Asp Thr Leu Glu Asn Pro Ala Ala His Thr  
 1055 1060 1065  
 Phe Thr Tyr Thr Gly Leu Gly Lys Ser Leu Ser Glu Asn Pro Ala  
 1070 1075 1080  
 Asn Arg Tyr Ser Phe Val Cys Asn Ala Leu Met His Val Cys Val  
 1085 1090 1095  
 Gly His His Asp Pro Asp Arg Val Asn Asp Ile Ala Ile Leu Cys  
 1100 1105 1110  
 Ala Glu Leu Thr Gly Tyr Cys Lys Ser Leu Ser Ala Glu Trp Leu  
 1115 1120 1125  
 Gly Val Leu Lys Ala Leu Cys Cys Ser Ser Asn Asn Gly Thr Cys  
 1130 1135 1140  
 Gly Phe Asn Asp Leu Leu Cys Asn Val Asp Val Ser Asp Leu Ser  
 1145 1150 1155  
 Phe His Asp Ser Leu Ala Thr Phe Val Ala Ile Leu Ile Ala Arg  
 1160 1165 1170

ES 2 424 976 T3

Gln Cys 1175 Leu Leu Leu Glu Asp 1180 Leu Ile Arg Cys Ala 1185 Ala Ile Pro

Ser Leu 1190 Leu Asn Ala Ala Cys 1195 Ser Glu Gln Asp Ser 1200 Glu Pro Gly

Ala Arg 1205 Leu Thr Cys Arg Ile 1210 Leu Leu His Leu Phe 1215 Lys Thr Pro

Gln Leu 1220 Asn Pro Cys Gln Ser 1225 Asp Gly Asn Lys Pro 1230 Thr Val Gly

Ile Arg 1235 Ser Ser Cys Asp Arg 1240 His Leu Leu Ala Ala 1245 Ser Gln Asn

Arg Ile 1250 Val Asp Gly Ala Val 1255 Phe Ala Val Leu Lys 1260 Ala Val Phe

Val Leu 1265 Gly Asp Ala Glu Leu 1270 Lys Gly Ser Gly Phe 1275 Thr Val Thr

Gly Gly 1280 Thr Glu Glu Leu Pro 1285 Glu Glu Glu Gly Gly 1290 Gly Gly Ser

Gly Gly 1295 Arg Arg Gln Gly Gly 1300 Arg Asn Ile Ser Val 1305 Glu Thr Ala

Ser Leu 1310 Asp Val Tyr Ala Lys 1315 Tyr Val Leu Arg Ser 1320 Ile Cys Gln

Gln Glu 1325 Trp Val Gly Glu Arg 1330 Cys Leu Lys Ser Leu 1335 Cys Glu Asp

Ser Asn 1340 Asp Leu Gln Asp Pro 1345 Val Leu Ser Ser Ala 1350 Gln Ala Gln

Arg Leu 1355 Met Gln Leu Ile Cys 1360 Tyr Pro His Arg Leu 1365 Leu Asp Asn

Glu Asp 1370 Gly Glu Asn Pro Gln 1375 Arg Gln Arg Ile Lys 1380 Arg Ile Leu

Gln Asn 1385 Leu Asp Gln Trp Thr 1390 Met Arg Gln Ser Ser 1395 Leu Glu Leu

Gln Leu 1400 Met Ile Lys Gln Thr 1405 Pro Asn Asn Glu Met 1410 Asn Ser Leu

Leu Glu 1415 Asn Ile Ala Lys Ala 1420 Thr Ile Glu Val Phe 1425 Gln Arg Ser

ES 2 424 976 T3

Ala Glu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ala Ser Asn Met Pro  
 1430 1435 1440

Ser Ser Ser Lys Thr Lys Pro Val Leu Ser Ser Leu Glu Arg Ser  
 1445 1450 1455

Gly Val Trp Leu Val Ala Pro Leu Ile Ala Lys Leu Pro Thr Ser  
 1460 1465 1470

Val Gln Gly His Val Leu Lys Ala Ala Gly Glu Glu Leu Glu Lys  
 1475 1480 1485

Gly Gln His Leu Gly Ser Ser Ser Arg Lys Glu Arg Asp Arg Gln  
 1490 1495 1500

Lys Gln Lys Ser Met Ser Leu Leu Ser Gln Gln Pro Phe Leu Ser  
 1505 1510 1515

Leu Val Leu Thr Cys Leu Lys Gly Gln Asp Glu Gln Arg Glu Gly  
 1520 1525 1530

Leu Leu Thr Ser Leu Tyr Ser Gln Val His Gln Ile Val Asn Asn  
 1535 1540 1545

Trp Arg Asp Asp Gln Tyr Leu Asp Asp Cys Lys Pro Lys Gln Leu  
 1550 1555 1560

Met His Glu Ala Leu Lys Leu Arg Leu Asn Leu Val Gly Gly Met  
 1565 1570 1575

Phe Asp Thr Val Gln Arg Ser Thr Gln Gln Thr Thr Glu Trp Ala  
 1580 1585 1590

Met Leu Leu Leu Glu Ile Ile Ile Ser Gly Thr Val Asp Met Gln  
 1595 1600 1605

Ser Asn Asn Glu Leu Phe Thr Thr Val Leu Asp Met Leu Ser Val  
 1610 1615 1620

Leu Ile Asn Gly Thr Leu Ala Ala Asp Met Ser Ser Ile Ser Gln  
 1625 1630 1635

Gly Ser Met Glu Glu Asn Lys Arg Ala Tyr Met Asn Leu Ala Lys  
 1640 1645 1650

Lys Leu Gln Lys Glu Leu Gly Glu Arg Gln Ser Asp Ser Leu Glu  
 1655 1660 1665

Lys Val Arg Gln Leu Leu Pro Leu Pro Lys Gln Thr Arg Asp Val  
 1670 1675 1680

ES 2 424 976 T3

Ile Thr Cys Glu Pro Gln Gly Ser Leu Ile Asp Thr Lys Gly Asn  
 1685 1690 1695

Lys Ile Ala Gly Phe Asp Ser Ile Phe Lys Lys Glu Gly Leu Gln  
 1700 1705 1710

Val Ser Thr Lys Gln Lys Ile Ser Pro Trp Asp Leu Phe Glu Gly  
 1715 1720 1725

Leu Lys Pro Ser Ala Pro Leu Ser Trp Gly Trp Phe Gly Thr Val  
 1730 1735 1740

Arg Val Asp Arg Arg Val Ala Arg Gly Glu Glu Gln Gln Arg Leu  
 1745 1750 1755

Leu Leu Tyr His Thr His Leu Arg Pro Arg Pro Arg Ala Tyr Tyr  
 1760 1765 1770

Leu Glu Pro Leu Pro Leu Pro Pro Glu Asp Glu Glu Pro Pro Ala  
 1775 1780 1785

Pro Thr Leu Leu Glu Pro Glu Lys Lys Ala Pro Glu Pro Pro Lys  
 1790 1795 1800

Thr Asp Lys Pro Gly Ala Ala Pro Pro Ser Thr Glu Glu Arg Lys  
 1805 1810 1815

Lys Lys Ser Thr Lys Gly Lys Lys Arg Ser Gln Pro Ala Thr Lys  
 1820 1825 1830

Thr Glu Asp Tyr Gly Met Gly Pro Gly Arg Ser Gly Pro Tyr Gly  
 1835 1840 1845

Val Thr Val Pro Pro Asp Leu Leu His His Pro Asn Pro Gly Ser  
 1850 1855 1860

Ile Thr His Leu Asn Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Gly Leu Tyr Thr  
 1865 1870 1875

Gln Asn Gln Pro Leu Pro Ala Gly Gly Pro Arg Val Asp Pro Tyr  
 1880 1885 1890

Arg Pro Val Arg Leu Pro Met Gln Lys Leu Pro Pro Ser Tyr Ser  
 1895 1900 1905

Ser Gln Pro Tyr Gln Ser Thr His Pro Ser Thr Asn Pro Thr Leu  
 1910 1915 1920

Val Asp Pro Thr Arg His Leu Gln Gln Arg Pro Ser Gly Tyr Val  
 1925 1930 1935

ES 2 424 976 T3

His Gln Gln Ala Pro Thr Tyr Gly His Gly Leu Thr Ser Thr Gln  
 1940 1945 1950

Arg Phe Ser His Gln Thr Leu Gln Gln Thr Pro Met Ile Ser Thr  
 1955 1960 1965

Met Thr Pro Met Ser Ala Gln Gly Val Gln Ala Gly Val Arg Ser  
 1970 1975 1980

Thr Ala Ile Leu Pro Glu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 1985 1990 1995

Gln  
 2000 2005 2010

Gln Gln Tyr His Ile Arg Gln Gln Gln Gln Gln Ile Leu Arg  
 2015 2020 2025

Gln  
 2030 2035 2040

Gln His Gln Gln Gln  
 2045 2050 2055

Gln Gln Gln Gln Ala Ala Pro Pro Gln Pro Gln Pro Gln Ser Gln  
 2060 2065 2070

Pro Gln Phe Gln Arg Gln Gly Leu Gln Gln Thr Gln Gln Gln Gln  
 2075 2080 2085

Gln Thr Ala Ala Leu Val Arg Gln Leu Gln Gln Gln Leu Ser Asn  
 2090 2095 2100

Thr Gln Pro Gln Pro Ser Thr Asn Ile Phe Gly Arg Tyr  
 2105 2110 2115

<210> 101  
 <211> 2190  
 <212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 101  
 Met Lys Gln Ser Met Pro Ser Leu His Thr Lys Lys Ile Leu Phe Cys  
 1 5 10 15

Tyr Phe His Leu Thr Asn Ser Trp Cys Leu Arg Arg Tyr Gly Leu Gly  
 20 25 30

Lys Met Ala Ala Phe Gly Ile Leu Ser Tyr Glu His Arg Pro Leu Lys  
 35 40 45

ES 2 424 976 T3

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

ES 2 424 976 T3

Glu Phe Val Gln Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Arg Leu Ala Tyr Phe Cys  
 325 330 335  
 Thr Arg Arg Leu Ala Leu Gln Leu Asp Gly Val Ser Ser His Ser Ser  
 340 345 350  
 His Val Ile Ser Ala Gln Ser Thr Ser Thr Leu Pro Thr Thr Pro Ala  
 355 360 365  
 Pro Gln Pro Pro Thr Ser Ser Thr Pro Ser Thr Pro Phe Ser Asp Leu  
 370 375 380  
 Leu Met Cys Pro Gln His Arg Pro Leu Val Phe Gly Leu Ser Cys Ile  
 385 390 400  
 Leu Gln Thr Ile Leu Leu Cys Cys Pro Ser Ala Leu Val Trp His Tyr  
 405 410 415  
 Ser Leu Thr Asp Ser Arg Ile Lys Thr Gly Ser Pro Leu Asp His Leu  
 420 425 430  
 Pro Ile Ala Pro Ser Asn Leu Pro Met Pro Glu Gly Asn Ser Ala Phe  
 435 440 445  
 Thr Gln Gln Val Arg Ala Lys Leu Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Lys  
 450 455 460  
 Glu Arg Gly Gln Ala Val Glu Val Arg Trp Ser Phe Asp Lys Cys Gln  
 465 470 475 480  
 Glu Ala Thr Ala Gly Phe Thr Ile Gly Arg Val Leu His Thr Leu Glu  
 485 490 495  
 Val Leu Asp Ser His Ser Phe Glu Arg Ser Asp Phe Ser Asn Ser Leu  
 500 505 510  
 Asp Ser Leu Cys Asn Arg Ile Phe Gly Leu Gly Pro Ser Lys Asp Gly  
 515 520 525  
 His Glu Ile Ser Ser Asp Asp Ala Val Val Ser Leu Leu Cys Glu  
 530 535 540  
 Trp Ala Val Ser Cys Lys Arg Ser Gly Arg His Arg Ala Met Val Val  
 545 550 555 560  
 Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Gln Ala Glu Ile Glu Ala Glu Arg Cys  
 565 570 575  
 Gly Glu Ser Glu Ala Ala Asp Glu Lys Gly Ser Ile Ala Ser Gly Ser  
 580 585 590

ES 2 424 976 T3

Leu Ser Ala Pro Ser Ala Pro Ile Phe Gln Asp Val Leu Leu Gln Phe  
 595 600 605  
 Leu Asp Thr Gln Ala Pro Met Leu Thr Asp Pro Arg Ser Glu Ser Glu  
 610 615 620  
 Arg Val Glu Phe Phe Asn Leu Val Leu Leu Phe Cys Glu Leu Ile Arg  
 625 630 635 640  
 His Asp Val Phe Ser His Asn Met Tyr Thr Cys Thr Leu Ile Ser Arg  
 645 650 655  
 Gly Asp Leu Ala Phe Gly Ala Pro Gly Pro Arg Pro Pro Ser Pro Phe  
 660 665 670  
 Asp Asp Pro Ala Asp Asp Pro Glu His Lys Glu Ala Glu Gly Ser Ser  
 675 680 685  
 Ser Ser Lys Leu Glu Asp Pro Gly Leu Ser Glu Ser Met Asp Ile Asp  
 690 695 700  
 Pro Ser Ser Ser Val Leu Phe Glu Asp Met Glu Lys Pro Asp Phe Ser  
 705 710 715 720  
 Leu Phe Ser Pro Thr Met Pro Cys Glu Gly Lys Gly Ser Pro Ser Pro  
 725 730 735  
 Glu Lys Pro Asp Val Glu Lys Glu Val Lys Pro Pro Pro Lys Glu Lys  
 740 745 750  
 Ile Glu Gly Thr Leu Gly Val Leu Tyr Asp Gln Pro Arg His Val Gln  
 755 760 765  
 Tyr Ala Thr His Phe Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ser Cys Ser His Glu  
 770 775 780  
 Cys Asn Gln Arg Leu Val Val Leu Phe Gly Val Gly Lys Gln Arg Asp  
 785 790 795 800  
 Asp Ala Arg His Ala Ile Lys Lys Ile Thr Lys Asp Ile Leu Lys Val  
 805 810 815  
 Leu Asn Arg Lys Gly Thr Ala Glu Thr Asp Gln Leu Ala Pro Ile Val  
 820 825 830  
 Pro Leu Asn Pro Gly Asp Leu Thr Phe Leu Gly Gly Glu Asp Gly Gln  
 835 840 845  
 Lys Arg Arg Arg Asn Arg Pro Glu Ala Phe Pro Thr Ala Glu Asp Ile  
 850 855 860

ES 2 424 976 T3

Phe Ala Lys Phe Gln His Leu Ser His Tyr Asp Gln His Gln Val Thr  
 865 870 875 880  
 Ala Gln Val Ser Arg Asn Val Leu Glu Gln Ile Thr Ser Phe Ala Leu  
 885 890 895  
 Gly Met Ser Tyr His Leu Pro Leu Val Gln His Val Gln Phe Ile Phe  
 900 905 910  
 Asp Leu Met Glu Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu Ile Asp Phe Ala  
 915 920 925  
 Ile Gln Leu Leu Asn Glu Leu Ser Val Val Glu Ala Glu Leu Leu Leu  
 930 935 940  
 Lys Ser Ser Asp Leu Val Gly Ser Tyr Thr Thr Ser Leu Cys Leu Cys  
 945 950 955 960  
 Ile Val Ala Val Leu Arg His Tyr His Ala Cys Leu Ile Leu Asn Gln  
 965 970 975  
 Asp Gln Met Ala Gln Val Phe Glu Gly Leu Cys Gly Val Val Lys His  
 980 985 990  
 Gly Met Asn Arg Ser Asp Gly Ser Ser Ala Glu Arg Cys Ile Leu Ala  
 995 1000 1005  
 Tyr Leu Tyr Asp Leu Tyr Thr Ser Cys Ser His Leu Lys Asn Lys  
 1010 1015 1020  
 Phe Gly Glu Leu Phe Ser Asp Phe Cys Ser Lys Val Lys Asn Thr  
 1025 1030 1035  
 Ile Tyr Cys Asn Val Glu Pro Ser Glu Ser Asn Met Arg Trp Ala  
 1040 1045 1050  
 Pro Glu Phe Met Ile Asp Thr Leu Glu Asn Pro Ala Ala His Thr  
 1055 1060 1065  
 Phe Thr Tyr Thr Gly Leu Gly Lys Ser Leu Ser Glu Asn Pro Ala  
 1070 1075 1080  
 Asn Arg Tyr Ser Phe Val Cys Asn Ala Leu Met His Val Cys Val  
 1085 1090 1095  
 Gly His His Asp Pro Asp Arg Val Asn Asp Ile Ala Ile Leu Cys  
 1100 1105 1110  
 Ala Glu Leu Thr Gly Tyr Cys Lys Ser Leu Ser Ala Glu Trp Leu  
 1115 1120 1125

ES 2 424 976 T3

Gly Val Leu Lys Ala Leu Cys Cys Ser Ser Asn Asn Gly Thr Cys  
 1130 1135 1140

Gly Phe Asn Asp Leu Leu Cys Asn Val Asp Val Ser Asp Leu Ser  
 1145 1150 1155

Phe His Asp Ser Leu Ala Thr Phe Val Ala Ile Leu Ile Ala Arg  
 1160 1165 1170

Gln Cys Leu Leu Leu Glu Asp Leu Ile Arg Cys Ala Ala Ile Pro  
 1175 1180 1185

Ser Leu Leu Asn Ala Ala Cys Ser Glu Gln Asp Ser Glu Pro Gly  
 1190 1195 1200

Ala Arg Leu Thr Cys Arg Ile Leu Leu His Leu Phe Lys Thr Pro  
 1205 1210 1215

Gln Leu Asn Pro Cys Gln Ser Asp Gly Asn Lys Pro Thr Val Gly  
 1220 1225 1230

Ile Arg Ser Ser Cys Asp Arg His Leu Leu Ala Ala Ser Gln Asn  
 1235 1240 1245

Arg Ile Val Asp Gly Ala Val Phe Ala Val Leu Lys Ala Val Phe  
 1250 1255 1260

Val Leu Gly Asp Ala Glu Leu Lys Gly Ser Gly Phe Thr Val Thr  
 1265 1270 1275

Gly Gly Thr Glu Glu Leu Pro Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Ser  
 1280 1285 1290

Gly Gly Arg Arg Gln Gly Gly Arg Asn Ile Ser Val Glu Thr Ala  
 1295 1300 1305

Ser Leu Asp Val Tyr Ala Lys Tyr Val Leu Arg Ser Ile Cys Gln  
 1310 1315 1320

Gln Glu Trp Val Gly Glu Arg Cys Leu Lys Ser Leu Cys Glu Asp  
 1325 1330 1335

Ser Asn Asp Leu Gln Asp Pro Val Leu Ser Ser Ala Gln Ala Gln  
 1340 1345 1350

Arg Leu Met Gln Leu Ile Cys Tyr Pro His Arg Leu Leu Asp Asn  
 1355 1360 1365

Glu Asp Gly Glu Asn Pro Gln Arg Gln Arg Ile Lys Arg Ile Leu  
 1370 1375 1380

ES 2 424 976 T3

Gln Asn Leu Asp Gln Trp Thr Met Arg Gln Ser Ser Leu Glu Leu  
 1385 1390 1395

Gln Leu Met Ile Lys Gln Thr Pro Asn Asn Glu Met Asn Ser Leu  
 1400 1405 1410

Leu Glu Asn Ile Ala Lys Ala Thr Ile Glu Val Phe Gln Arg Ser  
 1415 1420 1425

Ala Glu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ala Ser Asn Met Pro  
 1430 1435 1440

Ser Ser Ser Lys Thr Lys Pro Val Leu Ser Ser Leu Glu Arg Ser  
 1445 1450 1455

Gly Val Trp Leu Val Ala Pro Leu Ile Ala Lys Leu Pro Thr Ser  
 1460 1465 1470

Val Gln Gly His Val Leu Lys Ala Ala Gly Glu Glu Leu Glu Lys  
 1475 1480 1485

Gly Gln His Leu Gly Ser Ser Ser Arg Lys Glu Arg Asp Arg Gln  
 1490 1495 1500

Lys Gln Lys Ser Met Ser Leu Leu Ser Gln Gln Pro Phe Leu Ser  
 1505 1510 1515

Leu Val Leu Thr Cys Leu Lys Gly Gln Asp Glu Gln Arg Glu Gly  
 1520 1525 1530

Leu Leu Thr Ser Leu Tyr Ser Gln Val His Gln Ile Val Asn Asn  
 1535 1540 1545

Trp Arg Asp Asp Gln Tyr Leu Asp Asp Cys Lys Pro Lys Gln Leu  
 1550 1555 1560

Met His Glu Ala Leu Lys Leu Arg Leu Asn Leu Val Gly Gly Met  
 1565 1570 1575

Phe Asp Thr Val Gln Arg Ser Thr Gln Gln Thr Thr Glu Trp Ala  
 1580 1585 1590

Met Leu Leu Leu Glu Ile Ile Ile Ser Gly Thr Val Asp Met Gln  
 1595 1600 1605

Ser Asn Asn Glu Leu Phe Thr Thr Val Leu Asp Met Leu Ser Val  
 1610 1615 1620

Leu Ile Asn Gly Thr Leu Ala Ala Asp Met Ser Ser Ile Ser Gln  
 1625 1630 1635

ES 2 424 976 T3

Gly Ser Met Glu Glu Asn Lys Arg Ala Tyr Met Asn Leu Ala Lys  
 1640 1645 1650  
 Lys Leu Gln Lys Glu Leu Gly Glu Arg Gln Ser Asp Ser Leu Glu  
 1655 1660 1665  
 Lys Val Arg Gln Leu Leu Pro Leu Pro Lys Gln Thr Arg Asp Val  
 1670 1675 1680  
 Ile Thr Cys Glu Pro Gln Gly Ser Leu Ile Asp Thr Lys Gly Asn  
 1685 1690 1695  
 Lys Ile Ala Gly Phe Asp Ser Ile Phe Lys Lys Glu Gly Leu Gln  
 1700 1705 1710  
 Val Ser Thr Lys Gln Lys Ile Ser Pro Trp Asp Leu Phe Glu Gly  
 1715 1720 1725  
 Leu Lys Pro Ser Ala Pro Leu Ser Trp Gly Trp Phe Gly Thr Val  
 1730 1735 1740  
 Arg Val Asp Arg Arg Val Ala Arg Gly Glu Glu Gln Gln Arg Leu  
 1745 1750 1755  
 Leu Leu Tyr His Thr His Leu Arg Pro Arg Pro Arg Ala Tyr Tyr  
 1760 1765 1770  
 Leu Glu Pro Leu Pro Leu Pro Pro Glu Asp Glu Glu Pro Pro Ala  
 1775 1780 1785  
 Pro Thr Leu Leu Glu Pro Glu Lys Lys Ala Pro Glu Pro Pro Lys  
 1790 1795 1800  
 Thr Asp Lys Pro Gly Ala Ala Pro Pro Ser Thr Glu Glu Arg Lys  
 1805 1810 1815  
 Lys Lys Ser Thr Lys Gly Lys Lys Arg Ser Gln Pro Ala Thr Lys  
 1820 1825 1830  
 Thr Glu Asp Tyr Gly Met Gly Pro Gly Arg Ser Gly Pro Tyr Gly  
 1835 1840 1845  
 Val Thr Val Pro Pro Asp Leu Leu His His Pro Asn Pro Gly Ser  
 1850 1855 1860  
 Ile Thr His Leu Asn Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Gly Leu Tyr Thr  
 1865 1870 1875  
 Gln Asn Gln Pro Leu Pro Ala Gly Gly Pro Arg Val Asp Pro Tyr  
 1880 1885 1890

ES 2 424 976 T3

Arg Pro Val Arg Leu Pro Met Gln Lys Leu Pro Thr Arg Pro Thr  
 1895 1900 1905

Tyr Pro Gly Val Leu Pro Thr Thr Met Thr Gly Val Met Gly Leu  
 1910 1915 1920

Glu Pro Ser Ser Tyr Lys Thr Ser Val Tyr Arg Gln Gln Gln Pro  
 1925 1930 1935

Ala Val Pro Gln Gly Gln Arg Leu Arg Gln Gln Leu Gln Ala Lys  
 1940 1945 1950

Ile Gln Ser Gln Gly Met Leu Gly Gln Ser Ser Val His Gln Met  
 1955 1960 1965

Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Leu Gln Thr Ser Gln Gly Tyr Thr  
 1970 1975 1980

Pro Tyr Val Ser His Val Gly Leu Gln Gln His Thr Gly Pro Ala  
 1985 1990 1995

Asp Pro Thr Arg His Leu Gln Gln Arg Pro Ser Gly Tyr Val His  
 2000 2005 2010

Gln Gln Ala Pro Thr Tyr Gly His Gly Leu Thr Ser Thr Gln Arg  
 2015 2020 2025

Phe Ser His Gln Thr Leu Gln Gln Thr Pro Met Ile Ser Thr Met  
 2030 2035 2040

Thr Pro Met Ser Ala Gln Gly Val Gln Ala Gly Val Arg Ser Thr  
 2045 2050 2055

Ala Ile Leu Pro Glu Gln  
 2060 2065 2070

Gln  
 2075 2080 2085

Gln Tyr His Ile Arg Gln Gln Gln Gln Gln Ile Leu Arg Gln  
 2090 2095 2100

Gln  
 2105 2110 2115

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Gln Gln Gln Gln  
 2120 2125 2130

Gln Gln Gln Ala Ala Pro Pro Gln Pro Gln Pro Gln Ser Gln Pro  
 2135 2140 2145

Gln Phe Gln Arg Gln Gly Leu Gln Gln Thr Gln Gln Gln Gln  
 2150 2155 2160

Thr Ala Ala Leu Val Arg Gln Leu Gln Gln Gln Leu Ser Asn Thr  
 2165 2170 2175

Gln Pro Gln Pro Ser Thr Asn Ile Phe Gly Arg Tyr  
 2180 2185 2190

<210> 102  
 <211> 2050  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 102

5

ES 2 424 976 T3

Met Lys Gln Ser Met Pro Ser Leu His Thr Lys Lys Ile Leu Phe Cys  
 1 5 10 15

Tyr Phe His Leu Thr Asn Ser Trp Cys Leu Arg Arg Tyr Gly Leu Gly  
 20 25 30

Lys Met Ala Ala Phe Gly Ile Leu Ser Tyr Glu His Arg Pro Leu Lys  
 35 40 45

Arg Pro Arg Pro Arg Leu Gly Pro Pro Asp Val Tyr Pro Gln Asp Pro  
 50 55 60

Lys Gln Lys Glu Asp Glu Leu Thr Ala Leu Asn Val Lys Gln Gly Phe  
 65 70 75 80

Asn Asn Gln Pro Ala Val Ser Gly Asp Glu His Gly Ser Ala Lys Asn  
 85 90 95

Val Ser Phe Asn Pro Ala Lys Ile Ser Ser Asn Phe Ser Ser Ile Ile  
 100 105 110

Ala Glu Lys Leu Arg Cys Asn Thr Leu Pro Asp Thr Gly Arg Arg Lys  
 115 120 125

Pro Gln Val Asn Gln Lys Asp Asn Phe Trp Leu Val Thr Ala Arg Ser  
 130 135 140

Gln Ser Ala Ile Asn Thr Trp Phe Thr Asp Leu Ala Gly Thr Lys Pro  
 145 150 155 160

Leu Thr Gln Leu Ala Lys Lys Val Pro Ile Phe Ser Lys Lys Glu Glu  
 165 170 175

Val Phe Gly Tyr Leu Ala Lys Tyr Thr Val Pro Val Met Arg Ala Ala  
 180 185 190

Trp Leu Ile Lys Met Thr Cys Ala Tyr Tyr Ala Ala Ile Ser Glu Thr  
 195 200 205

ES 2 424 976 T3

Lys Val Lys Lys Arg His Val Asp Pro Phe Met Glu Trp Thr Gln Ile  
 210 215 220  
 Ile Thr Lys Tyr Leu Trp Glu Gln Leu Gln Lys Met Ala Glu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Arg Pro Gly Pro Ala Gly Ser Gly Gly Cys Gly Ser Thr Ile Gly Pro  
 245 250 255  
 Leu Pro His Asp Val Glu Val Ala Ile Arg Gln Trp Asp Tyr Thr Glu  
 260 265  
 Lys Leu Ala Met Phe Met Phe Gln Asp Gly Met Leu Asp Arg His Glu  
 275 280 285  
 Phe Leu Thr Trp Val Leu Glu Cys Phe Glu Lys Ile Arg Pro Gly Glu  
 290 295 300  
 Asp Glu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Arg Tyr Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Glu Phe Val Gln Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Arg Leu Ala Tyr Phe Cys  
 325 330 335  
 Thr Arg Arg Leu Ala Leu Gln Leu Asp Gly Val Ser Ser His Ser Ser  
 340 345 350  
 His Val Ile Ser Ala Gln Ser Thr Ser Thr Leu Pro Thr Thr Pro Ala  
 355 360 365  
 Pro Gln Pro Pro Thr Ser Ser Thr Pro Ser Thr Pro Phe Ser Asp Leu  
 370 375 380  
 Leu Met Cys Pro Gln His Arg Pro Leu Val Phe Gly Leu Ser Cys Ile  
 385 390 395 400  
 Leu Gln Thr Ile Leu Leu Cys Cys Pro Ser Ala Leu Val Trp His Tyr  
 405 410 415  
 Ser Leu Thr Asp Ser Arg Ile Lys Thr Gly Ser Pro Leu Asp His Leu  
 420 425 430  
 Pro Ile Ala Pro Ser Asn Leu Pro Met Pro Glu Gly Asn Ser Ala Phe  
 435 440 445  
 Thr Gln Gln Val Arg Ala Lys Leu Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Lys  
 450 455 460  
 Glu Arg Gly Gln Ala Val Glu Val Arg Trp Ser Phe Asp Lys Cys Gln  
 465 470 475 480

ES 2 424 976 T3

Glu Ala Thr Ala Gly Phe Thr Ile Gly Arg Val Leu His Thr Leu Glu  
 485 490 495  
 Val Leu Asp Ser His Ser Phe Glu Arg Ser Asp Phe Ser Asn Ser Leu  
 500 505 510  
 Asp Ser Leu Cys Asn Arg Ile Phe Gly Leu Gly Pro Ser Lys Asp Gly  
 515 520 525  
 His Glu Ile Ser Ser Asp Asp Ala Val Val Ser Leu Leu Cys Glu  
 530 535 540  
 Trp Ala Val Ser Cys Lys Arg Ser Gly Arg His Arg Ala Met Val Val  
 545 550 555 560  
 Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Gln Ala Glu Ile Glu Ala Glu Arg Cys  
 565 570 575  
 Gly Glu Ser Glu Ala Ala Asp Glu Lys Gly Ser Ile Ala Ser Gly Ser  
 580 585 590  
 Leu Ser Ala Pro Ser Ala Pro Ile Phe Gln Asp Val Leu Leu Gln Phe  
 595 600 605  
 Leu Asp Thr Gln Ala Pro Met Leu Thr Asp Pro Arg Ser Glu Ser Glu  
 610 615 620  
 Arg Val Glu Phe Phe Asn Leu Val Leu Leu Phe Cys Glu Leu Ile Arg  
 625 630 635 640  
 His Asp Val Phe Ser His Asn Met Tyr Thr Cys Thr Leu Ile Ser Arg  
 645 650 655  
 Gly Asp Leu Ala Phe Gly Ala Pro Gly Pro Arg Pro Pro Ser Pro Phe  
 660 665 670  
 Asp Asp Pro Ala Asp Asp Pro Glu His Lys Glu Ala Glu Gly Ser Ser  
 675 680 685  
 Ser Ser Lys Leu Glu Asp Pro Gly Leu Ser Glu Ser Met Asp Ile Asp  
 690 695 700  
 Pro Ser Ser Ser Val Leu Phe Glu Asp Met Glu Lys Pro Asp Phe Ser  
 705 710 715 720  
 Leu Phe Ser Pro Thr Met Pro Cys Glu Gly Lys Gly Ser Pro Ser Pro  
 725 730 735  
 Glu Lys Pro Asp Val Glu Lys Glu Val Lys Pro Pro Pro Lys Glu Lys  
 740 745 750

ES 2 424 976 T3

Ile Glu Gly Thr Leu Gly Val Leu Tyr Asp Gln Pro Arg His Val Gln  
755 760 765

Tyr Ala Thr His Phe Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ser Cys Ser His Glu  
770 775 780

Cys Asn Gln Arg Leu Val Val Leu Phe Gly Val Gly Lys Gln Arg Asp  
785 790 795 800

Asp Ala Arg His Ala Ile Lys Lys Ile Thr Lys Asp Ile Leu Lys Val  
805 810 815

Leu Asn Arg Lys Gly Thr Ala Glu Thr Asp Gln Leu Ala Pro Ile Val  
820 825 830

Pro Leu Asn Pro Gly Asp Leu Thr Phe Leu Gly Gly Glu Asp Gly Gln  
835 840 845

Lys Arg Arg Arg Asn Arg Pro Glu Ala Phe Pro Thr Ala Glu Asp Ile  
850 855 860

Phe Ala Lys Phe Gln His Leu Ser His Tyr Asp Gln His Gln Val Thr  
865 870 875 880

Ala Gln Val Ser Arg Asn Val Leu Glu Gln Ile Thr Ser Phe Ala Leu  
885 890 895

Gly Met Ser Tyr His Leu Pro Leu Val Gln His Val Gln Phe Ile Phe  
900 905 910

Asp Leu Met Glu Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu Ile Asp Phe Ala  
915 920 925

Ile Gln Leu Leu Asn Glu Leu Ser Val Val Glu Ala Glu Leu Leu Leu  
930 935 940

Lys Ser Ser Asp Leu Val Gly Ser Tyr Thr Thr Ser Leu Cys Leu Cys  
945 950 955 960

Ile Val Ala Val Leu Arg His Tyr His Ala Cys Leu Ile Leu Asn Gln  
965 970 975

Asp Gln Met Ala Gln Val Phe Glu Gly Leu Cys Gly Val Val Lys His  
980 985 990

Gly Met Asn Arg Ser Asp Gly Ser Ser Ala Glu Arg Cys Ile Leu Ala  
995 1000 1005

Tyr Leu Tyr Asp Leu Tyr Thr Ser Cys Ser His Leu Lys Asn Lys  
1010 1015 1020

ES 2 424 976 T3

Phe Gly Glu Leu Phe Ser Asp Phe Cys Ser Lys Val Lys Asn Thr  
 1025 1030 1035  
 Ile Tyr Cys Asn Val Glu Pro Ser Glu Ser Asn Met Arg Trp Ala  
 1040 1045 1050  
 Pro Glu Phe Met Ile Asp Thr Leu Glu Asn Pro Ala Ala His Thr  
 1055 1060 1065  
 Phe Thr Tyr Thr Gly Leu Gly Lys Ser Leu Ser Glu Asn Pro Ala  
 1070 1075 1080  
 Asn Arg Tyr Ser Phe Val Cys Asn Ala Leu Met His Val Cys Val  
 1085 1090 1095  
 Gly His His Asp Pro Asp Arg Val Asn Asp Ile Ala Ile Leu Cys  
 1100 1105 1110  
 Ala Glu Leu Thr Gly Tyr Cys Lys Ser Leu Ser Ala Glu Trp Leu  
 1115 1120 1125  
 Gly Val Leu Lys Ala Leu Cys Cys Ser Ser Asn Asn Gly Thr Cys  
 1130 1135 1140  
 Gly Phe Asn Asp Leu Leu Cys Asn Val Asp Val Ser Asp Leu Ser  
 1145 1150 1155  
 Phe His Asp Ser Leu Ala Thr Phe Val Ala Ile Leu Ile Ala Arg  
 1160 1165 1170  
 Gln Cys Leu Leu Leu Glu Asp Leu Ile Arg Cys Ala Ala Ile Pro  
 1175 1180 1185  
 Ser Leu Leu Asn Ala Ala Cys Ser Glu Gln Asp Ser Glu Pro Gly  
 1190 1195 1200  
 Ala Arg Leu Thr Cys Arg Ile Leu Leu His Leu Phe Lys Thr Pro  
 1205 1210 1215  
 Gln Leu Asn Pro Cys Gln Ser Asp Gly Asn Lys Pro Thr Val Gly  
 1220 1225 1230  
 Ile Arg Ser Ser Cys Asp Arg His Leu Leu Ala Ala Ser Gln Asn  
 1235 1240 1245  
 Arg Ile Val Asp Gly Ala Val Phe Ala Val Leu Lys Ala Val Phe  
 1250 1255 1260  
 Val Leu Gly Asp Ala Glu Leu Lys Gly Ser Gly Phe Thr Val Thr  
 1265 1270 1275

ES 2 424 976 T3

Gly Gly Thr Glu Glu Leu Pro Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Ser  
 1280 1285 1290  
 Gly Gly Arg Arg Gln Gly Gly Arg Asn Ile Ser Val Glu Thr Ala  
 1295 1300 1305  
 Ser Leu Asp Val Tyr Ala Lys Tyr Val Leu Arg Ser Ile Cys Gln  
 1310 1315 1320  
 Gln Glu Trp Val Gly Glu Arg Cys Leu Lys Ser Leu Cys Glu Asp  
 1325 1330 1335  
 Ser Asn Asp Leu Gln Asp Pro Val Leu Ser Ser Ala Gln Ala Gln  
 1340 1345 1350  
 Arg Leu Met Gln Leu Ile Cys Tyr Pro His Arg Leu Leu Asp Asn  
 1355 1360 1365  
 Glu Asp Gly Glu Asn Pro Gln Arg Gln Arg Ile Lys Arg Ile Leu  
 1370 1375 1380  
 Gln Asn Leu Asp Gln Trp Thr Met Arg Gln Ser Ser Leu Glu Leu  
 1385 1390 1395  
 Gln Leu Met Ile Lys Gln Thr Pro Asn Asn Glu Met Asn Ser Leu  
 1400 1405 1410  
 Leu Glu Asn Ile Ala Lys Ala Thr Ile Glu Val Phe Gln Arg Ser  
 1415 1420 1425  
 Ala Glu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ala Ser Asn Met Pro  
 1430 1435 1440  
 Ser Ser Ser Lys Thr Lys Pro Val Leu Ser Ser Leu Glu Arg Ser  
 1445 1450 1455  
 Gly Val Trp Leu Val Ala Pro Leu Ile Ala Lys Leu Pro Thr Ser  
 1460 1465 1470  
 Val Gln Gly His Val Leu Lys Ala Ala Gly Glu Glu Leu Glu Lys  
 1475 1480 1485  
 Gly Gln His Leu Gly Ser Ser Ser Arg Lys Glu Arg Asp Arg Gln  
 1490 1495 1500  
 Lys Gln Lys Ser Met Ser Leu Leu Ser Gln Gln Pro Phe Leu Ser  
 1505 1510 1515  
 Leu Val Leu Thr Cys Leu Lys Gly Gln Asp Glu Gln Arg Glu Gly  
 1520 1525 1530

ES 2 424 976 T3

Leu 1535 Thr Ser Leu Tyr Ser 1540 Gln Val His Gln Ile 1545 Val Asn Asn  
 Trp 1550 Arg Asp Asp Gln Tyr Leu 1555 Asp Asp Cys Lys Pro 1560 Lys Gln Leu  
 Met 1565 His Glu Ala Leu Lys Leu 1570 Arg Leu Asn Leu Val 1575 Gly Gly Met  
 Phe 1580 Asp Thr Val Gln Arg Ser 1585 Thr Gln Gln Thr Thr 1590 Glu Trp Ala  
 Met 1595 Leu Leu Glu Ile Ile 1600 Ile Ser Gly Thr Val 1605 Asp Met Gln  
 Ser 1610 Asn Glu Leu Phe Thr 1615 Thr Val Leu Asp Met 1620 Leu Ser Val  
 Leu 1625 Ile Asn Gly Thr Leu Ala 1630 Ala Asp Met Ser Ser 1635 Ile Ser Gln  
 Gly 1640 Ser Met Glu Glu Asn Lys 1645 Arg Ala Tyr Met Asn 1650 Leu Ala Lys  
 Lys 1655 Leu Gln Lys Glu Leu Gly 1660 Glu Arg Gln Ser Asp 1665 Ser Leu Glu  
 Lys 1670 Val Arg Gln Leu Leu Pro 1675 Leu Pro Lys Gln Thr 1680 Arg Asp Val  
 Ile 1685 Thr Cys Glu Pro Gln Gly 1690 Ser Leu Ile Asp Thr 1695 Lys Gly Asn  
 Lys 1700 Ile Ala Gly Phe Asp Ser 1705 Ile Phe Lys Lys Glu 1710 Gly Leu Gln  
 Val 1715 Ser Thr Lys Gln Lys Ile 1720 Ser Pro Trp Asp Leu 1725 Phe Glu Gly  
 Leu 1730 Lys Pro Ser Ala Pro Leu 1735 Ser Trp Gly Trp Phe 1740 Gly Thr Val  
 Arg 1745 Val Asp Arg Arg Val Ala 1750 Arg Gly Glu Glu Gln 1755 Gln Arg Leu  
 Leu 1760 Leu Tyr His Thr His Leu 1765 Arg Pro Arg Pro Arg 1770 Ala Tyr Tyr  
 Leu 1775 Glu Pro Leu Pro Leu Pro 1780 Pro Glu Asp Glu Glu 1785 Pro Pro Ala

ES 2 424 976 T3

Pro Thr Leu Leu Glu Pro Glu Lys Lys Ala Pro Glu Pro Pro Lys  
 1790 1795 1800

Thr Asp Lys Pro Gly Ala Ala Pro Pro Ser Thr Glu Glu Arg Lys  
 1805 1810 1815

Lys Lys Ser Thr Lys Gly Lys Lys Arg Ser Gln Pro Ala Thr Lys  
 1820 1825 1830

Thr Glu Asp Tyr Gly Met Gly Pro Gly Arg Ser Gly Pro Tyr Gly  
 1835 1840 1845

Val Thr Val Pro Pro Asp Leu Leu His His Pro Asn Pro Gly Ser  
 1850 1855 1860

Ile Thr His Leu Asn Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Gly Leu Tyr Thr  
 1865 1870 1875

Gln Asn Gln Pro Leu Pro Ala Gly Gly Pro Arg Val Asp Pro Tyr  
 1880 1885 1890

Arg Pro Val Arg Leu Pro Met Gln Lys Leu Pro Thr Arg Pro Thr  
 1895 1900 1905

Tyr Pro Gly Val Leu Pro Thr Thr Met Thr Gly Val Met Gly Leu  
 1910 1915 1920

Glu Pro Ser Ser Tyr Lys Thr Ser Val Tyr Arg Gln Gln Gln Pro  
 1925 1930 1935

Ala Val Pro Gln Gly Gln Arg Leu Arg Gln Gln Leu Gln Ala Lys  
 1940 1945 1950

Ile Gln Ser Gln Gly Met Leu Gly Gln Ser Ser Val His Gln Met  
 1955 1960 1965

Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Leu Gln Thr Ser Gln Gly Tyr Thr  
 1970 1975 1980

Pro Tyr Val Ser His Val Gly Leu Gln Gln His Thr Gly Pro Ala  
 1985 1990 1995

Gly Thr Met Val Pro Pro Ser Tyr Ser Ser Gln Pro Tyr Gln Ser  
 2000 2005 2010

Thr His Pro Phe Leu Leu Ile Pro Asn Pro Ile Pro Gly Leu Ala  
 2015 2020 2025

Pro Val Val Val Gly Ala Leu Pro Ser Gly Ser Ile Phe Asn Lys  
 2030 2035 2040

Phe Leu Val Phe Leu Leu Met  
 2045 2050

<210> 103  
 <211> 1708  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 103

5

ES 2 424 976 T3

Met Lys Gln Ser Met Pro Ser Leu His Thr Lys Lys Ile Leu Phe Cys  
1 5 10 15

Tyr Phe His Leu Thr Asn Ser Trp Cys Leu Arg Arg Tyr Gly Leu Gly  
20 25 30

Lys Met Ala Ala Phe Gly Ile Leu Ser Tyr Glu His Arg Pro Leu Lys  
35 40 45

Arg Pro Arg Pro Arg Leu Gly Pro Pro Asp Val Tyr Pro Gln Asp Pro  
50 55 60

Lys Gln Lys Glu Asp Glu Leu Thr Ala Leu Asn Val Lys Gln Gly Phe  
65 70 75 80

Asn Asn Gln Pro Ala Val Ser Gly Asp Glu His Gly Ser Ala Lys Asn  
85 90 95

Val Ser Phe Asn Pro Ala Lys Ile Ser Ser Asn Phe Ser Ser Ile Ile  
100 105 110

Ala Glu Lys Leu Arg Cys Asn Thr Leu Pro Asp Thr Gly Arg Arg Lys  
115 120 125

Pro Gln Val Asn Gln Lys Asp Asn Phe Trp Leu Val Thr Ala Arg Ser  
130 135 140

Gln Ser Ala Ile Asn Thr Trp Phe Thr Asp Leu Ala Gly Thr Lys Pro  
145 150 155 160

Leu Thr Gln Leu Ala Lys Lys Val Pro Ile Phe Ser Lys Lys Glu Glu  
165 170 175

Val Phe Gly Tyr Leu Ala Lys Tyr Thr Val Pro Val Met Arg Ala Ala  
180 185 190

Trp Leu Ile Lys Met Thr Cys Ala Tyr Tyr Ala Ala Ile Ser Glu Thr  
195 200 205

Lys Val Lys Lys Arg His Val Asp Pro Phe Met Glu Trp Thr Gln Ile  
210 215 220

ES 2 424 976 T3

Ile Thr Lys Tyr Leu Trp Glu Gln Leu Gln Lys Met Ala Glu Tyr Tyr  
 225 230 235 240

Arg Pro Gly Pro Ala Gly Ser Gly Gly Cys Gly Ser Thr Ile Gly Pro  
 245 250 255

Leu Pro His Asp Val Glu Val Ala Ile Arg Gln Trp Asp Tyr Thr Glu  
 260 265

Lys Leu Ala Met Phe Met Phe Gln Asp Gly Met Leu Asp Arg His Glu  
 275 280 285

Phe Leu Thr Trp Val Leu Glu Cys Phe Glu Lys Ile Arg Pro Gly Glu  
 290 295 300

Asp Glu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Arg Tyr Ser Gly  
 305 310 315 320

Glu Phe Val Gln Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Arg Leu Ala Tyr Phe Cys  
 325 330 335

Thr Arg Arg Leu Ala Leu Gln Leu Asp Gly Val Ser Ser His Ser Ser  
 340 345 350

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

Pro Gln Pro Pro Thr Ser Ser Thr Pro Ser Thr Pro Phe Ser Asp Leu  
 370 375 380

Leu Met Cys Pro Gln His Arg Pro Leu Val Phe Gly Leu Ser Cys Ile  
 385 390 395 400

Leu Gln Thr Ile Leu Leu Cys Cys Pro Ser Ala Leu Val Trp His Tyr  
 405 410 415

Ser Leu Thr Asp Ser Arg Ile Lys Thr Gly Ser Pro Leu Asp His Leu  
 420 425 430

Pro Ile Ala Pro Ser Asn Leu Pro Met Pro Glu Gly Asn Ser Ala Phe  
 435 440 445

Thr Gln Gln Val Arg Ala Lys Leu Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Lys  
 450 455 460

Glu Arg Gly Gln Ala Val Glu Val Arg Trp Ser Phe Asp Lys Cys Gln  
 465 470 475 480

Glu Ala Thr Ala Gly Phe Thr Ile Gly Arg Val Leu His Thr Leu Glu  
 485 490 495

ES 2 424 976 T3

Val Leu Asp Ser His Ser Phe Glu Arg Ser Asp Phe Ser Asn Ser Leu  
 500 505 510  
 Asp Ser Leu Cys Asn Arg Ile Phe Gly Leu Gly Pro Ser Lys Asp Gly  
 515 520 525  
 His Glu Ile Ser Ser Asp Asp Ala Val Val Ser Leu Leu Cys Glu  
 530 535 540  
 Trp Ala Val Ser Cys Lys Arg Ser Gly Arg His Arg Ala Met Val Val  
 545 550 555 560  
 Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Gln Ala Glu Ile Glu Ala Glu Arg Cys  
 565 570 575  
 Gly Glu Ser Glu Ala Ala Asp Glu Lys Gly Ser Ile Ala Ser Gly Ser  
 580 585 590  
 Leu Ser Ala Pro Ser Ala Pro Ile Phe Gln Asp Val Leu Leu Gln Phe  
 595 600 605  
 Leu Asp Thr Gln Ala Pro Met Leu Thr Asp Pro Arg Ser Glu Ser Glu  
 610 615 620  
 Arg Val Glu Phe Phe Asn Leu Val Leu Leu Phe Cys Glu Leu Ile Arg  
 625 630 635 640  
 His Asp Val Phe Ser His Asn Met Tyr Thr Cys Thr Leu Ile Ser Arg  
 645 650 655  
 Gly Asp Leu Ala Phe Gly Ala Pro Gly Pro Arg Pro Pro Ser Pro Phe  
 660 665 670  
 Asp Asp Pro Ala Asp Asp Pro Glu His Lys Glu Ala Glu Gly Ser Ser  
 675 680 685  
 Ser Ser Lys Leu Glu Asp Pro Gly Leu Ser Glu Ser Met Asp Ile Asp  
 690 695 700  
 Pro Ser Ser Ser Val Leu Phe Glu Asp Met Glu Lys Pro Asp Phe Ser  
 705 710 715 720  
 Leu Phe Ser Pro Thr Met Pro Cys Glu Gly Lys Gly Ser Pro Ser Pro  
 725 730 735  
 Glu Lys Pro Asp Val Glu Lys Glu Val Lys Pro Pro Pro Lys Glu Lys  
 740 745 750  
 Ile Glu Gly Thr Leu Gly Val Leu Tyr Asp Gln Pro Arg His Val Gln  
 755 760 765

ES 2 424 976 T3

Tyr Ala Thr His Phe Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ser Cys Ser His Glu  
 770 775 780  
 Cys Asn Gln Arg Leu Val Val Leu Phe Gly Val Gly Lys Gln Arg Asp  
 785 790 795 800  
 Asp Ala Arg His Ala Ile Lys Lys Ile Thr Lys Asp Ile Leu Lys Val  
 805 810 815  
 Leu Asn Arg Lys Gly Thr Ala Glu Thr Asp Gln Leu Ala Pro Ile Val  
 820 825 830  
 Pro Leu Asn Pro Gly Asp Leu Thr Phe Leu Gly Gly Glu Asp Gly Gln  
 835 840 845  
 Lys Arg Arg Arg Asn Arg Pro Glu Ala Phe Pro Thr Ala Glu Asp Ile  
 850 855 860  
 Phe Ala Lys Phe Gln His Leu Ser His Tyr Asp Gln His Gln Val Thr  
 865 870 875 880  
 Ala Gln Val Ser Arg Asn Val Leu Glu Gln Ile Thr Ser Phe Ala Leu  
 885 890 895  
 Gly Met Ser Tyr His Leu Pro Leu Val Gln His Val Gln Phe Ile Phe  
 900 905 910  
 Asp Leu Met Glu Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu Ile Asp Phe Ala  
 915 920 925  
 Ile Gln Leu Leu Asn Glu Leu Ser Val Val Glu Ala Glu Leu Leu Leu  
 930 935 940  
 Lys Ser Ser Asp Leu Val Gly Ser Tyr Thr Thr Ser Leu Cys Leu Cys  
 945 950 955 960  
 Ile Val Ala Val Leu Arg His Tyr His Ala Cys Leu Ile Leu Asn Gln  
 965 970 975  
 Asp Gln Met Ala Gln Val Phe Glu Gly Leu Cys Gly Val Val Lys His  
 980 985 990  
 Gly Met Asn Arg Ser Asp Gly Ser Ser Ala Glu Arg Cys Ile Leu Ala  
 995 1000 1005  
 Tyr Leu Tyr Asp Leu Tyr Thr Ser Cys Ser His Leu Lys Asn Lys  
 1010 1015 1020  
 Phe Gly Glu Leu Phe Ser Asp Phe Cys Ser Lys Val Lys Asn Thr  
 1025 1030 1035

ES 2 424 976 T3

Ile Tyr Cys Asn Val Glu Pro Ser Glu Ser Asn Met Arg Trp Ala  
 1040 1045 1050

Pro Glu Phe Met Ile Asp Thr Leu Glu Asn Pro Ala Ala His Thr  
 1055 1060 1065

Phe Thr Tyr Thr Gly Leu Gly Lys Ser Leu Ser Glu Asn Pro Ala  
 1070 1075 1080

Asn Arg Tyr Ser Phe Val Cys Asn Ala Leu Met His Val Cys Val  
 1085 1090 1095

Gly His His Asp Pro Asp Arg Val Asn Asp Ile Ala Ile Leu Cys  
 1100 1105 1110

Ala Glu Leu Thr Gly Tyr Cys Lys Ser Leu Ser Ala Glu Trp Leu  
 1115 1120 1125

Gly Val Leu Lys Ala Leu Cys Cys Ser Ser Asn Asn Gly Thr Cys  
 1130 1135 1140

Gly Phe Asn Asp Leu Leu Cys Asn Val Asp Val Ser Asp Leu Ser  
 1145 1150 1155

Phe His Asp Ser Leu Ala Thr Phe Val Ala Ile Leu Ile Ala Arg  
 1160 1165 1170

Gln Cys Leu Leu Leu Glu Asp Leu Ile Arg Cys Ala Ala Ile Pro  
 1175 1180 1185

Ser Leu Leu Asn Ala Ala Cys Ser Glu Gln Asp Ser Glu Pro Gly  
 1190 1195 1200

Ala Arg Leu Thr Cys Arg Ile Leu Leu His Leu Phe Lys Thr Pro  
 1205 1210 1215

Gln Leu Asn Pro Cys Gln Ser Asp Gly Asn Lys Pro Thr Val Gly  
 1220 1225 1230

Ile Arg Ser Ser Cys Asp Arg His Leu Leu Ala Ala Ser Gln Asn  
 1235 1240 1245

Arg Ile Val Asp Gly Ala Val Phe Ala Val Leu Lys Ala Val Phe  
 1250 1255 1260

Val Leu Gly Asp Ala Glu Leu Lys Gly Ser Gly Phe Thr Val Thr  
 1265 1270 1275

Gly Gly Thr Glu Glu Leu Pro Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Ser  
 1280 1285 1290

ES 2 424 976 T3

Gly Gly Arg Arg Gln Gly Gly Arg Asn Ile Ser Val Glu Thr Ala  
 1295 1300 1305

Ser Leu Asp Val Tyr Ala Lys Tyr Val Leu Arg Ser Ile Cys Gln  
 1310 1315 1320

Gln Glu Trp Val Gly Glu Arg Cys Leu Lys Ser Leu Cys Glu Asp  
 1325 1330 1335

Ser Asn Asp Leu Gln Asp Pro Val Leu Ser Ser Ala Gln Ala Gln  
 1340 1345 1350

Arg Leu Met Gln Leu Ile Cys Tyr Pro His Arg Leu Leu Asp Asn  
 1355 1360 1365

Glu Asp Gly Glu Asn Pro Gln Arg Gln Arg Ile Lys Arg Ile Leu  
 1370 1375 1380

Gln Asn Leu Asp Pro Tyr Arg Pro Val Arg Leu Pro Met Gln Lys  
 1385 1390 1395

Leu Pro Thr Arg Pro Thr Tyr Pro Gly Val Leu Pro Thr Thr Met  
 1400 1405 1410

Thr Gly Val Met Gly Leu Glu Pro Ser Ser Tyr Lys Thr Ser Val  
 1415 1420 1425

Tyr Arg Gln Gln Gln Pro Ala Val Pro Gln Gly Gln Arg Leu Arg  
 1430 1435 1440

Gln Gln Leu Gln Gln Ser Gln Gly Met Leu Gly Gln Ser Ser Val  
 1445 1450 1455

His Gln Met Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Leu Gln Thr Ser Gln  
 1460 1465 1470

Gly Tyr Thr Pro Tyr Val Ser His Val Gly Leu Gln Gln His Thr  
 1475 1480 1485

Gly Pro Ala Gly Thr Met Val Pro Pro Ser Tyr Ser Ser Gln Pro  
 1490 1495 1500

Tyr Gln Ser Thr His Pro Ser Thr Asn Pro Thr Leu Val Asp Pro  
 1505 1510 1515

Thr Arg His Leu Gln Gln Arg Pro Ser Gly Tyr Val His Gln Gln  
 1520 1525 1530

Ala Pro Thr Tyr Gly His Gly Leu Thr Ser Thr Gln Arg Phe Ser  
 1535 1540 1545

ES 2 424 976 T3

His Gln Thr Leu Gln Gln Thr Pro Met Ile Ser Thr Met Thr Pro  
1550 1555 1560

Met Ser Ala Gln Gly Val Gln Ala Gly Val Arg Ser Thr Ala Ile  
1565 1570 1575

Leu Pro Glu Gln  
1580 1585 1590

Gln Tyr  
1595 1600 1605

His Ile Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ile Leu Arg Gln Gln Gln  
1610 1615 1620

Gln  
1625 1630 1635

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
1640 1645 1650

Gln Ala Ala Pro Pro Gln Pro Gln Pro Gln Ser Gln Pro Gln Phe  
1655 1660 1665

Gln Arg Gln Gly Leu Gln Gln Thr Gln Gln Gln Gln Gln Thr Ala  
1670 1675 1680

Ala Leu Val Arg Gln Leu Gln Gln Gln Leu Ser Asn Thr Gln Pro  
1685 1690 1695

Gln Pro Ser Thr Asn Ile Phe Gly Arg Tyr  
1700 1705

<210> 104

<211> 1815

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 104

Met Lys Gln Ser Met Pro Ser Leu His Thr Lys Lys Ile Leu Phe Cys  
1 5 10 15

Tyr Phe His Leu Thr Asn Ser Trp Cys Leu Arg Arg Tyr Gly Leu Gly  
20 25 30

Lys Met Ala Ala Phe Gly Ile Leu Ser Tyr Glu His Arg Pro Leu Lys  
35 40 45

Arg Pro Arg Pro Arg Leu Gly Pro Pro Asp Val Tyr Pro Gln Asp Pro  
50 55 60

Lys Gln Lys Glu Asp Glu Leu Thr Ala Leu Asn Val Lys Gln Gly Phe  
65 70 75 80

ES 2 424 976 T3

Asn Asn Gln Pro Ala Val Ser Gly Asp Glu His Gly Ser Ala Lys Asn  
 85 90 95  
 Val Ser Phe Asn Pro Ala Lys Ile Ser Ser Asn Phe Ser Ser Ile Ile  
 100 105 110  
 Ala Glu Lys Leu Arg Cys Asn Thr Leu Pro Asp Thr Gly Arg Arg Lys  
 115 120 125  
 Pro Gln Val Asn Gln Lys Asp Asn Phe Trp Leu Val Thr Ala Arg Ser  
 130 135 140  
 Gln Ser Ala Ile Asn Thr Trp Phe Thr Asp Leu Ala Gly Thr Lys Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Gln Leu Ala Lys Lys Val Pro Ile Phe Ser Lys Lys Glu Glu  
 165 170 175  
 Val Phe Gly Tyr Leu Ala Lys Tyr Thr Val Pro Val Met Arg Ala Ala  
 180 185 190  
 Trp Leu Ile Lys Met Thr Cys Ala Tyr Tyr Ala Ala Ile Ser Glu Thr  
 195 200 205  
 Lys Val Lys Lys Arg His Val Asp Pro Phe Met Glu Trp Thr Gln Ile  
 210 215 220  
 Ile Thr Lys Tyr Leu Trp Glu Gln Leu Gln Lys Met Ala Glu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Arg Pro Gly Pro Ala Gly Ser Gly Gly Cys Gly Ser Thr Ile Gly Pro  
 245 250 255  
 Leu Pro His Asp Val Glu Val Ala Ile Arg Gln Trp Asp Tyr Thr Glu  
 260 265 270  
 Lys Leu Ala Met Phe Met Phe Gln Asp Gly Met Leu Asp Arg His Glu  
 275 280 285  
 Phe Leu Thr Trp Val Leu Glu Cys Phe Glu Lys Ile Arg Pro Gly Glu  
 290 295 300  
 Asp Glu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Arg Tyr Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Glu Phe Val Gln Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Arg Leu Ala Tyr Phe Cys  
 325 330 335  
 Thr Arg Arg Leu Ala Leu Gln Leu Asp Gly Val Ser Ser His Ser Ser  
 340 345 350

ES 2 424 976 T3

His Val Ile Ser Ala Gln Ser Thr Ser Thr Leu Pro Thr Thr Pro Ala  
 355 360 365  
 Pro Gln Pro Pro Thr Ser Ser Thr Pro Ser Thr Pro Phe Ser Asp Leu  
 370 375 380  
 Leu Met Cys Pro Gln His Arg Pro Leu Val Phe Gly Leu Ser Cys Ile  
 385 390 395 400  
 Leu Gln Thr Ile Leu Leu Cys Cys Pro Ser Ala Leu Val Trp His Tyr  
 405 410 415  
 Ser Leu Thr Asp Ser Arg Ile Lys Thr Gly Ser Pro Leu Asp His Leu  
 420 425 430  
 Pro Ile Ala Pro Ser Asn Leu Pro Met Pro Glu Gly Asn Ser Ala Phe  
 435 440 445  
 Thr Gln Gln Val Arg Ala Lys Leu Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Lys  
 450 455 460  
 Glu Arg Gly Gln Ala Val Glu Val Arg Trp Ser Phe Asp Lys Cys Gln  
 465 470 475 480  
 Glu Ala Thr Ala Gly Phe Thr Ile Gly Arg Val Leu His Thr Leu Glu  
 485 490 495  
 Val Leu Asp Ser His Ser Phe Glu Arg Ser Asp Phe Ser Asn Ser Leu  
 500 505 510  
 Asp Ser Leu Cys Asn Arg Ile Phe Gly Leu Gly Pro Ser Lys Asp Gly  
 515 520 525  
 His Glu Ile Ser Ser Asp Asp Ala Val Val Ser Leu Leu Cys Glu  
 530 535 540  
 Trp Ala Val Ser Cys Lys Arg Ser Gly Arg His Arg Ala Met Val Val  
 545 550 555 560  
 Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Gln Ala Glu Ile Glu Ala Glu Arg Cys  
 565 570 575  
 Gly Glu Ser Glu Ala Ala Asp Glu Lys Gly Ser Ile Ala Ser Gly Ser  
 580 585 590  
 Leu Ser Ala Pro Ser Ala Pro Ile Phe Gln Asp Val Leu Leu Gln Phe  
 595 600 605  
 Leu Asp Thr Gln Ala Pro Met Leu Thr Asp Pro Arg Ser Glu Ser Glu  
 610 615 620

ES 2 424 976 T3

Arg Val Glu Phe Phe Asn Leu Val Leu Leu Phe Cys Glu Leu Ile Arg  
 625 630 635 640  
 His Asp Val Phe Ser His Asn Met Tyr Thr Cys Thr Leu Ile Ser Arg  
 645 650  
 Gly Asp Leu Ala Phe Gly Ala Pro Gly Pro Arg Pro Pro Ser Pro Phe  
 660 665 670  
 Asp Asp Pro Ala Asp Asp Pro Glu His Lys Glu Ala Glu Gly Ser Ser  
 675 680 685  
 Ser Ser Lys Leu Glu Asp Pro Gly Leu Ser Glu Ser Met Asp Ile Asp  
 690 695 700  
 Pro Ser Ser Ser Val Leu Phe Glu Asp Met Glu Lys Pro Asp Phe Ser  
 705 710 715 720  
 Leu Phe Ser Pro Thr Met Pro Cys Glu Gly Lys Gly Ser Pro Ser Pro  
 725 730 735  
 Glu Lys Pro Asp Val Glu Lys Glu Val Lys Pro Pro Pro Lys Glu Lys  
 740 745 750  
 Ile Glu Gly Thr Leu Gly Val Leu Tyr Asp Gln Pro Arg His Val Gln  
 755 760 765  
 Tyr Ala Thr His Phe Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ser Cys Ser His Glu  
 770 775 780  
 Cys Asn Gln Arg Leu Val Val Leu Phe Gly Val Gly Lys Gln Arg Asp  
 785 790 795 800  
 Asp Ala Arg His Ala Ile Lys Lys Ile Thr Lys Asp Ile Leu Lys Val  
 805 810 815  
 Leu Asn Arg Lys Gly Thr Ala Glu Thr Asp Gln Leu Ala Pro Ile Val  
 820 825 830  
 Pro Leu Asn Pro Gly Asp Leu Thr Phe Leu Gly Gly Glu Asp Gly Gln  
 835 840 845  
 Lys Arg Arg Arg Asn Arg Pro Glu Ala Phe Pro Thr Ala Glu Asp Ile  
 850 855 860  
 Phe Ala Lys Phe Gln His Leu Ser His Tyr Asp Gln His Gln Val Thr  
 865 870 875 880  
 Ala Gln Val Ser Arg Asn Val Leu Glu Gln Ile Thr Ser Phe Ala Leu  
 885 890 895

ES 2 424 976 T3

Gly Met Ser Tyr His Leu Pro Leu Val Gln His Val Gln Phe Ile Phe  
 900 905 910

Asp Leu Met Glu Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu Ile Asp Phe Ala  
 915 920 925

Ile Gln Leu Leu Asn Glu Leu Ser Val Val Glu Ala Glu Leu Leu Leu  
 930 935 940

Lys Ser Ser Asp Leu Val Gly Ser Tyr Thr Thr Ser Leu Cys Leu Cys  
 945 950 955 960

Ile Val Ala Val Leu Arg His Tyr His Ala Cys Leu Ile Leu Asn Gln  
 965 970 975

Asp Gln Met Ala Gln Val Phe Glu Gly Leu Cys Gly Val Val Lys His  
 980 985 990

Gly Met Asn Arg Ser Asp Gly Ser Ser Ala Glu Arg Cys Ile Leu Ala  
 995 1000 1005

Tyr Leu Tyr Asp Leu Tyr Thr Ser Cys Ser His Leu Lys Asn Lys  
 1010 1015 1020

Phe Gly Glu Leu Phe Ser Asp Phe Cys Ser Lys Val Lys Asn Thr  
 1025 1030 1035

Ile Tyr Cys Asn Val Glu Pro Ser Glu Ser Asn Met Arg Trp Ala  
 1040 1045 1050

Pro Glu Phe Met Ile Asp Thr Leu Glu Asn Pro Ala Ala His Thr  
 1055 1060 1065

Phe Thr Tyr Thr Gly Leu Gly Lys Ser Leu Ser Glu Asn Pro Ala  
 1070 1075 1080

Asn Arg Tyr Ser Phe Val Cys Asn Ala Leu Met His Val Cys Val  
 1085 1090 1095

Gly His His Asp Pro Asp Arg Val Asn Asp Ile Ala Ile Leu Cys  
 1100 1105 1110

Ala Glu Leu Thr Gly Tyr Cys Lys Ser Leu Ser Ala Glu Trp Leu  
 1115 1120 1125

Gly Val Leu Lys Ala Leu Cys Cys Ser Ser Asn Asn Gly Thr Cys  
 1130 1135 1140

Gly Phe Asn Asp Leu Leu Cys Asn Val Asp Val Ser Asp Leu Ser  
 1145 1150 1155

ES 2 424 976 T3

Phe His Asp Ser Leu Ala Thr Phe Val Ala Ile Leu Ile Ala Arg  
 1160 1165 1170  
 Gln Cys Leu Leu Leu Glu Asp Leu Ile Arg Cys Ala Ala Ile Pro  
 1175 1180 1185  
 Ser Leu Leu Asn Ala Ala Cys Ser Glu Gln Asp Ser Glu Pro Gly  
 1190 1195 1200  
 Ala Arg Leu Thr Cys Arg Ile Leu Leu His Leu Phe Lys Thr Pro  
 1205 1210 1215  
 Gln Leu Asn Pro Cys Gln Ser Asp Gly Asn Lys Pro Thr Val Gly  
 1220 1225 1230  
 Ile Arg Ser Ser Cys Asp Arg His Leu Leu Ala Ala Ser Gln Asn  
 1235 1240 1245  
 Arg Ile Val Asp Gly Ala Val Phe Ala Val Leu Lys Ala Val Phe  
 1250 1255 1260  
 Val Leu Gly Asp Ala Glu Leu Lys Gly Ser Gly Phe Thr Val Thr  
 1265 1270 1275  
 Gly Gly Thr Glu Glu Leu Pro Glu Glu Glu Gly Gly Gly Ser  
 1280 1285 1290  
 Gly Gly Arg Arg Gln Gly Gly Arg Asn Ile Ser Val Glu Thr Ala  
 1295 1300 1305  
 Ser Leu Asp Val Tyr Ala Lys Tyr Val Leu Arg Ser Ile Cys Gln  
 1310 1315 1320  
 Gln Glu Trp Val Gly Glu Arg Cys Leu Lys Ser Leu Cys Glu Asp  
 1325 1330 1335  
 Ser Asn Asp Leu Gln Asp Pro Val Leu Ser Ser Ala Gln Ala Gln  
 1340 1345 1350  
 Arg Leu Met Gln Leu Ile Cys Tyr Pro His Arg Leu Leu Asp Asn  
 1355 1360 1365  
 Glu Asp Gly Glu Asn Pro Gln Arg Gln Arg Ile Lys Arg Ile Leu  
 1370 1375 1380  
 Gln Asn Leu Asp Gln Trp Thr Met Arg Gln Ser Ser Leu Glu Leu  
 1385 1390 1395  
 Gln Leu Met Ile Lys Gln Thr Pro Asn Asn Glu Met Asn Ser Leu  
 1400 1405 1410

ES 2 424 976 T3

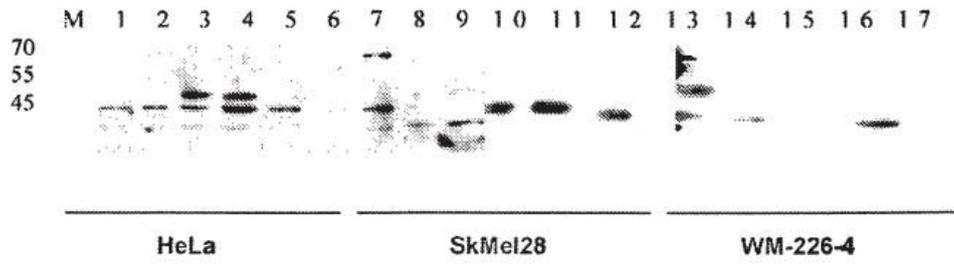
Leu Glu Asn Ile Ala Lys Ala Thr Ile Glu Val Phe Gln Arg Ser  
 1415 1420 1425  
 Ala Glu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ala Ser Asn Met Pro  
 1430 1435 1440  
 Ser Ser Ser Lys Thr Lys Pro Val Leu Ser Ser Leu Glu Arg Ser  
 1445 1450  
 Gly Val Trp Leu Val Ala Pro Leu Ile Ala Lys Leu Pro Thr Ser  
 1460 1465 1470  
 Val Gln Gly His Val Leu Lys Ala Ala Gly Glu Glu Leu Glu Lys  
 1475 1480  
 Gly Gln His Leu Gly Ser Ser Ser Arg Lys Glu Arg Asp Arg Gln  
 1490 1495 1500  
 Lys Gln Lys Ser Met Ser Leu Leu Ser Gln Gln Pro Phe Leu Ser  
 1505 1510 1515  
 Leu Val Leu Thr Cys Leu Lys Gly Gln Asp Glu Gln Arg Glu Gly  
 1520 1525 1530  
 Leu Leu Thr Ser Leu Tyr Ser Gln Val His Gln Ile Val Asn Asn  
 1535 1540 1545  
 Trp Arg Asp Asp Gln Tyr Leu Asp Asp Cys Lys Pro Lys Gln Leu  
 1550 1555 1560  
 Met His Glu Ala Leu Lys Leu Arg Leu Asn Leu Val Gly Gly Met  
 1565 1570 1575  
 Phe Asp Thr Val Gln Arg Ser Thr Gln Gln Thr Thr Glu Trp Ala  
 1580 1585 1590  
 Met Leu Leu Leu Glu Ile Ile Ile Ser Gly Thr Val Asp Met Gln  
 1595 1600 1605  
 Ser Asn Asn Glu Leu Phe Thr Thr Val Leu Asp Met Leu Ser Val  
 1610 1615 1620  
 Leu Ile Asn Gly Thr Leu Ala Ala Asp Met Ser Ser Ile Ser Gln  
 1625 1630 1635  
 Gly Ser Met Glu Glu Asn Lys Arg Ala Tyr Met Asn Leu Ala Lys  
 1640 1645 1650  
 Lys Leu Gln Lys Glu Leu Gly Glu Arg Gln Ser Asp Ser Leu Glu  
 1655 1660 1665

ES 2 424 976 T3

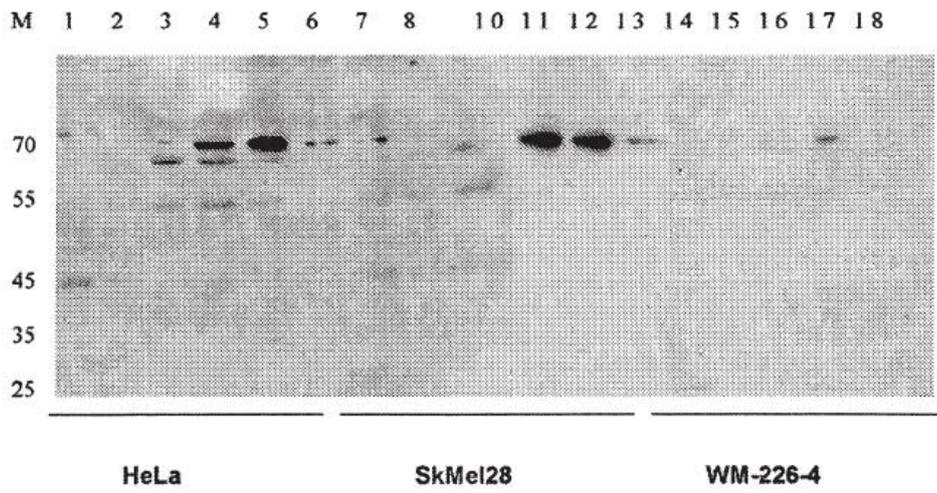
Lys Val Arg Gln Leu Leu Pro Leu Pro Lys Gln Thr Arg Asp Val  
 1670 1675 1680  
 Ile Thr Cys Glu Pro Gln Gly Ser Leu Ile Asp Thr Lys Gly Asn  
 1685 1690  
 Lys Ile Ala Gly Phe Asp Ser Ile Phe Lys Lys Glu Gly Leu Gln  
 1700 1705  
 Val Ser Thr Lys Gln Lys Ile Ser Pro Trp Asp Leu Phe Glu Gly  
 1715 1720 1725  
 Leu Lys Pro Ser Ala Pro Leu Ser Trp Gly Trp Phe Gly Thr Val  
 1730 1735 1740  
 Arg Val Asp Arg Arg Val Ala Arg Gly Glu Glu Gln Gln Arg Leu  
 1745 1750  
 Leu Leu Tyr His Thr His Leu Arg Pro Arg Pro Gln Ser Gln Pro  
 1760 1765 1770  
 Gln Phe Gln Arg Gln Gly Leu Gln Gln Thr Gln Gln Gln Gln Gln  
 1775 1780 1785  
 Thr Ala Ala Leu Val Arg Gln Leu Gln Gln Gln Leu Ser Asn Thr  
 1790 1800  
 Gln Pro Gln Pro Ser Thr Asn Ile Phe Gly Arg Tyr  
 1805 1810 1815

**REIVINDICACIONES**

1. Una isoforma de un co-regulador transcripcional, en la que la isoforma es:
- 5 a) una isoforma de MED 12 según se expone en SEC ID N.ºs: 100-104 o
- b) una secuencia enteramente complementaria de una cualquiera de las isoformas de a).
2. Una proteína de fusión que comprende una isoforma según la reivindicación 1 fusionada con un péptido heterólogo, en la que, opcionalmente, el péptido heterólogo se selecciona entre el grupo que consiste en las SEC ID N.º.: 1-3.
- 10 3. Un anticuerpo que se une específicamente a una isoforma según la reivindicación 1, en el que, opcionalmente, el anticuerpo está etiquetado con un marcador detectable.
- 15 4. Un polinucleótido que codifica una isoforma según la reivindicación 1 o un componente de la misma.
5. Una composición que comprende una molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 6. Un método para detectar cáncer en un espécimen de tejido que comprende detectar la presencia de una isoforma según la reivindicación 1 en el espécimen de tejido, en el que la presencia de isoforma es indicativa de cáncer.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la detección comprende poner en contacto el espécimen de tejido con una molécula detectable que se une específicamente a una isoforma según la reivindicación 1 y detectar la unión de la molécula detectable, en donde la unión de la molécula detectable es indicativa de cáncer.
- 25 8. Un método para monitorizar cáncer en un sujeto, comprendiendo el método:
- 30 (a) analizar un espécimen de tejido obtenido del sujeto para medir la cantidad de una isoforma según la reivindicación 1 presente en el espécimen; y
- (b) comparar la cantidad de isoforma presente en el espécimen con la cantidad de isoforma determinada en la situación anterior, en el que un cambio en la cantidad de la isoforma es indicativo de un cambio en el progreso del cáncer.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que el análisis comprende poner en contacto el espécimen con una molécula detectable que se une específicamente a una isoforma según la reivindicación 1, en el que un cambio en el nivel de unión de la molécula detectable es indicativo de un cambio en el progreso del cáncer.
- 40 10. El método de la reivindicación 8, en el que el análisis de la etapa (a) comprende determinar el porcentaje de células cancerosas en el espécimen de tejido a las que se une la isoforma y/o determinar la cantidad de unión de la molécula detectable en el espécimen de tejido.
- 45 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el cáncer es melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, hepatoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, gliomas, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma, condrosarcoma, cáncer de mama, cáncer ovárico, o teratocarcinoma.
- 50 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que la molécula que se une específicamente a la isoforma es un anticuerpo, en donde opcionalmente el anticuerpo se etiqueta con un marcador detectable.



**Figura 1**



**Figura 2**

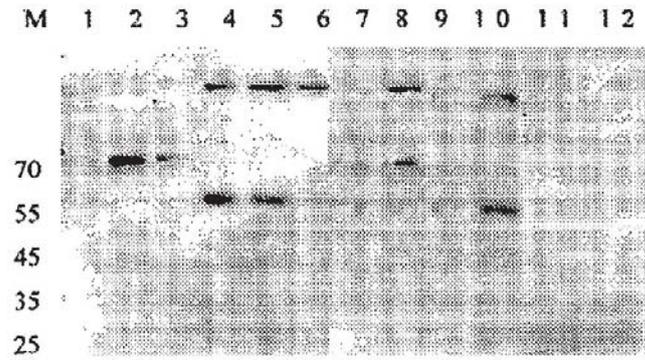


Figura 3

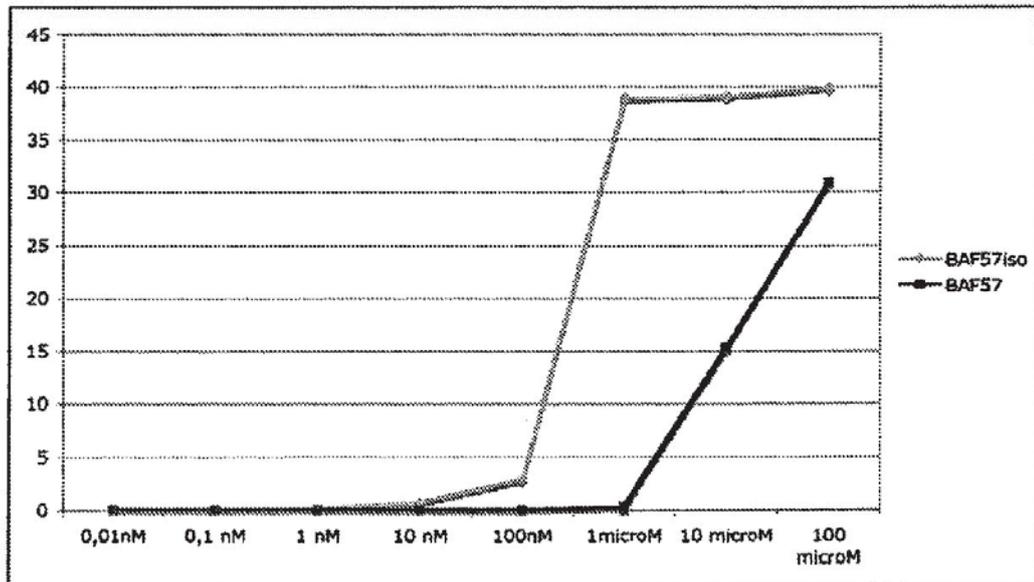


Figura 4